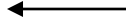


Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

PPAR- γ AGONİSTİ PİOGLİTAZONUN PERİVASKÜLER
ADİPOZ DOKU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

ERKAN CİVELEK

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ DENİZ KALELİ DURMAN

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMAKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2021

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Çalışmamın her aşamasında beni destekleyen, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Deniz Kaleli Durman'a,

Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. B. Sönmez Uydeş Doğan'a ve doktora ders sürecimde büyük katkıları olan Farmakoloji Anabilim Dalı'ndaki değerli hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Değerli görüşlerini esirgemeyen, her zaman yol göstericiliğinden yararlandığım sevgili hocalarım Prof. Dr. Sibel Özden ve Prof. Dr. Melih Altan'a,

Deneylerim süresince desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Gülsev Özen ve Dr. Öğr. Üyesi Ecem Fatma Karaman'a,

Deneysel çalışmalarımda büyük katkıları olan değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Zeynep Çelik ve Ecz. Ceren Karanfil'e,

Her zaman destekleyen, fikirlerini paylaşan, eşim Dr. Ecz. Dilek Öztürk'e,

Tüm hayatım boyunca destekleri ve sonsuz sevgileri ile her zaman yanımda olan annem Hatice Civelek'e babam Yılmaz Civelek'e, ağabeyim Kenan Civelek'e

Çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu-TÜBİTAK (Proje No: 217S209) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT.....	XVI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Enerji Homeostazı.....	4
2.1.1. İştahın Düzenlenmesi	5
2.1.2. Glukoz Metabolizması	7
2.1.2.1. İnsülin.....	8
2.1.2.2. Glukagon	12
2.1.2.3. Somatostatin	14
2.1.2.4. Glukozun Organizmaya Giriş Yolu ve İncretin Etki	14
2.2. T2DM.....	15
2.2.1. Epidemiyoloji.....	16
2.2.2. Etiyoloji ve Patojenez	16
2.2.2.1. İnsülin Direnci.....	17
2.2.2.2. İnsülin Sekresyonunda Bozulma	20
2.2.3. Tanı Kriterleri ve Tedavi.....	21
2.2.3.1. Non-Farmakolojik Tedavi	23
2.2.3.2. Farmakolojik Tedavi	24
2.2.4. T2DM Komplikasyonları	28
2.2.5. T2DM ile KVS Hastalıkların İlişkisi	29
2.2.5.1. Ateroskleroz	29

2.2.6. T2DM Deneyisel Hayvan Modelleri.....	32
2.2.6.1. HFD/STZ T2DM Modeli	33
2.3. Adipoz Doku.....	36
2.3.1. Beyaz Adipoz Doku	36
2.3.2. Kahverengi Adipoz Doku	37
2.3.3. Bej Adipoz Doku	37
2.3.4. Adipokinler	38
2.3.5. KVS Hastalıklarında Adipoz Dokunun Değişen Rolü.....	38
2.4. PVAD.....	43
2.4.1. PVAD Anatomisi ve Histolojisi.....	43
2.4.2. PVAD'ın Fizyolojik Önemi	44
2.4.3. Patolojik Koşullarda PVAD'ın Değişen Rolü	45
2.5. Pioglitazon	47
2.5.1. Tanımı	47
2.5.2. Farmakodinamik Özellikleri	47
2.5.3. Farmakokinetik Özellikleri	51
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
3.1. Gereç	52
3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler.....	52
3.1.2. Sıçan/Fare Yemleri	53
3.1.3. Kitler	55
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Çözelti ve Süspansiyonların Hazırlanışı	56
3.1.5. Ekipman ve Cihazlar	57
3.1.6. Programlar.....	58
3.2. In Vivo Hayvan Deneyleri	58
3.2.1. T2DM Oluşturulması	59
3.2.2. Pioglitazon Uygulaması	60
3.2.3. OGTT	60
3.2.4. Sakrifikasyon, Serum ve Doku Eldesi	60
3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	62
3.3.1. Total Kolesterol ve Trigliserit Ölçümü	62
3.3.2. Açlık Kan Glukoz Düzeyi Ölçümü	62
3.4. Vasküler Reaktivite Tayini	62

3.4.1. Dokuların Hazırlanışı.....	62
3.4.2. Deney Protokolü	62
3.5. PVAD’da Adipokin ve İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü	63
3.5.1. Protein İzolasyonu.....	63
3.5.2. Total Protein Miktar Tayini	63
3.5.3. PVAD’da Adiponektin Düzeyi Ölçümü	64
3.5.4. PVAD’da Leptin Düzeyi Ölçümü	65
3.5.5. PVAD’da TNF- α Düzeyi Ölçümü	65
3.5.6. PVAD’da IL-6 Düzeyi Ölçümü	66
3.6. PVAD’da Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	67
3.6.1. PVAD’dan RNA İzolasyonu.....	67
3.6.2. PVAD’dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	67
3.6.3. PVAD’da PPAR- γ , LC3-II, p62, Beclin, GRP78, ATF4, CHOP Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	69
3.7. Histopatolojik Değerlendirme.....	71
3.8. İstatistiksel Analiz.....	71
4. BULGULAR.....	74
4.1. Sıçanların Ağırlıklarının Ölçülmesi	74
4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi	76
4.2.1. Açlık Kan Glukozu Düzeyinin Değerlendirilmesi.....	76
4.2.2. OGTT	77
4.2.3. Total Kolesterol ve Trigliserit Düzeylerinin Değerlendirilmesi	78
4.3. Vasküler Reaktivite Tayini	79
4.3.1. Reseptör-Aracılı Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi	79
4.3.2. Reseptör-Aracılı Olmayan Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	82
4.3.3. Endotel-Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi.....	84
4.3.4. Düz Kas-Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi	86
4.4. PVAD Ağırlıklarının Ölçülmesi	88
4.5. PVAD’da Adipokin ve İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü	89
4.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini	89
4.5.2. Adiponektin Miktar Tayini	90
4.5.3. Leptin Miktar Tayini.....	91
4.5.4. TNF- α Miktar Tayini	92

4.5.5. IL-6 Miktar Tayini	93
4.6. PVAD’da Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	94
4.6.1. PVAD’da PPAR- γ Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi.....	94
4.6.2. PVAD’da Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	95
4.6.3. PVAD’da ER Stres ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	96
4.7. Histopatolojik Değerlendirme.....	98
5. TARTIŞMA	101
KAYNAKLAR	113
ETİK KURUL KARARI	155
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	156
ÖZGEÇMİŞ	157

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Normal Sıçan/Fare Yemi İçeriği	53
Tablo 3-2: Yüksek Yağlı Sıçan/Fare Yemi İçeriği	54
Tablo 3-3: Deney ve Kontrol Grupları	59
Tablo 3-4: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı (n=1 için gösterilmiştir).....	68
Tablo 3-5: Ekspresyon düzeyleri bakılan genlerin primerlerinin baz dizileri ve bağlanma sıcaklıkları.....	69
Tablo 3-6: RT-PCR protokolü	70
Tablo 3-7: İncelenen organ ve dokularda histopatolojik değerlendirme parametreleri..	71
Tablo 3-8: İncelenen organ ve dokularda histopatolojik değerlendirme skorları	71
Tablo 4-1: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15. Hafta) sıçan ağırlıkları.....	75
Tablo 4-2: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15.hafta) sıçanlarda 8 saatlik açlık sonrası ölçülen glukoz değerleri	76
Tablo 4-3: Deney süreci sonunda (15. Hafta) sıçanlarda ölçülen serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri	78
Tablo 4-4: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA Emaks ve pD2 değerleri.....	81
Tablo 4-5: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl Emaks ve pD2 değerleri.....	83
Tablo 4-6: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh Emaks ve pD2 değerleri.....	85
Tablo 4-7: İzole edilen torasik aortalara ait SNP Emaks ve pD2 değerleri	87
Tablo 4-8: PVAD ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması. (PVAD ağırlıkları aorta halkasının uzunluğuna göre normalize edilmiştir.).....	88
Tablo 4-9: PVAD’da ölçülen adiponektin ve leptin miktarının gruplar arası değişimi..	91
Tablo 4-10: PVAD’da ölçülen TNF- α ve IL-6 miktarının gruplar arası değişimi.	93
Tablo 4-11: PVAD’da gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.	96

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Enerji Homeostazında Rol Alan Hipotalamik Bölgeler ve Bu Bölgelerin Birbirleri ile İlişkileri- Waterson (2015)’ten değiştirilerek	7
Şekil 2-2: İnsülin Sinyalizasyonunun Temel Yolakları ve İnsülinin Etkileri- Van den Berghe 2004’ten değiştirilerek.....	11
Şekil 2-3: Erişkinlerde T2DM Taraması ve Tanılama.....	23
Şekil 2-4: Ateroskleroz Sürecinin Şematik Gösterimi- Zaid 2017’den değiştirilerek....	31
Şekil 2-5:Beyaz, Kahverengi ve Bej Adipoz Dokunun Işık Mikroskopu Görüntüsü- Bargut 2017’den alınmıştır.	36
Şekil 2-6: Farklı Damar Yataklarında PVAD’ın Şematik Gösterimi-Fitzgibbons 2014’ten Değiştirilerek.	44
Şekil 2-7: Pioglitazonun Yapısal Formülü.....	47
Şekil 3-1: 15 Haftalık <i>in vivo</i> hayvan deneyleri sürecinin şematik gösterimi.	61
Şekil 4-1: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15. Hafta) sıçan ağırlıkları.....	75
Şekil 4-2: Deney süreci sonunda (15.haftada) ölçülen 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri.....	76
Şekil 4-3: Deney süreci sonunda (15.hafta) sıçanlarda OGTT uygulaması ile elde edilen kan glukoz düzeylerinin zamana bağlı değişimi.	77
Şekil 4-4: Deney süreci sonunda sıçanlara uygulanan OGTT ile elde edilen AUC değerleri.	77
Şekil 4-5: Deney süreci sonunda (15. Hafta) alınan kandan ölçülen total kolesterol ve trigliserit düzeyleri.....	78
Şekil 4-6: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.....	80
Şekil 4-7: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA Emaks değerleri.	81
Şekil 4-8: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl (20-100 mM) konsantrasyon-yanıt eğrileri.	82
Şekil 4-9: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl Emaks değerleri.	83

Şekil 4-10: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.	84
Şekil 4-11: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh Emaks değerleri.	85
Şekil 4-12: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında SNP (10^{-9} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri	86
Şekil 4-13: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında SNP Emaks değerleri.	87
Şekil 4-14: PVAD ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması. (PVAD ağırlıkları aorta halkasının uzunluğuna göre normalize edilmiştir.).....	88
Şekil 4-15: BSA standart eğrisi ve 3. dereceden polinomial denklemi.	89
Şekil 4-16: PVAD'da ölçülen adiponektin miktarının gruplar arası değişimi.....	90
Şekil 4-17: PVAD'da ölçülen leptin miktarının gruplar arası değişimi.	91
Şekil 4-18: PVAD'da ölçülen TNF- α miktarının gruplar arası değişimi.	92
Şekil 4-19: PVAD'da ölçülen IL-6 miktarının gruplar arası değişimi.	93
Şekil 4-20: Torasik aortalardan elde edilen PVAD'da PPAR- γ ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.....	94
Şekil 4-21: PVAD'da Beclin, LC3-II ve p62 gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.....	95
Şekil 4-22: PVAD'da ATF4, CHOP ve GRP78 gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.	97
Şekil 4-23: Deney sürecinin sonunda (15. Hafta) sıçanlardan izole edilen (A) Kalp, (B) Karaciğer, (C) PVAD ve (D) Torasik aorta örneklerinde değerlendirilen hasar parametre skorlarının gruplar arası değişimi.	99
Şekil 4-24: Sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer, PVAD ve aortada kesitlerinin hemotoksilen&eosin boyaması sonrası ışık mikroskobu altındaki fotoğrafları.....	100

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ACh:** Asetilkolin
- ADRF:** Adiposit kaynaklı gevşetici faktör
- AGE:** İleri glikasyon son ürünleri
- AgRP:** Agouti-ilişkili protein
- AMPK:** Adenozin monofosfat kinaz
- ANOVA:** Varyans Analizi
- ApoE:** Apolipoprotein E
- ARC:** Arkuat çekirdek
- Asetil-CoA:** Asetil koenzim A
- AUC:** Eğri altında kalan alan
- BSA:** Sığır serum albümin
- cAMP:** Siklik adenozin monofosfat
- cDNA:** Komplementer DNA
- CT:** Eşik döngüsü
- DAG:** Diaçilgliserol
- DSÖ:** Dünya sağlık örgütü
- DPP-4:** Dipeptidil peptidaz 4
- ER:** Endoplazmik retikulum
- ET-1:** Endotelin-1
- FDA:** Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
- FFA:** Serbest yağ asidi
- GABA:** Gama amino bütirik asit
- GDM:** Gestasyonel diabetes mellitus
- GIP:** Glukoz-bağımlı insülinotropik polipeptid
- GİS:** Gastrointestinal sistem
- GLP-1:** Glukagon benzeri peptid-1
- GLUT:** Glukoz taşıyıcısı
- HbA1c:** Glikozillenmiş hemoglobin
- HFD/STZ:** Yüksek yağlı diyet/düşük doz streptozotosin
- HOMA-IR:** Homeostatik Model Değerlendirme-İnsülin Direnci
- IGF-1:** İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IL-6: İnterlökin-6
İ.P.: İntraperitoneal
IRS: İnsülin reseptör substrat
İ.V.: İntravenöz
K_{ATP}: ATP duyarlı potasyum kanalı
KCl: Potasyum Klorür
KVS: Kardiyovasküler sistem
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCP-1: Monosit kemotaktik protein-1
Mİ: Miyokard infarktüsü
NA: Noradrenalin
NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NPY: Nöropeptid Y
NO: Nitrik Oksit
OD: Optik dansite
OGTT: Oral glukoz tolerans testi
PAI-1: Plazminojen aktivatör inhibitörü-1
PKC: Protein kinaz C
POMC: Proopiomelanokortin
PPAR- γ : Peroksizom proliferatör aktive reseptör γ
PVAD: Perivasküler Adipoz Doku
SNP: Sodyum nitroprusiyat
SSS: Santral sinir sistemi
ROS: Reaktif oksijen türleri
T1DM: Tip 1 diabetes mellitus
T2DM: Tip 2 diabetes mellitus
TGF β : Transforme edici büyüme faktörü β
T_{maks}: Maksimum kan konsantrasyonuna ulaşma zamanı
TNF- α : Tümör nekrotizan faktör- α
UCP-1: Uncoupling protein 1
VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü
VKİ: Vücut kitle indeksi
VMH: Ventromediyal hipotalamus

ÖZET

Civelek E. (2021). PPAR- γ Agonisti Pioglitazonun Perivasküler Adipoz Doku Üzerine Olan Etkilerinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Perivasküler adipoz doku (PVAD), vasküler tonusun düzenlenmesi, vasküler inflamasyon ve ateroskleroz gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol almaktadır. Çalışmamızın amacı tip 2 diyabette (T2DM) PVAD'ın yapı ve fonksiyonunda meydana gelen değişimlerin değerlendirilmesi ve T2DM tedavisinde kullanılan PPAR- γ agonisti pioglitazonun bu tablodaki olası rolünün araştırılmasıdır. Çalışmamızda pioglitazon tedavisinin, T2DM gibi patolojik bir koşulda meydana gelen PVAD disfonksiyonu üzerine olan etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla Wistar albino erkek sıçanlarda HFD/STZ-T2DM modelinde 6 hafta süre ile 20mg/kg oral pioglitazon uygulamasının biyokimyasal parametreler (açlık glukoz, OGTT, total kolesterol ve trigliserit), PVAD miktarı, vasküler reaktivite, PVAD'da adipokin (adiponektin ve leptin), inflamatuvar sitokin (TNF- α ve IL-6) ve çeşitli gen ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca kalp, karaciğer, torasik aorta ve PVAD örnekleri histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir. Bulgularımız sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde pioglitazon uygulamasının kan glukozu ve lipid profilinde olumlu etkiler gösterdiği, PVAD miktarını arttırdığı, bununla birlikte PVAD'ın vasküler reaktivite üzerindeki antikontraktıl etkisini anlamlı bir düzeyde değiştirmedeği, endotel-aracılı veya endotel-aracısız gevşeme yanıtları üzerinde bir etkisinin olmadığı, adiponektin, leptin ve IL-6 düzeylerini değiştirmezken TNF- α düzeylerini artırdığını göstermektedir. Ayrıca diyabet grubunda PVAD dokusunda PPAR- γ ekspresyon düzeylerini belirgin düzeyde artırmıştır. Buna ilaveten pioglitazon diyabet grubunda otofaji ile ilişkili Beclin ve LC3-II gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma oluşturmuştur. Histopatolojik bulgular varolan klinik çalışmaları destekler niteliktedir. Ayrıca pioglitazon uygulaması PVAD'da adiposit büyüklüğünü artırmıştır. Bulgularımızın pioglitazonun kardiyovasküler sistem üzerine olan etkilerinin anlaşılmasında farklı bir boyut kazandıracağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Perivasküler adipoz doku, tip 2 diyabet, pioglitazon, PPAR γ , vasküler reaktivite

Bu çalışma, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu TÜBİTAK (217S209), tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Civelek E. (2021). Investigation of Effects of PPAR- γ Agonist Pioglitazone on Perivascular Adipose Tissue. İstanbul University, Institute of Health Science, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology. PhD Thesis. İstanbul.

Perivascular adipose tissue (PVAT) plays a role in many physiological and pathological processes, such as regulation of vascular tone, vascular inflammation and atherosclerosis. The aim of our study is to evaluate the changes in the structure and function of PVAT in type 2 diabetes (T2DM) and to investigate the possible role of PPAR γ agonist pioglitazone. In our study, it was aimed to examine the effect of pioglitazone treatment on PVAT dysfunction that occurs in a pathological condition such as T2DM. For this purpose, the effects of 20mg/kg oral pioglitazone administration for 6 weeks in HFD/STZ T2DM model in Wistar albino male rats on biochemical parameters (fasting glucose, OGTT, total cholesterol and triglyceride), amount of PVAT, vascular reactivity, adipokine (adiponectin and leptin) and inflammatory cytokine (TNF- α and IL-6) levels, various gene expression levels in PVAT were evaluated. In addition, heart, liver, thoracic aorta and PVAT samples were evaluated histopathologically. Our findings showed that pioglitazone administration showed positive effects on blood glucose and lipid profile in the HFD/STZ T2DM model in rats, increased the amount of PVAT, however, it did not significantly change the anticontractile effect of PVAT on vascular reactivity, and had no effect on endothelium-mediated or non-endothelium-mediated relaxation responses. Pioglitazone administration increased TNF- α levels while not changing adiponectin, leptin and IL-6 levels. It also significantly increased PPAR- γ expression levels in PVAT tissue in the diabetes group. In addition, pioglitazone caused a significant decrease in autophagy-related Beclin and LC3-II gene expression levels in the diabetes group. Histopathological findings support existing clinical studies. In addition, pioglitazone administration increased adipocyte size in PVAT. We think that our findings will add a different dimension to the understanding of the effects of pioglitazone on the cardiovascular system.

Keywords: Perivascular adipose tissue, type 2 diabetes, pioglitazone, PPAR γ , vascular reactivity

This study was supported by the Scientific and Technological Research Council of Turkey TUBITAK (217S209).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Perivasküler adipoz doku (PVAD), serebral damarlar haricinde tüm damarların etrafında bulunan lokal adipoz katmanıdır. PVAD, vücutta toplam yağ depolarının yaklaşık olarak %3'lük bir kısmını oluşturmaktadır. Sempatik sinir sistem ile innerve edilen PVAD'ın hücre kompozisyonu temel olarak adipositler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve mononükleer hücrelerden oluşmaktadır. Yapıda ayrıca kan damarları, kolajen ve elastik lifler de bulunmaktadır^{1,2}. Yapılan çalışmalar, ilk zamanlar damara mekanik destek sağlamak dışında bir rolü olmadığı düşünülen PVAD'ın metabolik olarak aktif olduğunu ve yapısından birçok biyoaktif maddenin salıverildiğini göstermiştir. Bu maddeler içerisinde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α), leptin, adiponektin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), interlekin-6 (IL-6), resistin ve anjiyotensinojen sayılabilir^{3,4}. Bu açıdan PVAD, otokrin, parakrin ve endokrin özelliği olan bir organ olarak değerlendirilmektedir.

PVAD'ın kardiyovasküler sistem (KVS) üzerine olan etkileri özellikle son yıllarda ilgi çekici bir araştırma konusu haline gelmiştir. PVAD'ın damar düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerine olan etkilerini gösteren çalışmalar mevcuttur^{5,6}. Çalışmalar ayrıca PVAD'ın fizyolojik koşullarda damar düz kas tonusu üzerinde gevşetici yönde etkisinin olduğunu göstermektedir. Konu ile ilgili yapılmış olan ilk çalışmada sıçan aortasında PVAD'ın, damar düz kasının noradrenaline (NA) olan duyarlılığı azalttığı tespit edilmiştir⁷. PVAD'ın sıçan aortasında NA'nın yanı sıra serotonin, fenilefrin ve anjiyotensinin kastırıcı yanıtlarını azalttığı bulunmuştur⁸. PVAD'ın damar düz kası üzerine gevşetici rolü insan damarları üzerinde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. İnsan internal mammaryal arterinde (IMA) PVAD varlığında fenilefrin, noradrenalin (NA) ve tromboksan A2 analogu U46619'un kastırıcı yanıtlarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir^{9,10}.

PVAD'ın vasküler tonus üzerine olan gevşetici etkisinin çeşitli patolojik koşullarda ortadan kalktığı öne sürülmektedir. Hipertansif sıçanlarda¹¹, tip 1 diyabetik (T1DM) sıçanlarda¹², obezitenin diyet ile indüklendiği farelerde¹³ ve metabolik sendromlu farelerde¹⁴ PVAD'ın damar gevşetici etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu patolojik durumlara ilaveten insülin direnci ve yüksek glukoz düzeyinin bir arada

gözleendiği tip 2 diyabette (T2DM) de PVAD disfonksiyonu olduğu db/db diyabetik farelerin mezenterik arterlerinde¹⁵ ve Goto-kakizaki T2DM’li sıçanların aortalarında¹⁶ gösterilmiştir. Bahsi geçen patolojik koşullarda gözlenen PVAD disfonksiyonunun mekanizması açık olmamakla birlikte bu mekanizma üzerine inflamasyonun rolüne işaret eden çalışmalar mevcuttur. Fare mezenterik arterinde yapılan bir *in vitro* çalışmada gevşetici etkideki azalmadan makrofaj infiltrasyonun sorumlu olduğu öne sürülmektedir. Buna göre makrofajlardan salınan TNF- α , PVAD’dan salınan vazodilatör maddelerin salınımını azaltmaktadır¹⁷. Yapılan bir diğer çalışmada bununla uyumlu olarak inflamatuvar koşullarda PVAD’dan TNF- α salınımındaki artışın adiponektin salınımındaki azalmayla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir¹⁸. Yapılan çalışmalar T2DM ve ilişkili patolojilerde inflamasyona ilaveten otofaji ve endoplazmik retikulum (ER) stresinin adipoz dokuda arttığına işaret etmektedir. T2DM’li hastaların omental adipoz dokularında otofajinin ve ER stresin arttığı gösterilmiştir¹⁹. Obez T2DM’li hastaların subkütan adipoz dokularından (SAD) elde edilen adipositlerde de otofajinin aktive olduğu bildirilmiştir²⁰. Yapılan diğer bir klinik çalışmada ise T2DM koşullarında otofaji aktivasyonunun incelenen adipoz doku katmanının çeşidine göre farklılık gösterebildiği öne sürülmektedir²¹. Literatürde T2DM koşulunda PVAD’da otofajinin rolünün incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte PVAD’da ER stresin incelendiği tek çalışmada ise diyabetik db/db farenin aortik PVAD’ında ER stresin arttığı gösterilmiştir²².

Özet olarak eldeki kanıtlar, PVAD’ın damar üzerine olan etkilerinin diyabetik koşulda patolojik bir karakter kazandığına işaret etmektedir. Diyabetin çeşitli KVS hastalıklarının (hipertansiyon, kalp yetmezliği, ateroskleroz) patojenezinde ve patofizyolojisinde yer aldığı göz önüne alındığında, bu hastalığın patofizyolojisinde PVAD’ın değişen rolünün, bu değişikliğin mekanizmasının ve sonuçlarının ortaya konması, bu hastalıklar ile KVS hastalıklarının ilişkisinin anlaşılması ve yeni tedavi seçenekleri oluşturulması bakımından önem taşımaktadır.

Pioglitazon, peroksizom proliferatör aktive reseptör γ (PPAR- γ) agonisti olan ve oral yoldan kullanılan antidiyabetik bir ilaçtır. Literatürde pioglitazonun KVS’de olumlu etkileri olduğunu gösteren hem prelinik hem de klinik birçok çalışma mevcuttur. Pioglitazon uygulamasının sıçanlarda anjiyotensin-II ile indüklenen hipertansiyonu önlediği ve sol ventrikül hipertrofisini azalttığı gözlenmiştir²³. Yine

benzer şekilde, sıçan iskemi reperfüzyon modelinde pioglitazon uygulamasının infarkt alanı azalttığı bildirilmiştir²⁴. Diyabetik hastalar üzerinde yapılan klinik çalışmalar pioglitazonun antihipertansif etkinliğinin bulunduğunu göstermektedir^{25,26}. Pioglitazonun KVS üzerine olan etkilerinin incelendiği bir meta-analiz, pioglitazonun insülin direnci olan, prediyabetik ve diyabetik tüm hasta gruplarında ölümcül olmayan inme, ölümcül olmayan miyokard infarktüsü ve kardiyovasküler ölüm riskini azalttığını fakat kemik kırığı, ödem, kilo artışı, kalp yetmezliği riskini artırdığını göstermiştir²⁷.

Pioglitazonun KVS üzerine olan olumlu etkilerinden antiinflamatuvar ve oksidatif stresi azaltıcı etkinliği kısmen sorumlu görülmekle birlikte²⁸ bu olumlu etkilerin mekanizması yeterince açık değildir. Bu açıdan, pioglitazonun olumlu etkilerinde diyabette bozulan PVAD etkinliği üzerine olan rolünün incelenmesi önem taşımaktadır.

Tez projemizde, pioglitazonun T2DM’de PVAD üzerine olası etkilerinin ve bu etkilerin KVS açısından öneminin ortaya konması hedeflenmiştir. Bu amaçla Wistar albino sıçanlarda yüksek yağlı diyet/düşük doz streptozotosin (HFD/STZ) ile indüklenen T2DM modeli kullanılmıştır. T2DM sıçanlara altı hafta süre ile oral 20mg/kg pioglitazon uygulamasının biyokimyasal parametreler, vasküler reaktivite, PVAD miktarı, PVAD’daki adipokin ve inflamatuvar sitokin düzeyleri ile PPAR- γ , otofaji, ER stres belirteci gen ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkisi ölçülmüştür. Ayrıca deney sonunda sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer torasik aorta ve PVAD örnekleri histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz bulguların T2DM koşulunda PVAD’ın değişen rolünün ve pioglitazon uygulamasının kardiyovasküler sistem üzerine olan etkilerinin mekanizmasının aydınlatılması açısından önem arz ettiğini düşünmekteyiz. T2DM ile KVS hastalıkları ilişkisi bağlamında T2DM’nin ve pioglitazonun PVAD üzerine olan etkisinin değerlendirilmesinin T2DM tedavisinde oral antidiyabetik ilaç seçimi açısından bağımsız bir parametre olma potansiyeline sahip olduğu tarafımızca değerlendirilmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enerji Homeostazı

Modern deneysel fizyolojinin kurucusu kabul edilen Fransız hekim Claude Bernard yaklaşık 150 yıl önce “iç ortam” (*milieu intérieur*) konseptini ilk kez gündeme getirmiş ve bu yeni konsept ile birlikte “homeostasis” olarak ifade edilen yaşamsal faaliyetlerin sürdürülebilmesi için iç ortamın dengede ve stabil olması gerektiği yaklaşımı ortaya çıkmıştır. İç ortamın dengesinin sağlanması organizmadaki birçok farklı organ ve sistemin koordineli bir şekilde çalışması ile mümkündür²⁹.

Organizmada yaşamsal faaliyetlerin yerine getirilebilmesi için enerji üretimi ve kullanımı zorunludur. Enerji kaynakları organizmaya karbonhidrat, yağ ve protein formunda, besinler yoluyla alınır. Absorpsiyon sonrası karbonhidratların monomeri olan glukoz molekülü hücre içine özel taşıyıcısı ile alınır ve ardından sitoplazmada glikoliz, mitokondride sitrik asit döngüsü ve elektron taşıma zinciri ile yapısındaki enerji açığa çıkarılarak bu enerji ATP formunda depolanır. Organizma gerek duyulan enerjiyi temel olarak bu yol ile üretmektedir. Ayrıca hücreler gliserolü ve aminoasitleri glukozla dönüştürerek bahsi geçen karbonhidrat metabolizması sürecinde kullanabilir. Glukoz dışı kaynaklardan glukoz sentezlenmesi süreci glukoneojenez olarak isimlendirilmektedir. Bunun dışında yağ ve protein metabolizması ürünleri de doğrudan enerji üretim sürecinde kullanılabilir. Vücutta yağın depo şekli olan trigliserit 3 adet serbest yağ asidi ile 1 adet gliserolden oluşmaktadır. Serbest yağ asitleri β -oksidasyon ile yıkılarak asetil koenzim A (asetil-CoA) sentezlenir. Asetil-CoA sitrik asit döngüsüne girerek enerji üretim sürecine dahil olmaktadır. Gliserol ise gliseraldehit-3-fosfat’a dönüştürülerek glikoliz sürecine katılabilir. Lösin, izolösin, lizin, fenilalanin, triptofan ve tirozin aminoasitleri α -ketoglutarat’a dönüşerek sitrik asit döngüsünde yer alırlar³⁰.

Hücre ve organizma düzeyinde enerjinin üretimi ve enerji kaynaklarının depolanması sürekli bir denge halindedir. Enerjinin fazla miktarda olması sonucunda enerji kaynaklarının enerji üretimi için kullanılması yerine depolanması eğilimi artar. Glukoz glukojen formunda depolanır ve bu olay glukojenez olarak isimlendirilmektedir. Tüm hücreler belirli düzeyde glukojen sentezleme kapasitesine sahip olmakla birlikte organizmada ana glukojen deposu karaciğerdir. Organizmada enerji fazlası esas olarak yağ (adipoz) dokuda trigliserit formunda depolanmaktadır. Enerji homeostazının

sağlanması için hem hücresel hem de organizma düzeyinde enerji üretimi ve enerji kaynaklarının depolanması sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Besin alımının (iştah) ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesi bu kontrolün en önemli iki basamağını oluşturmaktadır.

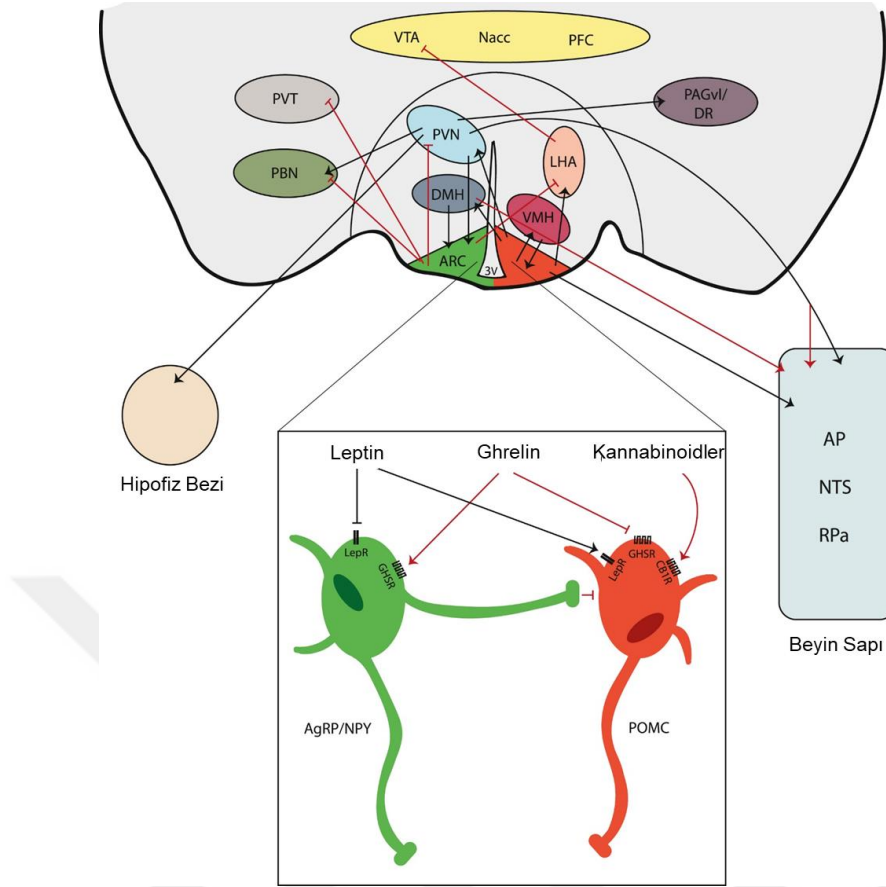
2.1.1. İştahın Düzenlenmesi

Sürekli değişen çevresel koşullara uyum sağlayabilmek adına organizmanın enerji homeostazının kontrolü enerjinin üretimi, kullanımı ve depolanmasının sıkı bir şekilde regüle edilmesini gerektirmektedir. Enerji kaynaklarının vücuda alımının sağlanması iştahın ve doygunluğun kontrolü ile mümkün olmaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan ilk çalışmalar iştahın düzenlenmesinde sorumlu beyin bölgesinin hipotalamus olduğunu göstermektedir. Sıçanlarda ventromediyal hipotalamus (VMH) lezyonlarının besin alımında artışa neden olduğu³¹, ventrolateral hipotalamus lezyonlarının ise tam tersine besin alımında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir³². Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar iştahın düzenlenmesinden sorumlu intrahipotalamik yollar ve sinyal iletimine aracılık eden nörotransmitterler üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar ile arkuat çekirdekte (ARC) nöropeptid Y'nin (NPY) ve proopiomelanokortinin (POMC) iştahın düzenlenmesinde baskın bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Buna göre fare hipotalamusunda NPY ve agouti-ilişkili protein (AgRP) eksprese eden nöronların ablasyonunun hipofaji ve kilo kaybına neden olduğu tespit edilmiştir³³. POMC ve kokain-amfetamin regüle transkript eksprese eden hücrelerin kaybı ise bunun tam tersi yönde etki göstermektedir^{34,35}. Bu çalışmalar NPY/AgRP nöronlarının iştah arttırıcı (oroksijenik), POMC nöronlarının ise iştah azaltıcı (anoroksijenik) karakterini ortaya koymaktadır. ARC aynı zamanda anatomik olarak 3. ventriküle yakın olması sebebiyle dolaşımdaki iştahı modüle eden bileşenlerden de etkilenmektedir. Örneğin adipoz dokudan salınan ve tokluk sinyali olarak işlev gören leptinin NPY/AgRP nöronlarının aktivitesini inhibe ederek, POMC nöronlarının ise aktivitesini stimüle ederek iştahı baskıladığı ve enerji tüketimini artırdığı gösterilmiştir³⁶. Dolaşımdaki bir diğer hormon olan ghrelin ise leptinin aksine NPY/AgRP nöronlarının aktivitesini uyarmakta³⁷, POMC nöronlarınınkini ise azaltmakta³⁸ ve bu yolla iştahın artmasına neden olmaktadır³⁹. Bunların yanı sıra AgRP/NPY nöronlarının doğrudan POMC nöronlarını inhibe ederek iştahın düzenlenmesine katkıda bulunduğu bildirilmiştir⁴⁰.

ARC dışında, ARC'nin diğer hipotalamik bölgeler ile bağlantılarının da iştahın düzenlenmesinde rolü olduğu bilinmektedir. Lateral hipotalamik alan ve paraventriküler çekirdek⁴¹, dorsomedial hipotalamus⁴², VMH⁴³ bahsi geçen hipotalamik bölgelerdendir. Bunların dışında beyin sapı, hipofiz bezi, mezolimbik ödül sistemi gibi ektrahipotalamik yapı ve sistemlerin de enerji homeostazının düzenlenmesinde rolü olduğu öne sürülmektedir. Beyin sapının hipotalamustan aldığı sinyaller vasıtasıyla hem iştah⁴⁴ hem de enerji tüketimini etkilediği öne sürülmüştür⁴⁵. Hipofiz bezinden salgılanan tiroid stimüle edici hormon (TSH) enerji tüketimini regülasyonunda rolü olduğu bilinen bir hormondur. Mezolimbik ödül sistemi hedonik besin alımının kontrol edildiği beyin bölgesidir ve kısmen hipotalamustan gelen sinyaller vasıtasıyla bu işlevini yerine getirdiği öne sürülmektedir⁴⁶. Enerji homeostazında rol alan hipotalamik bölgeler ve bu bölgelerin birbirleri ile ilişkileri Şekil 2-1'de şematik olarak gösterilmiştir.

Hipotalamus dışında hipotalamustan bağımsız olarak enerji homeostazına katkıda bulunan beyin yapıları mevcuttur. Bu yapılar arasında arka beyin, prefrontal korteks, parabrakiyal çekirdek, amigdala, periferik sinir sistemi, vagus siniri, mezolimbik ödül sistemi sayılabilir⁴⁷.

İştahın ve besin alımının kontrolü periferik uyaranlar ile santral sinir sistemi (SSS) arasındaki etkileşim sonucunda gerçekleşmektedir. Periferik uyaranlardan insülin, leptin ve adiponektinin enerji homeostazındaki rolleri iyi bilinmektedir. Bunlar dışında gastrointestinal sistemden (GİS) salınan ghrelin, kolesistokinin, glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) ve peptid YY; karaciğerden salınan fibroblast büyüme faktörü 21, IGF-1, seks hormonu bağlayan globülin; kemik dokudan salınan osteokalsin ve osteopontin, böbreklerden salınan renin de enerji homeostazında görev almaktadır⁴⁸.



Şekil 2-1: Enerji Homeostazında Rol Alan Hipotalamik Bölgeler ve Bu Bölgelerin Birbirleri ile İlişkileri- Waterson (2015)’ten değiştirilerek

3V, üçüncü ventrikül; AgRP, agouti-ilişkili protein; AP, area postrema; ARC, arkuat çekirdek; CB1R, kannabinoid reseptör 1; DMH, dorsomedyal hipotalamus; GHSR, büyüme hormonu salgılatıcı reseptör; LepR, leptin reseptörü; LHA, lateral hipotalamik alan; Nacc, nükleus akumbens; NPY, nöropeptid Y; NTS, nükleus traktus solitarius; PAGvl/DR, ventrolateral periakvaduktal gri madde ve dorsal rafe kompleksi; PBN, parabrakiyal çekirdek; PFC, prefrontal korteks; POMC, proopiomelanokortin; PVN, paraventriküler çekirdek; PVT, paraventriküler talamus; RPa, rafe pallidus; VMH, ventromedyal hipotalamus; VTA, ventral tegmental alan.

2.1.2. Glukoz Metabolizması

Organizmanın temel, beyin ve sinir dokusunun ise tek enerji kaynağının glukoz olması hem postabsorptif (8-12 saatlik gece açlığı) hem de öğün sonrası (yemekten 1-4 saat sonrası) kan glukoz düzeylerinin belirli bir aralıkta tutulmasını gerektirmektedir. Postabsorptif durumda glukozun ~%50’si insülininden bağımsız şekilde beyinde, ~25’i yine insülininden bağımsız olarak splanknik bölgede (karaciğer ve barsak), ~25’lik kısım ise insüline bağımlı şekilde kas dokuda ve kısmen adipoz dokuda kullanılmaktadır. Bazal koşulda, kullanılan miktarda glukoz karaciğerde (%85) ve böbrekte (%15) üretilerek kana verilir. Glukozun %50’si glukoneojenez %50’si ise glikojenoliz yoluyla

üretilmektedir⁴⁹. Öğün sonrasında ise glukoz absorpsiyonunu takiben kan glukoz düzeyleri yükselir ve bu yükseliş pankreasta Langerhans adacıklarındaki β -hücrelerden insülin salınmasına neden olur. Oluşan hiperglisemi ve hiperinsülinemi neticesinde endojen glukoz üretimi baskılanır ve periferdeki dokulara glukoz geçişi artar. Sonuçta kan glukoz düzeyi tekrar normal seviyelere dönmüş olur. Glukoz metabolizması ayrıca yağ metabolizması ile de yakın ilişkilidir. İnsülin antilipolitik etkinliğe sahiptir ve plazma serbest yağ asidi (FFA) düzeylerinin düşmesine neden olmaktadır⁵⁰. FFA düzeylerindeki azalma ise hem karaciğer glukoz üretimini baskılamakta hem de kas dokusunun glukoz alımını artırmaktadır⁵¹. Genel anlamda glukoz metabolizmasının düzenlenmesi pankreas hormonları (insülin, glukagon ve somatostatin), yağ metabolizması ve glukozun organizmaya giriş yolu tarafından belirlenmektedir.

2.1.2.1. İnsülin

İnsülin 1920'li yılların başlarında pankreas ekstratlarının diyabetik hayvanlarda kan glukoz düzeyini belirgin şekilde düşürdüğünün tespit edilmesi sonucunda keşfedilmiştir. Bu keşif Banting ve Macleod isimli araştırmacılara 1923 yılında Nobel Tıp veya Fizyoloji Ödülü'nü kazandırmıştır⁵². Bu büyük keşfin ardından insülinin biyosentezi, yapısı ve etki mekanizması ile ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

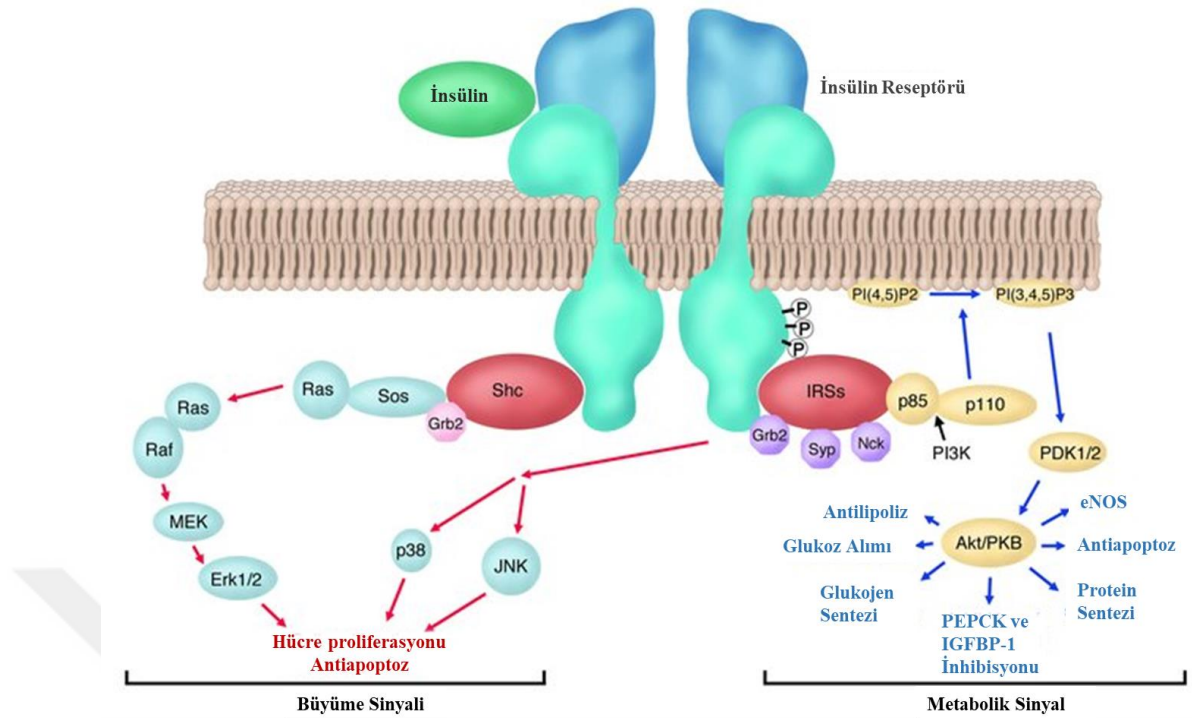
İnsülin heterodimerik polipeptid yapıda bir hormondur. Birbirlerine 2 adet disülfid bağı ile sistein aminoasitlerinden bağlanmış olan α ve β polipeptid zincirlerinden oluşmaktadır. α zincir, karboksil terminal ucu (C-terminal) taşımakta ve 21 aminoasitten oluşmaktadır. β zincirde ise 30 aminoasit bulunmakta ve zincir, amino terminal ucu (N-terminal) ile sonlanmaktadır. İnsülin, pankreasın Langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerinde insülin mRNA'sının transkripsiyonu neticesinde, yaklaşık 12.000 Dalton büyüklüğünde preproinsülin ismi verilen insülin prekürsöründen üretilmektedir. Bu molekül α ve β zincirlerinin yanı sıra bu iki zinciri birbirine bağlayan C-peptid ile preproinsülinin endoplazmik retikulumda işlenmesine olanak sağlayan ve yapıya N-terminalden bağlı 24 aminoasitlik sinyal peptidden oluşmaktadır. Preproinsülin ER'de üretildikten sonra yapısındaki sinyal peptid kısmı vasıtasıyla ER lümenine translokasyonu gerçekleşir. Burada sinyal peptidaz vasıtasıyla sinyal peptid kısmı kesilir. Oluşan bu yeni yapı proinsülin olarak isimlendirilmektedir. Proinsülinin ER sisternasında katlanma ve disülfid bağı oluşturma işlemleri gerçekleşir ve bunun sonucunda protein, insülinin direkt prekürsörü olan tersiyer yapısına kavuşmuş olur.

Son aşamada ise golgi aygıtında peptidazlar vasıtasıyla kesilir ardından insülin ve C-peptid olarak paketlenir. İnsülin sekretuvar granüllerde genellikle yapıda iki adet Zn^{+} iyonunun yer aldığı heksamer yapıda bulunmaktadır⁵³.

Kandaki glukoz düzeyi insülin sekresyonu için temel uyarıcı faktör konumundadır. Pankreastaki β hücreler kan glukozu düzeyini algılama ve uygun miktarda insülin salgılayarak kan glukoz düzeyini belirli bir aralıkta tutma görevini yerine getirmektedirler. Bu görevle uyumlu bir şekilde Langerhans adacıklarında kümelenmiş olan β hücreler yoğun bir kapiller ağ ile çevrili durumdadır. Bu kapillerler madde geçişini kolaylaştıracak şekilde porlu yapıya sahiptir⁵⁴. Dolaşımdan gelen glukoz, glukoz taşıyıcısı (GLUT2) yoluyla hücre içine alındıktan sonra glikoliz, sitrik asit döngüsü ve elektron taşıma zinciri aşamalarından geçer ve ATP sentezi için kullanılır. Artan hücre içi ATP/ADP (adenozin difosfat) oranı ATP duyarlı potasyum kanallarının (K_{ATP}) kapanmasına ve sonuç olarak β hücrelerin depolarize olmasına neden olur. Depolarizasyon neticesinde voltaj bağımlı kalsiyum kanalları açılır ve hücre içine kalsiyum girişi gerçekleşir. Hücre içinde artan kalsiyum konsantrasyonu membranda bulunan fosfolipaz C enzimini aktive eder. Fosfolipaz C aktivasyonu membran lipidlerinden fosfatidilinositid-4,5-bifosfatı hidrolize ederek inositol trifosfat ve diaçilgliserol (DAG) üretilmesine neden olur. Artan DAG konsantrasyonu ile protein kinaz C (PKC) enzimi aktifleşir. PKC hücre içi aktin ağının reorganizasyonu yoluyla insülin içeren veziküllerin membrana doğru hareket etmesine neden olur. PKC'nin insülin sekresyonundaki bir diğer rolü ise hücre içinde ekzositozdan sorumlu munc18, SNAP25, sinaptotagmin membran proteinlerini aktifleştirmesidir. Sonuç olarak insülin içeren veziküllerin membrana füzyonu sonrasında ekzositoz gerçekleşir ve insülin salınmış olur⁵⁵. PKC yolağına ek olarak reseptör-aracılı siklik adenosin monofosfat (cAMP) bağımlı yolların da insülin sekresyonunda rolü bulunmaktadır⁵⁶.

Hücre içi glukoz düzeylerinin yükselmesinin dışında çeşitli hormon, lipid ve nörotransmitterlerin de insülin sekresyonu üzerinde uyarıcı veya inhibe edici yönde etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Buna göre GLP-1⁵⁷, glukoz-bağımlı insülinotropik polipeptid (GIP)⁵⁷, vazoaftif intestinal peptid (VIP)⁵⁸, hipofiz adenilat siklaz-aktive polipeptid⁵⁸, lizofosfatidilkolin⁵⁹, oleoletanolamid⁶⁰, asetilkolin (ACh)⁶¹ insülin sekresyonunu stimüle ederken somatostatin⁶², NA⁶³, galanin⁶³, prostaglandinler⁶³, ghrelin⁶⁴ insülin sekresyonunu inhibe etmektedir.

İnsülin hücrelerdeki etkisini kendi spesifik reseptörü üzerinden göstermektedir. İnsülin reseptörü yapı olarak ekstraselüler yerleşim gösteren 2 adet α alt ünite ile ekstraselüler, transmembran ve sitozolik olarak yerleşmiş 2 adet β alt üniteden oluşmaktadır. Her bir α ve β alt üniteler birbirlerine disülfid bağları ile bağlanarak dimerik bir yapı oluşturmaktadır. A alt ünitesi 723 aminoasitten oluşmaktadır ve IGF-1 ve epidermal büyüme faktörü reseptörüne benzer şekilde sisteinden zengin bölgeye sahiptir. β alt ünitesinin sitozolik kısmında ise 3 adet tirozin kümesi bulunmaktadır. Reseptörün bu kısmı ayrıca tirozin kinaz aktivitesine sahiptir⁶⁵. İnsülinin reseptöre ekstraselüler bağlanması sonucunda intraselüler β alt ünitesi tirozin kinaz aktivitesi kazanır ve hem reseptörde bulunan tirozin aminoasitlerini hem de intraselüler insülin reseptör substrat (IRS) proteinlerini fosforiller. IRS proteinlerinin fosforillenmesi fosfoinositid kinaz 3-protein kinaz B/Akt yolağını aktive ederek glukojen sentaz kinaz 3 β , rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1 ve 2, forkhead transkripsiyon faktörleri gibi efektör molekülleri regüle eder⁶⁶. Bunlar dışında IRS proteinlerinin aktivasyonu ile fosfotirozin-bağlayıcı src homoloji 2 kısmı taşıyan büyüme faktörü reseptörü bağlı protein 2 ve Shc proteinleri vasıtasıyla mitojen aktive eden protein kinaz yolağı da aktive olmaktadır. Bu yolakların uyarılması sonucunda hücrelerde insülinin etkileri ortaya çıkmaktadır⁴⁹. İnsülin sinyalizasyonun ana yolakları ve insülinin etkileri Şekil 2-2’de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2-2: İnsülin Sinyalizasyonunun Temel Yolakları ve İnsülinin Etkileri- Van den Berghe 2004'ten değiştirilerek

(eNOS, endotelial nitrik oksit sentaz; Erk1/2, ekstraselüler sinyal-regüle kinaz 1/2; Grb2, büyüme faktörü reseptörü bağlı protein 2; IGFBP-1, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1; IRS, insülin reseptör substratı; JNK, Januz kinaz; MEK, mitojen aktive protein kinaz; Nck, tirozin kinaz adaptör protein 1'in non-katalitik bölgesi; PDK1/2, fosfoinositid bağımlı kinaz 1/2; PEPCK, fosfoenolpirüvat karboksikinas; PI3K, fosfoinositid 3-kinaz; PKB, protein kinaz B; Syp, sinaptofizin)

İnsülin reseptörü hemen hemen her hücre tipinde bulunmakla birlikte iskelet kası, karaciğer, adipoz doku gibi enerji depolayan ve metabolik aktivitesi yüksek doku ve organlarda daha fazla eksprese olmaktadır. Bu durum bahsi geçen doku ve organları insülinin ana hedefi haline getirmektedir.

Yapılan çalışmalar insülinin iskelet kası glukoz metabolizmasının farklı boyutları üzerine etkileri olduğunu göstermektedir. İnsülin, iskelet kasında bulunan glukoz transportunun (GLUT4) translokasyonunu uyarak membran GLUT4 miktarını ve hücre içine glukoz girişini artırmaktadır⁶⁷. Bunun yanı sıra insülinin heksokinazın gen transkripsiyonunu, translasyonunu ve aktivitesini artırdığı tespit edilmiştir⁶⁸. Hekzokinaz enzimi glukoz fosforillemekte ve sonuçta ürün olarak glukoz 6-fosfat bileşiği ortaya çıkmaktadır. Bu aşamadan sonra hücrenin enerji ihtiyacına göre glukoz 6-fosfat glikoliz ya da glukojen sentezi için kullanılabilir. Normal fizyolojik

plazma insülin konsantrasyonlarında glukoz kullanımı bu iki ana yolak arasında yaklaşık olarak eşit düzeydeyken insülin konsantrasyonu arttıkça denge glukojen sentezi yönünde bozulmaktadır⁶⁹. İnsülin glukojen sentaz enzimini aktive ederek glukojen sentezini uyarmaktadır⁷⁰.

İskelet kasında olduğu gibi adipoz dokuda da insülinin etkisine duyarlı olan GLUT4 bulunmaktadır. Dolayısıyla adipoz dokuya glukoz alımı da insülin tarafından uyarılmaktadır⁷¹. İnsülinin adipoz dokuda yağ metabolizması üzerine etkileri olduğu da yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. İnsülin hormon-duyarlı lipaz enzimini inhibe ederek lipolizi baskılamaktadır⁷². Lipolizi baskılamamanın yanı sıra lipoprotein lipaz enzimini uyarmaktadır⁷³. Bu sayede insülin plazma triaçilgliserol seviyelerinin azalmasına neden olmaktadır. İnsülinin ayrıca adipoz dokuda lipid sentezini ve adiyojenezi uyardığı bilinmektedir⁷⁴.

İnsülinin etkilerine duyarlı olduğu bilinen organlardan en önde geleni glukoz metabolizmasındaki baskın rolünden ötürü karaciğerdir. Karaciğerde bulunan glukoz transportu (GLUT2) insülin duyarlı değildir. Postprandiyal durumda karaciğere glukoz alımının plazma glukoz artışı ile korele olduğu bilinmektedir⁴⁹. İnsülinin karaciğer glukoz alımı üzerine etkisi olmamasına karşın glukoz metabolizmasının diğer basamakları üzerine önemli etkilere sahip olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. İnsülin karaciğerde glukojenolizi ve glukoneojenezi inhibe etmektedir. Bu şekilde insülinin hepatik glukoz üretimini baskıladığı gösterilmiştir^{49,75}.

2.1.2.2. Glukagon

Glukoz metabolizmasında önemli rol oynayan bir diğer hormon glukagondur. Glukagon pankreasta Langerhans adacıklarındaki α hücrelerden salgınmaktadır. Bazal koşullarda karaciğer glukoz üretiminin yaklaşık olarak yarısı glukagonun etkisi ile gerçekleşmektedir. Öğün sonrası ise hiperinsülinemi glukagon salgınını baskılamakta ve sonuçta kan glukoz düzeyleri azalmaktadır.

Glukagon yapı olarak hipofiz adenilat siklaz-aktive polipeptid ailesine mensup diğer hormonlar ile benzerlik göstermektedir. 29 aminoasitten oluşan glukagonun molekül ağırlığı 3485 daltondur. Pankreasta proglukagondan prohormon konvertaz 2 enzimi aracılığıyla glukagon-ilişkili polipeptid ve majör proglukagon fragment ile birlikte üretilir⁴⁹.

Glukagon sekresyonunun da tıpkı insülinde olduğu gibi glukoz düzeyleri ile yakın ilişki içerisinde olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Glukoz düzeylerinde artışın α hücrelerden glukagon sekresyonunu doğrudan azalttığı bildirilmiştir⁷⁶. Buna ilave olarak glukagon sekresyonunun otokrin kontrolünde glukagonun kendisinin de rolü olduğu öne sürülmüştür. Buna göre glukagon α hücrelerde cAMP düzeylerini artırarak kendi sekresyonunu stimüle etmektedir⁷⁷. Glukagon ile birlikte sekrete edilen glutamatın da glukagon sekresyonunun regülasyonunda rol aldığı öne sürülmüştür^{78,79}. Otokrin regülasyona ilave olarak glukagon sekresyonunun parakrin regülasyona tabi olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. β hücrelerden salınan insülin, glukagon sekresyonunu inhibe etmektedir⁸⁰. İnsülinin bu inhibitör etkisinden gama amino bütirik asit (GABA) A reseptör ekspresyonunu artırması⁸¹, K_{ATP} kanallarını aktive ederek α hücrelerde hiperpolarizasyona neden olması⁸² ve fosfodiesteraz enzimi aracılığıyla hücre içi cAMP düzeylerini azaltması⁸⁰ sorumlu tutulmuştur. İnsülin ile birlikte sekrete edilen çinko iyonun da glukagon sekresyonunu baskıladığı gösterilmiştir⁸³. β hücrelerden salınan bir diğer faktör olan amilin de glukagon sekresyonunu baskılamaktadır⁸⁴. β hücrelerden salınan faktörlerin yanı sıra δ hücrelerden salınan somatostatinin de glukagon sekresyonunu baskıladığı bilinmektedir⁶². İncretin bir hormon olan GLP-1 glukagon sekresyonunu P/Q tipi kalsiyum kanalları üzerinden inhibe etmektedir⁸⁵. Glukagon sekresyonu üzerinde otonom sinir sisteminin de regülatör etkisi olduğu iyi bilinmektedir. Hem sempatik hem de parasempatik aktivasyonun glukagon sekresyonu üzerinde stimüle edici etkisi bulunduğu tespit edilmiştir⁸⁶. Bazı çalışmalar ise plazma alanin ve arjinin aminoasit düzeylerinin glukagon sekresyonu üzerinde önemli etkileri olduğunu öne sürmektedir⁸⁷⁻⁸⁹.

Glukagon etkilerini hedef hücrelerin membranında yer alan G-protein kenetli reseptör ailesine mensup glukagon reseptörü vasıtasıyla göstermektedir⁹⁰. Reseptörün glukagon ile uyarılması neticesinde membranda yer alan adenilat siklaz enzimi aktive olmakta ve hücre içi cAMP düzeyleri yükselmektedir. Glukagonun hücre içi etkileri artan cAMP'nin aktive ettiği protein kinazlar aracılığıyla gerçekleşmektedir⁴⁹. Karaciğer, glukagonun etkileri açısından ana merkez konumundadır. Glukagon hepatositlerde glikojen sentezini inhibe etmek, glikojenoliz ve glukoneojenezi stimüle etmek suretiyle karaciğerden glukoz çıkışını artırmaktadır⁹¹. Glukagonun karaciğerde ayrıca ketojenezi uyardığı da yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Yüksek plazma glukagon/insülin oranının artan hücre içi cAMP vasıtasıyla glikolizi, asetil-CoA

karboksilaz aktivitesini ve malonil-CoA düzeylerini azalttığı gösterilmiştir. Azalan malonil-CoA yağ asidi sentezini durdurmakta ve ketojenezi stimüle etmektedir⁹². Glukagonun karaciğer dışında diğer önemli hedefi adipoz dokudur. Glukagon insülinin aksine adipoz dokuda lipolizi stimüle etmektedir. Bu sayede glukagon etkisi ile plazmada FFA ve gliserol düzeyi artmaktadır⁹³.

2.1.2.3. Somatostatin

İlk kez 1960'lı yılların sonunda hipotalamus ekstratlarında büyüme hormonu sekresyonunu inhibe edici madde olarak varlığı tanımlanmıştır⁹⁴. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar varlığının hipotalamusla sınırlı olmadığını periferik nöronlarda, GİS'te ve pankreasta da sentezlendiğini göstermiştir⁹⁵. Biyosentezi inaktif prekürsörü olan preprosomatostatin molekülünün enzimatik olarak kesilmesi sonucunda gerçekleşmektedir. Somatostatinin 14 ve 28 aminoasit uzunluğunda 2 farklı aktif formu bulunmaktadır. 14 aminoasitlik formun pankreas, mide ve sinir dokuda, 28 aminoasitlik formun ise beyin ve enterik nöronlarda yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır⁹⁶. Yapılan çalışmalar hormon, nörotransmitter, sitokin vb. biyoaktif maddelerin somatostatin sekresyonunu regüle ettiğini göstermektedir. Glukagon, büyüme hormonu serbestleştirici hormon, nörotensin, kalsitonin gen ilişkili peptid, bombesin somatostatin sekresyonunu uyarırken; insülin, leptin ve adrenalin, GABA ve opiyatlar somatostatin sekresyonunu inhibe etmektedir⁹⁵. Somatostatin, etkilerini G-protein ile kenetli reseptör ailesine mensup somatostatin reseptörleri aracılığıyla göstermektedir. Somatostatin pankreasta δ hücrelerinden salgın ve hem insülin hem de glukagon sekresyonunu inhibe eder⁹⁷. Somatostatinin glukoz metabolizması açısından bir başka etkisi ise ghrelin sekresyonunu inhibe etmesidir⁹⁸.

2.1.2.4. Glukozun Organizmaya Giriş Yolu ve İncretin Etki

Yapılan çalışmalar glukozun organizmaya giriş yolunun da glukoz metabolizması üzerine etkili olduğunu göstermiştir^{99,100}. İntravenöz yoldan glukoz uygulanması ile splanknik glukoz alımı artan plazma glukoz düzeyleri ile orantılı şekilde gerçekleşmektedir¹⁰¹. Buna karşın glukoz oral yoldan alındığında splanknik glukoz alımı belirgin şekilde artmaktadır. Bunun nedeni hepatik arter-portal ven glukoz gradiyenti neticesinde oluşan hepatik sinyalin vagus aracılığıyla SSS'ye gitmesi ve karaciğerin sempatik sinir sistemi tarafından uyarılmasının bloke edilmesidir. Sonuçta ise karaciğere glukoz alımı artmakta, glukojen sentaz enziminin aktivasyonu ve

glukojen fosforilaz enziminin inhibisyonu neticesinde glukojen sentezi uyarılmaktadır¹⁰². Glukozun oral yoldan kullanılmasının insülin salımı üzerine etkileri bulunmaktadır. Benzer kan glukoz düzeylerinde glukozun oral yoldan alımı, intravenöz (i.v.) glukoz uygulamasına kıyasla yaklaşık 2 kat daha fazla insülin salımına neden olmaktadır. İncretin etki olarak adlandırılan bu etkiden kalın barsaktan salınan GLP-1 ve ince barsaktan salınan GIP sorumludur⁴⁹.

42 aminoasitten oluşan bir polipeptid olan GIP barsakta bulunan K hücrelerinden salınmaktadır. GIP sekresyonu glukoz ve galaktoz gibi karbonhidratlar ile bazı aminoasitler tarafından uyarılmaktadır⁴⁹. GIP reseptörü G-protein kenetli reseptör ailesine mensuptur ve pankreasta hem α hem de β hücrelerde bulunmaktadır. GIP'in bu reseptörleri aracılığıyla insülin ve glukagon sekresyonunu genel olarak uyardığı bilinmektedir⁴⁹. Fakat yapılan bir çalışmada yüksek kan glukoz düzeylerinde GIP'in insülin sekresyonunu belirgin şekilde uyardığını fakat glukagon sekresyonu üzerine önemli bir etkisi olmadığını düşük glukoz düzeylerinde ise bu tablonun tam tersi olarak glukagon sekresyonunun uyarıldığı insülin sekresyonunun ise değişmediği gösterilmiştir. Bu noktadan hareketle GIP'in kan insülin ve glukagon sekresyonu üzerine olan etkisi kan glukoz düzeyleri ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür¹⁰³. GIP'in ayrıca lipoprotein lipaz aktivitesini artırarak adipoz dokuda yağ birikimini uyardığı öne sürülmektedir¹⁰⁴. İntestinal sekresyonun ardından GIP, dipeptidil peptidaz 4 (DPP-4) enzimi aracılığıyla proteolitik olarak kesilerek inaktive edilmektedir.

İncretin hormonların bir diğeri olan GLP-1 GİS'te L hücrelerinden salınmaktadır. Sekresyonunun glukoz, trigliserit ve aminoasitler tarafından uyarıldığı gösterilmiştir⁴⁹. GIP gibi GLP-1 reseptörleri de G-protein kenetli reseptör ailesine mensuptur¹⁰⁵. GLP-1 insülin ve somatostatin sekresyonunu uyarmakta, glukagon sekresyonunu ise baskılamaktadır⁴⁹. Glukagon sekresyonu üzerine olan etkisinin glukoz düzeyine bağımlı olduğu düşünülmektedir¹⁰⁶. GIP'ten farklı olarak GLP-1'in SSS üzerine enerji homeostazı yönünden de etkileri bulunmaktadır. GLP-1 uygulamasının doyumluğu artırdığı ve açlık hissini azalttığı gösterilmiştir¹⁰⁷ GLP-1 de tıpkı GIP gibi DPP-4 enzimi tarafından inaktive edilmektedir.

2.2. T2DM

T2DM, insülin sekresyonunda bozulma ve insülin direnciyle karakterize olan kronik olarak kandaki glukoz düzeyinin normal seviyelerin üzerinde seyretmesi

(hiperglisemi) durumuna verilen isimdir. T1DM'den farklı olarak tedavi mutlak şekilde insüline bağımlı değildir. Hipergliseminin hastanın farkedebileceği semptomlara neden olması sıklıkla uzun zaman alır dolayısıyla T2DM bazı hastalarda yıllar boyunca asemptomatik olarak seyredebilmektedir. T2DM, hastalarda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlara sıklıkla neden olabilmektedir. Gerek T2DM'nin komplikasyonlarının mekanizmasının araştırılması gerekse de tedavide yer alma potansiyeli bulunan yeni ajanların etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla deneysel T2DM hayvan modelleri prelinik aşamada sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2.1. Epidemiyoloji

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun 2019 yılı için yapmış olduğu tahminlere göre 20-79 yaş arasında diyabet prevalansı dünya nüfusunun %9,3'üne ulaşarak 463 milyon kişi olmuştur. Bunun ötesinde 2019 yılı için tahmin edilen %9,3'lük oranın 2030 yılında %10,2, 2045 yılında ise %10,9'a çıkacağı öngörülmektedir¹⁰⁸ Ülkemizde 2013 yılında gerçekleştirilen TURDEP-II çalışması ile 20 yaş üzeri bireylerde diyabet prevalansının %16,5 olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç 2002 yılında yapılan TURDEP-I çalışmasındaki orana göre %90'lık artış anlamına gelmektedir¹⁰⁹. Bahsi geçen çalışmalarda T2DM prevalansı ayrıca saptanmamış olmakla birlikte yapılan farklı çalışmalarda T2DM vakalarının tüm diyabet vakalarının yaklaşık olarak %90'ını oluşturduğu gözlenmiştir^{110,111}. Diyabet prevalansının yüksekliği diyabetin mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları da hesaba katıldığında önemli bir halk sağlığı problemine işaret etmektedir.

2.2.2. Etiyoloji ve Patojenez

T2DM'nin ortaya çıkması bazal (10-12 saatlik overnight açlık sonrası) ve postprandiyal (yemekten 1-4 saat sonrası) glukoz homeostazının bozulması sonucunda gerçekleşmektedir. Hastalığın etiyoloji ve patojenezinde genetik faktörler ve çevresel etkiler sonucunda ortaya çıkan insülin sekresyonunda bozulma ve insülin direnci rol oynamaktadır. T2DM patojenezinde yer alan olayların kronolojik sırası ve birbirleriyle ilişkileri kesin olarak belirlenmemiş olmakla birlikte insülin direncinin sürecin başlatıcısı olarak değerlendirildiği "T2DM'nin doğal seyri" yaklaşımı genel olarak kabul görmektedir. Buna göre genetik faktörler ve obezitenin neden olduğu insülin direnci neticesinde karaciğer, iskelet kası, adipoz doku gibi glukoz homeostazında önemli rol oynayan doku ve organların insüline verdikleri yanıt azalır ve kan glukoz

düzeyi normal seviyenin üzerinde kalır. Bu durumda yüksek plazma glukoz düzeyi ile pankreastan daha fazla insülin salınması için bir uyarı oluşur. İnsülin direncinin ilk safhasında hiperinsülinemi vasıtasıyla kan glukoz düzeyleri normal seviyelerde tutulabilir. İnsülin direncinin devam etmesi her seferinde daha fazla insüline ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Bu durum ise pankreastaki β hücreleri için stres oluşumu ve nihayetinde β hücre kaybı ile sonuçlanmaktadır. β hücre kaybı ile birlikte görülen hipoinsülinemi ile kan glukoz düzeyleri normal seviyelerde tutulamaz ve aşikar diyabet tablosu ortaya çıkar⁴⁹.

2.2.2.1. İnsülin Direnci

İnsülin direnci, fizyolojik koşullarda insüline duyarlı dokularda, insülinin neden olduğu yanıtın azalmasını ifade etmektedir. Bu duyarsızlaşma, insülin reseptörü, insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesi, reseptör sonrası hücre içi sinyal iletimi düzeylerinde gerçekleşebilir. Direnç sonucunda glukoz metabolizmasında insüline duyarlı süreçler (karaciğerden glukoz çıkışının inhibisyonu, adipoz doku ve iskelet kasında glukoz transport ve metabolizması) baskılanmış olur. Sonuç olarak hem insülin direnci hem de insülin direnci karşısında devreye giren kompensatuvar mekanizmalar T2DM'nin gelişimine neden olmaktadır. İnsülin direncinin gelişiminde obezite, fiziksel inaktivite ve genetik faktörlerin rolü olduğu bilinmektedir⁴⁹.

Obezite, aşırı yağ birikmesi ile karakterize vücut ağırlığı artışı durumuna verilen isimdir. Kişinin vücut ağırlığının normal olarak kabul edilen aralık içerisinde olup olmadığının değerlendirilmesi için vücut kitle indeksi (VKİ) ismi verilen bir parametre kullanılmaktadır. VKİ'nin hesaplanması şu şekildedir:

$$VKİ = \frac{\text{Vücut Ağırlığı (kg)}}{[\text{Boy Uzunluğu (m)}]^2}$$

Buna göre VKİ değeri ≥ 25 olması durumunda kişi aşırı kilolu, ≥ 30 olması durumunda ise obez olarak değerlendirilmektedir.

Günlük fiziksel aktivitenin azalması, sedanter yaşam tarzının yaygınlaşması, yemek yeme alışkanlıklarında gözlenen dramatik değişim son 30 yılda obezitenin özellikle gelişmiş batı toplumlarında görülme sıklığında artışa neden olmuştur¹¹². Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) verilerine göre 1975'ten günümüze dünya çapında obezite 3 katına çıkmıştır. Ayrıca yine DSÖ'ye göre 2016 yılında 18 yaş ve üstü dünya

nüfusunun %39'unun aşırı kilolu, %13'ünün ise obez olduğu tespit edilmiştir¹¹³. Gelinebilir durumda dünyada bir "obezite epidemisi" varlığından söz etmek mümkündür.

Obezite basitçe vücuda alınan enerjinin tüketilen enerjiden fazla olduğu bir enerji homeostazı bozukluğu olarak değerlendirilebilirse de, obezite patojenezi farklı yapı ve sistemlerin (gastrointestinal, sinir) ve farklı metabolik parametrelerin (glukoz, insülin, yağ asidi, adipokinler, mikrobiyota) yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Yapılan çalışmalar ayrıca obezite patojenezinde genetik faktörlerin de rolü olabileceğine işaret etmektedir¹¹⁴. Bununla birlikte obezite ciddi bir halk sağlığı problemidir. Obezite, tüm nedenlere bağlı mortalite, hipertansiyon, dislipidemi, T2DM, koroner arter hastalığı, inme, safra kesesi hastalıkları, osteoartrit, uyku apnesi ve birçok kanser türü için bir risk faktörü olarak değerlendirilmektedir¹¹⁵⁻¹¹⁷. Bunların yanı sıra obezitenin düşük yaşam kalitesi, depresyon ve anksiyete gibi psikososyal sonuçları olduğu bilinmektedir^{118,119}. Obezitenin komorbiditeleri arasında KVS hastalıkları ön planda yer almaktadır. Obezitenin KVS hastalıkları ile ilişkisi olasılıkla hipertansiyon, dislipidemi, tromboza yatkınlık, inflamasyon, insülin direnci vb. bilinen kardiyovasküler risk faktörleri ile ilişkilidir¹¹⁴.

Obezite sistemik olarak düşük yoğunluklu inflamasyonun gözlemlendiği bir durumdur. Yapılan çalışmalar obez hastalarda serum proinflamatuvar sitokin düzeylerinin arttığını göstermektedir^{120,121}. Ayrıca obezitede inflamatuvar yollarda yer alan I κ B α kinaz β ve c-Jun N-terminal kinaz 1 sinyal moleküllerinin aktivitelerinin arttığı bilinmektedir^{122,123}. Obezitede görülen inflamasyon insülin direncine neden olmaktadır. TNF- α 'nın p55 üzerine olan etkisi yoluyla insülin IRS-1 sinyal yolağını inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu inhibisyonda I κ B α kinaz β ve c-Jun N-terminal kinaz 1'in rolü olduğu tespit edilmiştir^{124,125}. İnflamasyon ayrıca PPAR- γ aktivitesini azaltarak insülin direncine neden olmaktadır. Son olarak inflamasyona bağlı olarak lipolizin uyarılması ve trigliserit sentezinin inhibisyonu neticesinde artan FFA miktarı da inflamasyon ile insülin direnci arasındaki ilişkinin bir başka boyutunu oluşturmaktadır¹²⁶. İnflamasyon dışında obezitede protein tirozin fosfatazların aktivasyonunun insülin direncine neden olabileceği öne sürülmüştür. Protein tirozin fosfataz 1B, lökosit antijen-ilişkili fosfataz, src-homoloji fosfatazın obez hastalarda ekspresyon ve aktivitelerinin arttığı gösterilmiştir¹²⁷. Protein tirozin fosfataz 1B ve

lökosit antijen-ilişkili fosfataz *in vitro* koşullarda insülin reseptörü ve IRS-1'i defosforile etmektedirler¹²⁸.

Vücutta yağ metabolizması ve dağılımında ortaya çıkan değişimlerin insülin duyarlılığında rolü bulunmaktadır. Plazma FFA düzeylerinin artması iskelet kasında insülin reseptör tirozin fosforilasyonu, IRS-1 tirozin fosforilasyonunu, fosfoinositid 3-kinaz aktivitesini ve Akt-serin fosforilasyonunu inhibe ederek insülin sinyalizasyonunu bozmaktadır¹²⁹. Ayrıca obezitede adiposit boyutlarında görülen artış adipositlerde insülin direncine neden olmaktadır. Bu durumda insülinin antilipolitik etkilerinin inhibe olması dolayısıyla adipoz dokudan lipid çıkışı meydana gelmektedir. Artan plazma FFA konsantrasyonu ise karaciğer ve iskelet kasında lipid birikmesine neden olur. FFA metabolizması neticesinde ortaya çıkan seramid ve DAG'ın insülin direncinde rolü bulunmaktadır¹²⁶. Bu süreçte aynı zamanda adipositlerden salınan adipokin kompozisyonu değişmekte ve insülin duyarlılaştırıcı bir adipokin olan adiponektin sekresyonu azalmaktadır¹³⁰.

Obezite dışında insülin direncinin gelişiminde rol oynayan bir diğer faktör fiziksel inaktivitedir. Özellikle son 30 yılda sedanter yaşam tarzının kazandığı yaygınlığın insülin direnci ve T2DM prevalans artışı ile gösterdiği paralellik, bahsi geçen durumlar arasında nedensel bir ilişki olup olmadığı sorusunu gündeme getirmektedir. Fiziksel inaktivitenin obezite dolayısıyla insülin direncine neden olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalar ayrıca fiziksel inaktivite ile insülin direnci arasında direkt bir ilişkinin mevcut olduğunu göstermektedir. Bir çalışmada fiziksel egzersizin obez hastalarda kilo azalmasına yol açmaksızın insülin direncinde iyileşmeye neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada fiziksel egzersiz ile hepatik trigliserit ve plazma FFA konsantrasyonlarının da azaldığı gözlenmiştir¹³¹. Bir başka çalışmada normal kiloya sahip bireylerde 5 günlük yatak istirahati insülin direncine, plazma total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde artışa neden olmuştur¹³².

Obezite ve fiziksel inaktiviteye ek olarak genetik faktörler de insülin direncinin alt yapısını oluşturmaktadır. İnsülin reseptöründe meydana gelen mutasyonların membran insülin reseptör sayısında azalmaya neden olmak suretiyle insülin direncine neden olduğu gösterilmiştir¹³³. İnsülin reseptörü dışında IRS-1 geninde ortaya çıkan mutasyonların da (Gly 972 Arg) insülin direncine neden olabileceği öne sürülmüştür¹³⁴.

İnsülin direncinde genetik faktörlerin rolü, genom-çaplı ilişkilendirme çalışmalarıyla da gösterilmiştir^{135,136}.

İnsülin direncinin hesaplanması için hiperinsülinemik öglisemik klemp testi altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu testin uygulama zorluğu nedeniyle açlık plazma glukoz ve insülin seviyeleri baz alınarak Homeostatik Model Değerlendirme-İnsülin Direnci (HOMA-IR), Kantitatif İnsülin Duyarlılığı Hesaplama İndeksi, Matsuda İndeksi vb. basitleştirilmiş yaklaşımlar geliştirilmiştir¹³⁷. Basitleştirilmiş modellerden HOMA-IR *in vivo* çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır¹³⁸⁻¹⁴⁰. HOMA-IR'nin hesaplanması şu şekildedir:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Açlık kan glukoz konsantrasyonu (mg/dl)} \times \text{Açlık kan insülin konsantrasyonu (mg/dl)} / 405$$

2.2.2.2. İnsülin Sekresyonunda Bozulma

İnsülin sekresyonunda meydana gelen bozulma, insülin direnci ile birlikte T2DM'nin gelişiminde temel bir role sahiptir. Obezite ve insülin direncinin süreç içerisinde β hücre kaybı ile sonuçlandığı "T2DM'nin doğal seyri" nin dışında doğrudan β hücre kaybı ya da β hücre insülin sekresyonu bozulmasından kaynaklı T2DM tipleri de mevcuttur. β hücre yetmezliği yaş, genetik faktörler, insülin direnci, lipotoksiste, glukotoksiste faktörleri tarafından belirlenmektedir.

İlerleyen yaş ile birlikte insülin sekresyonunda azalma meydana gelmektedir¹⁴¹. Bu durumun T2DM sıklığının yaş artışı ile olan ilişkisini kısmen açıklayabildiği düşünülmektedir⁴⁹.

İlerleyen yaş dışında β hücre fonksiyonu ve insülin sekresyonu genetik faktörlerden de etkilenmektedir. Yapılan bir çalışma *TCF7L2*, *SLC30A8*, *GIPR* ve *C2CD4B* gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin yüksek proinsülin seviyesi, düşük insülin sekresyonu ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca *MTNR1B*, *GCK*, *FADS1*, *DGKB*, *PROX1*, *G6PC2* gen bölgelerindeki tek nükleotid polimorfizmlerinin erken faz insülin sekresyonunda bozulma ile ilişkili olduğu bildirilmiştir¹⁴². Çin'de yapılan bir çalışma ise *CDKAL1* geninin rs10946398 polimorfizmiyle insülin sekresyonunda bozulma arasında ilişki olduğunu saptamıştır¹⁴³.

Gençlerde görülen erişkin tip diyabetten farklı olarak T2DM patofizyolojisinde birden çok gen rol oynamaktadır. Genetik bağlantı çalışmaları ile *CAPN10*, *TCF7L2*

genlerinin T2DM'deki rolü saptanmıştır. Aday gen çalışmaları ile de ayrıca *PPAR γ* , *IRS1*, *IRS-2*, *KCNJ11*, *WFS-1*, *HNF1A*, *HNF1B*, *HNF4A* genlerinin T2DM ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Bu genlere ilave olarak yapılan genom-çaplı ilişkilendirme çalışmaları birçok farklı genin T2DM ile ilişkisini göstermiştir¹⁴⁴.

T2DM'nin doğal seyrinde gelişen insülin direnci ile birlikte normogliseminin sağlanması için sürekli daha fazla miktarda insülin salınması ihtiyacı ortaya çıkar. T2DM'nin doğal seyrinde artan insülin ihtiyacı ile β hücre kaybı arasındaki mekanistik ilişki kesin olarak bilinmemektedir. T2DM patojenezinde ve patofizyolojisinde yer alan diğer faktörlerin β hücre kaybına neden olması da ayrıca mümkün gözükmemektedir. Glukoz metabolizmasındaki bozulmaya paralel olarak artan plazma FFA miktarı insülin sekresyonunda bozulmaya ve β hücre yetmezliğine neden olmaktadır¹⁴⁵. Buna ilave olarak adacık amiloid polipeptidin de β hücre kaybına neden olduğu bilinmemektedir¹⁴⁶. Son olarak yüksek glukoz düzeylerinin de β hücre fonksiyonunu bozduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir^{147,148}. Yüksek glukoz düzeylerinin neden olduğu toksik etki "glukotoksisite" olarak isimlendirilmektedir.

2.2.3. Tanı Kriterleri ve Tedavi

T2DM'de risk faktörlerini taşıyan yüksek risk grubundaki bireylerde diyabet taraması yapılması gerekmektedir. Diyabet taraması ve risk faktörleri için Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği'nin Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu 2020¹⁴⁹'da yer alan listeye göre:

1. Ülkemizde 40 yaş üzeri toplumun %10'dan fazlasında diyabet bulunduğu için kilosu ne olursa olsun, 40 yaşından itibaren 3 yılda bir, tercihen açlık plazma glukozu (APG) ile diyabet taraması yapılmalıdır.

2. VKİ ≥ 25 kg/m² olan asemptomatik kişilerin, aşağıdaki risk gruplarından birine mensup olmaları halinde, daha genç yaşlardan itibaren ve daha sık (örneğin yılda bir kez) diyabet yönünden araştırılmaları gerekir.

- Birinci ve ikinci derece yakınlarında diyabet bulunan kişiler
- Diyabet prevalansı yüksek etnik gruplara mensup kişiler
- Makrozomik (doğum tartısı 4,5 kg veya üzerinde olan) bebek doğuran veya daha önce gestasyonel diabetes mellitus (GDM) tanısı almış kadınlar

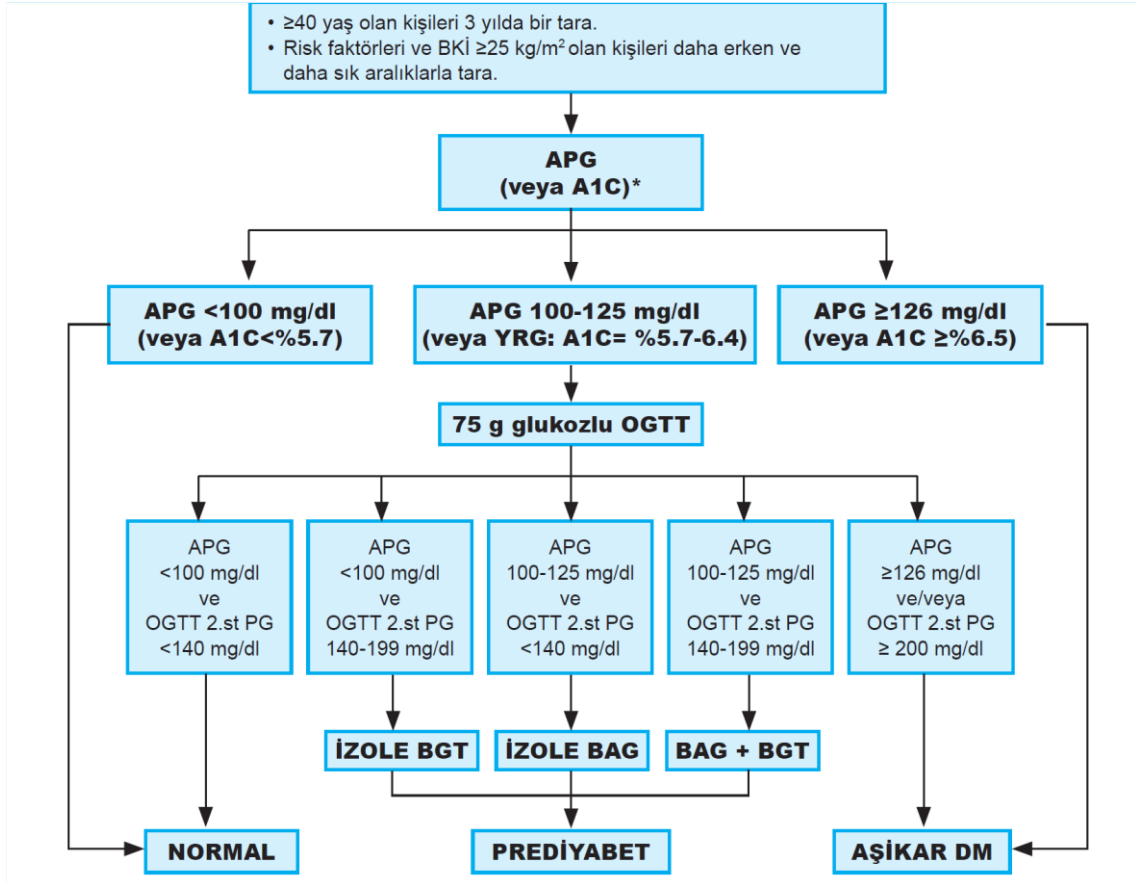
- Hipertansif bireyler (Kan basıncı $\geq 140/90$ mmHg)
- Dislipidemikler (HDL-kolesterol <35 mg/dl veya trigliserid ≥ 250 mg/dl)
- Polikistik over sendromu olan kadınlar
- İnsülin direnci ile ilgili klinik hastalığı veya bulguları (akantozis nigrikans) bulunan kişiler
- Koroner, periferik veya serebral vasküler hastalığı bulunanlar
- Düşük doğum tartılı doğan kişiler
- Sedanter yaşam süren veya fizik aktivitesi düşük olan kişiler
- Doymuş yağlardan zengin ve posa miktarı düşük beslenme alışkanlıkları olanlar
- Şizofreni hastaları ve atipik antipsikotik ilaç kullanan kişiler
- Solid organ (özellikle renal) transplantasyonu yapılmış hastalar
- Uzun süreli kortikosteroid ya da antiretroviral ilaç kullanan hastalar

3. Daha önce prediyabet (bozulmuş açlık glukozu, bozulmuş glukoz toleransı veya yüksek risk grubu) saptanan bireylerde yılda bir kez diyabet taraması yapılmalıdır.

4. Daha önce GDM tanısı almış kadınlarda üç yılda bir diyabet taraması yapılmalıdır.

Diabetes mellitus tanısı için APG, oral glukoz tolerans testi (OGTT) 2. saat plazma glukozu (PG) ve glikozillenmiş hemoglobin düzeyi (HbA1c) parametreleri kullanılabilir. Erişkinlerde T2DM taraması ve tanılama şeması Şekil 2-3'te görülmektedir.

T2DM tedavisinde kullanılan ilaç grupları insülin sekresyonunu ya da insülin duyarlılığını artırma, glukoz absorpsiyonunu ya da böbreklerden geri emilimini azaltma yollarıyla etkilerini göstermektedir. T2DM tedavisinde ayrıca insülin de önemli bir yere sahiptir. Farmakolojik tedavinin yanı sıra non-farmakolojik tedavi yaklaşımları da T2DM tedavisinde yer almaktadır.



Şekil 2-3: Erişkinlerde T2DM Taraması ve Tanılama¹⁴⁹

*A1C tayinleri uluslararası standartlara uygun bir yöntemle yapılmalıdır.

BKİ: Beden kitle indeksi, APG: Açlık plazma glukozu, A1C: Glikozillenmiş HbA1c, YRG: Yüksek risk grubu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, 2.st PG: OGTT'de 2.saat plazma glukozu, BGT: Bozulmuş glukoz toleransı, BAG: Bozulmuş açlık glukozu, DM: Diabetes mellitus.

2.2.3.1. Non-Farmakolojik Tedavi

T2DM tedavisinde non-farmakolojik yaklaşım, diyet ve kilo kontrolü ile fiziksel egzersizi içermektedir. Non-farmakolojik yaklaşım hem tedavi hem de korunma açısından önem taşımaktadır.

Düzenli fiziksel aktivite insülin direncini azaltarak kan glukozu regülasyonuna yardımcı olmaktadır. Kan glukozu regülasyonu dışında dislipidemi, kan basıncı

kontrolü ve kilo kontrolü açısından fiziksel aktivite T2DM'li hastalarda tercih edilmektedir. Aktivite türü olarak aerobik (tempolu yürüme, koşma, yüzme) ya da direnç egzersizi tercih edilebilmektedir. Hipoglisemi, hiperglisemi, kardiyovasküler riskler, retinopati, nefropati, periferik nöropati, otonom nöropatinin fiziksel aktiviteye bağlı olarak hastalarda görülme riski mevcuttur. Egzersiz programına başlanmadan önce hastaların riskler açısından değerlendirilmeleri gerektiği bildirilmiştir¹⁴⁹. Egzersiz ile ilgili bir diğer sorun insülin kullanımı ile ilgilidir. İnsülin kullanan hastalarda besin alımına ve fiziksel aktiviteye bağlı olarak insülin dozunun ayarlanması gerekmektedir. Bu hastalarda fiziksel aktiviteye bağlı hipoglisemi riski daha yüksektir⁴⁹.

Kilo kontrolü ve diyet T2DM tedavisinin ve önlenmesinin diğer önemli kısmını oluşturmaktadır. Aşırı kilolu ve insüline direnci olan obez bireylerde %5 civarındaki kilo kaybı insülin direncini azaltmaktadır. Aşırı kilolu ve obez T2DM hastalarında ise kilo kaybı ile glisemik kontrol iyileşmekte, hastanın kullanmakta olduğu antidiyabetik ilacın dozunun azaltılması mümkün hale gelebilmektedir. Vücut ağırlığını azaltmaya dönük girişimler, hasta ile birlikte hastanın gereksinimlerine göre bireyselleştirilmelidir. Vücut ağırlığının azaltılmasının yanı sıra diyet içeriğinin modifiye edilmesi de önem taşımaktadır. Buna göre karbonhidrat sayımı tekniği glisemik kontrol sağlanması açısından kritiktir. 130 gramın altında karbonhidrat içeren düşük karbonhidrat diyetleri önerilmemektedir. Sükroz tüketimi önerilmemekle birlikte alındığı takdirde günlük enerjinin %10'unu aşmaması tavsiye edilir. Ayrıca fruktoz içeriği de günlük enerjinin %12'sinin altında tutulmalıdır ve meyve suyu yerine doğrudan meyvelerden temin edilmelidir. Diyabetik hastalarda liften zengin beslenme önerilmektedir. Diyabetlilerde diyetin doymuş yağ içeriğinin %7-8 civarında olması istenir. Ayrıca trans yağların alımı kısıtlanmalı ve günlük enerji alımının %1'ini geçmemelidir. Bunun dışında kolesterol alımının günlük 300 mg'ın altında olması kardiyovasküler risk açısından önemlidir. Diyabetli hastaların haftada iki veya daha fazla porsiyon balık tüketmeleri önerilir. Alkol alımı glisemik kontrolü zorlaştırdığı için diyabetik hastalarda önerilmemektedir¹⁴⁹.

2.2.3.2. Farmakolojik Tedavi

T2DM'nin tedavisinde non-farmakolojik yaklaşımlar mevcut olmakla birlikte tedavinin temelini farmakolojik yaklaşım oluşturmaktadır. Bu amaçla tedavide biguanid grubu ilaçlar, insülin salgılatıcı ilaçlar, tiazolidindion grubu ilaçlar (PPAR- γ

agonistleri), α -glukozidaz inhibitörleri, inkretin bazlı ilaçlar, sodyum-glukoz ko-transporter-2 (SGLT2) inhibitörleri ve insülin kullanılmaktadır.

2.2.3.2.1. Biguanid Grubu İlaçlar

Metformin kimyasal olarak biguanid sınıfına mensup bir oral antidiyabetik ilaçtır. T2DM tedavisinde ilk sırada tercih edilmektedir. Kullanımına bağlı olarak en sık görülen yan etkiler bulantı, kusma, şişkinlik vb. GİS yan etkilerdir. Kilo artışına yol açmaması ve düşük hipoglisemi riski nedeniyle metformin kullanımı güvenli kabul edilmektedir¹⁵⁰. Metforminin karaciğerden glukoz çıkışı azaltıcı etkisi glukoz metabolizması üzerine tanımlanmış ilk etkisidir. Bu noktadan hareketle metforminin karaciğer üzerine olan etkileri yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Metformin hepatositlerde mitokondrideki elektron transport zincirinde kompleks I'ı inhibe ederek ATP üretimini azaltmaktadır. Bunun sonucu olarak artan ADP/ATP ve AMP/ATP oranları hücrenin enerji durumu için sensör özelliği gösteren adenosin monofosfat kinazın (AMPK) uyarılmasına neden olur. Bu uyarı hepatositlerde glukoneojenez ve lipid sentezi gibi yapım süreçlerinin baskılanmasına yağ asidi oksidasyonu gibi enerji üreten süreçlerin ise uyarılmasına neden olur. Glukoneojenezin baskılanması sayesinde karaciğerden glukoz çıkışı azaltılmış olur. Lipid sentezinin engellenmesi ve yağ asidi oksidasyonunun uyarılması karaciğerde lipotoksiteyi engeller ve sonuçta insülin duyarlılığı artar¹⁵¹. Son yıllarda yoğunlaşan çalışmalar metforminin glukoz metabolizması üzerine olan etkilerinin karaciğer dışında mide ve ince barsaktan da kaynaklanabileceğini öne sürmektedir^{152,153}.

2.2.3.2.2. Tiazolidindion Grubu İlaçlar (PPAR- γ Agonistleri)

Hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olan PPAR- γ hücre sitoplazmasında serbest halde yer alır. Ligandlar, reseptörün ligand bağlanma bölgesine bağlanırlar ve ardından oluşan ligand-reseptör kompleksi hücre çekirdeğine geçer. Burada diğer bir nükleer reseptör olan retinoid X reseptörü ile heterodimer oluşturur. Bu yapı daha sonra peroksizom proliferatör yanıt elementi adı verilen, hedef genlerin spesifik DNA bölgelerine bağlanır ve böylece gen transkripsiyonunu regüle eder¹⁵⁴. PPAR- γ organizmada hedef genlerin transkripsiyonlarını regüle etmek suretiyle birçok fizyolojik fonksiyon üzerinde etki gösterir. PPAR- γ , adipoz doku farklılaşması, karaciğer ve iskelet kası glukoz metabolizması, lipid homeostazı, makrofaj ve vasküler endotel fonksiyonunun düzenleyicisi konumundadır. PPAR- γ aktivasyonu iskelet kaslarına

glukoz alımını artırır ve hepatik glukoneojenezi azaltır¹⁵⁵. Ayrıca adipoz dokuda lipid depolanmasını artırır. İnsülin direncini azaltır. Hiperglisemiye bağlı olarak insülin salınımını artırdığı ve pankreas β hücreleri üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu gösterilmiştir¹⁵⁶. PPAR- γ 'nın aktivasyonu bu etkilerinin yanı sıra inflamatuvar adipokinlerin salınımını azaltmakta ve adiponektin gibi antidiyabetik etkisi iyi bilinen bir adipokinin düzeyini artırmaktadır¹⁵⁷.

PPAR- γ 'nın insülin duyarlılığındaki baskın rolünden hareketle 90'lı yılların sonundan itibaren sentetik PPAR- γ agonistleri (tiyazolidindionlar) tedaviye girmiştir. İnsülin duyarlılaştırıcı etkilerinin yanı sıra adipositlerde lipolizi engellemeleri ve hepatik glukoneojenezi baskılamaları, tiyazolidindionları ilgi çekici bir antidiyabetik seçenek haline getirmiştir. Bu etkilerinin yanı sıra tiyazolidindionların doğrudan KVS üzerine yararlı etkileri olduğuna dair hayvan çalışmalarından birçok veri elde edilmiştir^{158,159}.

Bu grup ilaçlardan klinik kullanıma giren ilk ilaç troglitazondur (Rezulin®). 1997 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alan ilaç hepatotoksisite nedeniyle 2000 yılında piyasadan çekilmiştir¹⁶⁰. PPAR- γ agonisti olarak 1999 yılında piyasaya sürülen ikinci ilaç olan rosiglitazonda (Avandia®), troglitazon ile görülen hepatotoksisite gözlenmemiş fakat ilacın MI riskini artırdığını gösteren bulgular¹⁶¹ nedeniyle FDA tarafından ilacın satışıyla ilgili sınırlamalar getirilmiştir. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ise 2010 yılında ilacın Avrupa'da satışını yasaklamıştır. RECORD klinik araştırmasından¹⁶² gelen verilere dayanarak FDA, ilacın MI risk artışı ile ilişkili olmadığı sonucuna ulaşmış ve ilaç ile ilgili sınırlamaları ve uyarıları kaldırdığını duyurmuştur¹⁶³.

Bu grupta piyasaya sürülen üçüncü ilaç pioglitazondur (Actos®). Piyasada 15, 30 ve 45 mg tablet formları mevcuttur. Tedavinin günde 1 kez 15 veya 30 mg ile başlatılması gerektiğinde 45 mg günlük doza çıkılması önerilmektedir¹⁶⁴. Pioglitazon, rosiglitazona göre kardiyovasküler risk açısından daha güvenli kabul edilmektedir. Fakat pioglitazon kullanımının mesane kanseri riskinde artışa neden olduğuna dair endişeler mevcuttur¹⁶⁵.

2.2.3.2.3. İnsülin Salgılatıcı İlaçlar

Bu grup ilaçlardan sülfonilüre grubu antidiyabetikler ilk keşfedilen oral antidiyabetik ilaç grubudur. İnsülin sekresyonunu uyarmalarından ötürü bu grup ilaçlar

aynı zamanda “sekratagoglar” olarak da isimlendirilmektedir. Sülfonilüreler yapıcı sülfonamidlere benzemektedirler ve β hücrelerdeki K_{ATP} kanallarını inhibe ederek etkilerini gösterirler. β hücrelerdeki K_{ATP} kanalları hetero-oktamer yapıdadır. Por oluşturan 4 adet Kir6 alt üniteyle 4 adet regülatör sülfonilüre reseptör alt ünitesinden oluşmaktadır. Regülatör alt ünitelerin bloke edilmesiyle K_{ATP} kanalı kapanır ve depolarize olan β hücrelerden insülin sekresyonu uyarılmış olur¹⁶⁶. İnsülin sekresyonunu uyarmaları nedeniyle kullanımlarına bağlı olarak hipoglisemi ve kilo artışı görülebilmektedir¹⁶⁷.

K_{ATP} kanallarının organizmada yaygın dağılım göstermesi nedeniyle sülfonilürelerin pankreas dışı etkileri de bulunmaktadır¹⁶⁸. Sülfonilüre grubu insülin salgılatıcı ilaçlardan glibenklamid, glüklazid, glimepid ve glipizid ülkemizde ruhsat almıştır. Ayrıca yapıcı sülfonilürelere benzemeyen fakat sülfonilüre grubu antidiyabetik ilaçlar gibi K_{ATP} kanal inhibisyonu ile insülin salgılatıcı etkiye sahip olan repaglinid ve nateglinid de klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.3.2.4 α -Glukozidaz İnhibitörleri

α -Glukozidaz inihibitörleri, ince barsak fırçası kenar (brush-border) enzimlerinden α -glukozidazı inhibe ederek di-,oligo- ve poli-sakkaritlerin monomerlerine hidrolizini engellerler. Bu sayede glukoz absorpsiyonu ve kan glukoz düzeyleri azalmış olur. Ayrıca bu grup ilaçlar bilinen etki mekanizmalarına ek olarak GIP ve GLP-1’in sekresyonunu modifiye etmektedirler. Fakat bu etkinin bu grup ilaçların terapötik etkinliğindeki rolü net olarak bilinmemektedir⁴⁹. Bu grup ilaçlardan miglitol, akarboz ve vogliboz ülkemizde ruhsat almıştır. α -Glukozidaz inhibitörleri GİS yan etkileri dışında güvenli kabul edilen ilaçlardır¹⁶⁹.

2.2.3.2.5 İncretin Bazlı İlaçlar

GIP ve GLP-1 hormonları fizyolojik koşullarda barsaktan kaynaklanan inkretin etkiyi oluşturmaktadırlar. Normal sağlıklı bireylerde inkretin etki esas olarak GIP aracılığıyla ortaya çıkmaktadır. Fakat T2DM’de pankreas β hücreleri GIP’e duyarsız hale gelmekte ve neticede GIP’in insülinotropik etkisi ortadan kalkmaktadır. GLP-1’in insülinotropik etkisi ise T2DM’de korunmaktadır. Bu nedenden ötürü T2DM tedavisinde GIP yerine GLP-1 temelli inkretin-mimetik yaklaşım benimsenmektedir⁴⁹. Bu grup ilaçlardan ülkemizde ruhsatlı olarak GLP-1 agonistleri olan eksenatid, liraglutid, dulaglutid, liksisenatid ile GLP-1 ve GIP’ın yıkımından sorumlu DPP-4

enziminin antagonistleri alogliptin, linagliptin, saksagliptin, sitagliptin ve vildagliptin bulunmaktadır. GLP-1 aktivitesinin glukoz homeostazı üzerine olan bilinen etkilerinin yanı sıra nöroprotektif¹⁷⁰ ve endotel düzeyinde olumlu kardiyovasküler etkilerinin olduğu da bilinmektedir¹⁷¹. İncretin-mimetik tedavinin akut pankreatit, pankreatik karsinoma, medüller tiroid karsinoma riskinde artışa neden olabileceği düşünülmüşse de böyle bir risk artışı klinik araştırmalarda net olarak ortaya konulabilmiş değildir¹⁷².

2.2.3.2.6 Sodyum-Glukoz Ko-transporter-2 (SGLT2) İnhibitörleri

SGLT2 inhibitörleri, nefron proksimal tübülünde yer alan ve glukozun reabsorpsiyonundan sorumlu olan SGLT2'yi inhibe ederek antidiyabetik etkinlik göstermektedirler. SGLT2 inhibitörleri hipergliseminin engellenmesinin yanı sıra kilo vermeye de yardımcı olmaktadır. Bu grup ilaçlar insülin sekresyonunu uyarmamalarından ötürü hipoglisemi açısından düşük riskli kabul edilmektedirler. Artan glukozüri nedeniyle ilacı kullanan hastalarda idrar yolları enfeksiyonu görülme sıklığı artmaktadır⁴⁹. Bu grup ilaçlardan dapagliflozin ve empagliflozin ülkemizde ruhsat almıştır.

2.2.3.2.7 İnsülin

İnsülin T2DM hastalarında insülin dışı anti-hiperglisemik ilaçlarla hedeflenen glisemik kontrolün sağlanamaması [örn. HbA1C $\geq$ %10 (86 mmol/mol) ve/veya glisemi $\geq$ 300 mg/dl], insülin eksikliğini düşündüren bulgular (aşırı kilo kaybı, aşırı hipertrigliseridemi ve ketozis), ağır hiperglisemik semptomlar (poliüri, polidipsi), hiperglisemik aciller (diyabetik ketoasidoz, hiperozmolar hiperglisemik durum), akut Mİ, akut, ateşli ve sistemik hastalıklar, major cerrahi operasyonlar, gebelik ve laktasyon, ağır karaciğer ve böbrek yetersizliği, insülin dışı antihiperglisemik ilaçlara alerji ve ağır yan etkiler, klinik olarak ciddi insülin direnci, uzun süreli yüksek doz kortikosteroid kullanımı durumlarında insülin tercih edilmektedir. İnsülin tedavisi ile hipoglisemi, kilo artışı, enjeksiyon yerinde kanama, sızma ve ağrı, ödem, lipohipertofi, lipoatrofi vb. yan etkiler görülmektedir¹⁴⁹.

2.2.4. T2DM Komplikasyonları

Diyabette görülen yüksek kan glukozu düzeyi, artmış oksidatif stres ve düşük yoğunluklu inflamasyon damar sağlığını olumsuz etkilemektedir. Sonuç olarak diyabete bağlı olarak mikrovasküler (retinopati, nöropati, nefropati) ve makrovasküler

komplikeasyonlar ortaya çıkmaktadır. Moleküler düzeyde diyabetin damar üzerine olan olumsuz etkilerine artmış oksidatif stres, polyol ve heksozamin yolağının akışında artış, PKC aktivasyonu ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) üretimindeki artış kaynaklık etmektedir. Sonuç olarak makromoleküllerin yapı ve fonksiyonlarında değişim gerçekleşmesi, metilglioksal ve sorbitol gibi bazı toksik metabolitlerin birikmesi ve proinflatuvar sitokin [(TNF α , IL-1 β , IL-6, siklooksijenaz 2, monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1)], pro-fibrotik [(transforme edici büyüme faktörü- β (TGF β), kolajen)], ve protrombotik [plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1)] proteinlerin upregüle olmasına bağılı olarak damar yapı ve fonksiyonunda bozulma gerçekleşmektedir¹⁷³. Diyabetin makrovasküler komplikeasyonları T2DM ile KVS hastalıkları ilişkisi açısından temel oluşturmaktadır.

2.2.5. T2DM ile KVS Hastalıklarının İlişkisi

KVS hastalıkları, koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, romatizmal kalp hastalığı, konjenital kalp hastalığı, derin ven trombozu ve pulmoner embolizmi içeren kalp ve damar sistemi hastalıklarıdır. DSÖ verilerine göre 2017 yılında dünyada 17.9 milyon kişi KVS hastalıkları nedeniyle hayatını kaybetmiştir. Bu sayı 2017 yılında tüm ölümlerin %31'ini oluşturmakta ve KVS hastalıklarına bağılı ölümleri dünyadaki 1 numaralı ölüm nedeni haline getirmektedir¹⁷⁴.

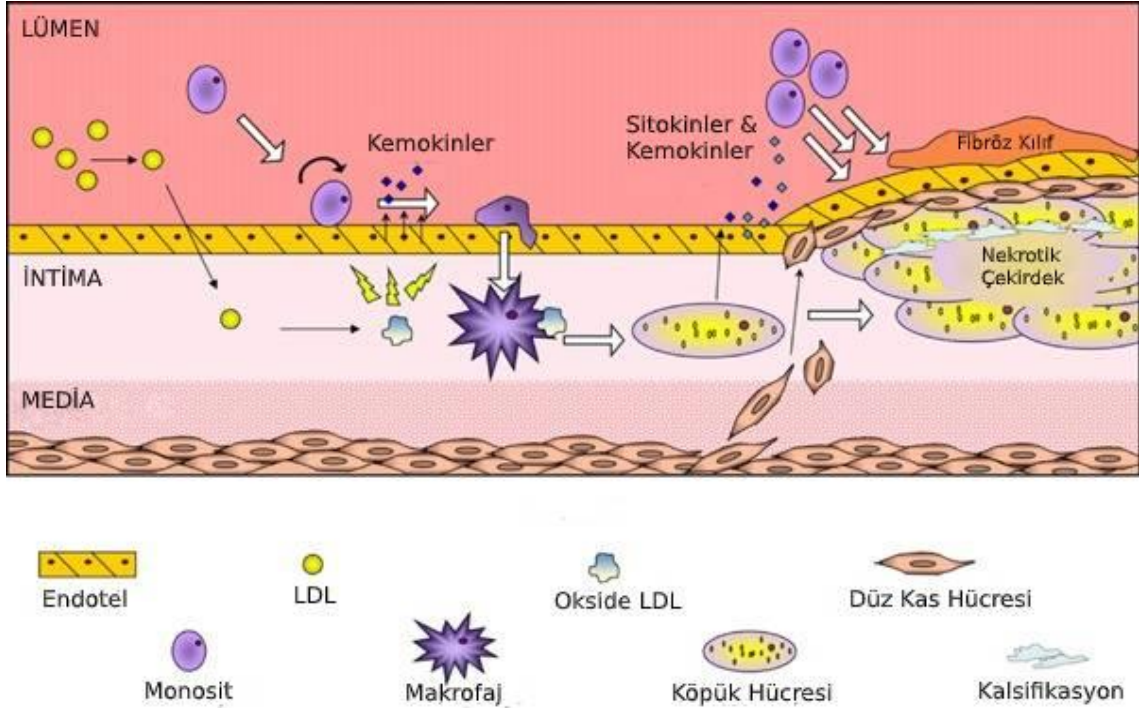
Yapılan epidemiyolojik çalışmalar T2DM ile KVS hastalıkları arasında yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymaktadır. T2DM hastalarının %32.2'sinde KVS hastalıkları ortaya çıkmaktadır ve bu hastalıklar T2DM'li hastalarda ölümlerin %50'sinden sorumludur¹⁷⁵. T2DM'li hastaların normal popülasyona göre yaş, sigara kullanımı, VKİ ve sistolik kan basıncı gibi bilenen kardiyovasküler risk faktörlerinden bağımsız olarak KVS hastalık riski 2 kattır¹⁷⁶. Ayrıca T2DM hastalarında KVS hastalıkları ortalama olarak 14.6 yıl önce ortaya çıkmaktadır¹⁷⁷. T2DM ile kardiyovasküler hastalık ilişkisinin mekanizması incelendiğinde, aterosklerozun bu ilişkide temel bir role sahip olduğu görülmektedir.

2.2.5.1. Ateroskleroz

Ateroskleroz, damar duvarında yağ birikimi ve aterom plak oluşumu neticesinde kan akımının kısıtlanması ile karakterize inflamatuvar bir hastalıktır. Oluşan aterom plağı süreç içerisinde unstabil hale gelebilmekte, rüptür sonucunda trombüs ve emboliye

neden olarak daha ciddi bir akım kısıtlamasıyla sonuçlanabilmektedir. Akım kısıtlaması ise doku ve organlarda iskemik hasarın ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Ateroskleroz süreci subendotelyal alanda lipoproteinlerin birikimi ile tetiklenmektedir. Subendotelyal alana lipoprotein birikimi dolaşımdaki lipoprotein konsantrasyonu, subendotelyal matriks proteinleri ve risk faktörleri (hipertansiyon, sigara kullanımı, diyabet, stres ve genetik yatkınlık) ile yakından ilişkilidir. Biriken lipoproteinler okside olurlar. Okside lipoproteinler daha sonra endotel hücrelerden monosit adezyon moleküllerinin serbestlenmesine neden olur. Salınan kemoatraktan moleküller ile monosit birikmesi olur ve biriken monositler makrofaja dönüşürler. Makrofajlar ise reseptör-aracılı olarak okside lipoproteinleri hücre içine almaya başlar. Bu sayede makrofajların lipid içeriği artar ve hacimce büyüyerek köpük hücrelerine dönüşürler. Bu süreç esnasında ayrıca endotel hasarı oluşur ve endotel disfonksiyonel hale gelir. Makrofajların birikimi ve köpük hücresi oluşumu plak oluşumu sürecini başlatmaktadır. Aterom plağı ilk aşamada ağırlıklı olarak köpük hücrelerinden meydana gelirken sonraki aşamalarda makrofajlar, T lenfositler, endotel hücreleri, trombositler ve salınan kemoatraktanlar nedeniyle luminal yüzeye göç eden ve proliferen olan damar düz kas hücreleri plakta yer almaya başlar. Aynı zamanda kolajen sentezinde de artış gözlenir. Süreç içerisinde inflamatuvar ve nekrotik süreçler aterom plağını instabil hale getirir. Aktive olmuş makrofajlardan salınan proteolitik enzimler ile plakta bulunan damar düz kas hücrelerin apoptozu plağı instabil hale getiren faktörlerdir. Instabil hale gelmiş plakta gerçekleşen yırtılma sonucunda açığa çıkan kolajen, trombositleri aktive eder. Ayrıca makrofajlarda ve damar düz kas hücrelerde üretilen doku faktörü koagülasyon kaskadını aktive etmektedir. Sonuçta meydana gelen trombotik süreç lümenin daralmasına ve kan akımının kısıtlanarak iskemi oluşmasına neden olur¹⁷⁸. Ateroskleroz sürecinin gelişimi şematik olarak Şekil 2-4'te gösterilmiştir.



Şekil 2-4: Ateroskleroz Sürecinin Şematik Gösterimi- Zaid 2017'den değiştirilerek

T2DM ile damarda moleküler düzeyde meydana gelen değişimler aterosklerotik sürece birçok yönden katkıda bulunmaktadır. T2DM ile oluşan AGE'ler monosit migrasyonunu ve makrofaja dönüşümünü, makrofajlardan sitokin salımını, ekstraselüler matriks, doku faktörü ve VEGF üretimini artırmaktadır. Ayrıca endotelin-1 (ET-1) üretiminde artışa ve nitrik oksit (NO) üretiminde ise azalmaya neden olmaktadır. Bunun dışında AGE'ler monositlerde dışa atım pompasını inhibe ederek hücre dışında kolesterol atımını bloke etmektedir¹⁷⁹. Glikozillenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) makrofajlar tarafından alınmasının köpük hücresi oluşumuna neden olduğu bilinmektedir¹⁸⁰. Ayrıca diyabetik hastaların aterom plaklarında AGE reseptörlerinin ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir¹⁸¹. Diyabet indüklenmiş apolipoprotein E (ApoE) knock-out farelerde solübl AGE reseptörü uygulamasının ateroskleroz gelişimini baskıladığı bildirilmiştir¹⁸².

AGE'ler dışında polyol yolağındaki aktivasyonun da ateroskleroz sürecine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Polyol yolağı AGE üretimini artırmaktadır. Ayrıca nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) düzeyindeki azalmaya bağlı olarak glutatyon üretiminin azalmasına dolayısıyla oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır. Nikotinamid adenin dinükleotit artışı ise gliserol 3 fosfat seviyesini artırarak

PKC seviyesinin artmasına neden olur¹⁷⁹. ApoE knock-out farede polyol yolağı aktive edildiğinde ateroskleroz gelişiminin hızlandığı bildirilmiştir¹⁸³.

PKC aktivasyonu ateroskleroz ile ilgili bir başka yolaktır. PKC aktivasyonu vasküler permeabiliteyi artırmaktadır¹⁸⁴. Ayrıca endotel disfonksiyonuna neden olarak NO üretiminde ve vazodilatasyonda azalmaya neden olmaktadır¹⁸⁵. PKC aktivasyonu NO üretimindeki azalmaya ek olarak VEGF, hücreler arası adezyon molekül-1, ET-1 ve PAI-1 gibi aterosklerotik süreçte önemli rol oynayan moleküllerin düzeylerini artırır¹⁷⁹. ApoE knock-out farede PKC inhibisyonunun aterosklerotik süreci baskıladığı bildirilmiştir¹⁸⁶.

Oksidatif stres aterosklerotik sürecin önemli bir parçasını oluşturmaktadır. Hiperglisemi koşullarında yüksek glukoz düzeyleri glikolizi ve süperoksit üretimini artırmaktadır. Reaktif oksijen türleri (ROS) yağ, protein ve nükleik asitlerin yapısını bozarak hasar oluşturma potansiyeline sahiptir. Ayrıca ROS, inflamasyon, endotel disfonksiyonu, trombojenez, plak instabilitesi ile damar düz kas hücre migrasyonu ve proliferasyonunu uyarmaktadır. Bunların dışında ROS, AGE üretimi ve PKC aktivasyonunu da artırır. Vasküler hücre adezyon molekül-1, MCP-1, VEGF ve sitokin ekspresyonlarını artırması ROS ile aterosklerotik süreç ilişkisinin bir başka boyutunu oluşturmaktadır¹⁷⁹.

2.2.6. T2DM Deneysel Hayvan Modelleri

T2DM'nin patojenezinin ve patofizyolojisinin anlaşılması amacıyla farklı hayvan türleri kullanılarak deneysel diyabet modelleri oluşturulmaktadır. Bu amaçla kullanılan hayvanlara, memeli olmayan hayvanlar (zebrafish, meyve sineği, *C. elegans*), kemirgenler (fare, sıçan), büyük memeliler (domuz, köpek) ve primatlar örnek olarak verilebilir. T2DM deneysel hayvan modelleri, kullanılan hayvan türüne ve diyabetin indüklenme şekline göre farklı avantajlara ve dezavantajlara sahiptirler. Büyük memeliler ve primat modellerinin translasyonel gücü fazlayken; erişim ve bakım zorluğu vb. faktörler kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Kemirgen modelleri ise hem genetik manipülasyona imkan vermeleri hem de kemirgenlerin bakım ve eldesinin kolay olması nedeniyle araştırmacılar tarafından en sık tercih edilen modeller olmuşlardır¹⁸⁷.

Kemirgen T2DM modelleri içerisinde genetik modeller önemli bir yer tutmaktadır. Leptin geni mutant ob/ob fare, leptin reseptör geni mutant db/db fare ve Zucker Diabetic Fatty sıçan, monojenik T2DM modellerini oluşturmaktadırlar. Bu

modellerde hiperfaji ile birlikte obezite görülmekte bunun sonucunda hiperinsülinemi ve hiperglisemi izlenmektedir. Her ne kadar bu modellerin T2DM'nin doğal seyrini iyi yansıttığı düşünülse de insan T2DM'sinin monojenik olmaması nedeniyle bu modellerin klinik durumu yansıtmaya güçleri zayıftır. Monojenik T2DM modellerinin yanı sıra klinik durumu daha iyi yansıttığı düşünülen polijenik T2DM modelleri de mevcuttur. Bu modellerde mutant genlerdeki çeşitliliğe ve farklılığa bağlı olarak T2DM'nin birçok farklı boyutunu değerlendirmek mümkün olmaktadır. Bu önemli avantajına rağmen polijenik modellerde yabanıl tip (wild-type) kontrol bulunmaması önemli bir dezavantajdır. KK fare, OLETF sıçan, NZO fare, TallyHo/Jng fare, NoncNZO10/LtJ fare polijenik kemirgen T2DM modellerine örnek olarak verilebilir. Bu modeller dışında insan adacık amiloid polipeptidini eksprese eden transjenik hIAAP fare de genetik T2DM modelleri arasında sayılmaktadır. Glukoz toleransı düşük Wistar sıçanların nesiller boyunca çiftleştirilmesi ile elde edilmiş GK sıçanlarda obezite görülmemesine karşın glukoz intoleransı ve glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunda bozulma gözlenmektedir. Bu model insülin direncinin olmadığı, T2DM'nin insülin sekresyonundaki bozulmadan kaynaklandığı diyabet durumunu taklit etmek için sıklıkla tercih edilmektedir¹⁸⁷.

T2DM'nin yüksek yağ içeren diyet ve/veya β hücre toksini olan streptozotosin (STZ) ile indüklendiği modeller, uygulama kolaylığı ve erişebilirlik açısından öne çıkmaktadır. Bu modeller ayrıca deneysel çalışmanın amaçları doğrultusunda modifiye edilebilme imkanına sahiptir. C57BL/6 farelerin yüksek yağlı (%58) diyet ile beslenmesi ile birlikte kilo artışı ve insülin direnci görülmekte ve bunun sonucunda glukoz toleransında bozulma gözlenmektedir¹⁸⁸. Sıçanlarda ise yüksek yağlı diyetle ilave olarak STZ ile β hücre kaybı oluşturulmaktadır. Deneysel T2DM modeli olarak sık kullanılan bu model HFD/STZ T2DM modeli olarak isimlendirilmektedir¹⁸⁹.

2.2.6.1. HFD/STZ T2DM Modeli

İlk kez Reed ve ark.¹⁹⁰ tarafından erkek Sprague Dawley sıçanlarda uygulanmış olan HFD/STZ T2DM modeli ile T2DM'nin patojenezini birçok açıdan taklit edilmeye çalışılmaktadır. Bu modelde STZ uygulaması öncesinde sıçanlar belirli bir süre yüksek yağlı diyet ile beslenerek hiperinsülinemi, insülin direnci ve/veya glukoz intoleransı oluşturulmaktadır. Ardından STZ uygulaması ile sıçanlarda β hücre kaybı

indüklenmektedir. Sonuç olarak T2DM'nin doğal seyri ile oluşan insülin direnci ve hiperglisemi durumu daha kısa bir zaman diliminde ortaya çıkmaktadır.

HFD/STZ T2DM modelindeki temel yaklaşım ortak olmakla birlikte literatürde modelin uygulandığı çalışmalar modele ait bileşenler açısından değişkenlik gösterebilmektedir. Model, Sprague Dawley soyu sıçanlarda kullanıldığı gibi Wistar soyu sıçanlarda da kullanılmaktadır. STZ uygulaması öncesi yüksek yağlı diyet uygulamasının süresi de çalışmalar arasında farklılık göstermektedir. İnsülin direncinin oluşturulabilmesi için görece kısa süre (>2 hafta) yeterli olurken, belirgin bir kilo artışının istendiği durumlarda daha uzun süreli (>3 ay) yüksek yağlı diyet uygulaması tercih edilmektedir. Diyet içeriğinin yağ oranı da çalışmalar arasında farklılık gösterebilmektedir. Bazı çalışmalarda kalori cinsinde %45 yağ içeren “batı tarzı diyet” uygulanırken bazı çalışmalarda ise %60'lık diyet kullanılmaktadır. Yüksek yağlı diyetlerde yağın hayvansal kaynaklı olması tercih edilmektedir. Diyet ile insülin direnci oluşabilmesi için ayrıca diyetle karbonhidrat olarak sükröz ve fruktoz gibi basit şekerler yer almaktadır. STZ uygulaması için genellikle 15-50 mg/kg aralığında STZ miktarları tercih edilebilmektedir. Tek seferlik STZ uygulaması yaygın olarak kullanılmakla birlikte çoklu doz STZ uygulaması yapılan çalışmalar da literatürde mevcuttur. STZ uygulaması intraperitoneal (i.p.) veya i.v. yoldan yapılabilmektedir¹⁸⁹.

HFD/STZ T2DM modelinin özellikleri incelendiğinde, bu modelde hiperglisemiye ilave olarak T2DM'de karakteristik olarak gözlenen yüksek trigliserit ve total kolesterol düzeyleri ile azalmış plazma insülin düzeyi gözlenmektedir¹⁹¹. Bu modelin ayrıca organ bazında etkilerinin incelendiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır. HFD/STZ T2DM modeli ile sıçan karaciğerinde ROS, trigliserit ve oksidatif stres belirteci olan malonildialdehid (MDA) seviyelerinde artış görülmüştür. Oksidatif streste artışa paralel olarak ayrıca karaciğerde protein oksidasyonu ürünlerinde de artış gözlenmiştir. Yine aynı çalışmada karaciğer histopatolojik olarak değerlendirilmiş ve HFD/STZ T2DM modelinde karaciğer steatozu gözlenmiştir¹⁹². Yapılan başka bir çalışmada da bu model ile karaciğerde oksidatif stresin arttığını tespit edilmiştir¹⁹³. HFD/STZ T2DM modeli karaciğerde olduğu gibi kalpte de yağ infiltrasyonunu artırmaktadır¹⁹⁴. Bu modelin ayrıca diyabetik kardiyomiyopati oluşturmak için kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur. Yapılan bir çalışmada sıçanlarda STZ enjeksiyonundan sonra 16 haftalık sürenin ardından sol ventrikül disfonksiyonunun

oluştugu gözlenmiştir¹⁹⁵. Yapılan başka bir çalışmada da bu model ile 48 haftalık sürenin sonunda sıçanlarda kardiyak hasar oluşumu fonksiyonel ve histopatolojik açıdan doğrulanmıştır¹⁹⁶. Oluşan kardiyak hasarın mekanizmasında azalmış otofajinin¹⁹⁷, artmış AGE üretiminin¹⁹⁸ rolü olduğu ileri sürülebilir. HFD/STZ T2DM modeli ayrıca adipoz doku üzerine de etkilere sahiptir. Bu modelin visceral adipoz dokuda (VAD) yağ birikimi¹⁹⁹ ve hipertrofiye²⁰⁰ neden olduğu gösterilmiştir. HFD/STZ T2DM modelinin adipoz doku üzerine olan etkilerinden bir diğeri ise inflamasyondaki artıştır. Buna göre bu model ile VAD'da proinflamatuvar sitokin²⁰¹ ve iNOS²⁰² mRNA düzeyleri artmaktadır. Adipoz dokudaki adipokin kompozisyonu da model ile oluşturulan T2DM patolojisinde değişim göstermekte ve leptin düzeyi artarken²⁰³, vaspın ve adiponektin düzeyleri azalmaktadır²⁰⁴. Modelin PVAD'daki etkilerine dair ise herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir.

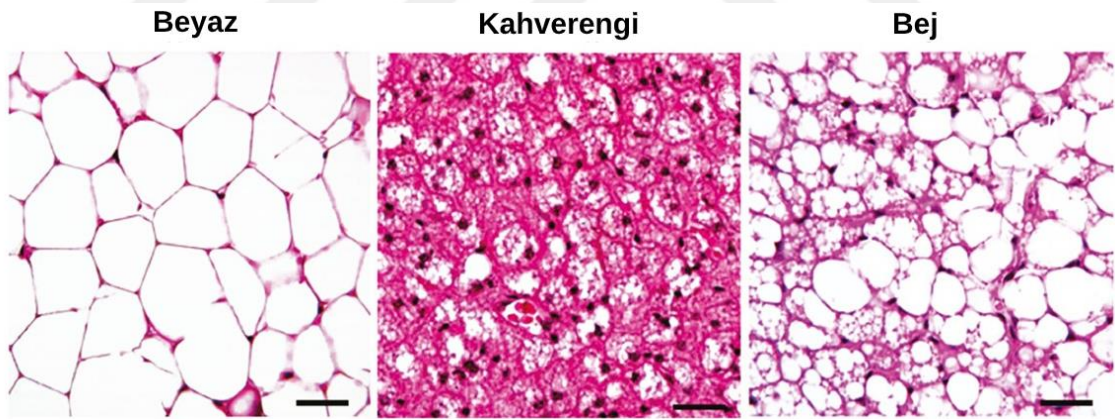
HFD/STZ T2DM modeli, diyabetin makrovasküler komplikasyonlarının ve tedavi seçeneklerinin değerlendirilebilmesi açısından elverişli bir modeldir. Bu modelin sıçanlarda damar yeniden şekillenmesi²⁰⁵, sertliği^{206,207}, inflamasyon²⁰⁸ kalsifikasyonuna^{209,210} neden olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Damar kalsifikasyonundan artmış AGE üretimi ve AGE reseptör sinyalizasyonunun sorumlu olduğu iler sürülmüştür²¹⁰. Bu model ile ayrıca damar düz kas hücre proliferasyonunda artış olduğu görülmüştür²¹¹. Yapılan bir çalışmada bunlara ek olarak HFD/STZ T2DM modeli ile torasik aorta kalınlığının arttığı ve aortada vazokonstriktör bir endojen madde olan ET-1 düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir²¹².

HFD/STZ T2DM modelinin damar fonksiyonu üzerine olan etkileri de yapılan birçok çalışma ile ortaya konmuştur. Bu modelin sıçan torasik aortasında^{193,213}, mezenterik arterinde²¹⁴, epinöral arteriyolünde²¹⁵ endotel-aracılı gevşeme yanıtlarını azalttığı gösterilmiştir. Bu modelin farelerde kullanıldığı bir çalışmada koroner arterde endotel-aracılı gevşeme yanıtlarının azaldığı tespit edilmiştir²¹⁶. Gevşeme yanıtlarının bozulmasına ek olarak bu hastalık modelinde damarların kastırıcı ajanlara olan yanıtlarında artış meydana gelmektedir. Sıçan torasik aortasında fenilefrin²¹⁷ ve anjiyotensin-II'nin²¹⁸ oluşturduğu kasılma yanıtlarının HFD/STZ T2DM modelinde arttığı gösterilmiştir. T2DM'nin neden olduğu vasküler hasarı ve fonksiyon bozukluğunu iyi yansıtmaması nedeniyle HFD/STZ T2DM modeli diyabetin

makrovasküler komplikasyonlarının değerlendirilebilmesi açısından oldukça elverişli bir modeldir.

2.3. Adipoz Doku

Adipoz doku, organizmada enerji fazlasının trigliserit şeklinde depolandığı gevşek bağ dokusu yapısıdır. Enerji homeostazında rol almasının yanı sıra ısı üretimi ve yalıtımı, etrafında yer aldığı organları mekanik olarak koruma vb. işlevleri de bulunmaktadır. Yapısı, temel görevi trigliserit depolamak olan adipositler ve farklı hücre tiplerini içeren stromal vasküler fraksiyondan oluşmaktadır. Bu hücre tipleri arasında preadipositler, makrofajlar, kök hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar sayılabilir²¹⁹. Yapıda ayrıca kan damarları, kolajen ve elastik lifler de bulunmaktadır². Adipoz doku memelilerde temel histolojik özelliklerine, içerdikleri adiposit tipi ve bununla ilişkili olarak işlevlerine göre beyaz adipoz doku, kahverengi adipoz doku ve bej adipoz doku olarak üçe ayrılmaktadır. Beyaz, kahverengi ve bej adipoz dokunun ışık mikroskopi görüntüleri Şekil 2-5'te gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Beyaz, Kahverengi ve Bej Adipoz Dokunun Işık Mikroskopi Görüntüsü- Bargut 2017'den alınmıştır.

Örnekler hemotoksilen & eozin ile boyanmış olup aynı büyütme oranı kullanılmıştır. Siyah bar 50 µM uzunluğa karşılık gelmektedir.

2.3.1. Beyaz Adipoz Doku

Beyaz adipoz dokunun esasını teşkil eden beyaz adipositler, sitoplazmasının önemli bir kısmını büyük tek bir yağ damlacığının kapladığı uniloküler hücrelerdir. Beyaz adipositlerde hücre çekirdeği hücrenin merkezinde değil kenarlarında yer

almaktadır. Yağ deposu işlevleri ile uyumlu olarak beyaz adipositler vücutta yer alan hücrelerin en büyüklerindendir. Beyaz adipoz doku vücutta anatomik lokasyon ve bununla bağlantılı olarak işlevlerine göre ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan ilki metabolik olarak aktif organların etrafında bulunan ve temel görevi bu organlara enerji sağlamak olan viseral (omental, mezenterik, retroperitoneal, gonadal ve perikardiyal) adipoz dokudur²²⁰. Diğer beyaz adipoz doku çeşidi olan subkütan adipoz doku ise özellikle abdominal, femoral ve gluteal bölgede yerleşim göstermekte ve ısı yalıtımı, mekanik koruma işlevlerini üstlenmektedir.

2.3.2. Kahverengi Adipoz Doku

Kahverengi adipoz dokunun esasını teşkil eden kahverengi adipositler, beyaz adipositlerden farklı olarak multilokülerdir. Embriyolojik olarak mezodermde *Myf5* ve *Pax7* eksprese eden hücrelerden köken aldıkları öne sürülmektedir²²¹. Yapıda çok miktarda mitokondri ve mitokondri iç zar proteini olan uncoupling protein 1 (UCP-1) bulunmaktadır. UCP-1 proteini oksijenli solunum esnasında açığa çıkan ısıdan sorumludur. Bu sayede kahverengi adipoz doku depolanmış enerjiden ısı üretimi ve ısının yayılması fonksiyonlarını yerine getirir²²². Yenidoğanda esas olarak interskapular alanda bulunmaktadır. Önceleri erişkinlerde bulunmadığı düşünülen kahverengi adipoz dokunun erişkinlerde de olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur²²¹. Kemirgenlerde ise başta interskapular bölge olmak üzere servikal, mediastinal, perikardiyal ve perirenal bölgede bulunmaktadır²²³. Kahverengi adipoz dokunun obezite ve ilişkili metabolik hastalıklarda koruyucu rolü olduğu hem kemirgenlerde²²⁴ hem de insanda²²⁵ gösterilmiştir.

2.3.3. Bej Adipoz Doku

Bej adipoz doku sahip olduğu zengin mitokondri ve UCP-1 içeriği ile kahverengi adipoz doku ile benzer özelliklere sahiptir. Kemirgenlerde beyaz adipoz dokudan β -3 agonistler ve soğuk ile stimüle olmaktadır²²⁶. Yapısal olarak yüksek miktarda UCP-1 transkripte eden kahverengi adipoz dokudan farklı olarak bej adipoz dokuda UCP-1 miktarı uyarı ile artmaktadır²²⁷. β -3 agonist ve soğuk ile stimülasyon ile beyaz adipositlerin bej adipositlere dönüşümünün obeziteye karşı koruyucu rolü olduğu bildirilmektedir²²⁸.

2.3.4. Adipokinler

Adipoz doku, enerji deposu olma ve ısı üretimi fonksiyonlarının yanında yapısından salınan biyoaktif peptidler “adipokinler” vasıtasıyla otokrin, parakrin ve endokrin organ özelliği göstermektedir. Adipsin ismi verilen adipokinin keşfinden²²⁹ bu yana yapılan çalışmalar adipoz dokunun 600 civarında adipokine kaynaklık ettiğine işaret etmektedir²³⁰. Adipoz dokudan salınan adipokinlerin kaynağının yalnızca adipositler olmadığı dokuda bulunan endotel hücrelerin, makrofajların, lenfositlerin, nötrofillerin, fibroblastların da adipokin kaynağı olduğu bildirilmektedir²³¹. Adipokinler sistemik olarak; immün yanıt (adipsin, açılasyon stimüle edici protein, serum amiloid A3), inflamasyon [interlökin -1 β , -6, -8, -10, TNF- α , C-reaktif protein, MCP-1, resistin, progranülin ve kemerin], glukoz metabolizması (leptin, adiponektin, DPP-4, FGF21, resistin, vaspin, anjiyopoietin benzeri protein 8), insülin duyarlılığı (leptin, adiponektin, kemerin, retinol bağlayıcı protein 4 ve omentin), insülin sekresyonu (apelin ve nesfatin-1), kan basıncı (apelin, anjiyotensinojen), myokard kontraktilitesi (yağ asidi bağlayıcı protein 4), hücre adezyonu (PAI-1), VEGF, adipojenez ve kemik morfojenezi (kemik morfogenetik protein -4, -7), büyüme (IGF-1, TGF β ve fibronektin), lipid metabolizması (solübl CD36 ve apelin), karaciğerde lipid birikimi (fetuin-A), doyumluk hissi ve açlığın regülasyonu (leptin ve vaspin) vb. fizyolojik olayları düzenlediği bildirilmektedir²³². Adipokinlerin sistemik etkilerinin yanı sıra adipoz doku üzerine otokrin ve parakrin etkileri de bulunmaktadır. Buna göre adipokinlerin adipoz dokuda adipojenezi, adipoz dokuya immün hücre migrasyonunu, adiposit metabolizma ve fonksiyonunu modüle ettiği gösterilmiştir^{232,233}.

2.3.5. KVS Hastalıklarında Adipoz Dokunun Değişen Rolü

KVS hastalıklarının patojenezinde ve patofizyolojisinde adipoz doku miktarı ve fonksiyonundaki değişimlerin önemli rolleri bulunmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar VAD miktarının ateroskleroz²³⁴, damar sertliği²³⁵, hipertansiyon²³⁶ ile ilişkili olduğuna işaret etmektedir. VAD’ın yanı sıra epikardiyal adipoz doku miktarı da karotid arter²³⁷ ve koroner arterde²³⁸ plak oluşumu, hipertansiyon²³⁹, atriyal fibrilasyon²⁴⁰ ile ilişkilidir. Yapılan bu epidemiyoloji çalışmaları ilişkinin nedenselliğini değerlendirme imkanı sunmamaktadır. Olası nedensel ilişkiyi aydınlatmak için yapılmış bir mendelian randomizasyon çalışmasında genel ve santral adipoz doku artışıyla koroner arter hastalığı ve T2DM arasında nedensel bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir²⁴¹.

KVS hastalıkları açısından risk faktörleri olan obezite, insülin direnci ve T2DM’de adipoz dokunun yapı ve fonksiyonunda değişiklikler gözlenmektedir. Yüksek kalori alımı durumunda adipositlerde hiperplazi ya da hipertrofi görülebilmektedir. Genel anlamda miktarı yüksek kardiyometabolik risk ile ilişkilendirilen VAD’da adiposit hipertrofisi yaygın olarak görülürken düşük riskli kabul edilen SAD’da hiperplazi daha baskındır^{242,243}.

Bahsi geçen metabolik hastalıklarda adipoz dokuda inflamasyon da gözlenmektedir. İnflamasyon neticesinde adipoz dokudaki inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler adipoz dokunun çevresinde yer aldığı dokunun fonksiyonunu etkilemektedir. Ayrıca bu sitokinler adipositlerden salınan adipokinlerin kompozisyonunu da değiştirmektedirler. Sonuç olarak adipoz doku inflamasyonunun adipoz dokunun işlevi üzerine önemli bir etkisi bulunmaktadır²⁴⁴.

Adipoz dokunun sahip olduğu adiposit fenotipinin de KVS hastalıkları açısından önemi bulunmaktadır. Kahverengi adipoz dokunun beyaz adipoz dokuya göre metabolik hastalıklar ve KVS hastalıkları açısından daha olumlu bir profile sahip olduğu düşünülmektedir. Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar da bu görüşü desteklemektedir. Kahverengi adipoz doku miktarının olumlu metabolik profil ve düşük obezite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir²⁴⁵. Yapılan bir çalışmada ise kahverengi adipoz doku transplantasyonu yapılan farelerde insülin duyarlılığının arttığı, glukoz intoleransının azaldığı gözlenmiştir²⁴⁶. Katekolamin ile indüklenmiş kardiyomiyopati modeli kullanılan bir başka çalışmada UCP1 knock-out farelerde kardiyomiyosit hasarı artmış ve sağkalım azalmıştır. Bu farelere wild-type farelerden kahverengi adipoz doku transplantasyonu yapılması ise bahsi geçen olumsuz etkileri ortadan kaldırmıştır²⁴⁷.

KVS hastalıklarında adipoz dokunun değişen rolünün değerlendirilmesinde en kritik bileşen adipokinlerdir. Adipokinler üstlendikleri önemli fizyolojik rollerin yanı sıra KVS hastalıkları başta olmak üzere birçok hastalığın patojenezinde ve patofizyolojisinde önemli yerler tutmaktadır²⁴⁸. Adipoz dokuda en fazla eksprese edilen adipokin olan adiponektin, KVS hastalıklarında rolü en fazla incelenmiş adipokinlerin başında gelmektedir. Gerek *in vitro* ve hayvan çalışmalarından elde edilen prelinik bulgular, gerekse de klinik çalışmalardan elde edilen veriler birçok KVS hastalığında adiponektinin belirgin rolüne işaret etmektedir. Yapılan çalışmalar plazma adiponektin düzeyleri ile VKİ’nin negatif korelasyon gösterdiğine işaret etmektedir^{249,250}. Bu

çalışmalardan elde edilen sonuçlar obezitenin KVS hastalıkları için risk faktörü olması bağlamında önem taşımaktadır. Buna ek olarak hipertansiyonda adiponektinin rolünü araştıran pek çok çalışma da yapılmıştır. Örneğin hipertansif hastaların, normotansif bireylere göre daha düşük plazma adiponektin düzeylerine sahip oldukları ve plazma adiponektin düzeylerinde her 1µg/mL'lik azalmanın hipertansiyon riskinde %6'lık bir artış anlamına geldiği tespit edilmiştir²⁵¹. Bu çalışmaya paralel şekilde düşük adiponektin düzeylerinin hipertansiyon gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir²⁵². Düşük adiponektin düzeyleri ile hipertansiyon riski arasında epidemiyolojik çalışmaların gösterdiği bu ilişkinin mekanizması kesin olarak bilinmemektedir. Kan basıncı, total periferik damar direnci ve kalp debisi tarafından belirlenmektedir. Bu bağlamda adiponektinin damar düz kası üzerine gevşetici bir etkisi olduğu ve bu etkinin hem endotel-aracılı (NO sentezi), hem de K⁺ kanalları üzerinden olduğunu gösteren hayvan çalışmaları^{253,254} bu ilişkisinin mekanizmasına ışık tutmaktadır. Hipertansiyonun yanı sıra koroner arter hastalığında da düşük plazma adiponektin düzeylerinin risk faktörü olduğu gösterilmiştir²⁵⁵. Bununla uyumlu olarak yüksek plazma adiponektin düzeyinin MI riskinde azalmayla ilişkili olduğu tespit edilmiştir²⁵⁶. Adiponektin düzeyleri ile ateroskleroz arasında da ilişki bulunmaktadır. Anjina pectoris hastalarında düşük adiponektin seviyelerinin koroner ateroskleroz gelişimiyle bağlantılı olduğu gösterilmiştir²⁵⁷. Bununla birlikte stabil anjinası olan hastalarda yapılan bir çalışmada düşük adiponektin düzeylerinin koroner plak kompleksitesi ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir²⁵⁸. Adiponektinin KVS hastalıklarındaki rolü hayvan çalışmalarıyla da gösterilmiştir. ApoE knock-out farelerde yapılan çalışmalar adiponektinin ateroskleroz patojenezinde ve patofizyolojisindeki rolünü net bir şekilde ortaya koymaktadır. Adiponektini overekprese eden ApoE knock-out farelerde aterosklerotik lezyon oluşumu azalmıştır²⁵⁹. ApoE/adiponektin double knock-out farelerde ApoE knock-out farelere kıyasla daha ciddi bir ateroskleroz gelişimi gözlenmiştir²⁶⁰. Yine ApoE knock-out farelerde adiponektinin kateterle oluşturulmuş vasküler hasarda neointima oluşumunu azalttığı gözlenmiştir²⁶¹. Bu etkiden adiponektinin damar düz kas hücre proliferasyonunu azaltıcı etkisi²⁶² kısmen sorumlu görülebilir.

Adipoz doku ile kardiyovasküler hastalık ilişkisi açısından önem taşıyan bir diğer adipokin ise leptindir. 1950'lerden bu yana metabolizma çalışmalarında kullanılmakta olan ob farelerde ob geninin 1994 yılında pozisyonel klonlanması

gerçekleştirilmiş ve aynı genin insandaki homologu da gösterilmiştir²⁶³. Daha sonra bu genin kodladığı proteine Yunanca’da “zayıf” anlamına gelen “leptos” kelimesinden türetilmiş olan leptin ismi verilmiştir²⁶⁴. Esas olarak beyaz adipoz dokuda üretilen ve salınan 16 kDa büyüklüğündeki bu peptid hormon, hipotalamus, hipokampus ve beyin sapı üzerinde etki göstererek besin alımını azaltmakta, enerji kullanımını artırmaktadır²⁶⁵. Plazma düzeyi, beyaz adipoz doku miktarı ile korelasyon gösteren leptin bu yolla vücutta enerji depolanması için bir negatif geri-bildirim mekanizması işlevini görmektedir. Obezitede beyaz adipoz doku miktarında artışla birlikte plazma leptin düzeyleri de artmasına karşın²⁶⁶ negatif geri-bildirim mekanizması normal kilolu bireylerdeki gibi etkin bir şekilde çalışmamaktadır. Bu durum “leptin direnci” olarak isimlendirilmektedir. Leptin direncinin mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, sitokin sinyalizasyon supressörü 3 proteinin leptin sinyalizasyonunu inhibe ederek leptin direncine neden olduğu öne sürülmüştür²⁶⁷.

Epidemiyolojik çalışmalar obezite ile hipertansiyon arasında kuvvetli bir ilişki olduğunu göstermektedir²⁶⁸. Obezitede aynı zamanda hiperleptinemi görüldüğü göz önüne alındığında leptinin hipertansiyon gelişiminde doğrudan bir rolü olup olmadığı önem kazanmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar leptin düzeylerinin vücut kitlesinden bağımsız olarak hipertansiyon gelişimine işaret edebileceğini göstermektedir^{269,270}. Leptinin kan basıncı üzerine akut ve kronik etkileri birbirlerinden farklılık göstermektedir. Leptinin damar üzerine doğrudan vazodilatör etki gösterdiği ve bu etkinin endotelden bağımsız olduğu hem insan safen veni ve mammaryel arterinde²⁷¹ hem de sıçan aortasında gösterilmiştir²⁷². Leptin damar üzerine doğrudan vazodilatör etki göstermesine karşın leptinin kronik i.v. infüzyonu kalp atım hızını ve ortalama arteriyel kan basıncını artırmaktadır. Bu durumdan leptinin SSS’de sempatik aktivasyona ve katekolamin salınmasına neden olması sorumlu görülmüştür^{273,274}.

Ob/Ob farelerin ateroskleroz gelişimi açısından dirençli oldukları gözlemi leptinin aterosklerotik süreçlerdeki olası rolünü gündeme getirmiştir. Leptin endotel hücrelerde mitokondriyal süperoksit ve MCP-1 üretimini artırmaktadır²⁷⁵. Bu durum ateroskleroz gelişiminin başlangıç aşamasında makrofaj ve lökosit migrasyonu açısından önem taşımaktadır. Bunun yanı sıra leptin endotel hücrelerde ve kandaki mononükleer hücrelerde proinflamatuvar TNF- α IL-2, IL-6, MCP-1, ROS, Th1-tip sitokin düzeylerini artırarak vasküler inflamasyonu uyarmaktadır²⁷⁶. İnflamatuvar

sitokinlerin yanı sıra klinik araştırmalarda leptinin trombüs oluşumunda önemli olduğu ve leptin düzeylerinin PAI-1, von Willebrand faktör, doku plazminojen aktivatör, doku fibrinojen düzeyleri ile pozitif, protein C düzeyleri ile negatif korelasyon gösterdiği bulunmuştur²⁷⁷. Benzer şekilde, leptinin insan ve kemirgen makrofaj hücrelerinde trombosit agregasyonunu ve proaterojenik lipoprotein lipaz düzeylerini artırdığı tespit edilmiştir²⁶⁵. Leptinin ayrıca damar düz kas hücre hipertrofisini ve proliferasyonunu uyarak, metalloproteinaz II aktivitesini artırarak ateroskleroz sürecine katkı yaptığı öne sürülmektedir²⁷⁸.

Adipositlerden salınan bir başka adipokin olan resistin de leptine benzer bir şekilde artan kardiyovasküler hastalık riskiyle ilişkilendirilmektedir. Yüksek plazma resistin düzeylerinin artmış kardiyovasküler risk ve unstabil anjina²⁷⁹, metabolik sendrom²⁸⁰, koroner arter hastalığının kötü prognozu²⁸¹ ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Resistin de tıpkı leptin gibi endotel disfonksiyonuna neden olmaktadır. Resistinin insan endotel hücrelerinde adezyon moleküllerini ve sitokin sentezini artırdığı bildirilmiştir²⁸². Bunun yanı sıra resistin, endotelyal nitrik oksit sentaz ekspresyonunu azaltmakta²⁸³ ve damar düz kas hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu uyarmaktadır^{284,285}.

Adipoz dokudan salınan bir diğer adipokin olan visfatin diğer adipokinlerden farklı olarak adipositlerden değil, adipoz dokudan bulunan immün sistem hücrelerinden salıverilmektedir²⁸⁶. Bu nedenle, visfatin düzeyleri inflamasyon seviyesi ile ilişkilendirilmektedir. Visfatinin ayrıca damar tonusu üzerine doğrudan etkisi de bulunmaktadır. Visfatinin sıçan aorta düz kasında endotel bağımlı gevşemeye neden olduğu bildirilmiştir²⁸⁷. Ayrıca, visfatinin insan endotel hücrelerinde adezyon moleküllerini²⁸⁸ ve doku faktörü²⁸⁹ ekspresyonlarını artırdığı belirlenmiştir.

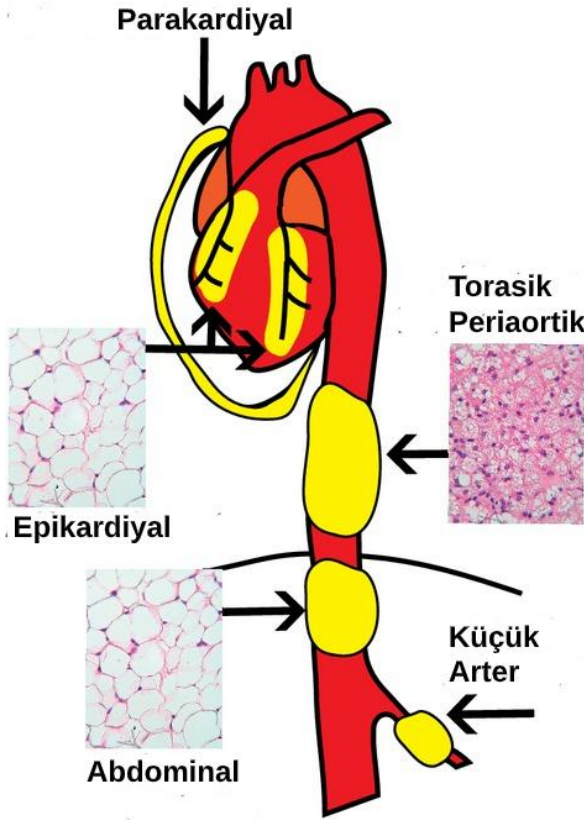
Adipoz doku ve KVS ilişkisi farklı yağ depolarının farklı roller üstlenebildiği çok boyutlu ve oldukça kompleks bir süreçtir. SAD tarafından üretilen ve dolaşıma geçen adipokinler kalp ve damarlar üzerine etki göstererek KVS'yi etkilemektedirler. Bunun dışında PVAD'dan salınan adipokinler vasıtasıyla damar ya da miyokard fonksiyonu değişmektedir. Dolayısıyla adipoz dokuda meydana gelen değişiklikler ve adipoz doku disfonksiyonunun KVS üzerine olan etkileri endokrin, parakrin ve vazokrin özellik gösterebilmektedir.

2.4. PVAD

2.4.1. PVAD Anatomisi ve Histolojisi

PVAD, organizmada serebral damarlar haricinde kalan tüm damarların etrafında yer alan lokal adipoz doku katmanıdır²⁹⁰. İlk kez insan asendan aortasında fibröz-yağlı epikardiyal kıvrım olarak tarif edilmiştir. Sonraki yıllarda birçok araştırmacı gözlemledikleri bu anatomik yapıyı periaortik yağlı cisim, epikardiyal yağ yastığı vb. farklı isimlerle adlandırmışlardır². Yapılan bu ilk gözlemsel çalışmalarda PVAD'ın hücre bileşimi ve anatomisi ile ilgilenilmiş ve fizyolojik rolünün damara mekanik destek sağlamak ile sınırlı olduğu düşünülmüştür. 90'lı yılların başından itibaren yapılan çalışmalar ile PVAD'ın fizyolojik yönden öneme sahip olduğu anlaşılmıştır⁷.

PVAD'ın gerek fizyolojik rolü gerekse histolojik yapısı anatomik pozisyonuna ve türe göre değişkenlik göstermektedir. Bu açıdan PVAD, histolojik açıdan beyaz adipoz doku, kahverengi adipoz doku ve bej adipoz doku özellikleri gösterebilmektedir. Örneğin sıçan mezenterik arterinin etrafındaki adipoz doku beyaz adipoz dokuyken²⁹¹, torasik aorta etrafındaki adipoz doku kahverengi adipoz doku özelliğine sahiptir. Sıçan abdominal aortasının etrafındaki adipoz dokunun ise torasik aortadan farklı olarak yine beyaz adipoz doku özellikleri gösterdiği saptanmıştır²⁹². Farklı damar yataklarında PVAD içeriği Şekil 2-6'da şematik olarak gösterilmiştir. Histolojik yönden saptanan bu farklılığın yanı sıra abdominal aorta PVAD'ı ve torasik aorta PVAD'ı arasında adipokin ve inflamatuvar sitokin içeriği yönünden de farklılık olduğu gösterilmiştir.²⁹² Bunlara ilaveten PVAD miktarında cinsiyet farklılığının rolü olduğu tespit edilmiştir²⁹³. Embriyolojik kökeni incelendiğinde PVAD'ın kahverengi adipoz doku gibi miyojenik kökenli olmadığı, vasküler kökenli olduğunu düşünülmektedir. Adipojenezin ana regülatörü olan PPAR- γ 'nın damar düz kas spesifik olarak knock-out edildiği farelerde PVAD'ın oluşmadığı, diğer adipoz doku depolarında ise kontrol farelere göre herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir²⁹⁴.



Şekil 2-6: Farklı Damar Yataklarında PVAD'ın Şematik Gösterimi-Fitzgibbons 2014'ten Değiştirilerek.

2.4.2. PVAD'ın Fizyolojik Önemi

PVAD vasküler tonusun düzenlenmesinde rol almaktadır. Bu konuda yapılan ilk çalışmada PVAD'ın sıçan torasik aortasında NA'nın kastırıcı etkisine olan duyarlılığı azalttığı tespit edilmiştir⁷. PVAD'ın sıçan torasik aortasında NA'nın yanı sıra serotonin, fenilefrin ve anjiyotensinin kastırıcı yanıtlarını da azalttığı bulunmuştur⁸. PVAD'ın ortaya çıkardığı bu gevşetici etkinin kaynağının belirlenmesi için aynı çalışmada PVAD bulunan banyolardan alınan solüsyonun PVAD'dan yoksun bırakılmış aortaların bulunduğu banyolara transferi neticesinde doz-bağımlı bir gevşeme yanıtı gözlenmiştir. Bu durum PVAD'ın varlığında ortaya çıkan gevşeme yanıtının PVAD'ın damar etrafında mekanik bariyer oluşturmak suretiyle kastırıcı ajanların damar düz kasına ulaşmasına engel olmasından değil, doğrudan PVAD'dan salınan gevşetici faktörler vasıtasıyla gerçekleştiğini göstermektedir. PVAD'ın gevşetici etkisi insan damarları üzerinde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. İnsan internal mammaryal arterinde

PVAD varlığında fenilefrin/NA ve U46619'un (tromboksan A2 analogu) kastırıcı yanıtlarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir^{9,10}.

PVAD'ın damar düz kas tonusu üzerine olan gevşetici etkisi hayvanlardan ve insanlardan alınan damarlar üzerinde yapılan birçok deneyde gösterilmiş olmasına karşın, bu gevşetici etkinin spesifik olarak PVAD'dan salınan hangi adipokinden kaynaklandığı ve hangi mekanizma üzerinden oluştuğu kesin olarak bilinmemektedir. Bu nedenle PVAD'ın neden olduğu damar düz kas gevşemesinden sorumlu biyoaktif madde hipotetik olarak adiposit kaynaklı gevşetici faktör (ADRF) olarak isimlendirilmiştir. ADRF'nin ne olduğuna ya da nelerden oluştuğuna dair farklı görüşler mevcuttur. Adiponektin²⁵³, hidrojen sülfür (H₂S)²⁹⁵, NO²⁹⁶, anjiyotensin-(1-7)²⁹⁷, palmitik asit metil ester²⁹⁸ bu konuda öne sürülen adaylardır. ADRF'nin özelliklerini ve etki mekanizmasını araştıran bir çalışmada ADRF'nin salınımının Ca⁺⁺ bağımlı olduğu ve etkisini hem endotel bağımlı olarak (NO aracılı) hem de endotel bağımsız bir şekilde (K⁺ kanalı aracılı) ortaya koyduğu gösterilmiştir²⁹⁹. Başka bir çalışmada ise ADRF'nin gevşetici etkisinin reseptör tirozin kinaz inhibitörü genistein varlığında azaldığı bildirilmiştir⁸.

2.4.3. Patolojik Koşullarda PVAD'ın Değişen Rolü

PVAD'ın yapı ve fonksiyonu metabolik hastalıklarda bozulmaktadır. Bu bozulma PVAD disfonksiyonu olarak isimlendirilmektedir. PVAD disfonksiyonunun KVS hastalıklarının patojenezinde ve patofizyolojisinde rolü olduğu fikri yaygın bir şekilde kabul görmektedir³⁰⁰.

Yapılan çalışmalar PVAD'ın vasküler tonus üzerine olan gevşetici etkisinin çeşitli patolojik koşullarda ortadan kalktığını göstermektedir. Hipertansif sıçanlarda¹¹, diyabetik sıçanlarda¹², obezitenin diyet ile indüklendiği farelerde¹³ ve metabolik sendromda¹⁴ PVAD'ın damar gevşetici etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bu azalmanın mekanizması net olarak bilinmemektedir.

Konu ile ilgili yapılan çalışmalarla obezitede PVAD'dan salıverilen kastırıcı ve gevşetici adipokinlerin kompozisyonunda değişiklik meydana geldiği ve net fizyolojik etkinin gevşetici etkiden kastırıcı etkiye kaydığı bildirilmiştir³⁰¹. Ayrıca obezitede, oksidatif stres ve inflamasyonun PVAD'ın gevşetici etkisini azalttığı düşünülmektedir. Obez hastalara yapılan gluteal yağ doku biyopsisi neticesinde elde edilen arter segmentlerinde, antioksidan süperoksit dismutazın ve katalazın PVAD'ın azalmış

gevşetici etkisini iyileştirdiği gözlenmiştir³⁰². Bu bulgu PVAD'ın obezitede azalan gevşetici etkisinin oksidatif stres ile ilişkisini ortaya koymaktadır. Bunun yanı sıra PVAD'ın damar üzerine olan gevşetici etkisinde inflamasyonun rolünü ortaya koyan birçok çalışma da mevcuttur. Farelerde yapılan bir çalışmada gevşetici etkideki azalmadan makrofaj infiltrasyonun sorumlu olduğu öne sürülmektedir¹⁷. Bu yaklaşıma göre makrofajlardan salınan TNF- α , PVAD'dan salınan vazodilatör maddelerin salınımını azaltmaktadır. Farelerde yapılan bir diğer çalışmada bu yaklaşımla uyumlu olarak inflamatuvar koşullarda PVAD'dan TNF- α salınımındaki artışın adiponektin salınımındaki azalmayla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir¹⁸. Yine bu bulgulara paralel bir şekilde, yüksek yağlı diyet ile kemirgenlerde T-hücreleri, makrofaj ve proinflamatuvar adipokin düzeylerinde artış tespit edilmiştir³⁰³. T2DM koşullarında da PVAD'ın yapı ve fonksiyonunda çeşitli değişimler meydana gelmektedir. Yapılan bir çalışmada db/db farelerin PVAD'ında dendritik hücrelerin yoğunlaştığı buna paralel olarak proinflamatuvar TNF- α ve IL-6 mRNA düzeyleri artarken antiinflamatuvar adiponektin mRNA düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca db/db farelerde mezenterik arter PVAD'ının antikontraktıl etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir¹⁵. Yapılan başka bir çalışmada Goto-kakizaki sıçanların PVAD'ının proinflamatuvar ve prooksidan bir karakter kazandığı ve antikontraktıl etkisinin ise ortadan kalktığı bildirilmiştir¹⁶. T2DM hastalarının PVAD'larında yapılan bir çalışmada T2DM hastalarında azalan serum adiponektin seviyelerinin damar NADPH oksidazın stimülasyonuna neden olduğu, PVAD'ın artan NADPH oksidaz etkinliğine karşı adiponektin gen ekspresyonunu artırarak yanıt verdiği öne sürülmektedir³⁰⁴.

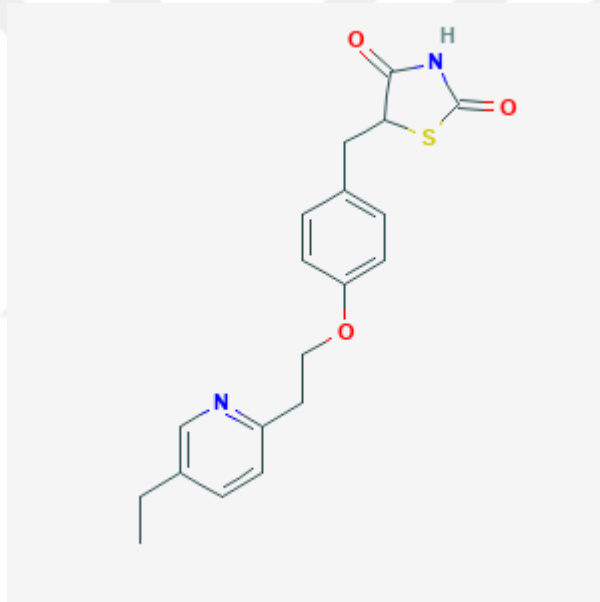
İnflamasyon ve oksidatif stresin kaynaklık ettiği PVAD disfonksiyonu, vasküler tonus regülasyonunun yanı sıra ateroskleroz süreci açısından da önem taşımaktadır. PVAD disfonksiyonu ile ateroskleroz ilişkisini araştıran bir çalışmada koroner arter hastalığı olan bireylerden alınan epikardiyal adipoz dokuda TNF- α ve IL-6 proinflamatuvar sitokinlerinin düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir³⁰⁵. Yapılan bir post-mortem çalışmada PVAD miktarının ve makrofaj infiltrasyonunun koroner arter aterosklerotik plak büyüklüğü ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur³⁰⁶. Bu çalışmalar ateroskleroz ile PVAD disfonksiyonu arasında bir ilişki olduğuna dair kanıt sunmasına karşın neden-sonuç ilişkisinin ortaya konabilmesi açısından yeterli değildir. Ateroskleroz sürecinin oluşumu ile ilgili yaygın kanı sürecin içten başlayarak dışarıya doğru devam ettiği şeklindeki görüştür. Fakat özellikle son yıllarda yapılan çalışmalar

PVAD disfonksiyonunun ateroskleroz sürecinin patojenezinde rolü olabileceğine dair kanıtlar sunmaktadır. Konu ile ilgili yapılan bir çalışmada bu soruya ışık tutacak şekilde obez farelerden alınan PVAD'ın ApoE knock-out farelere transplantasyonu neticesinde lezyon oluşumunda artış olduğu gözlenmiştir³⁰⁷.

2.5. Pioglitazon

2.5.1. Tanımı

Pioglitazon, PPAR- γ agonisti oral antidiyabetik bir ilaçtır. Kimyasal ismi, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği isimlendirmesine göre 5-[[4-[2-(5-etilpiridin-2-il)etoksi]fenil]metil]-1,3-tiazolidin-2,4-dion'dur. Moleküler formülü $C_{19}H_{20}N_2O_3S$ olan pioglitazonun yapısal formülü Şekil 2-7'de verilmiştir.



Şekil 2-7: Pioglitazonun Yapısal Formülü

2.5.2. Farmakodinamik Özellikleri

Pioglitazon etkilerini aynı farmakolojik grupta yer alan diğer etken maddeler gibi PPAR- γ agonizması vasıtasıyla göstermektedir. PPAR- γ agonizması GLUT1, GLUT4, adiponektin, leptin, TNF- α , Akt ve hepatik glukokinaz gibi glukoz metabolizmasında rolü olan pek çok genin ekspresyon düzeyini değiştirmektedir. Bu değişiklikler sonucunda pioglitazon insülin duyarlılığını artırmakta ve kan glukoz düzeylerinde düşüşe neden olmaktadır. İnsülin duyarlılaştırıcı etkisinin yanı sıra

pioglitazonun β hücre fonksiyonunu iyileştirici etkisi olduğu da öne sürülmüştür⁴⁹. Pioglitazon aynı zamanda kandaki lipid profilini de olumlu yönde değiştirmektedir. Diyabet ile birlikte görülen dislipidemide karakteristik olarak trigliserit, LDL düzeyleri artarken, HDL kolesterol düzeyi azalmaktadır³⁰⁸. T2DM hastalarında pioglitazon tedavisi ile trigliserit düzeylerinin azaldığı, HDL kolesterol düzeylerinin arttığı, LDL kolesterol düzeylerinin ise değişmediği bildirilmiştir³⁰⁹. Benzer şekilde, pioglitazonun T2DM’de lipid profili üzerine olumlu etkileri çeşitli hayvan çalışmalarında da gösterilmiştir. Sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde pioglitazon uygulamasının trigliserit ve total kolesterol düzeylerini azalttığı bildirilmiştir¹⁹¹. Pioglitazonun bu etkisi bir başka T2DM modeli olan OLETF sıçanlarda da gösterilmiştir³¹⁰.

Pioglitazonun PPAR- γ ’nın eksprese edildiği esas yer adipoz dokuda da belirgin etkileri bulunmaktadır. Adipojenez sürecinin ana regülatörü olan PPAR- γ ’nın uyarılması neticesinde yağ doku miktarında artış meydana gelmektedir. Buna paralel olarak, T2DM hastalarında pioglitazon uygulamasına bağlı olarak kilo artışı olduğu gözlenmiştir³¹¹. Kilo artışının yanında pioglitazon uygulaması adipoz doku dağılımını da değiştirmektedir. Pioglitazon SAD miktarını artırırken KVS hastalıkları açısından risk faktörü olarak değerlendirilen VAD miktarını ise azaltmaktadır³¹². VAD miktarını azaltmasının yanında VAD’ın metabolik aktivitesi de pioglitazon uygulaması ile azalmaktadır³¹³.

Pioglitazonun hem hayvan hem de insan adipoz dokusunda inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir^{314,315}. Yapılan bir çalışmada bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda pioglitazon uygulamasına bağlı olarak subkütan adipoz doku makrofaj sayısında azalma olduğu tespit edilmiştir³¹⁶. Benzer bir çalışmada ise pioglitazon uygulamasına bağlı olarak fare VAD’ında inflamatuvar yanıtı baskılayan regülatör T hücre sayısını arttığı gözlenmiştir³¹⁷. Bu bulgular, pioglitazonun adipoz doku üzerine olan antiinflamatuvar etkisinin hem makrofajlar hem de T hücreler üzerinden gerçekleşebildiğini göstermektedir. Pioglitazonun antiinflamatuvar etkisi ayrıca insülin duyarlılaştırıcı etkisine de katkıda bulunmaktadır. Pioglitazonun insülin duyarlılaştırıcı etkisinin mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik yapılan bir çalışma pioglitazonun sıçan adipoz dokusunda AMPK’yı uyardığını göstermektedir³¹⁸. Bu bulgu antiinflamatuvar etkiye ilave olarak AMPK uyarılmasının da pioglitazonun adipoz dokuda insülin duyarlılaştırıcı etkisine katkı yaptığını düşündürmektedir. Yapılan bir

klirik araştırmada pioglitazonun insülin duyarlılaştırıcı etkisinde adipoz dokuda natriüretik peptid biyoaktivitesini artırmasının da rolü olduğu öne sürülmüřtür³¹⁹. Pioglitazonun insan SAD'ından adiponektin üretimini ve sekresyonunu artırarak periferik insülin duyarlılığında artışa katkıda bulunduğu gösterilmiřtir³²⁰. Pioglitazon ayrıca bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda SAD matriks metalloproteinaz 9 seviyelerini azaltmakta³²¹, T2DM'li hastaların SAD'ında ise mitokondri biyojenezini artırmaktadır³²².

Pioglitazon uygulamasının farklı yağ depoları üzerine olan etkileri de yoğun olarak araştırılmaktadır. Yapılan bir çalışmada kahverengi adipoz dokuda pioglitazonun enerji depolanmasını artırdığını fakat enerji tüketimini değiştirmediği bildirilmiřtir³²³. Metabolik sendromu olan obez hastalarda yapılan bir çalışmada pioglitazonun kemik iliği adipoz miktarını değiştirmediği gösterilmiřtir³²⁴. T2DM hastalarında ise pioglitazon uygulamasının kemik iliği adipoz doku miktarını artırdığı bildirilmiřtir³²⁵.

Literatürde pioglitazonun PVAD üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalar da mevcuttur. Yüksek yağlı diyet ile beslenmiş farelerde PVAD hipertrofisi ve damar sertliğinin oluştuğu, pioglitazon uygulamasının ise mitokondri dış membran proteini mitoNEET miktarını artırarak antiinflamatuvar etki gösterdiğini ve PVAD hipertrofisi ile damar sertliğini azalttığı gösterilmiřtir³²⁶. Yapılan başka bir çalışmada ise ApoE knock-out hayvanlarda fruktoz alımı ile oksidatif stres ve inflamasyon ile ilişkili genlerin ekspresyonu artmış, pioglitazon uygulaması ise PVAD oksidatif hasarını ve proinflamatuvar gen ekspresyonunu azaltmışır³²⁷.

Pioglitazonun KVS'de olumlu etkileri olduğunu gösteren birçok klinik araştırma mevcuttur³²⁸⁻³³⁰. Pioglitazonun KVS üzerine olan etkilerinin değerlendirildiği bir meta-analiz, pioglitazonun insülin direnci olan, prediyabetik ve diyabetik tüm hasta gruplarında ölümcül olmayan inme, ölümcül olmayan miyokard infarktüsü ve kardiyovasküler ölüm riskini azalttığını fakat kemik kırığı, ödem, kilo artışı, kalp yetmezliği riskini artırdığını göstermiřtir²⁷. Yapılan bir başka meta-analizde KVS hastalığı olan kişilerde pioglitazon kullanımının majör advers kardiyovasküler olay, inme ve miyokard infarktüsü tekrarlama riskini azalttığı fakat tüm nedenlere bağlı mortaliteyi değiştirmediği ve kalp yetmezliği riskini artırdığı belirlenmiřtir³³¹. Pioglitazonun KVS üzerine olan olumlu etkilerinin mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Yapılan hayvan çalışmaları, *in vitro* alışmalar ve klinik

araştırmalardan elde edilen bulgular bu olumlu etkilerin mekanizmasının hem kalp hem damarlar yönünden anlaşılmasına yönelik ipuçları sunmaktadır.

Literatürde patolojik koşullarda pioglitazonun miyokardda koruyucu bir etkinliğe sahip olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur. Yapılan bir çalışmada 2 hafta boyunca 3 nmol/saat intraserebral pioglitazon uygulamasının sıçanlarda anjiyotensin II ile indüklenen sol ventrikül hipertrofisini azalttığı gözlenmiştir²³. Sıçan iskemi reperfüzyon modeli kullanılan bir çalışmada iskemi reperfüzyon hasarından 24 saat önce 3 mg/kg intravenöz pioglitazon uygulamasının infarkt alanı azalttığı bildirilmiştir²⁴. İskemi reperfüzyon modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada hiperlipidemik sıçanlarda iskemik ön koşullanmanın infarkt alanı azaltıcı etkisinin kaybolduğu, 2 µM pioglitazon uygulamasıyla bu etkinin korunduğu gösterilmiştir³³². HFD/STZ diyabet modelinde 16 haftalık boyunca pioglitazon uygulanması neticesinde hem düşük doz (4 mg/kg) hem de yüksek doz (20 mg/kg) pioglitazon uygulamasına bağlı olarak sıçan kalbinde immünoglobulin birikiminin azaldığı tespit edilmiştir³³³. Koruyucu etkinin mekanizmasının açıklanmasına yönelik bir çalışmada pioglitazonun kardiyomiyositler üzerinde apoptozu indükleyici, hipertrofiyi ise inhibe edici etkisini olduğu gösterilmiştir³³⁴.

Pioglitazonun KVS hastalıkları üzerine olumlu etkilerinin diğer bileşeni damar fonksiyonu ve yapısı üzerine olan etkileridir. Yapılan çalışmalar pioglitazonun antiaterosklerotik etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. İnsan koroner arter düz kas hücrelerinde yapılan *in vitro* bir çalışmada pioglitazon uygulamasının (8 µM, 5 saat) yüksek glukoz düzeyi ile indüklenen, damar düz kas hücre proliferasyonu ve migrasyonunu engellediği bildirilmiştir³³⁵. Aynı şekilde sıçan damar düz kas hücrelerinde pioglitazon uygulamasının (5-20 µM, 12 gün) β-gliserofosfat ile indüklenen kalsifikasyonu azalttığı tespit edilmiştir³³⁶. Pioglitazonun hipertansif sıçan modellerinde damarda oksidatif stres, ER stresi³³⁷ ve lipid birikimini³³⁸ azalttığı gösterilmiştir. Yine sıçanlarda yapılan bir çalışmada pioglitazon uygulamasına bağlı olarak karotid arter lezyon gelişiminde azalma tespit edilmiştir³³⁹. Diyabetik hastalarda yapılan bir çalışmada ise 20 hafta boyunca 30-45 mg/kg pioglitazon uygulamasının vasküler inflamasyonu azalttığı gösterilmiştir²⁵. Pioglitazonun antiaterosklerotik etkisinde monositlerdeki MCP-1 reseptörü olan CC-kemokin reseptör 2'nin ekspresyonunu azaltmasının da katkısı olduğu yapılan bir hayvan çalışmasıyla öne

sürülmüştür³⁴⁰. Pioglitazon antiaterosklerotik etkinliğine ek olarak antihipertansif etkiye de sahiptir. Pioglitazonun hem hayvan çalışmalarında²³ hem de diyabetik hastalar üzerinde^{25,26} gösterilmiş olan antihipertansif etkisi, pioglitazonun KVS üzerine olumlu etkilerinde antihipertansif etkinliğin de rolü olabileceğini gündeme getirmektedir. Pioglitazonun bunlara ek olarak endotel fonksiyonunu iyileştirici etkisi de bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada 30 mg/kg dozunda 4 haftalık pioglitazon uygulamasının diyabetik hastalarda endotel fonksiyonunu iyileştirdiği gösterilmiş ve bu etkinin metabolik profildeki düzelmeden bağımsız olduğu öne sürülmüştür³⁴¹. Pioglitazonun endotel fonksiyonu üzerine iyileştirici etkisi diyabetik hayvan modelinde de gösterilmiş ve bu etkiden pioglitazonun oksidatif stresi azaltıcı etkisi sorumlu tutulmuştur³⁴². Farklı *in vitro* bir çalışmada 50 ng/ml ve 100 ng/ml pioglitazonun endotel hücrelerinde sitoprotektif etkiye sahip olduğu gösterilmiştir³⁴³.

2.5.3. Farmakokinetik Özellikleri

Oral kullanımdan sonra pioglitazon serum pik konsantrasyonu 2 saat içinde gözlenmektedir (T_{maks}). Yiyecekler ile birlikte alındığında ise T_{maks} 3-4 saate çıkabilmektedir. Günde 1 kez kullanım neticesinde hem pioglitazonun hem de aktif metabolitlerinin (M-III ve M-IV) kararlı durum konsantrasyonlarına 7 gün sonunda ulaşılmaktadır. Pioglitazonun dağılım hacmi 0.63 ± 0.41 L/kg'dır. Proteinlere yüksek oranda (>%99) bağlanan pioglitazon hidrosilasyon ve oksidasyon ile metabolize edilmektedir. Ortaya çıkan metabolitler kısmen sülfat ve glukuronid ile konjuge olmaktadır. Aktif metabolitleri dolaşımda pioglitazona eşit ya da daha yüksek konsantrasyonda bulunurlar. Pioglitazonun metabolizasyonundan sorumlu karaciğer enzimleri CYP2C8 ve kısmen CYP3A4'tür. Pioglitazonun yaklaşık %15-30'u idrar yoluyla atılmaktadır. Geriye kalan kısmın değişmemiş safra yoluyla ya da metabolitleri halinde feçesle atıldığı düşünülmektedir. Plazma yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) pioglitazon için 3-7 saat, aktif metabolitleri için ise 16-24 saat arasında değişmektedir. Oral yoldan uygulanan pioglitazonun klirensi 5-7 L/saat'tir¹⁶⁴.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Pioglitazon HCl	Neutec İlaç San. Tic. Aş. tarafından çalışmamızda kullanılmak üzere hediye edilmiştir.
Streptozotosin (STZ)	Cayman Chemical, ABD
Metilselüloz (vizkozite 4000 cP)	Fluka, İsviçre
Sodyum tiyopental	İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş. Türkiye
Formalin çözeltisi %10 (%1 Metanol ile stabilize edilmiş)	Tekkim, Türkiye
Sodyum sitrat dihidrat	Merck, Almanya
Sitrik asit	Merck, Almanya
RIPA hücre parçalama tamponu	Santa Cruz, ABD
Proteaz inhibitör karışımı	Santa Cruz, ABD
Fenilmetansülfonil florür	Santa Cruz, ABD
Sığır serum albumin	Sigma, ABD
Bradford reaktifi	Bio-Rad, ABD
Noradrenalin hidroklorür (NA)	Sigma, ABD
Asetilkolin klorür (ACh)	Fluka, İsviçre
Potasyum klorür (KCl)	Merck
Sodyum nitroprussiyat (SNP)	Sigma, ABD
Sodyum klorür (NaCl)	Merck, Almanya
Sodyum bikarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Almanya
Kalsiyum klorür (CaCl ₂)	Merck, Almanya

Magnezyum sülfat heptahidrat ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck, Almanya
D(+)-Glukoz monohidrat	Riedel-de Haën
Etilendinitrilo tetraasetik asit (EDTA)	Merck, Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Merck, Almanya
VetTest trigliserit test strip	Idexx, ABD
VetTest total kolesterol test strip	Idexx, ABD
Sentetik oligonüklotitler	Sentromer, Türkiye
Lam (renkli)	Epiglass, Türkiye
Lamel	Epiglass, Türkiye
Parafin	Leica, Almanya
Etanol (Absolü, %99,5)	Tekkim, Türkiye
Ksilen	Tekkim, Türkiye
Eozin	Biooptica, İtalya
Hematoksilen	Biooptica, İtalya
Mikrotom Bıçağı	Feather, İngiltere

3.1.2. Sıçan/Fare Yemleri

Normal sıçan/fare yemi	MBD Yem, Türkiye
------------------------	------------------

Tablo 3-1: Normal Sıçan/Fare Yemi İçeriği

Kuru Madde	(%88)
Ham Protein	(%20)
Ham Selüloz	(%6)
Ham Yağ	(%2,7)
Ham Kül	(%5,2)
Kalsiyum	(%0,9)
Fosfor	(%0,6)
Lizin	(%0,95)

Metiyonin	(%0,4)
Metiyonin+Sistein	(%0,68)
Sodyum	(%0,14)
Vitamin A (en az IU/kg)	24000
Vitamin D ₃ (en az IU/kg)	3000
Vitamin E (en az mg/kg)	300
Vitamin K ₃ (en az mg/kg)	30
Vitamin B ₁ (en az mg/kg)	20
Vitamin B ₂ (en az mg/kg)	20
Vitamin B ₆ (en az mg/kg)	12
Vitamin B ₁₂ (en az mcg/kg)	100
Nikotinik Asit (en az mg/kg)	100
Pantotenik Asit (en az mg/kg)	41
Biotin (en az mg/kg)	6,3
Kolin (en az mg/kg)	1000
Enerji (Kcal/Kg)	2600

Yüksek yağlı sıçan/fare yemi

MBD Yem, Türkiye

Tablo 3-2: Yüksek Yağlı Sıçan/Fare Yemi İçeriği

Kazein	(%25,84)
L-Sistin	(%0,38)
Maltodekstrin 10	(%16,15)
Sükroz	(%8,89)
Selüloz	(%6,46)
Soya Yağı	(%3,23)
Kuyruk Yağı	(%31,65)

Mineral Karışımı	(%1,29)
Dikalsiyum Fosfat	(%1,68)
Kalsiyum Karbonat	(%0,71)
Potasyum Sitrat	(%2,13)
Vitamin Karışımı	(%1,29)
Kolin Bitartarat	(%0,25)
Enerji (Kcal/Kg)	5400

3.1.3. Kitler

Rat adiponektin ELISA kit (Katalog No: CSB-E07271r)	Cusabio, ABD
Rat leptin ELISA kit (Katalog No: 201-11-0456)	Sunred, Çin
Rat IL-6 ELISA kit (Katalog No: 201-11-0136)	Sunred, Çin
Rat TNF- α ELISA kit (Katalog No: 201-11-0765)	Sunred, Çin
Sensifast SYBR No-Rox kit (Katalog No: BIO-98005)	Bioline, ABD
High pure RNA tissue kit (Katalog No: 12033674001)	Roche, Almanya
High-capacity cDNA reverse transcription kit (Katalog No: 4368814)	Thermofischer, ABD

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Çözelti ve Süspansiyonların Hazırlanışı

%0,5 Metilselüloz Çözeltisi: 200 mg metilselülozun distile suyla 40 mL'ye hacmen tamamlanması ile günlük olarak hazırlanmıştır.

Pioglitazon Süspansiyonu: 10 mg pioglitazon (=11,23 mg pioglitazon HCl)

% 0,5 metilselüloz çözeltisi içinde süspande edilerek 1 mL'ye tamamlanmıştır ve günlük olarak hazırlanmıştır.

Sitrat Tamponu: 0,134 g trisodyum sitrat dihidrat ile 0,10454 g sitrik asidin distile suyla 10 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Çözeltinin pH'sı ölçülmüş, HCl ve NaOH ile 4,5'a ayarlanmıştır. Sitrat tamponu her bir enjeksiyon günü için taze olarak hazırlanmış ve +4°C'de saklanmıştır. STZ enjeksiyonu yapılacak her bir sıçan için gerekli STZ miktarı belirlenmiş, 1,5 mL'lik eppendorf tüplerde tartımı yapılmış ve enjeksiyonun hemen öncesinde soğuk sitrat tamponunda çözölmüştür.

Sodyum Tiyopental Çözeltisi: Çözelti her bir enjeksiyon için 25 mg sodyum tiyopentalin steril salinle 1 mL'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Potasyum Klorür Çözeltisi: 1,86 g potasyum klorür distile suda çözölp 10 mL'ye tamamlanmıştır. Oluşan stok çözeltinin konsantrasyonu 2,5 M'dir. Stok çözeltisi -20°C'de saklanmıştır.

Noradrenalin Çözeltisi: 32 mg noradrenalin hidroklorür 0,001 N HCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Çözeltinin her 1 mL'sine 1 mg askorbik asit ilave edilmiştir. Oluşan stok çözeltisinin konsantrasyonu 10^{-2} M'dir. Stok çözeltisi 1 mL'lik alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Deneylerde kullanılan dilüsyonlar distile su ile hazırlanmıştır.

Asetilkolin Çözeltisi: 18,4 mg asetilkolin klorür 0,001 N HCl çözeltisi ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. Oluşan stok çözeltisinin konsantrasyonu 10^{-2} M'dir. Stok çözeltisi 1 mL'lik alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Deneylerde kullanılan dilüsyonlar distile su ile hazırlanmıştır.

Sodyum Nitroprussiyat Çözeltisi: 30 mg sodyum nitroprussiyat distile suda çözölmüş ve çözelti 10 mL'ye tamamlanmıştır. Oluşan stok çözeltisinin konsantrasyonu 10^{-2} M'dir. Stok çözeltisi 1 mL'lik alikotlar halinde -20°C'de saklanmıştır. Sodyum nitroprussiyatın ışıktan bozunmasından ötürü stok çözelti alüminyum folyo ile

kaplanmıştır. Deneylerde kullanılan dilüsyonlar distile su ile hazırlanmış ve ışıktan korunmuştur.

Deneylerde kullanılan Krebs Ringer-bikarbonat çözeltisi her deney günü için taze olarak hazırlanmıştır. Çözeltinin içeriği şu şekildedir: 118 mmol/L NaCl, 4,7 mmol/L KCl, 1,2 mmol/L KH_2PO_4 , 25 mmol/L NaHCO_3 , 1,2 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 mmol/L glukoz, ve 2,5 mmol/L CaCl_2 , 0,026 EDTA.

3.1.5. Ekipman ve Cihazlar

Paslanmaz çelik gavaj	Fine Science Tools, ABD
Accu-chek performa nano glukometre	Roche, Almanya
Santrifüj	Hettich, Almanya
Derin dondurucu (-80 °C)	Daihan Scientific, Güney Kore
Buzdolabı (-20 °C)	Arçelik, Türkiye
Cerrahi aletler	Bahadır A.Ş. Samsun-Türkiye
Dewar sıvı azot kabı	International Cryogenics, ABD
ELx800 mikropate okuyucu	Biotek, ABD
ELx50 otomatik yıkayıcı	Biotek, ABD
VetTest otomatik analizör	Idexx, ABD
Epishear Probe Sonicator	Active Motif, ABD
Epoch 2 mikropate okuyucu	Biotek, ABD
Take3 micro-volume plate	Biotek, ABD
CO ₂ İnkübatör	Sanyo, Japonya
Lightcycler 480 RT PCR sistemi	Roche, Almanya
Thermal Cycler PCR sistemi	Axygen, ABD
Orbital Shaker	Stuart, İngiltere
Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Vorteks	IKA, Almanya

Grass Model FT03 Transdüser	Grass Instruments, ABD
Sirkülasyonlu Su Banyosu	Grant, İngiltere
PowerLab 4/SP Data Acquisition System	ADI Instruments, Yeni Zelanda
ML118 Quad Bridge Amplifier	ADI Instruments, Yeni Zelanda
Hassas Terazı	Sartorius, Almanya
Leica RM2245 Mikrotom	Leica Biosystems, Almanya
Nikon Eclipse Ni-U Mikroskop	Nikon Instruments, Japonya
El Homojenizatörü	Sigma, ABD

3.1.6. Programlar

Graphpad Prism 5.00 GraphPad Software, ABD

Excel 2013 Microsoft, ABD

CurveExpert 1.4 Hyams Development, ABD

3.2. In Vivo Hayvan Deneyleri

Tez çalışması kapsamında gerçekleştirdiğimiz *in vivo* hayvan deneyleri için Bezmialem Vakıf Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiş 8-10 haftalık erkek Wistar Albino sıçanlar (~250 g) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılmış hayvanların tümü 21 ± 2 °C, %45-65 bağıl nem, 12 saat karanlık/12 saat aydınlık koşullarında barındırılmış, su ve yem erişimleri sınırlandırılmamıştır. Hayvanlar her kafeste 2 adet sıçan olacak şekilde kafeslere ayrılmışlardır. Hayvanların bakımı ve hayvanlar üzerinde yapılacak tüm işlemler İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Deney Hayvanı Bakım ve Araştırma Birimi'nde (EDEHAB), İ.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (HADYEK) 06/04/2017 tarihli 133720 sayılı etik kurul onayı çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Deney ve kontrol grupları Tablo 3-3'te sunulmuştur.

Tablo 3-3: Deney ve Kontrol Grupları

Grup No	Uygulama	N
I	Kontrol + MC	15
II	Kontrol + Pioglitazon (20 mg/kg)	15
III	T2DM + MC	15
IV	T2DM + Pioglitazon (20 mg/kg)	15

MC: Metilselüloz, T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

Sıçanların vücut ağırlıkları ve açlık kan glukoz düzeyleri çalışma başlangıcında ölçülerek bazal değerler elde edilmiştir. Kontrol gruplarında yer alan sıçanlardan (grup I ve II) tüm deney süreci boyunca standart içerikli (ağırlık cinsinden, %2,7 yağ, %20 protein ve %45 karbonhidrat) sıçan yemi ile beslenmiş, diyabet gruplarında yer alan sıçanlar ise (grup III ve IV) yüksek yağ içerikli (ağırlık cinsinden, %35,0 yağ, %23,1 protein %25,9 karbonhidrat) yem ile beslenmiştir. Sıçanların yem ve su ihtiyaçları günlük olarak takip edilmiştir.

3.2.1. T2DM Oluşturulması

Sıçanlarda T2DM oluşturulması için literatürde çok sayıda örneği bulunan yüksek yağlı diyet/düşük doz streptozotosin (HFD/STZ) modeli kullanılmıştır^{191,192}. Bu model, T2DM'nin doğal seyrini ve hastalığın karakteristik özelliklerini yansıtmaması nedeniyle tercih edilmiştir. Bu modelde T2DM'nin başlıca özellikleri olan insülin direnci, hiperglisemi ve bozulmuş lipid profilinin (yüksek serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri) eş zamanlı olarak gözlemlendiği bildirilmiştir³⁴⁴.

Çalışmamızda HFD/STZ T2DM modelinin oluşturulması amacıyla 4 haftalık yüksek yağlı diyet ile beslenen T2DM gruplarına (grup III ve IV) 8 saat açlık sonrasında 1 mL/kg hacimde 35 mg/kg STZ, normal standard sıçan yemi ile beslenen kontrol gruplarına ise yine aynı hacimde STZ'nin çözücü tamponu (0,1 M, pH=4,5) intraperitoneal (I.P.) olarak uygulanmıştır. Uygulamadan 1 hafta sonra diyabet

gelişiminin doğrulanması için 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri sıçanların kuyruk uçlarından alınan kandan glukometre vasıtasıyla ölçülmüştür.

Çalışmamızda STZ uygulamasından 1 hafta sonraki ölçüm neticesinde >140 mg/dl (7.8 mmol/L) açlık kan glukozuna sahip sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir³⁴⁵.

3.2.2. Pioglitazon Uygulaması

T2DM doğrulamasını takiben, diyabetin metabolik parametreler ve çalışmada incelenmesi öngörülmüş olan doku ve organlardaki etkisinin belirgin olarak görülebilmesi için 4 hafta beklenmiştir. Ardından kontrol (Grup II, Kontrol+Pioglitazon) ve diyabetik (Grup IV, T2DM+Pioglitazon) olduğu tespit edilmiş olan hayvanlara %0,5 metilselüloz (vizkozite 4000 cP) çözeltisiyle süspande edilmiş 20 mg/kg Pioglitazon 2 mL/kg hacimde oral yoldan (gavaj) 6 hafta boyunca uygulanmıştır. Diğer hayvanlara (Grup I ve III) Pioglitazonun çözücüsü %0,5 metilselüloz çözeltisi yine aynı hacimde gavaj yoluyla verilmiştir. Seçilen Pioglitazon dozunun, çalışmada kullanılması planlanan sıçan soyunda açlık kan glukoz düzeyleri üzerine etkisi literatürde tanımlanmıştır¹⁹⁴.

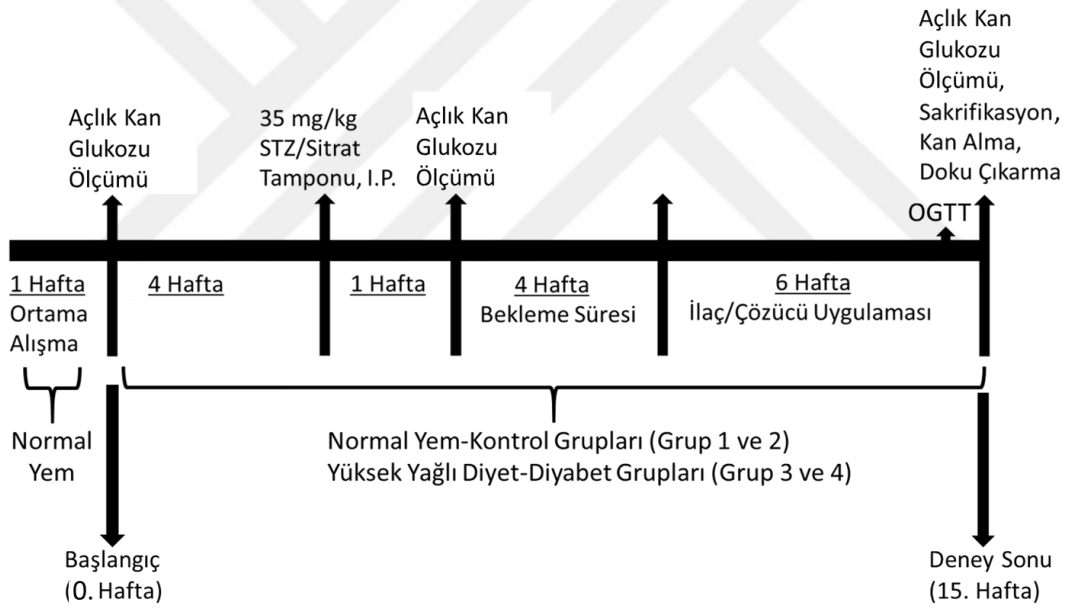
3.2.3. OGTT

6 haftalık ilaç uygulama periyodunun sonunda sakrifikasyondan 1 gün önce sıçanlara OGTT uygulanmıştır. OGTT için 8 saatlik açlık sonrası sıçanların kuyruk uçlarından bazal açlık kan glukoz düzeyleri ölçülmüş (0. dakika) ve bu ölçümü takiben 2g/kg glukoz oral yoldan verilmiştir. Ardından 30. 60. 90. 120. 180. ve 240. dakikalarda sıçanların kuyruk ucundan glukoz ölçümleri yapılmıştır³⁴⁶.

3.2.4. Sakrifikasyon, Serum ve Doku Eldesi

15 haftalık deney sürecinin sonunda tüm sıçanlar sakrifiye edilmiştir. Sakrifikasyonun hemen öncesinde sıçanların kuyruk ucundan glukometre vasıtasıyla 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. Sodyum tiyopental (50 mg/kg I.P.) anestezisi altında sıçanların toraksı açılmış ve sıçanlar kalpten kan alınarak sakrifiye edilmiştir. Sıçanlardan alınan kan örnekleri, serum eldesi için derhal laboratuvara transfer edilerek (<5 dk.) 3000g'de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında süpernatant kısmı total kolesterol ve trigliserit ölçümleri için eppendorflarda -80°C'de saklanmıştır. Sakrifiye edilen hayvanlardan kalp, karaciğer ve torasik aorta izole

edilmiştir. Aortanın yaklaşık 2 mm'lik bir segmenti, etrafındaki PVAD ile birlikte olacak şekilde ayrılmış ve kalp ve karaciğer ile birlikte histopatolojik değerlendirme için %10 tamponlanmış formalin çözeltisi (%1 metanol ile stabilize edilmiş) içerisinde saklanmıştır. Torasik aortanın geriye kalan kısmı yaklaşık 4 mm'lik 4 segmente ayrılmış ve bu dört segmentten birbirine bitişik olan 2 segmentten birinde PVAD intakt bırakılırken diğerinde temizlenmiştir. Bu şekilde elde edilen 2 PVAD(+) ve 2 PVAD(-) aorta halkaları, (4+C) soğuk Krebs ringer-bikarbonat çözeltisi içine konmuş ve izole organ banyosu sisteminde vasküler reaktivite çalışılmak üzere laboratuvara transfer edilmiştir. Torasik aortadan temizlenerek ayrılan PVAD ise sıvı azotta dondurulmuş ve ileriki aşamalarda adipokin, inflamatuvar sitokin ve gen ekspresyon düzeylerinin analizinde kullanılmak üzere -80°C'de eppendorflarda saklanmıştır. Tüm deneysel süreç Şekil 3-1'de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 3-1: 15 Haftalık *in vivo* hayvan deneyleri sürecinin şematik gösterimi.

3.3. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

3.3.1. Total Kolesterol ve Trigliserit Ölçümü

Sıçanlardan elde edilen serum örneklerinde total kolesterol ve trigliserit ölçümü Bezmialem Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Biriminde (BEDEHAL) otomatik analizör vasıtasıyla enzimatik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Açlık Kan Glukoz Düzeyi Ölçümü

Sıçanların 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri hem deney süreci başlangıcında hem de deney sürecinin sonunda sakrifikasyon öncesi ölçülmüştür. Ölçüm işlemi sıçanların kuyruk ucundan glukometre vasıtasıyla yapılmıştır.

3.4. Vasküler Reaktivite Tayini

3.4.1. Dokuların Hazırlanışı

Sıçanlardan izole edilen 2si PVAD(+) ve 2si PVAD(-) toplam 4 adet torasik aorta halkası L şeklindeki paslanmaz çelik tel tutuculara geçirilmiş ve 37°C’de, %95 O₂+%5 CO₂ gaz karışımı ile havalandırılan ve içerisinde krebs ringer-bikarbonat çözeltisi bulunan 10 mL’lik izole organ banyosuna takılmıştır. L şeklindeki tutucuların biri organ banyosunun tabanında bulunan platin tutucuya diğeri ise mikrometrik manipülatöre bağlı bulunan izometrik transdüser (Grass FT03) sabitlenmiştir. Aorta halkaları, her 15 dakikada bir krebs ringer-bikarbonat çözeltileri yenilenmek suretiyle, 1 saat boyunca 1 g’lık öngerim ile dengelenmiş ve ardından 30 dakika arayla 2 kez KCl (40 mM) uygulaması ile standardize edilmiştir. KCl uygulaması ile 1 gramın altında kasılan dokular deney dışı bırakılmıştır.

3.4.2. Deney Protokolü

Standardizasyon işleminin ardından reseptör-aracılı kasılma yanıtlarının değerlendirilebilmesi için izole sıçan aorta halkalarına nonselektif bir α -agonist olan noradrenalin (NA) kümülatif olarak artan konsantrasyonlarda (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanmıştır. Dokular 15 dakikalık aralarla yıkanmak suretiyle 1 saat boyunca dinlenmeye bırakılmıştır. Ardından endotel-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilebilmesi için, NA’nın submaksimal konsantrasyonu (10^{-6} M) ile prekontrakte edilmiş dokulara endotel-aracılı gevşetici bir ajan olan asetilkolin (ACh) kümülatif olarak (10^{-8} - 10^{-4} M) uygulanmıştır. Daha sonra dokular 15 dakikalık aralarla yıkanmak suretiyle 1 saat boyunca dinlenmeye bırakılmıştır. İzole sıçan aorta

halkalarında reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarının değerlendirilmesi için KCl kümülatif olarak artan konsantrasyonlarda (20, 40, 60, 80, 100 mM) dokulara uygulanmıştır. 15 dakikalık aralarla yıkanarak 1 saat dinlenmeye bırakılmış olan dokular düz kas-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilebilmesi için NA'nın submaksimal konsantrasyonu (3×10^{-6}) ile prekontrakte edilmiş ve ardından düz kas-aracılı gevşetici bir ajan olan sodyum nitroprusiyat (SNP) kümülatif olarak artan konsantrasyonlarda (10^{-9} - 10^{-4} M) uygulanmıştır. Deney sonunda aorta halkaları izole organ banyosu sisteminden çıkarılmış ve PVAD'ları temizlenerek süzgeç kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Daha sonra PVAD'lar tartılmış ve ağırlıkları elde edildikleri aorta halkalarının uzunluğuna göre normalize edilmiştir.

3.5. PVAD'da Adipokin ve İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü

Deney sonunda izole edilip -80°C 'de saklanan PVAD örneklerinde adipokin (adiponektin, leptin) ve inflamatuvar sitokin (TNF- α , IL-6) düzeyleri ölçümü için ELISA yöntemi kullanılmıştır. Ölçümler için PVAD örneklerinden protein izolasyonu işlemi gerçekleştirilmiş ve total protein miktarı Bradford metodu ile ölçülmüştür.

3.5.1. Protein İzolasyonu

Protein izolasyonu için sıvı azotta dondurularak -80°C 'de saklanmış PVAD örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla her bir sıçandan izole edilen 25 mg PVAD dokusu 450 μL RIPA lizis tamponu (Santacruz, USA), 1/100 oranında proteaz inhibitör kokteyli ve 1.66 μL fenilmetansülfonil florür ile muamele edildikten sonra sonikatör yardımı ile homojenat haline getirilmiştir. Daha sonra $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Oluşan 3 fazlı yapının orta fazı alınmıştır (homojenize edilen materyal adipoz doku olduğu için en üstte yağ tabaka bulunmaktadır). Daha sonra 20 μL 'lik kısım total protein miktar tayini için kullanılmış geriye kalan kısım eppendorf tüplere porsiyonlanmış ve sonraki analizler için -80°C 'de saklanmıştır.

3.5.2. Total Protein Miktar Tayini

Total protein miktar tayini Bradford yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Protein izolasyonu işleminden elde edilen homojenatlar (1/1 ve 1/50 dilüsyonu) ile daha önceden hazırlanan sığır serum albumin (BSA) standartları (400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 0 $\mu\text{g/mL}$) duplike olacak şekilde mikrolate kuyucuklarına uygulanmıştır. Daha sonra üzerlerine 200 μL Bradford boya çözeltisi (1 kısım Bradford reaktifi+4 kısım distile su)

ilave edilmiştir. 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 595 nm’de absorbans değerleri ölçülmüştür. Dilüe edilmemiş homojenat örneklerinin absorbans değerlerinin BSA standartlarının absorbans aralığının dışında olması nedeniyle standartların aralığında bulunan 1/50 homojenat dilüsyonları total protein hesaplamasında esas alınmıştır. BSA standartlarının absorbans değerleri ile Excel 2013 programı (Microsoft, ABD) vasıtasıyla çizdirilen grafiğin denklemi (3. derece polinomial) oluşturulmuş ve buna göre örneklerin absorbans değerlerinden total protein miktarları hesaplanmıştır.

3.5.3. PVAD’da Adiponektin Düzeyi Ölçümü

PVAD’da adiponektin ölçümü ELISA yöntemi ile Rat Adiponectin ELISA Kit (Cusabio, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde yer alan standartların optik dansite (OD) değerlerinin oluşturduğu aralığa denk gelecek dilüsyon oranını tespit etmek için, her gruptan birer örneğin farklı dilüsyonları ile deneme yapılmıştır. Yapılan deneme neticesinde 1/200 dilüsyon oranı uygun bulunmuş ve tüm örnekler, kitte yer alan örnek dilüenti ile bu oranda seyreltilerek kit talimatlarına göre çalışılmıştır. Tüm örnekler, standartlar ve blankler duplike olacak şekilde çalışılmış ve hesaplama için iki değer ortalama kullanılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri 37°C’de orbital shaker kullanılarak (60 rpm) gerçekleştirilmiştir. Buna göre kuyucuklara standart ve örnekler 100 µL hacminde uygulanmış ve 2 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürecin sonunda kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µL biotin-antikör uygulanmıştır. 1 saatlik inkübasyonun ardından kuyucuklar otomatik yıkayıcı (ELx50, Biotek, ABD) ile 3 kez yıkanmış ve yıkanan kuyucuklara 100 µL HRP-avidin uygulanmıştır. Tekrardan 1 saatlik inkübasyon yapılmış, kuyucuklar 5 kez yıkanmış ve 90 µL TMB substrat uygulanmıştır. Bu aşamada kuyucukları ışıktan korumak için plate alüminyum folyo ile kaplanmış ve 15-30 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kuyucuklara 50 µL stop solution ilave edilmiş ve mikropate reader (ELx800, Biotek, ABD) ile OD değerleri okunmuştur. Standartlardan elde edilen OD değerlerinin blank OD değeri çıkarıldıktan sonra CurveExpert 1.4 programı kullanılarak four parameter logistic (4-PL) denklemi çıkarılmış ve örneklerin OD değerlerine karşılık gelen adiponektin miktarları bu denkleme göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar dilüsyon oranıyla çarpılmış ardından total protein miktarlarına göre normalize edilmiştir.

3.5.4. PVAD'da Leptin Düzeyi Ölçümü

PVAD'da leptin ölçümü ELISA yöntemi ile Rat Leptin ELISA Kit (Sunred, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde yer alan standartların OD değerlerinin oluşturduğu aralığa denk gelecek dilüsyon oranını tespit etmek için, her gruptan birer örneğin farklı dilüsyonları ile deneme yapılmıştır. Yapılan deneme neticesinde 1/250 dilüsyon oranı uygun bulunmuş ve tüm örnekler PBS ile bu oranda seyreltilerek kit talimatlarına göre çalışılmıştır. Tüm örnekler, standartlar ve blankler duplike olacak şekilde çalışılmış ve hesaplama için iki değer ortalama kullanılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri 37°C'de orbital shaker kullanılarak (60 rpm) gerçekleştirilmiştir. Buna göre standartlardan 50 µL ve örneklerden 40 µL kuyucuklara uygulanmış ve yalnızca örneklerin üzerine 10 µL biotin-antikör ilave edilmiştir. Daha sonra tüm standart ve örnek kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP uygulanmıştır. Blank kuyucuklara bu aşamada hiçbir uygulama yapılmamıştır. 1 saat inkübasyonun ardından kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanmış ve tüm kuyucuklara (blank dahil) 50 µL Chromogen solution A ve yine 50 µL Chromogen solution B uygulanmıştır. Bu aşamada kuyucukları ışıktan korumak için plate alüminyum folyo ile kaplanmış ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda yine tüm kuyucuklara 50 µL stop solution ilave edilmiş ve OD değerleri okunmuştur. Blank OD değerinin 0 konsantrasyon karşılık geldiği kabul edilmiş ve CurveExpert 1.4 programı kullanılarak standartların four parameter logistic (4-PL) denklemi çıkarılmış ardından örneklerin OD değerlerine karşılık gelen leptin miktarları bu denkleme göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar dilüsyon oranıyla çarpılmış ardından total protein miktarlarına göre normalize edilmiştir.

3.5.5. PVAD'da TNF- α Düzeyi Ölçümü

PVAD'da TNF- α ölçümü ELISA yöntemi ile Rat TNF- α ELISA Kit (Sunred, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde yer alan standartların OD değerlerinin oluşturduğu aralığa denk gelecek dilüsyon oranını tespit etmek için, her gruptan birer örneğin farklı dilüsyonları ile deneme yapılmıştır. Yapılan deneme neticesinde 1/100 dilüsyon oranı uygun bulunmuş ve tüm örnekler bu oranda seyreltilerek kit talimatlarına göre çalışılmıştır. Tüm örnekler, standartlar ve blankler duplike olacak şekilde çalışılmış ve hesaplama için iki değerin ortalaması kullanılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri 37°C'de orbital shaker kullanılarak (60 rpm) gerçekleştirilmiştir. Buna göre

standartlardan 50 μ L ve örneklerden 40 μ L kuyucuklara uygulanmış ve yalnızca örneklerin üzerine 10 μ L biotin-antikör ilave edilmiştir. Daha sonra tüm standart ve örnek kuyucuklarına 50 μ L streptavidin-HRP uygulanmıştır. Blank kuyucuklara bu aşamada hiçbir uygulama yapılmamıştır. 1 saat inkübasyonun ardından kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanmış ve tüm kuyucuklara (blank dahil) 50 μ L Chromogen solution A ve yine 50 μ L Chromogen solution B uygulanmıştır. Bu aşamada kuyucukları ışıktan korumak için plate alüminyum folyo ile kaplanmış ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda yine tüm kuyucuklara 50 μ L stop solution ilave edilmiş ve OD değerleri okunmuştur. Blank OD değerinin 0 konsantrasyon karşılık geldiği kabul edilmiş ve CurveExpert 1.4 programı kullanılarak standartların four parameter logistic (4-PL) denklemi çıkarılmış ardından örneklerin OD değerlerine karşılık gelen TNF- α miktarları bu denkleme göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar örneklerin total protein miktarlarına göre normalize edilmiştir.

3.5.6. PVAD'da IL-6 Düzeyi Ölçümü

PVAD'da IL-6 ölçümü ELISA yöntemi ile Rat IL-6 ELISA Kit (Sunred, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit içerisinde yer alan standartların optik dansite değerlerinin oluşturduğu aralığa denk gelecek dilüsyon oranını tespit etmek için, her gruptan birer örneğin farklı dilüsyonları ile deneme yapılmıştır. Yapılan deneme neticesinde 1/100 dilüsyon oranı uygun bulunmuş ve tüm örnekler bu oranda seyreltilerek kit talimatlarına göre çalışılmıştır. Tüm örnekler, standartlar ve blankler duplike olacak şekilde çalışılmış ve hesaplama için iki değerin ortalaması kullanılmıştır. Tüm inkübasyon işlemleri 37°C'de orbital shaker kullanılarak (60 rpm) gerçekleştirilmiştir. Buna göre standartlardan 50 μ L ve örneklerden 40 μ L kuyucuklara uygulanmış ve yalnızca örneklerin üzerine 10 μ L biotin-antikör ilave edilmiştir. Daha sonra tüm standart ve örnek kuyucuklarına 50 μ L streptavidin-HRP uygulanmıştır. Blank kuyucuklara bu aşamada hiçbir uygulama yapılmamıştır. 1 saat inkübasyonun ardından kuyucuklar yıkama çözeltisi ile 5 kez yıkanmış ve tüm kuyucuklara (blank dahil) 50 μ L Chromogen solution A ve yine 50 μ L Chromogen solution B uygulanmıştır. Bu aşamada kuyucukları ışıktan korumak için plate alüminyum folyo ile kaplanmış ve 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda yine tüm kuyucuklara 50 μ L stop solution ilave edilmiş ve OD değerleri okunmuştur. Blank OD değerinin 0 konsantrasyon karşılık geldiği kabul edilmiş ve CurveExpert 1.4 programı kullanılarak standartların four

parameter logistic (4-PL) denklemi çıkarılmış ardından örneklerin OD değerlerine karşılık gelen IL-6 miktarları bu denkleme göre hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar örneklerin total protein miktarlarına göre normalize edilmiştir.

3.6. PVAD'da Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda, uygulanan diyabet modelinin ve pioglitazon uygulamasının PVAD örneklerinde pioglitazonun hedef molekülü PPAR- γ , otofaji ile ilişkili Beclin, LC3-II, p62 genleri ile endoplazmik retikulum (ER) stresi ile ilişkili ATF4, CHOP, GRP78 genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. PVAD'da gen ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi için -80 °C'de saklanmış olan PVAD doku örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikli olarak PVAD örneklerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, ardında cDNA sentezlenmiş ve ilgili genlerin ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür.

3.6.1. PVAD'dan RNA İzolasyonu

PVAD'da RNA izolasyonu gerçekleştirmek amacıyla her örnek için (10 mg) PVAD kit vasıtasıyla (High Pure RNA Isolation Kit, Roche, Germany) çalışılmıştır. Buna göre 10 mg PVAD örneklerine 400 μ L Lysis Buffer eklenmiş ve el homojenizatörü ile homojenize edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant kısmı alınmış üzerine absölü etanol eklenerek filtreli tüpe aktarılmış ve tekrar 15 sn. 8000g'de santrifüj edilmiştir. Ardından daha önceden hazırlanmış olan DNAase çözeltisi (90 μ L DNAase incubation buffer+ 10 μ L DNAase enzimi) ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon periyodunun ardından 500 μ L yıkama tamponu I eklenerek 15 sn. 8000g'de santrifüj yapılmıştır. Daha sonra 500 μ L yıkama tamponu II eklenmiş ve yine 15 sn. 8000g' de santrifüj yapılmıştır. Ardından 200 μ L yıkama tamponu II eklenmiş ve 2 dk. 13.000g'de santrifüj işlemi yapılmıştır. Son aşamada 100 μ L elüsyon tamponu eklenmiş 8000g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Mikrosantrifüj tüpte kalan RNA örneklerinin miktarları spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.

3.6.2. PVAD'dan Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Elde edilen RNA'lardan cDNA kit vasıtasıyla (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Thermofischer, USA) sentezlenmiştir. 10 μ L total RNA'dan cDNA sentezi için aşağıdaki karışım hazırlanmıştır (Tablo 3-4). Her bir örnek için hazırlanmış olan 10 μ L'lik karışım 10 μ L total RNA üzerine eklendikten sonra örnekler 25°C'de 10

dk, 37°C’de 120 dk, 85°C’de 5dk ve 4°C’de 5dk olacak şekilde programlanan thermal cyclers PCR (Axygen, ABD) cihazına yerleştirilmiştir. Reaksiyon süresinin sonunda elde edilen cDNA örnekleri gen ekspresyonlarını belirleme aşaması için yapılacak RT-PCR işlemine kadar -20°C’de saklanmıştır.

Tablo 3-4: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı (n=1 için gösterilmiştir).

İçerik	Miktar
10X RT Tampon	2 µL
25X dNTP	0,8 µL
10X RT Random Primer	2 µL
MultiScribe™ Ters Transkriptaz	1 µL
RNAaz İnhibitör	1 µL
ddH ₂ O	3,2 µl
RNA	10 µl
Toplam Hacim	20 µl

3.6.3. PVAD’da PPAR- γ , LC3-II, p62, Beclin, GRP78, ATF4, CHOP Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Kantitatif PCR analizi SYBR Green I Master kiti (Roche, Germany) kullanılarak ve LightCycler 480 (Roche, Germany) cihazı ile RT-PCR reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için kullanılan primerlerin baz dizileri ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 3-5’te verilmiştir.

Tablo 3-5: Ekspresyon düzeyleri bakılan genlerin primerlerinin baz dizileri ve bağlanma sıcaklıkları

Gen	Baz Dizisi	Bağlanma Sıcaklığı
PPAR- γ	İleri: TGC TGC AGG CCC TGG AAC TC	63,5°C
	Geri: AGC ACC TTG GCG AAC AGC TGG	63,7°C
L3-II	İleri: GTT AAG CCC CTA CCA AGG CA	59,4°C
	Geri: AGG GAC TGT TTC CAG GGA CT	59,4°C
P62	İleri: CTA GGC ATC GAG GTT GAC ATT	57,9°C
	Geri: CTT GGC TGA GTA CCA CTC TTA TC	60,6°C
Beclin	İleri: CTC TCG TCA AGG CGT CAC TTC	61,8°C
	Geri: CAT TCT TTA GGC CCC GAC G	58,8°C
GRP78	İleri: CCA ATG ACC AAA ACC GCC TG	59,4°C
	Geri: TGG CTT TCC AGC CAT TCG AT	57,3°C
ATF4	İleri: CCC CAG GGT TTC TGT CTT CC	61,4°C
	Geri: TGG CGA GAG AAT CTG CCT TC	59,4°C
CHOP	İleri: CTG TTG GCA TCA CCT CCT GT	59,4°C
	Geri: AGT GTA CAA GCC CCT CTC CT	59,4°C
β -Aktin	İleri: CGT GCG TGA CAT TAA AGA G	54,5°C
	Geri: TTG CCG ATA GTG ATG ACC T	54,5°C

Ekspresyon düzeyi bakılacak genlere özgül liyofilize halde gelen primerler son konsantrasyonları 100µM olacak şekilde PCR saflığındaki su ile çözülerek ana stokları hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan 1/10 dilüsyon yapılarak 10µM final konsantrasyonlardaki ara stoklar oluşturulmuştur. Her bir örnek için 6 µl distile su, 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer, 10 µl SensiFAST SYBR Mix (Bioline, ABD) eklenerek mikrosantrifüj tüpüne konulmuştur. Hazırlanan PCR karışımı vorteksenerek her bir örnek için lightcycler kapiller tüplere 18 µl olacak şekilde aktarılmış ve 2 µl cDNA örnekleri eklenmiştir. Uygulanmış olan RT-PCR reaksiyonunun genel protokolü Tablo 3-6’te verilmiştir.

Tablo 3-6: RT-PCR protokolü

Program adı	Siklus	Sıcaklık °C	Süre
Polimeraz aktivasyonu	1	95	2 dk.
Denatürasyon	40	95	5 sn.
Primerlerin hedef DNA’ ya bağlanması	40	54-64	10 sn.
Uzama	40	72	5-20 sn.
Uzama	1	72	1 dk.

Genlerin mRNA seviyesindeki değişimler β-aktin mRNA’sının kontrol olarak kullanılması ile hesaplanmıştır. SYBR Green hidrolizine bağlı floresan artışı görülen inceleme örneklerinden elde edilen grafiklerdeki eşik döngüsü (CT) verileri değerlendirilmiştir. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için yapılan gerçek zamanlı PCR (RT-PCR) deneylerinde kullanılan örneklerin her biri duplike olarak çalışılmış ve elde edilen CT değerlerinin ortalaması alınmıştır. Genlerin artış, azalış oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır. Yöntem formülü şu şekildedir:

$$\Delta Ct = Ct(\text{hedef}) - Ct(\text{referans})$$

$$\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct} = \text{Ürün miktarı oranı}$$

3.7. Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik değerlendirme için 15 haftalık deney süreci sonunda sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer ve 2 mm'lik PVAD'lı torasik aorta halkaları kullanılmıştır. Dokular %10'luk formalin solüsyonu ile fikse edildikten sonra parafinize edilmiş ve 5µm'lik 3 enine kesit alınmıştır. Ardından kesitler ksilen ile deparafinize edilmiş ve hematoksilen-eozin boyama yöntemi histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir (Araujo vd., 2015). Değerlendirme çalışmada yer alan patolog araştırmacı tarafından her bir örneğin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin körleme olarak yapılmıştır. İncelenen organ ve dokularda çeşitli hasar parametreleri değerlendirilmiş ve skorlama yapılmıştır. İlgili hasar parametreleri ve skorlama Tablo 3-7 ve Tablo 3-8'da verilmiştir.

Tablo 3-7: İncelenen organ ve dokularda histopatolojik değerlendirme parametreleri

Kalp	Karaciğer	PVAD	Aorta
Miyokard kas liflerinde bozulma ve kollaps, myokardiyal dejenerasyon	Steatoz	Adipositlerde genişleme	Damar duvarında kalınlaşma

Tablo 3-8: İncelenen organ ve dokularda histopatolojik değerlendirme skorları

0	1	2	3
Yok	Hafif	Orta	Yoğun

3.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada yer alan “n” sayısı deneyde ilgili analiz için kullanılan her bir sıçan sayısını ifade etmektedir. Tüm sonuçlar “ortalama ± st. hata (SEM)” olarak verilmiştir.

Sıçan ağırlıkları gram (g) cinsinden ifade edilmiş ve değerlendirilme için tekrarlayan ölçümlerde iki-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bonferroni post-test kullanılmıştır.

Biyokimyasal parametrelerin (açlık glukoz, total kolesterol ve trigliserit) değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA ve tukey post-test kullanılmıştır.

OGTT'de zamana bağlı olarak kan glukoz düzeylerinin değerlendirilmesi ve gruplar arası karşılaştırılması için tekrarlayan ölçümlerde iki-yönlü ANOVA ve bonferroni post-test kullanılmıştır. OGTT ile elde edilen kan glukoz-zaman eğrilerinden trapez yöntemi ile eğri altında kalan alan (AUC) değerleri hesaplanmış, değerlendirme için tek-yönlü ANOVA ve tukey post-test kullanılmıştır.

Vasküler reaktivitenin değerlendirilmesinde NA'nın kastırıcı etkisi "KCl'ye göre % kasılma" üzerinden değerlendirilmiştir. "% kasılma" değerlerinin hesaplanmasında, 40 mM KCl'nin o dokuda oluşturduğu kasılma cevabı "%100" olarak kabul edilmiş ve kasılma cevaplarının yüzdesi bu değere göre hesaplanmıştır. ACh'ın gevşetici etkisinin değerlendirilmesi için NA prekontraksiyonu "%100" olarak kabul edilmiş, gevşeme cevaplarının yüzdesi bu değere göre hesaplanmıştır. Vasküler reaktivitenin değerlendirilmesinde kümülatif olarak uygulanan KCl'nin kastırıcı etkisi "gram kasılma" olarak verilmiştir. SNP'nin gevşetici etkisinin değerlendirilmesi için NA prekontraksiyonu "%100" olarak alınmış ve gevşeme cevaplarının yüzdesi bu değere göre hesaplanmıştır. Değerlendirme için tekrarlayan ölçümlerde iki-yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bonferroni post-test kullanılmıştır.

Kastırıcı ve gevşetici maddelerin maksimum (Emaks) değerlerinin hesaplanması için her bir konsantrasyon-yanıt eğrisinde non-lineer regresyon analizi yapılmış ve maksimum gevşetici ve kastırıcı yanıtların ortalamaları alınmıştır. Kastırıcı ve gevşetici maddelerin pD₂ (maksimum kasılma ve gevşeme yanıtının %50'sini oluşturmak için gereken agonist konsantrasyonunun negatif logaritması, -logEC₅₀) değerlerinin hesaplanması için her bir konsantrasyon yanıt eğrisi için non-lineer regresyon analizi yapılmış ve elde edilen sonuçların ortalaması alınmıştır.

PVAD ağırlıklarının değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA ve tukey post-test kullanılmıştır.

PVAD'dan total protein miktar tayini için BSA standart eğrisi Microsoft Excel programı ile çizilmiş ve eğrinin 3. dereceden polinomial denklemi aynı program vasıtasıyla hesaplanmıştır.

PVAD'da adiponektin ve leptin düzeylerinin değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA ve tukey post-test kullanılmıştır.

PVAD'da TNF- α ve IL-6 düzeylerinin değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA ve tukey post-test kullanılmıştır.

PVAD'da gen ekspresyon düzeylerinin değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA tukey post-test kullanılmıştır.

Histopatolojik değerlendirmede hasar skorlarının değerlendirilmesi için tek-yönlü ANOVA tukey post-test kullanılmıştır.

Tüm istatistiksel analizler Graphpad Prism (version 5.00) kullanılarak yapılmıştır. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

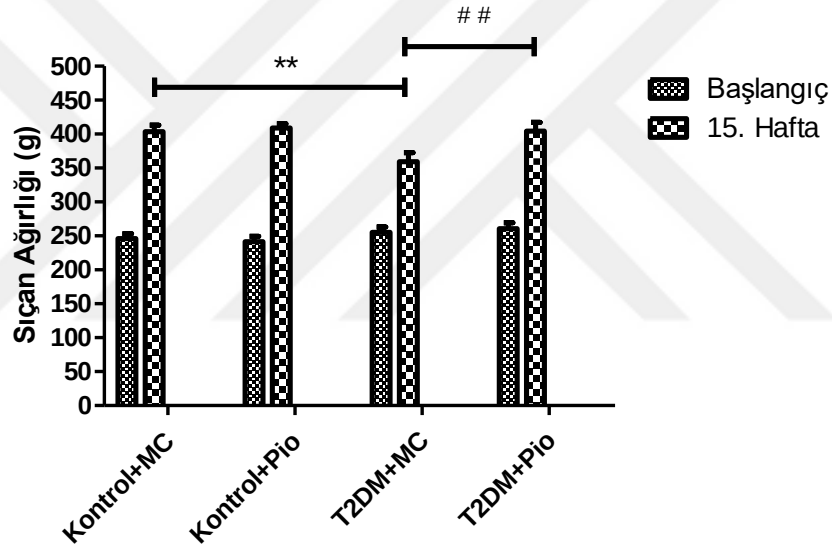
4.1. Sıçanların Ağırlıklarının Ölçülmesi

Sakrifikasyon işleminin gerçekleştirildiği son gün sıçanlar tartılmış ve başlangıç ağırlıkları ile kıyaslanmıştır (Tablo 4-1). Deney sürecinin başlangıcında tüm gruplarda sıçan ağırlıkları yaklaşık olarak aynı düzeydedir (~250 g). T2DM+MC grubunda STZ uygulamasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde kilo kaybı gözlenmiş, ayrıca pioglitazon uygulanan diyabetik sıçanlarda kontrol diyabetik sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ağırlık artışı olduğu tespit edilmiştir. Kontrol gruplarında ise pioglitazon uygulaması herhangi bir ağırlık artışına yol açmamıştır (Şekil 4-1).

Tablo 4-1: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15. Hafta) sıçan ağırlıkları

Ağırlık (g)	Kontrol+MC	Kontrol+Pio	T2DM+MC	T2DM+Pio
Başlangıç (0. Hafta)	245,925±7,28	241,53±8,03	255,17±8,02	260,45±8,74
Deney Sonu (15.Hafta)	403,33±9,81	408,86±6,41	359,54±13,02**	404,48±12,97##

**p<0.01 T2DM+MC 15. Hafta vs Kontrol+MC 15. Hafta, ##p<0.01 T2DM+Pio 15. Hafta vs T2DM+MC 15. Hafta, tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi, bonferroni post-test (n=12-15, ortalama±SEM).

**Şekil 4-1: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15. Hafta) sıçan ağırlıkları**

**p<0.01 T2DM+MC 15. Hafta vs Kontrol+MC 15. Hafta, ##p<0.01 T2DM+Pio 15. Hafta vs T2DM+MC 15. Hafta, tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi, bonferroni post-test (n=12-15, ortalama±SEM).

4.2. Biyokimyasal Parametrelerin Değerlendirilmesi

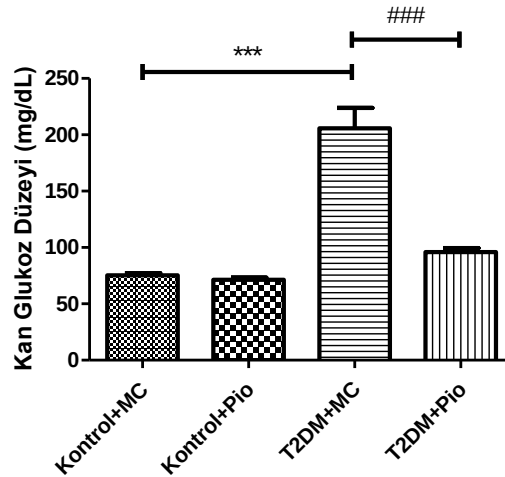
4.2.1. Açlık Kan Glukozu Düzeyinin Değerlendirilmesi

15. hafta sonunda sakrifikasyon işleminden önce glukometre vasıtasıyla sıçanların kuyruk ucundan 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür. 15. hafta sonunda ölçülen değerler ile uygulanan diyabet modelinin kontrol grubuna göre kan glukoz düzeyleri artmaktadır. Pioglitazon uygulaması ile diyabet grubunda kan glukoz düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmıştır (Tablo 4-2, Şekil 4-2).

Tablo 4-2: Deney sürecinin başlangıcında (0. Hafta) ve sonunda (15.hafta) sıçanlarda 8 saatlik açlık sonrası ölçülen glukoz değerleri

Glukoz (mg/dL)	Kontrol+MC	Kontrol+Pio	T2DM+MC	T2DM+Pio
Başlangıç (0. Hafta)	80,38±2,25	81,5±1,21	82,88±1,63	82,5±1,11
Deney Sonu (15. Hafta)	75,25±1,93	71,25±1,94	205,8±18,00***	96,00±3,44###

***p<0.001, T2DM+MC 15. Hafta vs. Kontrol+MC 15. Hafta, ###p<0.001, T2DM+Pio 15. Hafta vs. T2DM+MC 15. Hafta, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=5-8, ortalama±SEM)

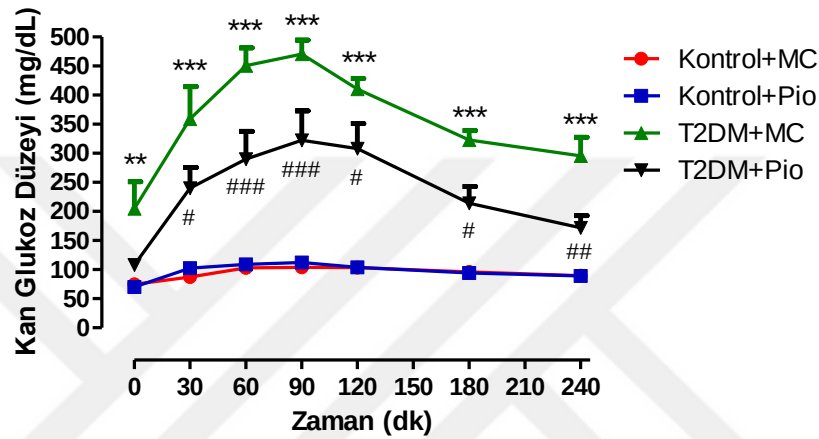


Şekil 4-2: Deney süreci sonunda (15.haftada) ölçülen 8 saatlik açlık kan glukoz düzeyleri.

***p<0.001 T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ###p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=5-8, ortalama±SEM).

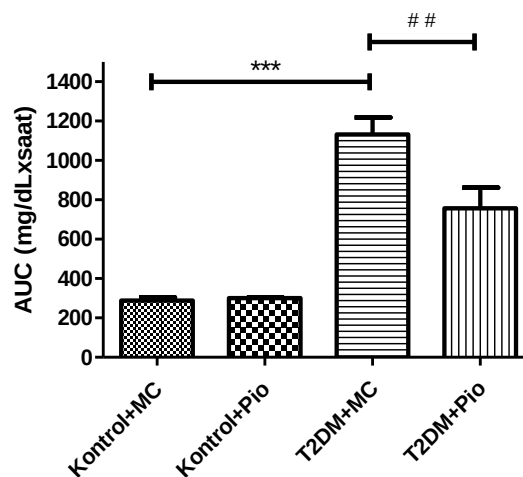
4.2.2. OGTT

Deney sürecinin sonunda sıçanlara OGTT uygulanmıştır. HFD/STZ modelinin kan glukoz düzeyini artırdığı, pioglitazon uygulamasının diyabetik hayvanlarda glukoz düzeyini azalttığı bulunmuştur (Şekil 4-3). Paralel olarak eğri altında kalan alanın (AUC) diyabetik kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gösterdiği, pioglitazon uygulamasının ise diyabetik sıçanlarda AUC'yi anlamlı olarak azalttığı belirlenmiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-3: Deney süreci sonunda (15.hafta) sıçanlarda OGTT uygulaması ile elde edilen kan glukoz düzeylerinin zamana bağlı değişimi.

p<0.01, *p<0.001 T2DM+MC vs Kontrol+MC, #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 T2DM+Pio vs T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post test (n=4-5, ortalama±SEM).



Şekil 4-4: Deney süreci sonunda sıçanlara uygulanan OGTT ile elde edilen AUC değerleri.

***p<0.001, T2DM+MC vs Kontrol+MC, ##p<0.01 T2DM+Pio vs T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n= 4-5, ortalama±SEM)

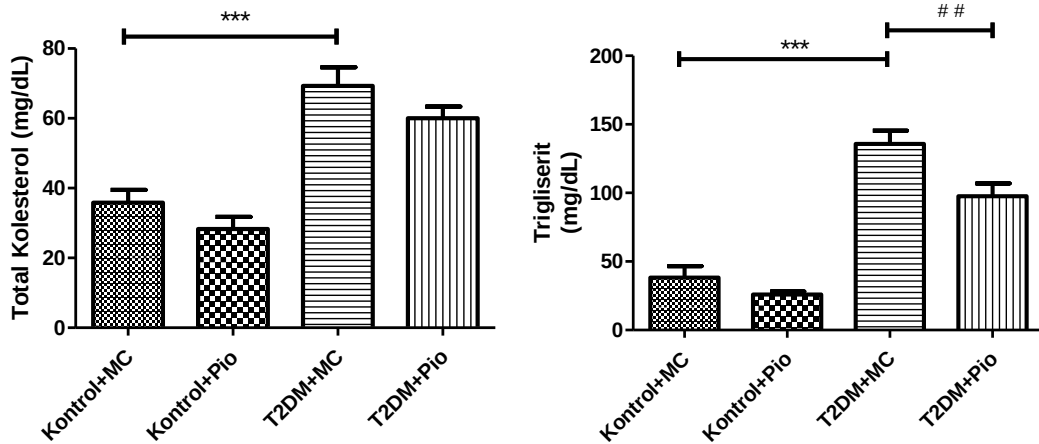
4.2.3. Total Kolesterol ve Trigliserit Düzeylerinin Değerlendirilmesi

15. hafta sonunda, 8 saatlik açlık sonrası sıçanların kalbinden elde edilen serumdan total kolesterol ve trigliserit ölçümleri otomatik analizör ile enzimatik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sayısal değerler Tablo 4-3'te gösterilmiştir. Diyabet grubunda total kolesterol ve trigliserit düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yükselmiştir. Diyabet grubunda 20mg/kg pioglitazon uygulaması trigliserit düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olurken, total kolesterol düzeylerinde azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-5).

Tablo 4-3: Deney süreci sonunda (15. Hafta) sıçanlarda ölçülen serum total kolesterol ve trigliserit düzeyleri

Parametre	Kontrol+MC	Kontrol+Pio	T2DM+MC	T2DM+Pio
Total Kolesterol (mg/dL)	35,83±3,64	28,30±3,43	69,30±5,33***	60,00±3,37
Trigliserit (mg/dL)	43,75±9,36	26,90±2,40	142,66±10,72***	93,18±11,17##

***p<0.001, T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ##p<0.01, T2DM+Pio vs. T2DM+MC tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=10-14, ortalama±SEM)



Şekil 4-5: Deney süreci sonunda (15. Hafta) alınan kandan ölçülen total kolesterol ve trigliserit düzeyleri.

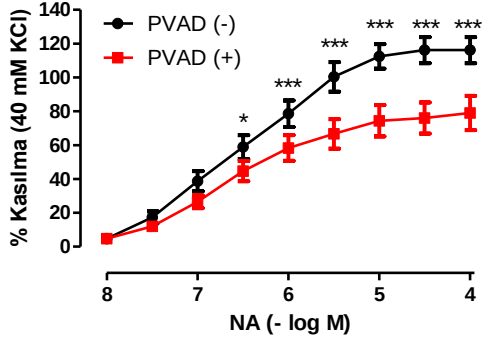
***p<0.001 T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ##p<0.01 T2DM+Pio vs. T2DM+MC tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=10-14, ortalama±SEM)

4.3. Vasküler Reaktivite Tayini

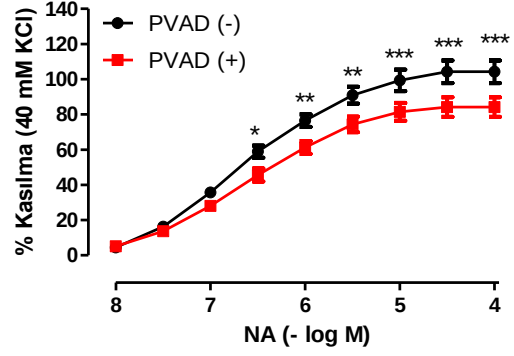
4.3.1. Reseptör-Aracılı Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Deney gruplarından izole edilen ikisi PVAD'lı ikisi PVAD'sız sıçan torasik aorta halkalarında reseptör-aracılı kasılma yanıtlarının değerlendirilmesi için organ banyosu sisteminde NA (10^{-8} - 10^{-4} M) kümülatif olarak uygulanmış ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir. Kontrol+MC grubunda PVAD'ın NA kasılmasını baskıladığı yani antikontraktil etkisi olduğu tespit gözlenmiştir (Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx$ %67; Şekil 4-6A). T2DM+MC grubunda gevşetici etkinin kısmen azalmış olduğu (Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx$ %80; Şekil 4-6C) ve pioglitazon uygulaması ile bu etkinin kısmen geriye döndüğü gözlenmiş (Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx$ %74; şekil 4-6D) ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-7). Buna ilaveten Kontrol+Pio grubunda PVAD'ın gevşetici bir etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca gruplar arasında pD2 değerlerinin de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklı olmadığı tespit edilmiştir.

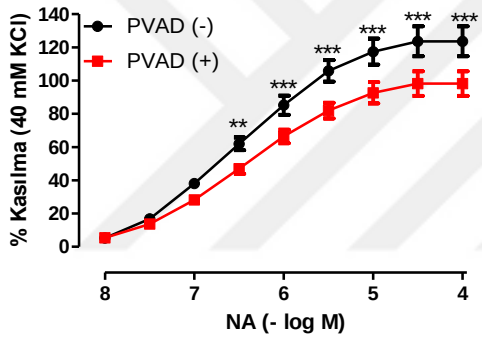
A) Kontrol+MC



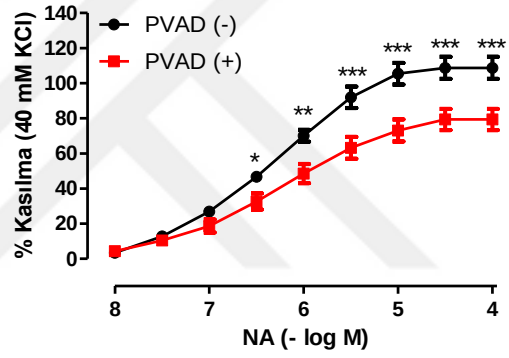
B) Kontrol+Pio



C) T2DM+MC



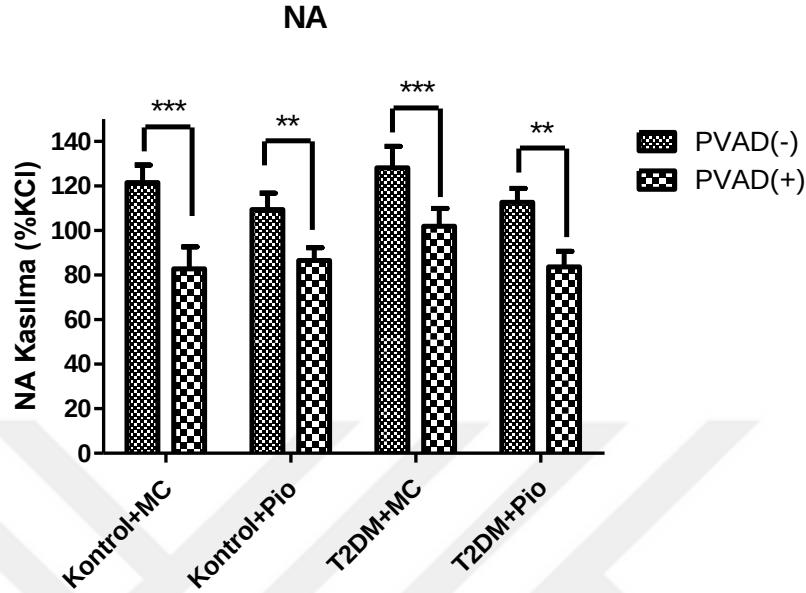
D) T2DM+Pio



Şekil 4-6: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi ($n=6-8$, ortalama $\pm$ SEM).

NA Emaks ve pD2 değerleri tüm gruplar için Şekil 4-7 ve Tablo 4-4'te verilmiştir.



Şekil 4-7: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA Emaks değerleri.

p<0.01, *p<0.001 tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi (n=6-8, ortalama±SEM).

Tablo 4-4: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında NA Emaks ve pD2 değerleri.

	Emaks (%)		pD2		N
	PVAD (-)	PVAD (+)	PVAD (-)	PVAD (+)	
Kontrol+MC	121,57±7,84	82,83±9,88***	6.57±0,17	6.61±0,08	8
Kontrol+Pio	109,48±7,34	86,07±5,73**	6.79±0,12	6.60±0,09	8
T2DM+MC	128,23±9,63	101,96±7,99***	6.54±0,08	6.44±0,07	8
T2DM+Pio	112,68±6,20	83,72±7,02**	6.49±0,14	6.31±0,19	6

pD2 : Maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun negatif logaritma değeri (-logEC50)

Emaks : Maksimum kasılma yanıtının %KCl 40mM cinsinden değeri

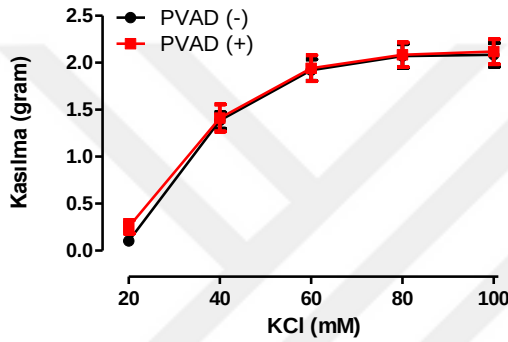
N: İzole aorta sayısı

p<0.01, *p<0.001 tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi (n=6-8, ortalama±SEM).

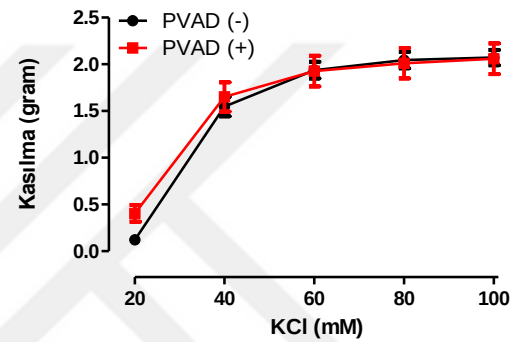
4.3.2. Reseptör-Aracılı Olmayan Kasılma Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Deney gruplarından izole edilen ikisi PVAD'lı ikisi PVAD'sız sıçan torasik aorta halkalarında reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarının değerlendirilmesi için organ banyosu sisteminde KCl (20-100 mM) kümülatif olarak uygulanmış ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir. Reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarında PVAD'ın, uygulanan diyabet modelinin ya da pioglitazon uygulamasının herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 4-8, Tablo 4-5).

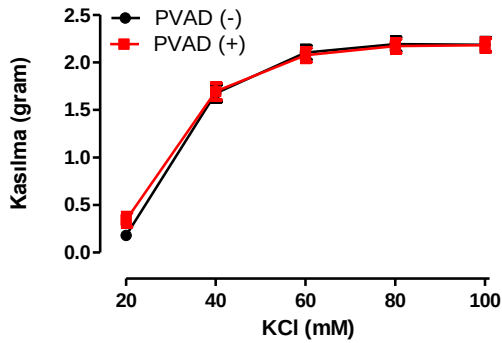
A) Kontrol+MC



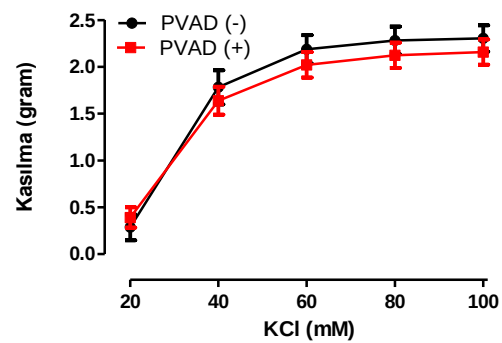
B) Kontrol+Pio



C) T2DM+MC



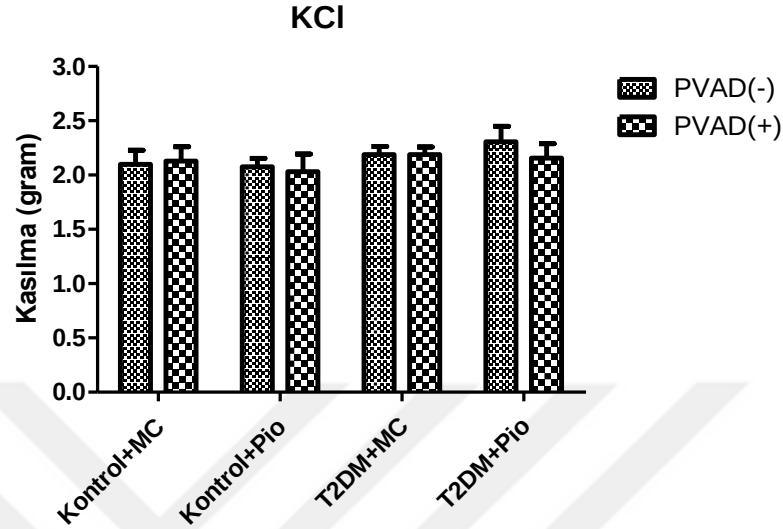
D) T2DM+Pio



Şekil 4-8: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl (20-100 mM) konsantrasyon-yanıt eğrileri.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=8-10, ortalama±SEM)

KCl duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. KCl'ye ait Emaks ve pD2 değerleri tüm gruplar için Şekil 4.9 ve Tablo 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4-9: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl Emaks değerleri.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n= 8-10, ortalama±SEM)

Tablo 4-5: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında KCl Emaks ve pD2 değerleri.

	Emaks (g)		pD2 (Mm)		N
	PVAD (-)	PVAD (+)	PVAD (-)	PVAD (+)	
Kontrol+MC	2,10±0,12	2,12±0,13	39,66±0,07	39,72±0,08	8
Kontrol+Pio	2,07±0,07	2,03±0,16	39,48±0,07	39,43±0,05	10
T2DM+MC	2,19±0,07	2,18±0,06	38,78±0,74	39,78±0,75	9
T2DM+Pio	2,30±0,14	2,15±0,13	39,46±0,09	39,56±0,04	8

pD2 : Maksimum kasılma yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun negatif logaritma değeri (-logEC50)

Emaks : Maksimum kasılma yanıtının gram cinsinden değeri

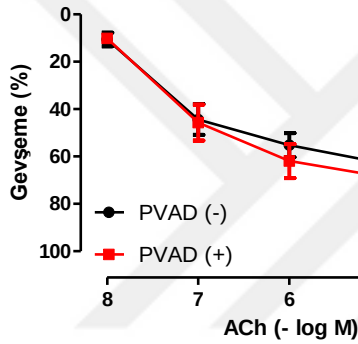
N: İzole aorta sayısı

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi,

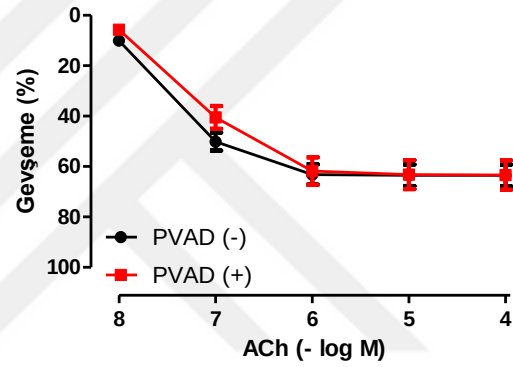
4.3.3. Endotel-Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

Deney gruplarından izole edilen ikisi PVAD'lı ikisi PVAD'sız sıçan torasik aorta halkalarında endotel-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için submaksimal NA (10^{-6} M) ile prekontrakte edilen dokulara kümülatif (10^{-8} - 10^{-4} M) olarak ACh uygulanmış ve elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri değerlendirilmiştir. Endotel-aracılı gevşeme yanıtlarında PVAD'ın, uygulanan diyabet modelinin ya da pioglitazon uygulamasının deney grupları üzerine herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. (Şekil 4-10, Tablo 4-6)

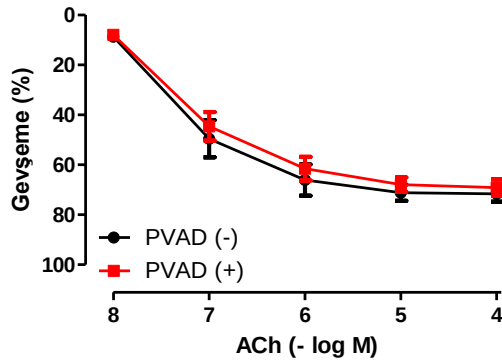
A) Kontrol+MC



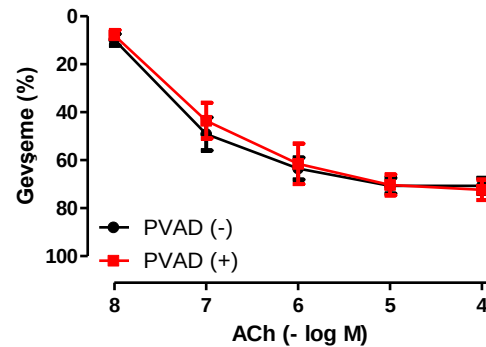
B) Kontrol+Pio



C) T2DM+MC



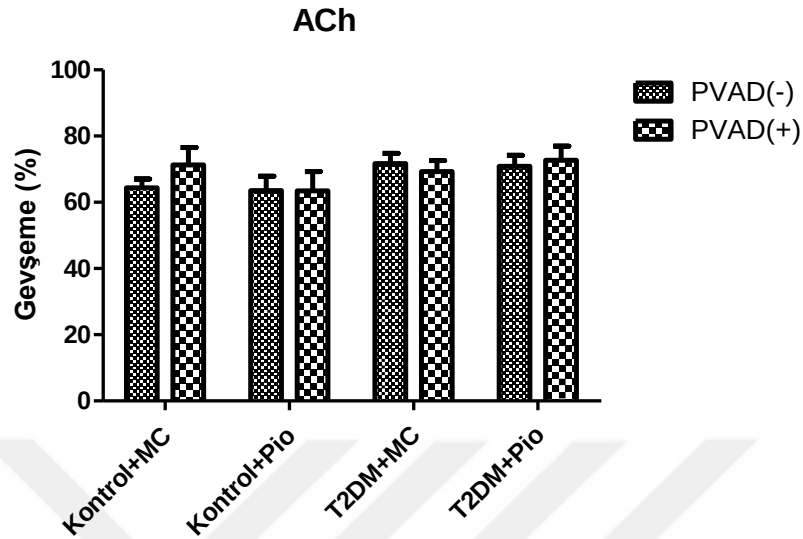
D) T2DM+Pio



Şekil 4-10: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh (10^{-8} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri.

$p > 0.05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=8-9, ortalama $\pm$ SEM).

ACh duyarlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. ACh Emaks ve pD2 değerleri tüm gruplar için Şekil 4-11 ve Tablo 4-6'da verilmiştir.



Şekil 4-11: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh Emaks değerleri.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=8-9, ortalama±SEM).

Tablo 4-6: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında ACh Emaks ve pD2 değerleri.

	Emaks (%)		pD2		N	Prekontraksiyon (g)
	PVAD (-)	PVAD (+)	PVAD (-)	PVAD (+)		
Kontrol+MC	64,38±2,65	71,25±5,28	6,90±0,18	6,81±0,20	8	0,80±0,14
Kontrol+Pio	63,58±4,30	63,45±5,80	7,11±0,02	7,10±0,06	8	0,93±0,09
T2DM+MC	71,70±3,08	69,29±3,36	6,88±0,18	6,91±0,19	9	0,97±0,1
T2DM+Pio	70,88±3,34	72,68±4,27	7,01±0,16	6,94±0,22	8	0,82±0,12

pD2: Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun negatif logaritma değeri (-logEC50)

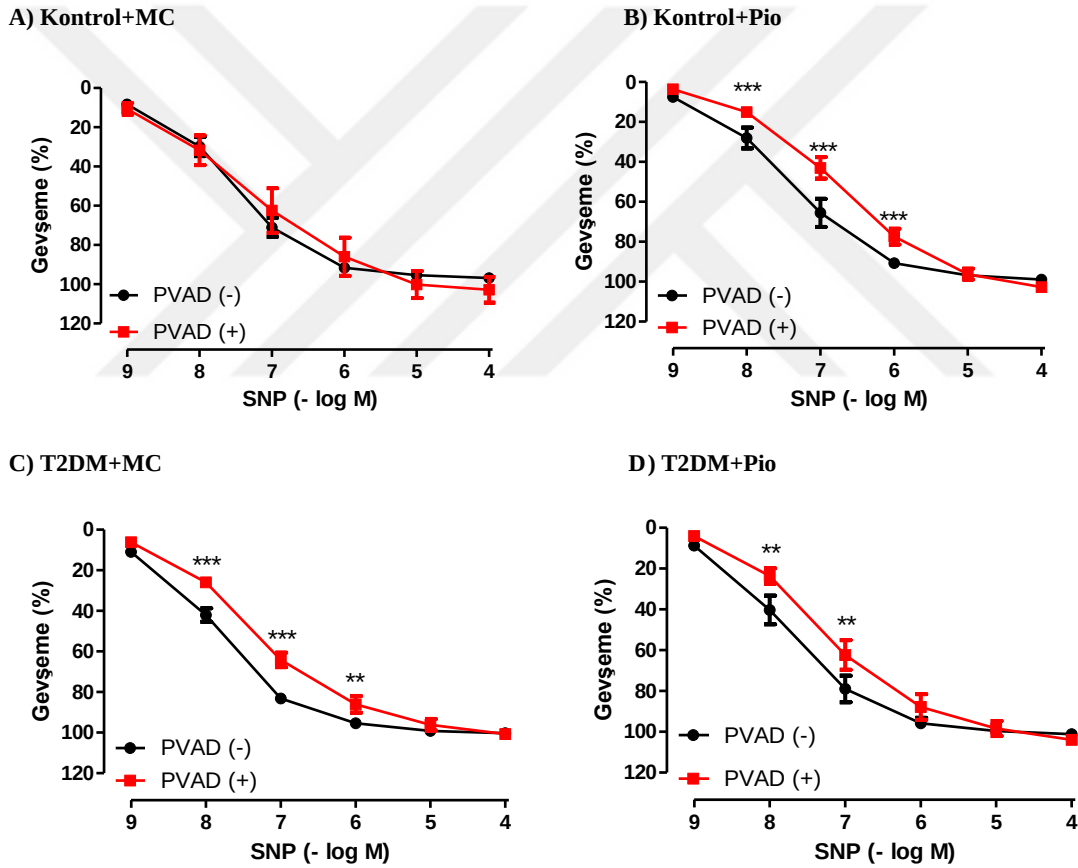
Emaks: Maksimum gevşeme yanıtının %NA prekontraksiyonu cinsinden değeri

N: İzole aorta sayısı

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi

4.3.4. Düz Kas-Aracılı Gevşeme Yanıtlarının Değerlendirilmesi

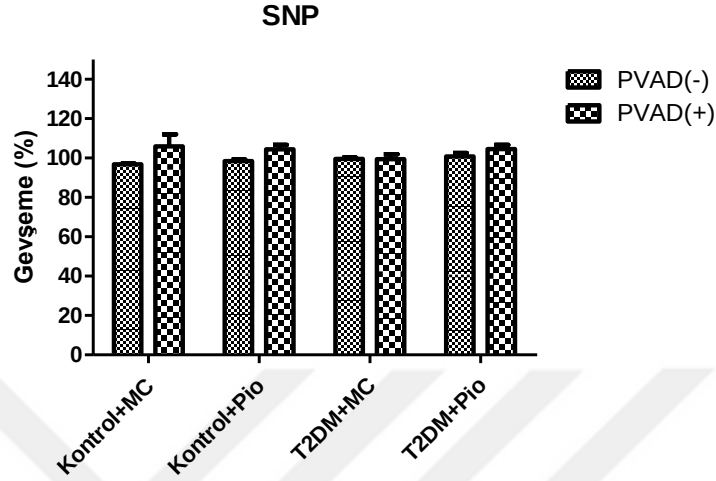
Deney gruplarından izole edilen ikisi PVAD'lı ikisi PVAD'sız sıçan torasik aorta halkalarında düz kas-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilmesi için submaksimal NA (3×10^{-6} M) ile prekontrakte edilen dokulara kümülatif (10^{-9} - 10^{-4} M) olarak SNP uygulanmış ve elde edilen konsantrasyon-yanıt eğrileri değerlendirilmiştir. Pioglitazon uygulanan gruplarda ve diyabetik kontrol grubunda PVAD'lı halkaların SNP yanıtlarında duyarlılığın azaldığı gözlenmiş ve bu değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4-12 B, C ve D).



Şekil 4-12: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında SNP (10^{-9} - 10^{-4} M) konsantrasyon-yanıt eğrileri

p<0.01, *p<0.001 tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi (n=6-9, ortalama±SEM).

Kontrol+Pio, T2DM+MC ve T2DM+Pio gruplarında PVAD varlığının SNP'ye olan duyarlılığı artırdığı tespit edilmiştir. SNP Emaks ve pD2 değerleri tüm gruplar için Şekil 4-13 ve Tablo 4-7'de verilmiştir.



Şekil 4-13: İzole edilen PVAD (-) ve PVAD (+) sıçan torasik aorta halkalarında SNP Emaks değerleri.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=6-9, ortalama±SEM)

Tablo 4-7: İzole edilen torasik aortalara ait SNP Emaks ve pD2 değerleri

	Emaks (%)		pD2		N	Prekontraksiyon (g)
	PVAD (-)	PVAD (+)	PVAD (-)	PVAD (+)		
Kontrol+MC	96,86±0,31	105,94±6,13	7,54±0,11	7,16±0,28	6	0,82±0,23
Kontrol+Pio	98,41±0,78	104,46±2,18	7,36±0,16	6,75±0,12**	8	1,06±0,15
T2DM+MC	99,50±0,66	99,39±2,55	7,83±0,07	7,33±0,08**	9	0,92±0,11
T2DM+Pio	100,86±1,74	104,59±2,12	7,79±0,16	7,22±0,20**	8	0,85±0,18

pD2: Maksimum gevşeme yanıtının %50'sini oluşturan konsantrasyonun negatif logaritma değeri (-logEC50)

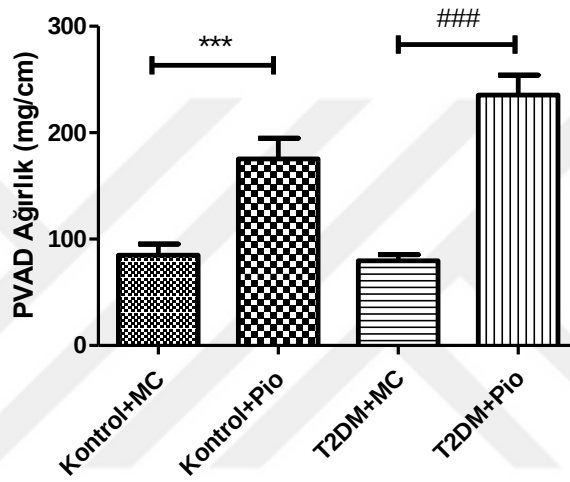
Emaks: Maksimum gevşeme yanıtının %NA prekontraksiyonu cinsinden değeri

N: İzole aorta sayısı

**p<0.01, tekrarlayan ölçümlerde çift-yönlü varyans analizi (n=6-9, ortalama±SEM).

4.4. PVAD Ağırlıklarının Ölçülmesi

İzole organ banyosu deneyleri sonunda sıçan torasik aorta halkaları sistemden çıkarılmış, PVAD'ları temizlenmiş, ardından damar halkalarının boyları ölçülmüş ve temizlenen PVAD'lar tartılarak ağırlıkları damar halkalarının boylarına göre normalize edilmiştir. Gerek kontrol gerekse diyabet gruplarında pioglitazon uygulamasının sıçanların PVAD ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu bu artışın diyabet grubunda daha belirgin olduğu gözlenmiştir. PVAD ağırlıkları damar boylarına göre normalize edilmiş olarak Şekil 4-14'te ve Tablo 4-8'de verilmiştir.



Şekil 4-14: PVAD ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması. (PVAD ağırlıkları aorta halkasının uzunluğuna göre normalize edilmiştir.)

***p<0.001 Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC, ###p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=6-9, ortalama±SEM)

Tablo 4-8: PVAD ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırması.

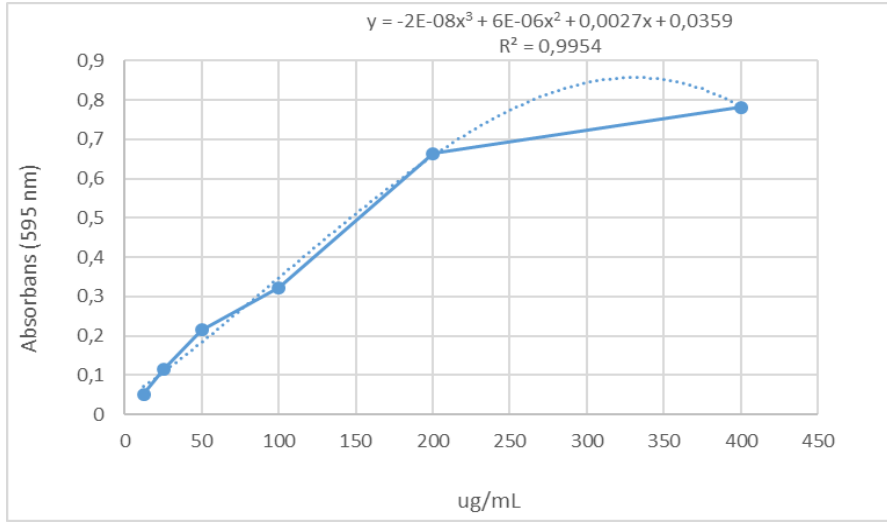
	PVAD Ağırlığı (mg/cm)	N
Kontrol+MC	84,78±10,67	8
Kontrol+Pio	175,45±19,27***	6
T2DM+MC	79,64±5,68	9
T2DM+Pio	235,47±18,69###	8

***p<0.001 Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC, ###p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=6-9, ortalama±SEM)

4.5. PVAD’da Adipokin ve İnflamatuvar Sitokin Düzeyi Ölçümü

4.5.1. Protein İzolasyonu ve Miktar Tayini

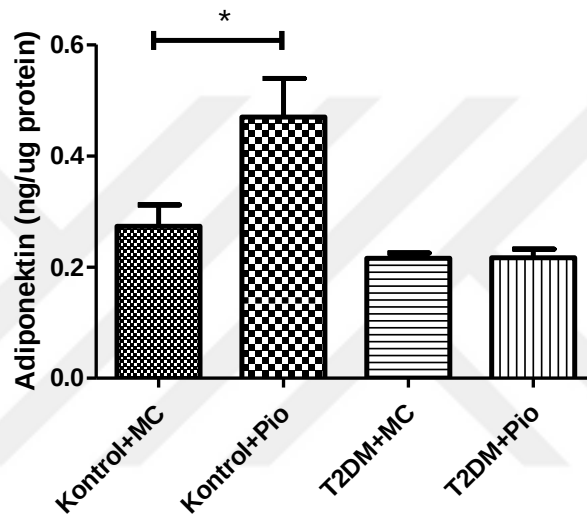
PVAD örneklerinde protein izolasyonu gerçekleştirilmiş ve miktar tayini Bradford yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bradford yöntemi ile elde edilmiş olan standart eğri ve eğrinin denklemi Şekil 4-15’te gösterilmiştir.



Şekil 4-15: BSA standart eğrisi ve 3. dereceden polinomial denklemi.

4.5.2. Adiponektin Miktar Tayini

ELISA yöntemi kullanılarak PVAD'dan yapılan adiponektin ölçümü neticesinde kontrol grubunda pioglitazon uygulamasının adiponektin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Uygulanan diyabet modeli ile adiponektin miktarında kontrol gruba göre kısmen bir düşüş (~%20) gözlenmiş fakat bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca, diyabet grubunda pioglitazon uygulamasının adiponektin miktarında değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir. (Şekil 4-16, Tablo 4-9)

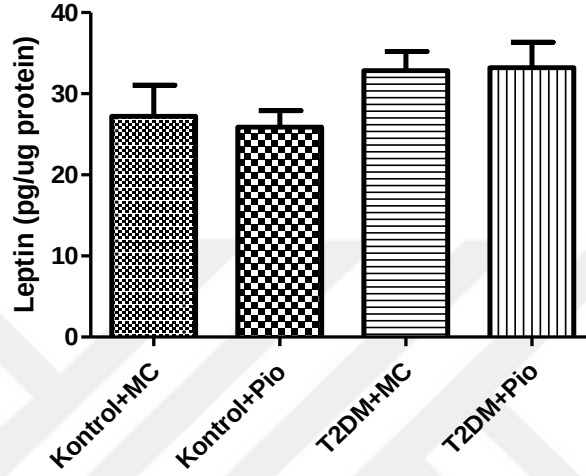


Şekil 4-16: PVAD'da ölçülen adiponektin miktarının gruplar arası değişimi.

* $p < 0.05$ tek-yönlü varyans analizi, tukey post test ($n=3-6$, ortalama $\pm$ SEM)

4.5.3. Leptin Miktar Tayini

ELISA yöntemi kullanılarak PVAD'dan yapılan leptin ölçümü neticesinde T2DM+MC ve Diyabet+Pio gruplarında kısmi bir artış gözlenmiş fakat söz konusu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-17, Tablo 4-9).



Şekil 4-17: PVAD'da ölçülen leptin miktarının gruplar arası değişimi.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=4-6, ortalama±SEM)

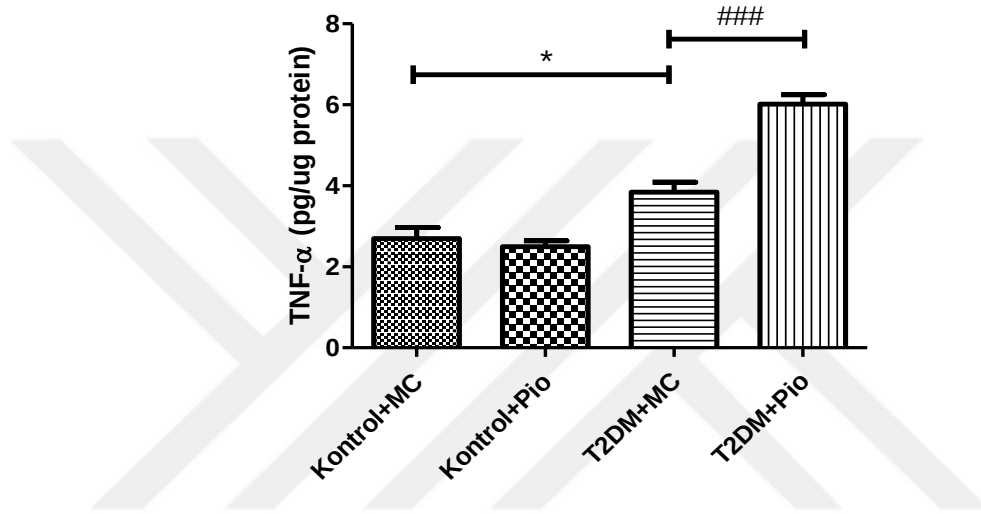
Tablo 4-9: PVAD'da ölçülen adiponektin ve leptin miktarının gruplar arası değişimi.

	Adiponektin (ng/ug protein)	N	Leptin (pg/ug protein)	N
Kontrol+MC	0,273±0,038	3	27,215±3,828	4
Kontrol+Pio	0,47±0,069*	5	25,898±2,015	6
T2DM+MC	0,216±0,009	5	32,866±2,335	6
T2DM+Pio	0,217±0,016	6	33,208±3,151	5

*p<0.05 Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=3-6 adiponektin, 4-6 leptin, ortalama±SEM)

4.5.4. TNF- α Miktar Tayini

ELISA yöntemi kullanılarak PVAD'dan yapılan TNF- α ölçümü neticesinde T2DM+MC grubunda Kontrol+MC grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca, diyabet grubunda pioglitazon uygulamasının TNF- α miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. (Şekil 4-18, Tablo 4-10).

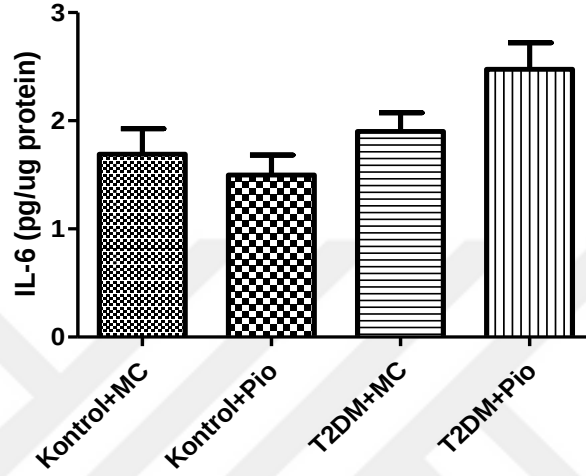


Şekil 4-18: PVAD'da ölçülen TNF- α miktarının gruplar arası değişimi.

* $p < 0.05$ T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ### $p < 0.001$ T2DM+Pio vs. T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test ($n=5$, ortalama $\pm$ SEM)

4.5.5. IL-6 Miktar Tayini

ELISA yöntemi kullanılarak PVAD'dan yapılan IL-6 ölçümü neticesinde, uygulanan diyabet modelinin veya pioglitazonun IL-6 düzeyleri üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir. (Şekil 4-19, Tablo 4-10)



Şekil 4-19: PVAD'da ölçülen IL-6 miktarının gruplar arası değişimi.

p>0.05 istatistiksel anlamlılık düzeyi, (n=5-6, ortalama±SEM)

Tablo 4-10: PVAD'da ölçülen TNF- α ve IL-6 miktarının gruplar arası değişimi.

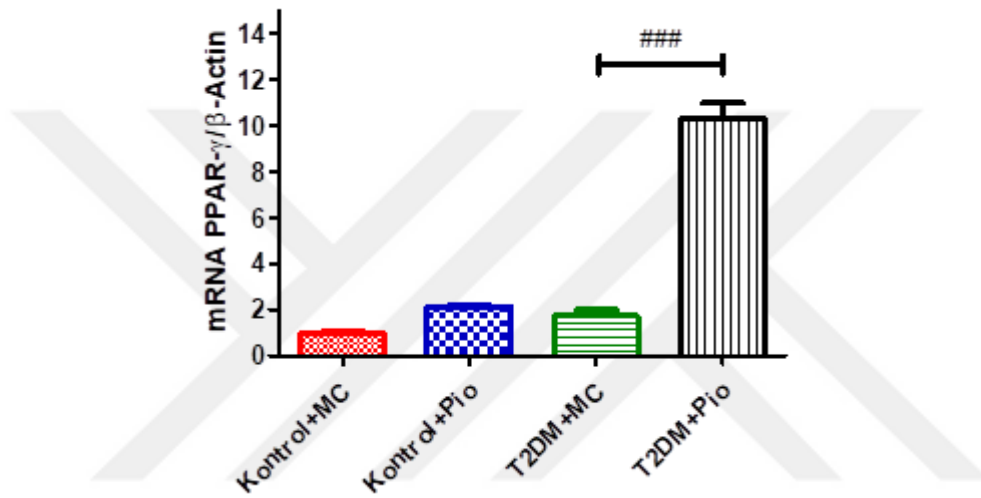
	TNF- α (pg/ug protein)	N	IL-6 (pg/ug protein)	N
Kontrol+MC	2,696±0,271	5	1,692±0,234	5
Kontrol+Pio	2,498±0,147	5	1,498±0,186	6
T2DM+MC	3,844±0,248*	5	1,902±0,171	5
T2DM+Pio	6,02±0,232 ^{###}	5	2,477±0,244	6

*p<0.05 T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ^{###}p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=5 TNF- α , 5-6 IL-6, ortalama±SEM)

4.6. PVAD'da Gen Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

4.6.1. PVAD'da PPAR- γ Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

İzole edilen sıçan torasik aortalarından elde edilen PVAD'da PPAR- γ ekspresyonunun kontrol grubunda pioglitazon uygulamasına bağlı olarak değişmediği, diyabet grubunda ise pioglitazon uygulmasının PPAR- γ ekspresyon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4-20, Tablo 4-11).



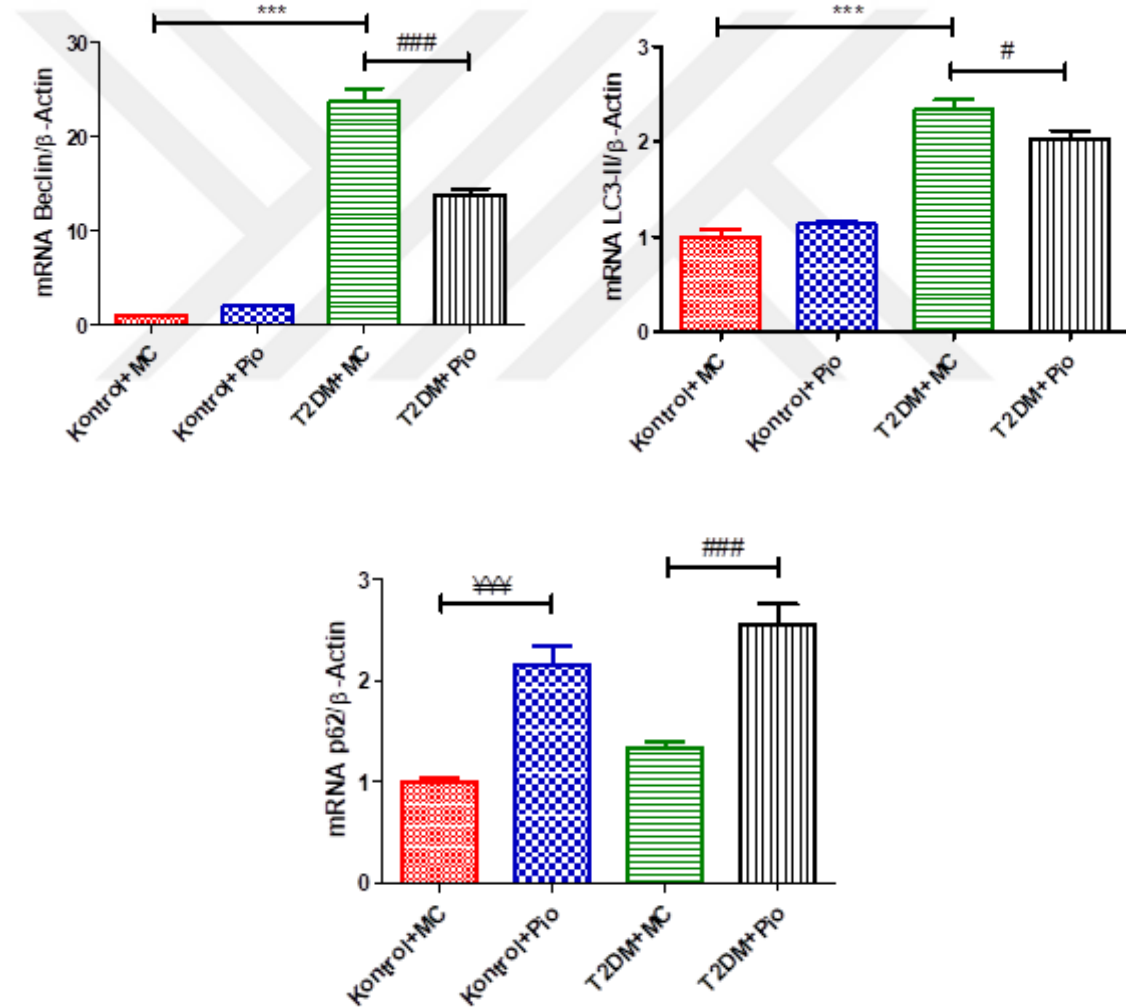
Şekil 4-20: Torasik aortalardan elde edilen PVAD'da PPAR- γ ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.

###p<0.001 tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=5, ortalama $\pm$ SEM).

4.6.2. PVAD'da Otofaji ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Toraksik aortalardan elde edilen PVAD'da otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, Beclin ve LC3-II genlerinin ekspresyon düzeylerinin diyabet varlığında belirgin bir artış gösterdiği ayrıca pioglitazon uygulaması ile bu artışın istatistiksel düzeyde anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir.

p62 gen ekspresyonu ise diyabet varlığında değişiklik göstermemiş ancak hem kontrol hem de diyabet gruplarında pioglitazon uygulamasına bağlı olarak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (Şekil 4-21, Tablo 4-11).



Şekil 4-21: PVAD'da Beclin, LC3-II ve p62 gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.

***p<0.001 Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC, ***p<0.001 T2DM+MC vs. Kontrol+MC, #p<0.05, ###p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=5, ortalama±SEM)

4.6.3. PVAD'da ER Stres ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

Torasik aortalardan elde edilen PVAD örneklerinde ER stres ile ilişkili olan CHOP, ATF4 ve GRP78 genlerinin ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular, kontrol grubunda pioglitazon uygulamasının ATF4 gen ekspresyonu düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını, diyabet grubunda ise pioglitazonun bir etkisinin olmadığını göstermektedir. Ayrıca, uygulanan diyabet modelinin de ATF4 ekspresyon düzeyini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir.

CHOP gen ekspresyonu da ATF4 ile benzer şekilde kontrol grubu ile kıyaslandığında pioglitazon uygulaması ile ve diyabet varlığında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.

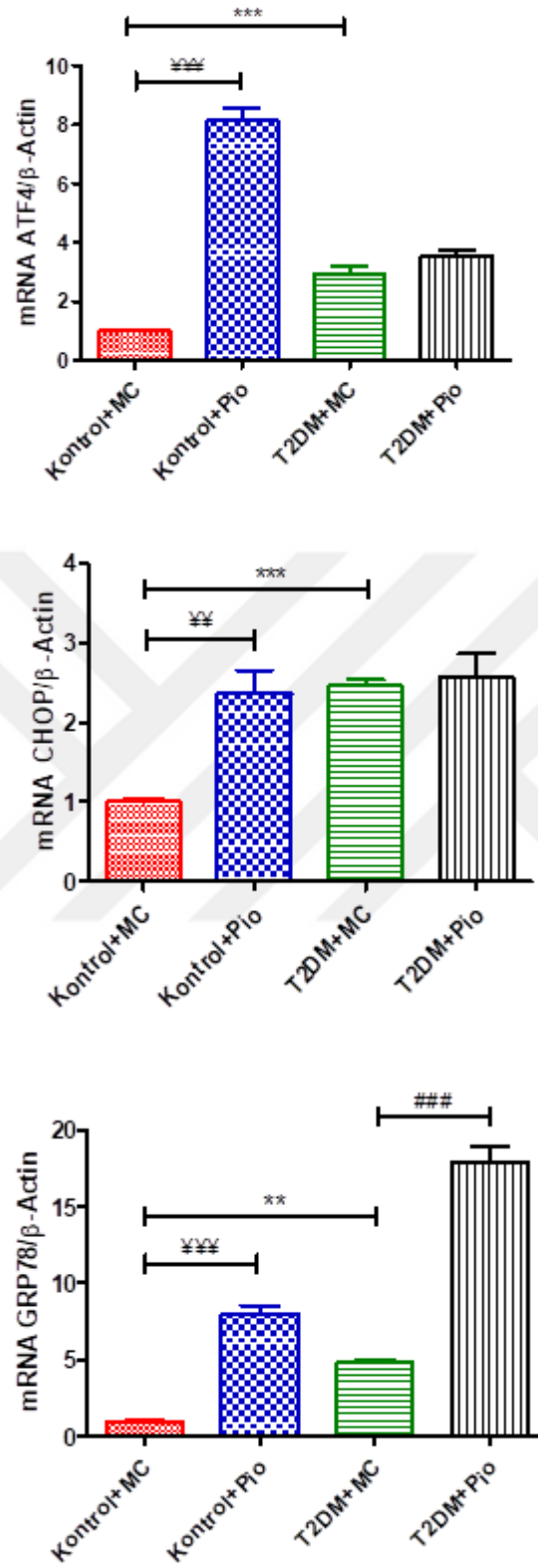
Son olarak, GRP78 gen ekspresyon düzeyi hem kontrol hem de diyabet grubunda pioglitazon uygulaması ile istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır. Özellikle diyabet grubunda bu artış daha belirgin bulunmuştur. Ayrıca, diğer ER stres ilişkili gen düzeylerinde olduğu gibi uygulanan diyabet modelinin GRP78 gen ekspresyon düzeylerini de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4-22, Tablo 4-11).

Tablo 4-11: PVAD'da gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.

	Kontrol+MC	Kontrol+Pio	T2DM+MC	T2DM+Pio
PPAR-γ	1,002 $\pm$ 0,049	2,132 $\pm$ 0,096	1,730 $\pm$ 0,253	10,35 $\pm$ 0,636 ^{###}
Beclin	1,000 $\pm$ 0,043	2,004 $\pm$ 0,071	23,74 $\pm$ 1,355 ^{***}	13,87 $\pm$ 0,627 ^{###}
LC3-II	1,000 $\pm$ 0,077	1,136 $\pm$ 0,035	2,342 $\pm$ 0,097 ^{***}	2,034 $\pm$ 0,078 [#]
P62	1,000 $\pm$ 0,043	2,156 $\pm$ 0,184 ^{YYY}	1,336 $\pm$ 0,062	2,556 $\pm$ 0,196 ^{###}
CHOP	1,000 $\pm$ 0,044	2,355 $\pm$ 0,298 ^{YY}	2,454 $\pm$ 0,086 ^{***}	2,57 $\pm$ 0,295
ATF4	1,000 $\pm$ 0,042	8,138 $\pm$ 0,416 ^{YYY}	2,95 $\pm$ 0,243 ^{***}	3,548 $\pm$ 0,182
GRP78	0,997 $\pm$ 0,023	8,002 $\pm$ 0,535 ^{YYY}	4,794 $\pm$ 0,216 ^{**}	17,83 $\pm$ 1,099 ^{###}

^{**}p<0.01, ^{***}p<0.001 T2DM+MC vs. Kontrol+MC, [#]p<0.05, ^{###}p<0.001 T2DM+Pio vs. T2DM+MC, ^{YY}p<0.01,

^{YYY}p<0.001 Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC, tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test (n=4-5, ortalama $\pm$ SEM)



Şekil 4-22: PVAD’da ATF4, CHOP ve GRP78 gen ekspresyon düzeylerinin gruplar arası değişimi.

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ T2DM+MC vs. Kontrol+MC, ### $p < 0.001$ T2DM+Pio vs. T2DM+MC, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$ Kontrol+Pio vs. Kontrol+MC tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test ($n=5$, ortalama $\pm$ SEM)

4.7. Histopatolojik Değerlendirme

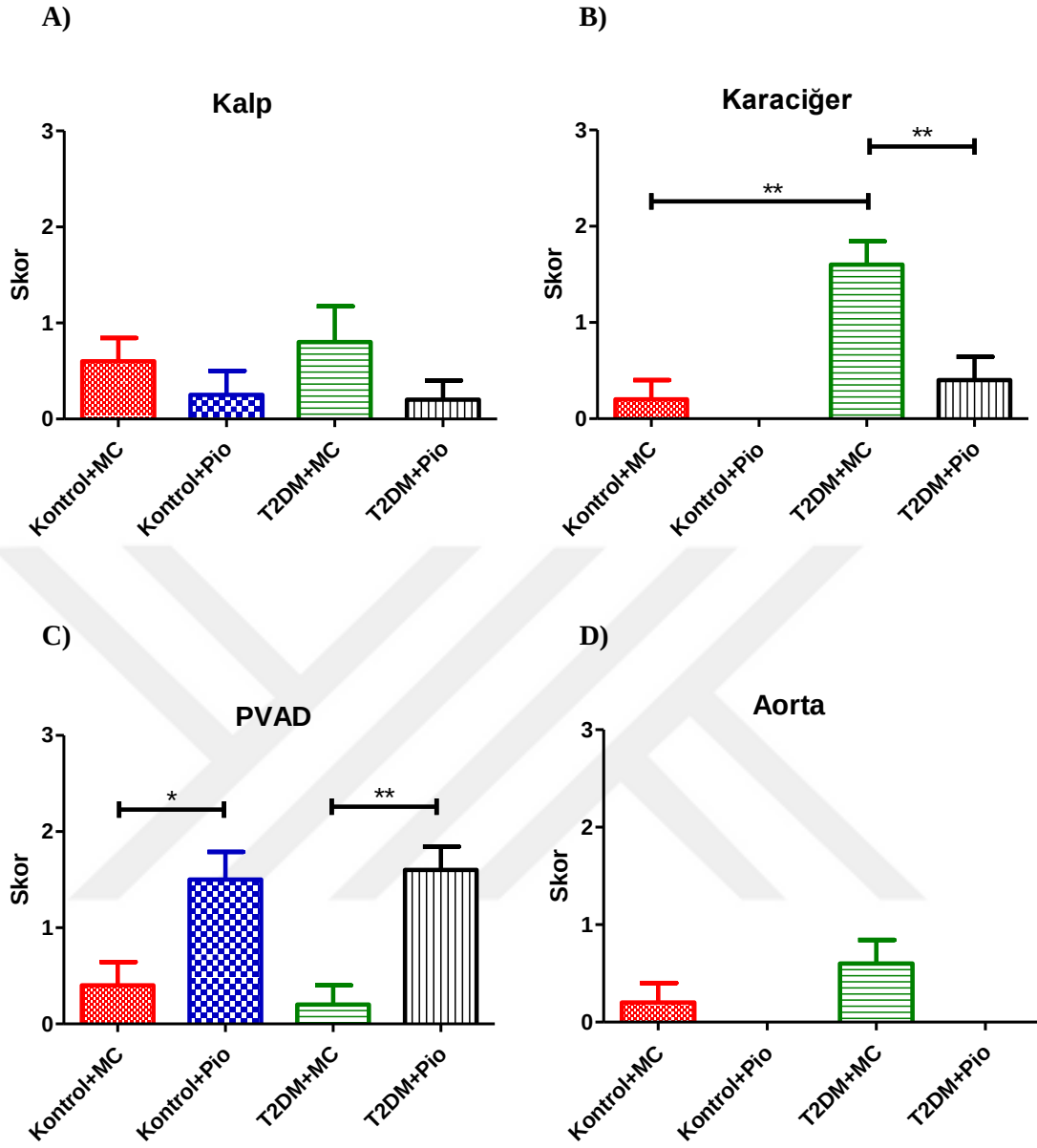
Histopatolojik değerlendirmede deney sürecinin sonunda (15. Hafta) sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer, aorta ve PVAD'da çeşitli hasar parametreleri değerlendirilerek skorlanmıştır.

Buna göre incelenen kalp örneklerinde, myokard kas liflerinde bozulma ve kollaps ile myokardiyal dejenerasyon yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4-23A, Şekil 4-24A ve 4-24B)

Karaciğer örneklerinde steatoz değerlendirilmiş ve oluşturulan HFD/STZ diyabet modelinin steatozu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı (Şekil 4-23B, Şekil 4-24 D) pioglitazon uygulaması ile steatozun geriye döndüğü gözlenmiştir.

Ayrıca, pioglitazon uygulamasının hem kontrol grubunda hem de diyabet grubunda PVAD'da yağlanmayı ve adiposit büyüklüğünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4-23C, Şekil 4-24 E ve 4-24F)

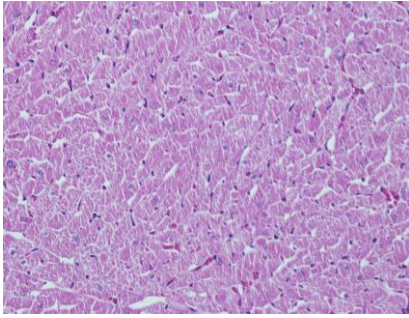
Bunlara ilaveten, diyabet grubunda kontrole göre torasik aortada kalınlaşma olduğu gözlenmiştir ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4-23D, Şekil 4-24 H).



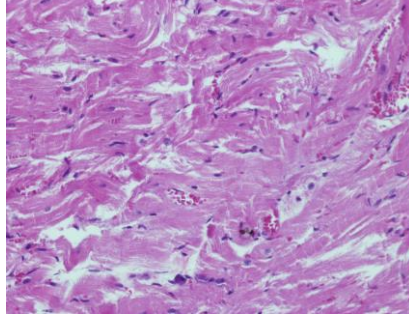
Şekil 4-23: Deney sürecinin sonunda (15. Hafta) sıçanlardan izole edilen (A) Kalp, (B) Karaciğer, (C) PVAD ve (D) Torasik aorta örneklerinde değerlendirilen hasar parametre skorlarının gruplar arası değişimi.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ tek-yönlü varyans analizi, tukey post-test ($n=5$, ortalama $\pm$ SEM)

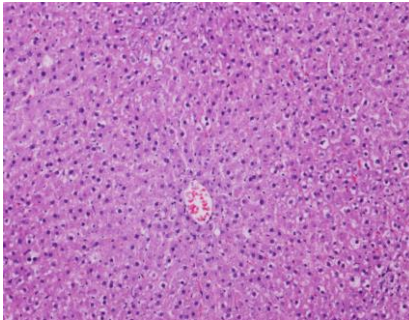
A)



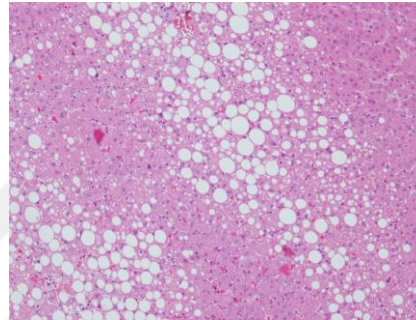
B)



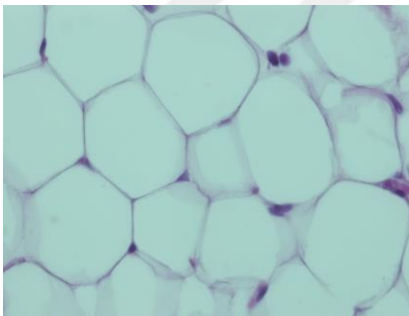
C)



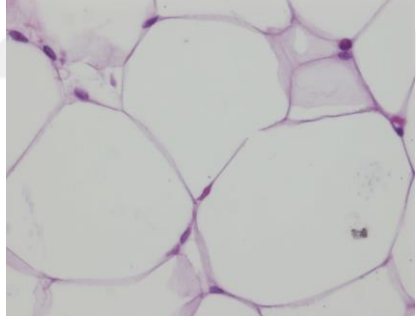
D)



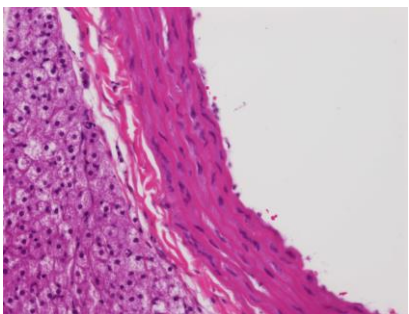
E)



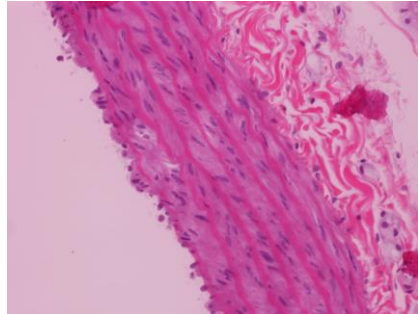
F)



G)



H)



Şekil 4-24: Sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer, PVAD ve aortada kesitlerinin hemotoksilen&eosin boyaması sonrası ışık mikroskobu altındaki fotoğrafları

(A ve B myokard x200, C ve D karaciğer x100, E ve F PVAD x400, G ve H aorta x200, tüm dokular için sol sütun kontrol, sağ sütun diyabetik)

5. TARTIŞMA

PVAD, damarların etrafında bulunan lokal adipoz doku katmanıdır. Vücuttaki yağ depolarının küçük bir kısmını oluşturmaya karşın PVAD, vasküler tonusun düzenlenmesi ve vasküler remodeling gibi olaylarda rol alması nedeniyle, fizyolojik ve patolojik açıdan oldukça önem arz etmektedir. PVAD'ın bu öneminden büyük ölçüde PVAD'dan salınan adipokinlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. T2DM, hipertansiyon, metabolik sendrom gibi birçok hastalıkta PVAD'ın fizyolojik rolünün bozulduğu ve patolojik bir karakter kazandığı gözlenmiştir. PVAD inflamasyonu, salınan adipokin kompozisyonunun değişmesi, oksidatif stres vb. nedenlerin PVAD disfonksiyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir^{17,301,302}. PPAR- γ , adipoz dokuda yüksek düzeyde eksprese olması ve insülin duyarlılığındaki rolü nedeniyle ilgi çekici bir terapötik hedef olarak değerlendirilmiştir ve neticede "tiyazolidindionlar" olarak da bilinen PPAR- γ agonistleri oldukça etkin antidiyabetik ajanlar olarak klinik kullanıma girmiştir. PPAR- γ agonisti olan pioglitazonun KVS üzerine olumlu etkileri birçok hayvan çalışmasında ve klinik çalışmada gösterilmiştir^{23,25}. Ortaya atılan birçok farklı görüşe rağmen pioglitazonun KVS üzerine olumlu etkilerinin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamıştır.

Projemizde, pioglitazonun deneysel T2DM modelinde PVAD üzerine olası etkilerinin ve bu etkilerin KVS açısından önemini ortaya konması hedeflenmiştir. Bu amaçla wistar albino erkek sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde 6 hafta süre ile 20mg/kg oral pioglitazon uygulamasının biyokimyasal parametreler (açlık glukoz, OGTT, total kolesterol ve trigliserit), PVAD miktarı, vasküler reaktivite, PVAD'da adipokin (adiponektin ve leptin) ve inflamatuvar sitokin (TNF- α ve IL-6) düzeyleri ile PVAD'da çeşitli gen ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca deney sonunda sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer, torasik aorta ve PVAD örnekleri histopatolojik açıdan değerlendirilmiştir.

HFD/STZ T2DM modeli, T2DM'nin metabolik olarak aktif doku ve organlar (adipoz doku, kalp, karaciğer) üzerine olan etkilerini iyi yansıtmaları nedeniyle birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir^{191,192}. Çalışmamızda STZ uygulamasından 1 hafta sonraki ölçüm neticesinde >140 mg/dl (7.8 mmol/L) açlık kan glukozuna sahip sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir^{345,347}. T2DM doğrulamasını takiben 4 hafta

beklenmiş ardından kontrol ve diyabetik olduğu tespit edilmiş olan hayvanlara (Grup II, Kontrol+Pioglitazon; Grup IV, T2DM+Pioglitazon) 20 mg/kg dozda pioglitazon oral yoldan 6 hafta boyunca uygulanmıştır.

15. haftanın sonunda yapılan ağırlık ölçümlerinde T2DM'ye bağlı olarak kilo kaybı gözlenmiş, pioglitazon uygulanan diyabetik sıçanlarda ise kontrol diyabetik sıçanlara göre ağırlık artışı olduğu belirlenmiştir. Kontrol gruplarında ise pioglitazon uygulaması herhangi bir ağırlık artışına yol açmamıştır. Bhandari ve arkadaşlarının sıçanlarda oluşturduğu HFD/STZ T2DM modelinde 20mg/kg dozunda 20 günlük oral pioglitazon uygulaması diyabetik sıçanlarda istatistiksel olarak anlamlı kilo artışına neden olmuştur¹⁹⁴. Aynı modelin kullanıldığı bir başka çalışmada 20mg/kg pioglitazon 28 gün boyunca uygulanmış ve pioglitazon uygulamasına bağlı olarak diyabetik hayvanlarda kilo artışı olduğu kaydedilmiştir³⁴⁸. HFD/STZ T2DM modelinin kullanıldığı bir başka çalışmada pioglitazon sıçanlara 1,5mg/kg dozunda 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Pioglitazon uygulamasının diyabetik sıçanlarda sınırlı bir kilo artışına neden olduğu gösterilmiş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır³⁴⁹. Klinik çalışmalarda pioglitazon kullanımının T2DM'li hastalarda kilo alımına neden olduğu gösterilmiştir^{27,350,351}. Bu durumdan pioglitazonun hipotalamustaki PPAR- γ reseptörlerini uyarak iştahı artırması³⁵², subkütan adipoz dokuda adipojenezi uyarması³⁵³, sıvı tutulumuna neden olması³⁵⁰ vb. faktörlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir. Tüm bunlara karşın pioglitazon tedavisi ile görülen kilo artışının T2DM'li hastalarda kardiyovasküler mortalite ve morbidite ile negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiştir³⁵⁴. Bu açıdan pioglitazon tedavisinin neden olduğu kilo artışının kardiyovasküler sistem hastalıklarının patofizyolojisinde rolü olmadığı düşünülmektedir³⁵⁴.

Pioglitazonun insülin duyarlılaştırma mekanizmasıyla T2DM'de açlık kan glukozunu düzeylerini düşürdüğü ve glukoz toleransını artırdığı bilinmektedir^{355,356}. Çalışmamızda pioglitazon uygulaması T2DM'de açlık kan glukoz düzeylerini düşürmüş aynı zamanda glukoz toleransında artışa neden olmuştur. Sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde 10mg/kg dozunda 1 haftalık^{191,218}, 10mg/kg dozunda 4 haftalık³⁵⁷, 1,5mg/kg dozunda 4 haftalık³⁴⁹, 20 mg/kg dozunda 20 günlük¹⁹⁴, 20 mg/kg dozunda 4 haftalık³⁴⁸ oral pioglitazon uygulamasının açlık kan glukozunu düşürücü ve glukoz toleransını artırıcı etkisini gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur.

T2DM'ye bağılı olarak dislipidemi gözlemlendiği bilinmektedir. Çalışmamızda T2DM modeline bağılı olarak total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. Diyabet grubunda pioglitazon uygulaması ile trigliserit düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlenirken total kolesterol düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Sıçanlarda HFD/STZ T2DM modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda 20 mg/kg dozunda 20 günlük¹⁹⁴, 20 mg/kg dozunda 4 haftalık³⁴⁸, 10 mg/kg dozunda 4 haftalık³⁵⁷, 10mg/kg dozunda 1 haftalık^{191,218}, oral pioglitazon uygulaması total kolesterol ve trigliserit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Sıçanlarda HFD/STZ T2DM modeli kullanıldığı iki farklı çalışmada ise 20mg/kg³⁵⁸ ve 1,5mg/kg³⁴⁹ dozunda 4 haftalık oral pioglitazon uygulamasının bulgularımıza paralel şekilde serum trigliserit düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı, total kolesterol düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmalarda pioglitazon uygulaması serum HDL-k düzeyini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yükseltmiştir. Çalışmamızda serum HDL-k düzeyleri ölçülmemiştir, total kolesterol düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark görülmemesinin yükselen HDL-k düzeyleri ile ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

PVAD'ın fizyolojik koşullarda damar düz kas tonusu üzerinde antikontraktil etkisinin olduğu bilinmektedir. Bu etkinin gösterildiği ilk çalışmada sıçan aortasında PVAD'ın damar düz kası üzerine NA'nın oluşturduğu kastırıcı yanıtı azalttığı tespit edilmiştir⁷. PVAD'ın sıçan aortasında NA'nın yanı sıra serotonin, fenilefrin ve anjiyotensinin kastırıcı yanıtlarını da azalttığı bulunmuştur⁸. PVAD'ın damar düz kası üzerine gevşetici rolü insan damarları üzerinde yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir. İnsan internal mammaryal arterinde PVAD varlığında fenilefrin ve U46619'un (tromboksan A2 analogu) kastırıcı yanıtlarında azalma meydana geldiği bildirilmiştir⁹. PVAD'ın ayrıca internal mammaryal arter ve safen vende NA kastırıcı yanıtlarını azalttığı da tespit edilmiştir¹⁰. PVAD'ın vasküler tonus üzerine olan gevşetici etkisinin çeşitli patolojik koşullarda ortadan kalktığı öne sürülmektedir. Hipertansif sıçanlarda¹¹, diyabetik sıçanlarda¹², db/db farelerde¹³ ve metabolik sendrom da¹⁴ PVAD'ın damar gevşetici etkisinin ortadan kalktığı gösterilmiştir. Bununla birlikte sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde PVAD'ın vasküler etkisinin incelendiği bir çalışma ise bulunmamaktadır. Bu bağlamda çalışmamızın bulguları sözkonusu deneysel diyabet modelinde PVAD çalışmalarına temel teşkil edecektir.

PPAR- γ adipoz doku farklılaşması, karaciğer ve iskelet kası glukoz metabolizması, lipid homeostazi, makrofaj ve vasküler endotel fonksiyonunun düzenleyicisi konumundadır¹⁵⁶. Visceral adipoz doku için sahip olduğu önemin yanı sıra PPAR- γ 'nın PVAD'ın yapı ve işlevinde de önemli rolleri bulunmaktadır. Damar düz kası PPAR- γ knock-out farelerde PVAD'ın bulunmadığı ve buna bağlı olarak da endotel disfonksiyonun olduğu gözlenmiştir²⁹⁴. PPAR- γ agonisti pioglitazonun adipoz doku üzerindeki etkileri incelenmekle birlikte PVAD üzerine olan etkilerinin vasküler reaktivite yönünden araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda 15. haftada sakrifiye edilen sıçanlardan izole edilen PVAD'lı ve PVAD'sız torasik aortalar KCl (40mM) ile standardize edildikten sonra, aortalara vasküler reaktivitenin değerlendirilmesi amacıyla NA (10^{-8} - 10^{-4} M), endotel-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilebilmesi için ACh (10^{-8} - 10^{-4} M), reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarının değerlendirilmesi için KCl (20, 40, 60, 80, 100 mM) ve son olarak düz kas-aracılı gevşeme yanıtlarının değerlendirilebilmesi için SNP (10^{-9} - 10^{-4} M) kümülatif olarak uygulanmış ve konsantrasyon-yanıt eğrileri elde edilmiştir. Kontrol grubunda NA ile elde edilen kasılma yanıtları PVAD varlığında azalmıştır. Bu bulgumuz PVAD'ın antikontraktıl etkisinin olduğunu gösteren diğer çalışmaları desteklemektedir^{7,8}. Kontrol grubunda KCl ile indüklenen ve reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtları ise, literatürde insan mammaryel arteri⁹ ve Wistar sıçan torasik aortasında³⁵⁹ yapılmış olan çalışmalara paralel şekilde PVAD varlığında değişmemiştir. Bulgularımız fizyolojik koşullarda PVAD'dan salınan gevşetici faktörlerin etkilerini reseptör-aracılı kastırıcı mekanizmalar üzerinden ortaya çıkardığına işaret etmektedir. Çalışmamızda ayrıca kontrol grubunda PVAD'ın endotel-aracılı gevşeme yanıtları üzerine herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir. C57BL6/J fare torasik aortasında³⁶⁰ ve Wistar sıçan torasik aortasında³⁶¹ yapılan çalışmalarda bulgularımıza paralel şekilde PVAD varlığında ACh yanıtının değişmediği gözlenmiştir. Yapılan bir başka çalışmada ise Wistar sıçan torasik aortasında PVAD'ın ACh yanıtlarını azalttığı tespit edilmiştir³⁶². Bu çalışmada PVAD'ın etkisi çalışmamızdan farklı bir şekilde incelenmiştir. PVAD intakt bırakılmamış, izole edilen PVAD ile inkübe edilen solüsyonun organ banyosuna transferi gerçekleştirilmiştir. Transfer metodu kullanılan çalışmalarda yalnızca PVAD'dan banyo ortamına salınan maddelerin etkinlikleri değerlendirilebilmektedir. PVAD'ın anatomik lokasyonunun PVAD etkisine olan katkısını tespit edebilmek mümkün değildir. Çalışma metodolojileri arasındaki bu

farklılığın bulgulara da yansımış olması mümkündür. Çalışmamızda kontrol grubunda PVAD'ın düz kas-aracılı maksimum gevşeme yanıtları üzerine etkisi olmadığı bununla birlikte diyabet grubunda ve pioglitazon verilen kontrol ve diyabet grubunda SNP'ye duyarlılığın azaldığı gözlenmiştir. Literatürde bulgularımıza paralel olarak domuz koroner arterinde^{363,364}, Wistar sıçan abdominal aortasında³⁶⁵, Wistar sıçan torasik aortasında³⁶⁶, Sprague Dawley sıçan torasik aortasında⁷, C57BL6/J fare torasik aortasında³⁶⁰ SNP yanıtlarının PVAD varlığından etkilenmediği gösterilmiştir. Sprague Dawley sıçan mezenterik arterinde yapılan bir çalışmada ise PVAD'ın SNP duyarlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir³⁶⁷. Duyarlılıktaki bu azalmanın PVAD'ın mezenterik arter preperatlarında fiziksel bir bariyer oluşturması ve SNP'nin damar düz kasına erişimini kısmen bloke etmesiden kaynaklanabileceği öne sürülmüştür³⁶⁷.

Çalışmamızda pioglitazon uygulanmış diyabetik olmayan grupta (Kontrol+Pio) PVAD'ın gevşetici etkisinin bulunduğu fakat bu etkinin istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte Kontrol+MC grubuna kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir (Kontrol+Pio, Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx$ %78 vs. Kontrol+MC, Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx$ %67). Gevşetici etkide gözlenen bu azalmadan pioglitazon uygulamasının PVAD(-) halkalarda direkt olarak kastırıcı yanıtı azaltması sorumlu olabilir (Kontrol+Pio Emaks PVAD(-) $109,48 \pm 7,34$ vs. Kontrol+MC Emaks PVAD(-) $121,57 \pm 7,84$). Literatürde pioglitazon ile inkübasyonun *in vitro* koşullarda sıçan aortasında NA^{368,369} ve fenilefrin^{370,371} kasılma yanıtlarını azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *in vivo* pioglitazon uygulamasının vazodepresör etkisini gösteren çalışmalar mevcuttur^{372,373}. Çalışmamızda bu depressör etki PVAD(+) kontrol grubu damar halkalarında gözlenmemiştir. Literatürde pioglitazonun vasküler reaktivite üzerine olan etkisinde PVAD'ın olası katkısının değerlendirildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Kontrol+Pio grubunda reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarında PVAD'ın herhangi bir etkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarında pioglitazon uygulamasına bağlı bir etki de gözlenmemiştir (Kontrol+Pio, PVAD(-) $2,07 \pm 0,07$ vs. Kontrol+MC, PVAD(-) $2,10 \pm 0,12$). Bulgumuz *in vivo* pioglitazon uygulamasının sıçan torasik aortasında KCl yanıtlarını değiştirmediğini gösteren literatür bilgisiyle uyumludur³⁷⁴. Endotel-aracılı gevşeme yanıtları da Kontrol+Pio grubunda PVAD varlığından etkilenmemektedir. Düz kas-aracılı gevşeme yanıtlarında ise PVAD varlığına bağlı olarak duyarlılıkta azalma gözlenmiştir.

Diyabetik kontrol grubunda PVAD'ın NA kasılmalarına karşı olan antikontraktil etkisi kısmen azalmış ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu bulgumuz önceki çalışmalarda PVAD'ın antikontraktil etkisinin tamamen ortadan kalktığını gösteren hatta etkinin kontraktil yönde değiştiğini ortaya koyan T1DM veya T2DM modellerinden farklı bulunmuştur^{12,15,16}. Bu farklılık kullandığımız T2DM modeli ile ilişkili olabilir. Diyabet grubunda pioglitazon uygulaması PVAD'ın diyabetle azalmış olan antikontraktil etkisini kısmen geriye çevirmekle birlikte bu etkide istatistiksel bir anlamlılık tespit edilmemiştir. Öte yandan KCl ile indüklenen ve reseptör-aracılı olmayan kasılma yanıtlarında gerek PVAD'ın gerek uygulanan diyabet modelinin herhangi bir etkisi gözlenmemiştir. Benzer şekilde T2DM+MC grubunda ACh ile indüklenen endotel-aracılı gevşeme yanıtlarında PVAD varlığına bağlı olarak herhangi bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra kullanmış olduğumuz HFD/STZ T2DM modelinin endotel disfonksiyonuna neden olmadığı gözlenmiştir (Kontrol+MC, PVAD(-) Emaks $64,38 \pm 2,65$ vs. T2DM+MC, PVAD(-) Emaks $71,70 \pm 3,08$). Bu durumun kullandığımız modelde kan glukoz düzeylerindeki artışın ılımlı düzeyde olması ile ilişkili olduğu değerlendirilmektedir. Uygulanan HFD/STZ T2DM modelinde PVAD varlığına bağlı olarak SNP ile indüklenen endotel aracısız gevşeme yanıtlarında duyarlılık azalması olduğu gözlenmiştir.

Çalışmamızda diyabetik sıçanlarda azalan PVAD'ın gevşetici etkisinin (T2DM+MC, NA Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx 80\%$) pioglitazon uygulaması ile kısmen geriye döndüğü gözlenmiştir (T2DM+Pio. NA Emaks PVAD(+)/Emaks PVAD(-) $\approx 74\%$) ancak bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Pioglitazon uygulanmış diyabetik sıçanlarda KCl kasılma yanıtları ve ACh gevşeme yanıtlarının PVAD varlığında değişmediği gözlenmiştir. PVAD varlığında SNP'ye olan duyarlılığın azaldığı tespit edilmiştir. Pioglitazonun *in vitro* koşullardaki etkisinin incelendiği bir çalışmada kontrol ve diyabetik sıçan aortalarında pioglitazonun fenilefrin kasılmalarını azalttığı, asetilkolin gevşeme yanıtlarını artırdığı gösterilmiştir. SNP yanıtlarında ise kontrol ve diyabetik koşullarda fark görülmemiştir³⁷⁰. Pioglitazonun *in vivo* etkilerinin incelendiği bir çalışmada ise bahsi geçen *in vitro* çalışmaların bulgularına benzer bir şekilde pioglitazon uygulaması ile STZ diyabetik sıçanlarda fenilefrin kasılmalarının azaldığı, asetilkolin gevşeme yanıtlarının arttığı, SNP gevşeme yanıtlarının ise değişmediği gözlenmiştir³⁴². Bu bulgular ile çalışmamızın bulguları

arasındaki farklılığın kullanılan hayvan türü ve yaşı, uygulanan diyabet modeli ve süresi, pioglitazon dozu ile ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir.

PPAR- γ aktivasyonu iskelet kaslarına glukoz alımını artırır ve hepatik glukoneojenezi azaltır. Ayrıca adipoz dokuda lipid depolanmasını artırır¹⁵⁶. Literatürde pioglitazon uygulamasının PVAD miktarı üzerine etkisinin incelendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. İzole organ banyosu deneyleri sonunda PVAD dokusu torasik aortadan izole edilerek tartılmış ardından doku uzunluğuna göre normalize edilmiştir. Çalışmamızda pioglitazon uygulamasının gerek kontrol gerekse diyabet grubunda PVAD miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olduğu bu artışın diyabet durumunda daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Sıçanlarda torasik PVAD yapı olarak ağırlıkla kahverengi adipoz doku içermektedir. Obez Zucker fa/fa sıçanlarda pioglitazon uygulamasının kahverengi adipoz doku miktarını artırdığı gösterilmiştir³²³. Pioglitazonun diğer adipoz doku katmanlarının miktarı ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada pioglitazon T2DM'de VAD miktarını azaltırken subkütan adipoz doku miktarını ise artırmıştır³¹². Pioglitazon uygulamasına bağlı olarak görülen subkütan adipoz dokudaki artışın adiposit sayısının artışı yani adipojenez ile ilişkili olduğu sürülmektedir^{375,376}. Çalışmamızda ilk kez pioglitazonun gerek kontrol gerekse de diyabetik sıçanlarda PVAD miktarında bir artış meydana getirdiğini gösterilmiştir.

Obezitede PVAD'dan salıverilen kastırıcı ve gevşetici adipokinlerin kompozisyonunda değişiklik meydana geldiği ve net fizyolojik etkinin gevşetici etkiden kastırıcı etkiye kaydığı bildirilmiştir³⁰¹. Adiponektinin damar düz kası üzerine gevşetici bir etkisi olduğu ve bu etkinin hem endotel-aracılı (NO sentezi), hem de K⁺ kanalları üzerinden olduğunu öne süren çalışmalar mevcuttur^{253,254}. Damar üzerine gevşetici etkisinin yanı sıra adiponektinin damar düz kas hücre proliferasyonunu azalttığı gösterilmiştir²⁶². İnsan safen veninde ve mamaryal arterinde PVAD'dan adiponektin salınımının PPAR- γ bağımlı bir mekanizma ile gerçekleştiği bildirilmiştir³⁷⁷. Çalışmamızda PVAD'dan yapılan adiponektin ölçümünde kontrol grubunda pioglitazon uygulamasına bağlı olarak adiponektin miktarının arttığı gözlenmiştir. Uygulanan diyabet modeli ile adiponektin miktarında hafif düzeyde bir düşüş gözlenmiş fakat bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca diyabet grubunda pioglitazon uygulamasının adiponektin miktarında değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Db/Db farelerde yapılan bir çalışma T2DM koşulunda PVAD'da adiponektin miktarının

azaldığını göstermektedir¹⁵. Fakat T2DM'li hastalarda yapılan bir çalışma bu çalışmanın aksine T2DM'de azalan serum adiponektin düzeylerinin PVAD'da oksidatif mekanizmalar vasıtasıyla adiponektin miktarını artmasına neden olduğunu öne sürmektedir³⁰⁴. Bu açıdan T2DM'nin PVAD adiponektin düzeylerini ne yönde etkilediği literatürde net olarak tanımlanmamıştır. Aynı şekilde pioglitazon uygulamasının serum adiponektin düzeyleri üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalar da çelişkilidir. Yapılan bir çalışma T2DM'li hastalarda 4 hafta süre ile pioglitazon uygulamasının plazma adiponektin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik oluşturmadığını göstermiştir³⁷⁸. Buna karşın PPAR- γ agonistleri ile tedavi edilen diyabetik hastalarda dolaşımdaki adiponektin seviyelerinin arttığını gösteren klinik araştırmalar da mevcuttur³⁷⁹. Çalışmamızda pioglitazonun serum seviyeleri ölçülmemiştir. Literatürde pioglitazon uygulamasının normal ya da T2DM koşulunda PVAD'daki adiponektin miktarı üzerine etkisini gösteren herhangi bir çalışma ise mevcut değildir. Adiponektinin adipoz dokuda PPAR- γ aracılı olarak sentezlendiği bilinmektedir. Kontrol grubunda beklendiği üzere pioglitazon uygulaması ile PVAD'da adiponektin miktarında artış görülmüştür.

Enerji homestazında kritik bir role sahip olmasının yanı sıra, leptinin KVS üzerine doğrudan etkileri olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir^{380,381}. Leptinin doğrudan damar fonksiyonu üzerine etkisini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. Leptinin damar düz kas üzerinde gevşetici rolü olduğu ve bu gevşetici etkiden endotel hücrelerinden salınan NO ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktörün sorumlu olduğu gösterilmiş olmasına^{382,383} karşın, fizyolojik koşullarda ortaya çıkan bu etkinin obezite gibi patolojik koşullarda ortadan kalktığı belirlenmiştir. Bu durumun obez hastalarda görülen endotel disfonksiyonunun nedenlerinden biri olabileceği öne sürülmektedir³⁸⁴. Yapılan çalışmalar çeşitli patolojik koşullarda adipoz dokuda leptin düzeylerinin değiştiği göstermektedir. Bir çalışmada yüksek yağ yüksek şeker içeren diyet ile beslenen obez farelerin VAD ve SAD'ında leptin mRNA'sının arttığı gösterilmiştir³⁸⁵. PVAD'ın anatomik pozisyonu, sekresyon profilini damar fonksiyonu açısından önemli hale getirmektedir. Bu bağlamda obezite ve T2DM vb. patolojilerde PVAD'da leptin miktarının değişimi önem kazanmaktadır. Bu konu ile ilgili yapılan bir çalışmada Batı tarzı diyet (%45 yağ, kalori cinsinden) ile beslenen farelerde abdominal PVAD leptin mRNA'sında ve buna paralel olarak abdominal PVAD'dan salınan leptin miktarında artış olduğu bildirilmiştir³⁸⁶. Çalışmamızda T2DM

ile PVAD leptin miktarında artış gözlenmiş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Pioglitazon uygulamasının T2DM koşullarında plazma leptin düzeylerini düşürdüğü hem klinik çalışmalar³⁸⁷ hem de hayvan çalışmaları¹⁹⁴ ile gösterilmiştir. Fakat literatürde pioglitazon uygulamasının PVAD'da leptin düzeylerine etkisi üzerine herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız normal ve diyabetik koşullarda pioglitazon uygulamasının PVAD leptin düzeylerini değiştirmediğini göstermektedir. Bulgularımız PVAD'da leptin protein ekspresyonunun PPAR- γ bağımsız bir yolak üzerinden kontrol edildiğine işaret etmektedir.

Obezite, diyabet, hipertansiyon vb. patolojilerde düşük yoğunluklu inflamasyon gözlenmektedir. İnflamasyon seviyesindeki artışın bahsi geçen hastalıkların KVS üzerine olan etkilerinde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Farelerde yapılan bir çalışmada gevşetici etkideki azalmadan makrofaj infiltrasyonun sorumlu olduğu öne sürülmektedir¹⁷. Bu yaklaşıma göre makrofajlardan salınan TNF- α , PVAD'dan salınan vazodilatör maddelerin salınımını azaltmaktadır. Yapılan bir diğer çalışmada bu yaklaşımla uyumlu olarak inflamatuvar koşullarda PVAD'dan TNF- α salınımındaki artışın adiponektin salınımındaki azalmayla korelasyon gösterdiği bildirilmiştir¹⁸. Yine bu bulgulara paralel bir şekilde, yüksek yağlı diyet ile kemirgenlerde T-hücreleri, makrofaj ve proinflamatuvar adipokin düzeylerinde artış tespit edilmiştir³⁰³. T2DM koşulunda PVAD inflamasyonun rolüne işaret eden çalışmalar sayıca oldukça azdır. Db/Db diyabetik farelerde yapılan bir çalışmada mezenterik adipoz dokuda TNF- γ mRNA'sının arttığı gösterilmiştir¹⁵. T2DM koşullarında pioglitazon uygulamasının PVAD'da TNF- α ve IL-6 düzeyleri üzerine etkisinin incelendiği bir çalışma literatürde bulunmamaktadır. Çalışmamızda T2DM koşulunda PVAD'da inflamasyon değerlendirilmesi için inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-6 düzeyleri ölçülmüştür. Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular literatürle paralel olarak, T2DM varlığında PVAD'da TNF- α miktarının arttığını göstermektedir. Aynı şekilde T2DM ile PVAD IL-6 düzeyinde kısmi miktarda artış gözlenmiş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Pioglitazon uygulaması ise kontrol gruplarında TNF- α ve IL-6 düzeylerinde herhangi bir değişikliğe neden olmazken diyabet grubunda TNF- α miktarında anlamlı bir artışa neden olmuştur. T2DM'li hastalarda pioglitazon tedavisinin serum TNF- α düzeylerini değiştirmediği, IL-6 düzeylerinde ise azalmaya neden olduğu gösterilmiştir³⁸⁸. Başka bir çalışma stent takılmış koroner arter hastalığı

bulunan T2DM'li hastalarda 6 aylık pioglitazon tedavisinin TNF- α ve IL-6 düzeylerini etkilemediği görülmüştür³⁸⁹.

Son yıllarda yapılan çalışmalar T2DM ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklarda ER stresin³⁹⁰⁻³⁹³ ve otofajinin³⁹⁴⁻³⁹⁶ rolüne işaret etmektedir. Bu noktadan hareketle çalışmamızda, uygulanan diyabet modelinin ve pioglitazon uygulamasının PVAD örneklerinde, otofaji ile ilişkili Beclin, LC3-II, p62 genleri ile ER stresi ile ilişkili ATF4, CHOP, GRP78 genlerinin ekspresyon düzeyleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bunlara ek olarak pioglitazonun hedef molekülü PPAR- γ 'nın gen ekspresyon düzeyi de değerlendirilmiştir. Çalışmamızda kontrol grubunda pioglitazon uygulamasına bağlı olarak PPAR- γ ekspresyon düzeyinde artış görülmüş fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. PVAD'da PPAR- γ ekspresyonunun diyabet grubunda pioglitazon uygulaması ile belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Bulgularımızla paralel olarak bir çalışmada yüksek yağlı diyetle beslenen farelere pioglitazon uygulamasının hem SAD hem de VAD'da PPAR- γ ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur³⁹⁷. Buna karşın diyabetik hastalarda yapılan klinik bir çalışmada pioglitazon kullanımının subkütan adipoz dokuda PPAR- γ ekspresyon düzeylerini değiştirmedeği gösterilmiştir³⁹⁸. Benzer şekilde, fare T2DM modelinde yapılan bir araştırmada pioglitazon uygulanan farelerin karaciğerlerinde PPAR- γ ekspresyon düzeylerinin değişmediği belirlenmiştir³⁹⁹.

Yapılan çalışmalar T2DM ve ilişkili patolojilerde oksidatif stres ve inflamasyona ilaveten otofaji ve ER stresinin de adipoz dokuda arttığına işaret etmektedir. Metabolik sendromlu hastaların omental adipoz dokularında otofajinin ve ER stresin arttığı gösterilmiştir⁴⁰⁰. Obez T2DM'li hastaların subkütan adipoz dokularından elde edilen adipositlerde de otofajinin aktive olduğu bildirilmiştir²⁰. Yapılan diğer bir klinik çalışmada ise T2DM koşullarında otofaji aktivasyonunun incelenen adipoz doku katmanının çeşidine göre farklılık gösterebildiği öne sürülmektedir²¹. Bu bağlamda literatür incelendiğinde HFD/STZ T2DM modelinde PVAD'da otofajinin rolünün incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla birlikte, PVAD'da ER stresin incelendiği tek çalışmada ise diyabetik db/db farenin aortik PVAD'ında ER stresin belirteçleri ATF4, CHOP ve GRP78 gen ekspresyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir²². Literatürde pioglitazon uygulamasının PVAD'da otofaji ve ER stres üzerine etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışma

bulunmamaktadır. Çalışmamızda otofaji ile ilişkili genlerin ekspresyon düzeyleri incelendiğinde LC3-II ve Beclin genlerinin ekspresyon düzeylerinin diyabet ile artış gösterdiği ayrıca pioglitazon uygulaması ile bu artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada çalışmamıza benzer şekilde, pioglitazon uygulamasının Wistar Kyoto sıçan rostral ventrolateral medullasında yüksek fruktoz ile indüklenen otofajiyi azalttığı gösterilmiştir⁴⁰¹. Çalışmamızda p62 gen ekspresyonu hem kontrol hem de diyabet gruplarında pioglitazon uygulamasına bağlı olarak artmıştır. Rodrigez ve ark.'ları adipojenez esnasında p62'in uyarıldığını göstermiştir⁴⁰². Çalışmamızda pioglitazon ile özellikle diyabette artan PVAD miktarını dikkate aldığımızda pioglitazon'un adipojenezi uyarak p62 ekspresyonunun yükselmesine aracılık ettiği düşünülebilir. T2DM'de çeşitli doku ve organlarda ER stresin arttığını gösteren birçok çalışma mevcuttur³⁹⁰⁻³⁹³. Çalışmamızda literatürle uyumlu bir biçimde, ER stres belirteçlerinden ATF4, CHOP ve GRP78 mRNA'larının T2DM koşulunda PVAD'da arttığı gözlenmiştir. Pioglitazonun PVAD'da ER stres üzerine etkisinin ilk kez incelendiği çalışmamızda pioglitazonun ER stresi azalttığını gösteren çalışmaların^{337,403,404} aksine pioglitazon uygulamasına bağlı olarak özellikle kontrol gruplarında ER stresin indüklendiği tespit edilmiştir.

Deney sonunda sıçanlardan izole edilen kalp, karaciğer ve PVAD'lı torasik aorta halkalarında histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Buna göre incelenen kalp örneklerinde myokard kas liflerinde bozulma ve kollaps ile myokardiyal dejenerasyon yönünden gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Literatürde T2DM ile sıçanlarda kardiyomiyopati oluştuğunu gösteren çalışmalar mevcuttur^{195,405}. Çalışmamızda benzer bulguların elde edilmemesinin uygulanan diyabet modelinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda ayrıca karaciğer örneklerinde steatoz değerlendirilmiş, HFD/STZ T2DM modelinde steatozun arttığı, pioglitazon uygulamasının karaciğerdeki steatozu istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. HFD/STZ T2DM modelinin kullanıldığı çalışmalarda çalışmamıza paralel şekilde karaciğer steatozunun arttığı bildirilmiştir⁴⁰⁶⁻⁴⁰⁸. Pioglitazonun karaciğer steatozu üzerine olumlu etkisi olduğu bilinmektedir^{409,410}. Pioglitazon uygulamasının beklendiği üzere hem kontrol gruplarında hem de diyabetik gruplarda PVAD'da yağlanmayı ve adiposit büyüklüğünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı gözlenmiştir. Bunlara ilaveten diyabetik kontrol grubunda ise aortada kalınlaşma olduğu bu etkinin pioglitazon uygulaması ile tamamen geriye döndüğü

gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar bulgularımıza paralel şekilde diyabetin aortada kalınlaşmaya neden olduğunu göstermektedir^{411,412}. Pioglitazon arter kalınlaşması üzerine olan etkisi, T2DM hastalarında karotid arter intima media kalınlığını azalttığını bildiren bir klinik çalışma ile gösterilmiştir⁴¹³. Bulgularımız klinikte pioglitazon kullanımına bağlı olarak organ düzeyinde gözlenen etkileri desteklemektedir^{414,415}.

Çalışmamız pioglitazon tedavisinin, T2DM gibi patolojik bir koşulda meydana gelen PVAD disfonksiyonu üzerine olan etkisini incelemeyi hedeflemiştir. Bulgularımız sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde 6 hafta süre ile pioglitazon uygulamasının kan glukozu ve lipid profilinde olumlu etkiler gösterdiği, PVAD miktarını arttırdığı, bununla birlikte PVAD'ın vasküler reaktivite üzerindeki antikontraktıl etkisini anlamlı bir düzeyde değiştirmedeği, endotel-aracılı veya endotel aracısız gevşeme yanıtları üzerinde bir etkisinin olmadığı, adiponektin, leptin ve IL-6 düzeylerini değiştirmezken TNF- α düzeylerini artırdığı gözlenmiştir. Ayrıca diyabet grubunda PVAD dokusunda PPAR- γ ekspresyon düzeylerini belirgin düzeyde artırmıştır. Buna ilaveten pioglitazon diyabet grubunda otofaji ile ilişkili Beclin ve LC3-II gen ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir azalma oluşturmuştur. Pioglitazon'un bu diyabet modelinde organ düzeyindeki etkilerini ortaya koyan ilk histopatolojik bulgular olup varolan klinik çalışmaları destekler niteliktedir. Sonuç olarak bulgularımız sıçanlarda HFD/STZ T2DM modelinde pioglitazon uygulamasının vasküler fonksiyonu, biyokimyasal parametreler, histopatolojik değerlendirme ve PPAR- γ , otofaji ile ilişkili gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri inceleyen ilk çalışmadır. Diyabette pioglitazon'un PVAD aracılı vasküler antikontraktıl etkide belirgin bir değişiklik oluşturmaması kullanılan diyabet modeli ve pioglitazon'un uygulama süresi ile ilişkili olabilir. PVAD'ın hemen hemen tüm arterlerin çevresinde bulunması ve salgıladığı adipokinler vasıtasıyla KVS'nin işleyişinde üstlendiği rol göz önüne alındığında PVAD'ın çeşitli patolojilerde vasküler tonus üzerindeki öneminin açıklığa kavuşturulması ileri çalışmalara temel teşkil edecektir.

KAYNAKLAR

1. Fernández-Alfonso MS, Somoza B, Tsvetkov D, Kuczmanski A, Dashwood M, Gil-Ortega M. Role of perivascular adipose tissue in health and disease. *Compr Physiol*. 2018;8(1):23-59. doi:10.1002/cphy.c170004
2. Lebona GT. The presence of paraganglia in the human ascending aortic fold: histological and ultrastructural studies. *J Anat*. 1993;183 (Pt 1):35-41.
3. Oriowo MA. Perivascular adipose tissue, vascular reactivity and hypertension. In: *Medical Principles and Practice*. Vol 24. S. Karger AG; 2015:29-37. doi:10.1159/000356380
4. Nosalski R, Guzik TJ. Perivascular adipose tissue inflammation in vascular disease. *Br J Pharmacol*. 2017;174(20):3496-3513. doi:10.1111/bph.13705
5. Lamers D, Schlich R, Greulich S, Sasson S, Sell H, Eckel J. Oleic acid and adipokines synergize in inducing proliferation and inflammatory signalling in human vascular smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2011;15(5):1177-1188. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01099.x
6. Miao C-Y, Li Z-Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. *Br J Pharmacol*. 2012;165(3):643-658. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1476-5381.2011.01404.x>. Accessed December 20, 2019.
7. Soltis EE, Cassis LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. *Clin Exp Hypertens*. 1991;A13(2):277-296. doi:10.3109/10641969109042063
8. Löhn M, Dubrovskaja G, Lauterbach B, Luft FC, Gollasch M, Sharma AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. 2002;16(9):1057-1063.
9. Gao Y-J, Zeng Z, Teoh K, et al. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2005;130(4):1130-1136. doi:10.1016/j.jtcvs.2005.05.028
10. Ozen G, Topal G, Gomez I, et al. Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2013;107:13-17. doi:10.1016/j.prostaglandins.2013.06.002
11. Gálvez-Prieto B, Somoza B, Gil-Ortega M, et al. Anticontractile effect of perivascular adipose tissue and leptin are reduced in hypertension. *Front*

- Pharmacol.* 2012;3 JUN. doi:10.3389/fphar.2012.00103
12. Emilova R, Dimitrova D, Mladenov M, Daneva T, Schubert R, Gagov H. Cystathionine gamma-lyase of perivascular adipose tissue with reversed regulatory effect in diabetic rat artery. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(1):147-151. doi:10.1080/13102818.2014.991565
 13. Meijer RI, Bakker W, Alta C-LAF, et al. Perivascular adipose tissue control of insulin-induced vasoreactivity in muscle is impaired in db/db mice. *Diabetes.* 2013;62(2):590-598. doi:10.2337/db11-1603
 14. Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2009;54(6):1384-1392. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.138305
 15. Qiu T, Li M, Tanner MA, et al. Depletion of dendritic cells in perivascular adipose tissue improves arterial relaxation responses in type 2 diabetic mice. *Metabolism.* 2018;85:76-89. doi:10.1016/j.metabol.2018.03.002
 16. Azul L, Leandro A, Boroumand P, Klip A, Seiça R, Sena CM. Increased inflammation, oxidative stress and a reduction in antioxidant defense enzymes in perivascular adipose tissue contribute to vascular dysfunction in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* November 2019.
 17. Withers SB, Agabiti-Rosei C, Livingstone DM, et al. Macrophage activation is responsible for loss of anticontractile function in inflamed perivascular fat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(4):908-913. doi:10.1161/ATVBAHA.110.221705
 18. Takaoka M, Suzuki H, Shioda S, et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30(8):1576-1582. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207175
 19. Li H, Zhou B, Xu L, et al. The reciprocal interaction between autophagic dysfunction and ER stress in adipose insulin resistance. *Cell Cycle.* 2014;13(4):565-579. doi:10.4161/cc.27406
 20. Ost A, Svensson K, Ruishalme I, et al. Attenuated mTOR signaling and enhanced autophagy in adipocytes from obese patients with type 2 diabetes. *Mol Med.* 2010;16(7-8):235-246. doi:10.2119/molmed.2010.00023

21. Kosacka J, Kern M, Klötting N, et al. Autophagy in adipose tissue of patients with obesity and type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2015;409:21-32. doi:10.1016/j.mce.2015.03.015
22. Battson ML, Lee DM, Jarrell DK, et al. Tauroursodeoxycholic Acid Reduces Arterial Stiffness and Improves Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetic Mice. *J Vasc Res.* 2017;54(5):280-287. doi:10.1159/000479967
23. Yu Y, Xue B-J, Wei S-G, et al. Activation of central PPAR- γ attenuates angiotensin II-induced hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 2015;66(2):403-411. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05726
24. Li J, Lang M-J, Mao X-B, Tian L, Feng Y-B. Antiapoptosis and mitochondrial effect of pioglitazone preconditioning in the ischemic/reperfused heart of rat. *Cardiovasc drugs Ther.* 2008;22(4):283-291. doi:10.1007/s10557-008-6115-x
25. Karagiannis E, Pfützner A, Forst T, et al. The IRIS V study: pioglitazone improves systemic chronic inflammation in patients with type 2 diabetes under daily routine conditions. *Diabetes Technol Ther.* 2008;10(3):206-212. doi:10.1089/dia.2008.0244
26. Yoshii H, Onuma T, Yamazaki T, et al. Effects of pioglitazone on macrovascular events in patients with type 2 diabetes mellitus at high risk of stroke: The profit-J study. *J Atheroscler Thromb.* 2014;21(6):563-573. doi:10.5551/jat.21626
27. Liao HW, Saver JL, Wu YL, Chen TH, Lee M, Ovbiagele B. Pioglitazone and cardiovascular outcomes in patients with insulin resistance, pre-diabetes and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *BMJ Open.* 2017;7(1). doi:10.1136/bmjopen-2016-013927
28. Nakamura T, Yamamoto E, Kataoka K, et al. Beneficial effects of pioglitazone on hypertensive cardiovascular injury are enhanced by combination with candesartan. *Hypertension.* 2008;51(2):296-301. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099044
29. Hall JE, Guyton GA. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th Ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011.*
30. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil P. *Editorler. Harper's Illustrated Biochemistry. 30th Ed. New York: McGraw-Hill; 2015.*
31. Anand BK, Brobeck JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med.* 1951;24(2):123-140.

32. Anand BK, Brobeck JR. Localization of a “Feeding Center” in the Hypothalamus of the Rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1951;77(2):323-325. doi:10.3181/00379727-77-18766
33. Luquet S, Perez FA, Hnasko TS, Palmiter RD. NPY/AgRP neurons are essentials for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. *Science* (80-). 2005;310(5748):683-685. doi:10.1126/science.1115524
34. Gropp E, Shanabrough M, Borok E, et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. *Nat Neurosci*. 2005;8(10):1289-1291. doi:10.1038/nn1548
35. Xu AW, Kaelin CB, Morton GJ, et al. Effects of hypothalamic neurodegeneration on energy balance. *PLoS Biol*. 2005;3(12):1-9. doi:10.1371/journal.pbio.0030415
36. Cowley MA, Smart JL, Rubinstein M, et al. Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus. *Nature*. 2001;411(6836):480-484. doi:10.1038/35078085
37. Betley JN, Xu S, Cao ZFH, et al. Neurons for hunger and thirst transmit a negative-valence teaching signal. *Nature*. 2015;521(7551):180-185. doi:10.1038/nature14416
38. Cowley MA, Smith RG, Diano S, et al. The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. 2003;37(4):649-661. doi:10.1016/S0896-6273(03)00063-1
39. Cone RD. Anatomy and regulation of the central melanocortin system. *Nat Neurosci*. 2005;8(5):571-578. doi:10.1038/nn1455
40. Atasoy D, Betley JN, Su HH, Sternson SM. Deconstruction of a neural circuit for hunger. *Nature*. 2012;488(7410):172-177. doi:10.1038/nature11270
41. Betley JN, Cao ZFH, Ritola KD, Sternson SM. Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*. 2013;155(6):1337-1350. doi:10.1016/j.cell.2013.11.002
42. Bell ME, Bhatnagar S, Akana SF, Choi S, Dallman MF. Disruption of arcuate/paraventricular nucleus connections changes body energy balance and response to acute stress. *J Neurosci*. 2000;20(17):6707-6713.
43. Xu B, Goulding EH, Zang K, et al. Brain-derived neurotrophic factor regulates energy balance downstream of melanocortin-4 receptor. *Nat Neurosci*.

- 2003;6(7):736-742. doi:10.1038/nn1073
44. Parise EM, Lilly N, Kay K, et al. Evidence for the role of hindbrain orexin-1 receptors in the control of meal size. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2011;301(6):1692-1699. doi:10.1152/ajpregu.00044.2011
 45. Chao P-T, Yang L, Aja S, Moran TH, Bi S. Knockdown of NPY expression in the dorsomedial hypothalamus promotes development of brown adipocytes and prevents diet-induced obesity. *Cell Metab*. 2011;13(5):573-583. doi:10.1016/j.cmet.2011.02.019
 46. Sheng Z, Santiago AM, Thomas MP, Routh VH. Metabolic regulation of lateral hypothalamic glucose-inhibited orexin neurons may influence midbrain reward neurocircuitry. *Mol Cell Neurosci*. 2014;62:30-41. doi:10.1016/j.mcn.2014.08.001
 47. Waterson MJ, Horvath TL. Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metab*. 2015;22(6):962-970. doi:10.1016/j.cmet.2015.09.026
 48. Lancha A, Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J. Peripheral signalling involved in energy homeostasis control. *Nutr Res Rev*. 2012;25(2):223-248. doi:10.1017/S0954422412000145
 49. Defronzo RA, Ferrannini E, Zimmet P, Alberti KGMM, Editörler. *International Textbook of Diabetes Mellitus. 4th Ed. New Jersey: Wiley-Blackwell; 2015.*
 50. Groop LC, Bonadonna RC, DelPrato S, et al. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1989;84(1):205-213. doi:10.1172/JCI114142
 51. Boden G. Effects of free fatty acids (FFA) on glucose metabolism: Significance for insulin resistance and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2003;111(3):121-124. doi:10.1055/s-2003-39781
 52. Frederick G. Banting-Facts [web page on the Internet]. Erişim: 20.05.2020, <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1923/banting/facts/>.
 53. Weiss M, Steiner DF, Philipson LH. *Insulin Biosynthesis, Secretion, Structure, and Structure-Activity Relationships*. MDText.com, Inc.; 2000.
 54. Suckale J, Solimena M. Pancreas islets in metabolic signaling--focus on the beta-cell. *Front Biosci*. 2008;13(18):7156-7171. doi:10.2741/3218
 55. Trexler AJ, Taraska JW. Regulation of insulin exocytosis by calcium-dependent

- protein kinase C in beta cells. *Cell Calcium*. 2017;67:1-10. doi:10.1016/j.ceca.2017.07.008
56. Furman B, Ong WK, Pyne NJ. Cyclic AMP signaling in pancreatic islets. *Adv Exp Med Biol*. 2010;654:281-304. doi:10.1007/978-90-481-3271-3_13
 57. Kim W, Egan JM. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):470-512. doi:10.1124/pr.108.000604
 58. Sanlioglu AD, Karacay B, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S. Therapeutic potential of VIP vs PACAP in diabetes. *J Mol Endocrinol*. 2012;49(3):R157-67. doi:10.1530/JME-12-0156
 59. Soga T, Ohishi T, Matsui T, et al. Lysophosphatidylcholine enhances glucose-dependent insulin secretion via an orphan G-protein-coupled receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;326(4):744-751. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.120
 60. Moran BM, Abdel-Wahab YHA, Flatt PR, McKillop AM. Activation of GPR119 by fatty acid agonists augments insulin release from clonal β -cells and isolated pancreatic islets and improves glucose tolerance in mice. *Biol Chem*. 2014;395(4):453-464. doi:10.1515/hsz-2013-0255
 61. Molina J, Rodriguez-Diaz R, Fachado A, Jacques-Silva MC, Berggren PO, Caicedo A. Control of insulin secretion by cholinergic signaling in the human pancreatic islet. *Diabetes*. 2014;63(8):2714-2726. doi:10.2337/db13-1371
 62. Strowski MZ, Parmar RM, Blake AD, Schaeffer JM. Somatostatin inhibits insulin and glucagon secretion via two receptor subtypes: An in vitro study of pancreatic islets from somatostatin receptor 2 knockout mice. *Endocrinology*. 2000;141(1):111-117. doi:10.1210/endo.141.1.7263
 63. Sharp GW. Mechanisms of inhibition of insulin release. *Am J Physiol*. 1996;271(6 Pt 1):C1781-99. doi:10.1152/ajpcell.1996.271.6.C1781
 64. Meyer C. Final answer: Ghrelin can suppress insulin secretion in humans, but is it clinically relevant? *Diabetes*. 2010;59(11):2726-2728.
 65. Lee J, Pilch PF. The insulin receptor: Structure, function, and signaling. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1994;266(2 35-2). doi:10.1152/ajpcell.1994.266.2.c319
 66. Lavin DP, White MF, Brazil DP. IRS proteins and diabetic complications. *Diabetologia*. 2016;59(11):2280-2291. doi:10.1007/s00125-016-4072-7
 67. Olson AL. Regulation of GLUT4 and Insulin-Dependent Glucose Flux. *ISRN Mol Biol*. 2012;2012:856987. doi:10.5402/2012/856987

68. Mandarino LJ, Printz RL, Cusi KA, et al. Regulation of hexokinase II and glycogen synthase mRNA, protein, and activity in human muscle. *Am J Physiol.* 1995;269(4 Pt 1):E701-8. doi:10.1152/ajpendo.1995.269.4.E701
69. Thiebaud D, Jacot E, DeFronzo RA, Maeder E, Jequier E, Felber JP. The effect of graded doses of insulin on total glucose uptake, glucose oxidation, and glucose storage in man. *Diabetes.* 1982;31(11):957-963. doi:10.2337/diacare.31.11.957
70. Lawrence JC, Roach PJ. New insights into the role and mechanism of glycogen synthase activation by insulin. *Diabetes.* 1997;46(4):541-547. doi:10.2337/diab.46.4.541
71. Dimitriadis G, Mitron P, Lambadiari V, Maratou E, Raptis SA. Insulin effects in muscle and adipose tissue. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;93(SUPPL. 1). doi:10.1016/S0168-8227(11)70014-6
72. Meijssen S, Castro Cabezas M, Ballieux CGM, Derksen RJ, Bilecen S, Erkelens DW. Insulin mediated inhibition of hormone sensitive lipase activity in vivo in relation to endogenous catecholamines in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4193-4197. doi:10.1210/jcem.86.9.7794
73. Sadur CN, Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest.* 1982;69(5):1119-1125. doi:10.1172/JCI110547
74. Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients.* 2015;7(11):9453-9474. doi:10.3390/nu7115475
75. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 2018;1411(1):21-35. doi:10.1111/nyas.13435
76. Vieira E, Salehi A, Gylfe E. Glucose inhibits glucagon secretion by a direct effect on mouse pancreatic alpha cells. *Diabetologia.* 2007;50(2):370-379. doi:10.1007/s00125-006-0511-1
77. Ma X, Zhang Y, Gromada J, et al. Glucagon stimulates exocytosis in mouse and rat pancreatic alpha-cells by binding to glucagon receptors. *Mol Endocrinol.* 2005;19(1):198-212. doi:10.1210/me.2004-0059
78. Bertrand G, Gross R, Puech R, Loubatières-Mariani MM, Bockaert J. Glutamate stimulates glucagon secretion via an excitatory amino acid receptor of the AMPA

- subtype in rat pancreas. *Eur J Pharmacol.* 1993;237(1):45-50. doi:10.1016/0014-2999(93)90091-U
79. Uehara S, Muroyama A, Echigo N, et al. Metabotropic Glutamate Receptor Type 4 Is Involved in Autoinhibitory Cascade for Glucagon Secretion by α -Cells of Islet of Langerhans. *Diabetes.* 2004;53(4):998-1006. doi:10.2337/diabetes.53.4.998
 80. Elliott AD, Ustione A, Piston DW. Somatostatin and insulin mediate glucose-inhibited glucagon secretion in the pancreatic α -cell by lowering cAMP. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2015;308(2):E130-43. doi:10.1152/ajpendo.00344.2014
 81. Xu E, Kumar M, Zhang Y, et al. Intra-islet insulin suppresses glucagon release via GABA-GABAA receptor system. *Cell Metab.* 2006;3(1):47-58. doi:10.1016/j.cmet.2005.11.015
 82. Franklin I, Gromada J, Gjnovci A, Theander S, Wollheim CB. β -cell secretory products activate α -cell ATP-dependent potassium channels to inhibit glucagon release. *Diabetes.* 2005;54(6):1808-1815. doi:10.2337/diabetes.54.6.1808
 83. Zhou H, Zhang T, Harmon JS, Bryan J, Robertson RP. Zinc, not insulin, regulates the rat α -cell response to hypoglycemia in vivo. *Diabetes.* 2007;56(4):1107-1112. doi:10.2337/db06-1454
 84. Young A. Inhibition of Glucagon Secretion. *Adv Pharmacol.* 2005;52:151-171. doi:10.1016/S1054-3589(05)52008-8
 85. Ramracheya R, Chapman C, Chibalina M, et al. GLP-1 suppresses glucagon secretion in human pancreatic alpha-cells by inhibition of P/Q-type Ca²⁺ channels. *Physiol Rep.* 2018;6(17):e13852. doi:10.14814/phy2.13852
 86. Taborsky GJ, Mundinger TO. Minireview: The role of the autonomic nervous system in mediating the glucagon response to hypoglycemia. *Endocrinology.* 2012;153(3):1055-1062. doi:10.1210/en.2011-2040
 87. Eisenstein AB, Strack I. Amino acid stimulation of glucagon secretion by perfused islets of high-protein-fed rats. *Diabetes.* 1978;27(4):370-376. doi:10.2337/diab.27.4.370
 88. Gerich JE, Charles MA, Grodsky GM. Characterization of the effects of arginine and glucose on glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas. *J Clin Invest.* 1974;54(4):833-841. doi:10.1172/JCI107823

89. Porcellati F, Pampanelli S, Rossetti P, et al. Effect of the amino acid alanine on glucagon secretion in non-diabetic and type 1 diabetic subjects during hyperinsulinaemic euglycaemia, hypoglycaemia and post-hypoglycaemic hyperglycaemia. *Diabetologia*. 2007;50(2):422-430. doi:10.1007/s00125-006-0519-6
90. Brubaker PL, Drucker DJ. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: The glucagon, GIP, GLP-1, and GLP-2 receptors. *Recept Channels*. 2002;8(3-4):179-188. doi:10.1080/10606820213687
91. Ramnanan CJ, Edgerton DS, Kraft G, Cherrington AD. Physiologic action of glucagon on liver glucose metabolism. *Diabetes, Obes Metab*. 2011;13(SUPPL. 1):118-125. doi:10.1111/j.1463-1326.2011.01454.x
92. Foster DW, McGarry JD. The regulation of ketogenesis. *Ciba Found Symp*. 1982;87:120-131. doi:10.1002/9780470720691.ch7
93. Paolisso G, Buonocore S, Gentile S, et al. Pulsatile glucagon has greater hyperglycaemic, lipolytic and ketogenic effects than continuous hormone delivery in man: effect of age. *Diabetologia*. 1990;33(5):272-277. doi:10.1007/BF00403320
94. Krulich L, Dhariwal AP, McCann SM. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology*. 1968;83(4):783-790. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4879544>. Accessed April 25, 2020.
95. Kumar U, Grant M. Somatostatin and somatostatin receptors. *Results Probl Cell Differ*. 2010;50:137-184. doi:10.1007/400_2009_29
96. Patel YC, Wheatley T, Ning C. Multiple forms of immunoreactive somatostatin: comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat. *Endocrinology*. 1981;109(6):1943-1949. doi:10.1210/endo-109-6-1943
97. Ballian N, Brunnicardi FC, Wang XP. Somatostatin and its receptors in the development of the endocrine pancreas. *Pancreas*. 2006;33(1):1-12. doi:10.1097/01.mpa.0000226894.16817.e8
98. Barkan AL, Dimaraki E V., Jessup SK, Symons K V., Ermolenko M, Jaffe CA. Ghrelin secretion in humans is sexually dimorphic, suppressed by somatostatin, and not affected by the ambient growth hormone levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(5):2180-2184. doi:10.1210/jc.2002-021169

99. Cherrington AD. Control of glucose uptake and release by the liver in vivo. In: *Diabetes*. Vol 48. ; 1999:1198-1214.
100. DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Wahren J, Felig P. Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(10):5173-5177. doi:10.1073/pnas.75.10.5173
101. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J. Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1985;76(1):149-155. doi:10.1172/JCI111938
102. DeFronzo RA, Jacot E, Jequier E, Maeder E, Wahren J, Felber JP. The effect of insulin on the disposal of intravenous glucose. Results from indirect calorimetry and hepatic and femoral venous catheterization. *Diabetes*. 1981;30(12):1000-1007.
103. Christensen M, Vedtofte L, Holst JJ, Vilsbøll T, Knop FK. Glucose-dependent insulintropic polypeptide: A bifunctional glucose-dependent regulator of glucagon and insulin secretion in humans. *Diabetes*. 2011;60(12):3103-3109. doi:10.2337/db11-0979
104. Meier JJ, Nauck MA, Schmidt WE, Gallwitz B. Gastric inhibitory polypeptide: The neglected incretin revisited. *Regul Pept*. 2002;107(1-3):1-13. doi:10.1016/S0167-0115(02)00039-3
105. Donnelly D. The structure and function of the glucagon-like peptide-1 receptor and its ligands. *Br J Pharmacol*. 2012;166(1):27-41. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01687.x
106. Nauck MA, Heimesaat MM, Behle K, et al. Effects of glucagon-like peptide 1 on counterregulatory hormone responses, cognitive functions, and insulin secretion during hyperinsulinemic, stepped hypoglycemic clamp experiments in healthy volunteers. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1239-1246. doi:10.1210/jcem.87.3.8355
107. Flint A, Raben A, Astrup A, Holst JJ. Glucagon-like peptide 1 promotes satiety and suppresses energy intake in humans. *J Clin Invest*. 1998;101(3):515-520. doi:10.1172/JCI990
108. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, et al. Global and regional diabetes prevalence

- estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* 2019;157. doi:10.1016/j.diabres.2019.107843
109. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol.* 2013;28(2):169-180. doi:10.1007/s10654-013-9771-5
 110. Bruno G, Runzo C, Cavallo-Perin P, et al. Incidence of type 1 and type 2 diabetes in adults aged 30-49 years: The population-based registry in the province of Turin, Italy. *Diabetes Care.* 2005;28(11):2613-2619. doi:10.2337/diacare.28.11.2613
 111. Holman N, Young B, Gadsby R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabet Med.* 2015;32(9):1119-1120. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25962518>. Accessed April 15, 2020.
 112. Hruby A, Hu FB. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics.* 2015;33(7):673-689. doi:10.1007/s40273-014-0243-x
 113. Obesity and overweight [web page on the Internet]. Erişim 23.05.2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>.
 114. Cercato C, Fonseca FA. Cardiovascular risk and obesity. *Diabetol Metab Syndr.* 2019;11(1). doi:10.1186/s13098-019-0468-0
 115. Bhaskaran K, Douglas I, Forbes H, Dos-Santos-Silva I, Leon DA, Smeeth L. Body-mass index and risk of 22 specific cancers: A population-based cohort study of 5.24 million UK adults. *Lancet.* 2014;384(9945):755-765. doi:10.1016/S0140-6736(14)60892-8
 116. Guidelines (2013) for managing overweight and obesity in adults. Preface to the Expert Panel Report (comprehensive version which includes systematic evidence review, evidence statements, and recommendations). *Obesity (Silver Spring).* 2014;22:S40.
 117. Clinical Guidelines on the Identification, Evaluation, and Treatment of Overweight and Obesity in Adults--The Evidence Report. National Institutes of Health. In: *Obesity Research.* Vol 6 Suppl 2. ; 1998.
 118. Kasen S, Cohen P, Chen H, Must A. Obesity and psychopathology in women: A three decade prospective study. *Int J Obes.* 2008;32(3):558-566. doi:10.1038/sj.ijo.0803736

119. Luppino FS, De Wit LM, Bouvy PF, et al. Overweight, obesity, and depression: A systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *Arch Gen Psychiatry*. 2010;67(3):220-229. doi:10.1001/archgenpsychiatry.2010.2
120. Schmidt FM, Weschenfelder J, Sander C, et al. Inflammatory cytokines in general and central obesity and modulating effects of physical Activity. *PLoS One*. 2015;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0121971
121. Azizian M, Mahdipour E, Mirhafez SR, et al. Cytokine profiles in overweight and obese subjects and normal weight individuals matched for age and gender. *Ann Clin Biochem*. 2016;53(6):663-668. doi:10.1177/0004563216629997
122. Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, et al. Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikk β . *Science (80-)*. 2001;293(5535):1673-1677. doi:10.1126/science.1061620
123. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central, role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420(6913):333-336. doi:10.1038/nature01137
124. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal kinase promotes insulin resistance during association with insulin receptor substrate-1 and phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem*. 2000;275(12):9047-9054. doi:10.1074/jbc.275.12.9047
125. Gao Z, Hwang D, Bataille F, et al. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by inhibitor κ B kinase complex. *J Biol Chem*. 2002;277(50):48115-48121. doi:10.1074/jbc.M209459200
126. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med China*. 2013;7(1):14-24. doi:10.1007/s11684-013-0262-6
127. Goldstein BJ, Ahmad F, Ding W, Li PM, Zhang WR. Regulation of the insulin signalling pathway by cellular protein-tyrosine phosphatases. *Mol Cell Biochem*. 1998;182(1-2):91-99. doi:10.1023/A:1006812218502
128. Goldstein BJ, Bittner-Kowalczyk A, White MF, Harbeck M. Tyrosine dephosphorylation and deactivation of insulin receptor substrate-1 by protein-tyrosine phosphatase 1B. Possible facilitation by the formation of a ternary complex with the GRB2 adaptor protein. *J Biol Chem*. 2000;275(6):4283-4289. doi:10.1074/jbc.275.6.4283
129. Belfort R, Mandarino L, Kashyap S, et al. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes*. 2005;54(6):1640-1648.

doi:10.2337/diabetes.54.6.1640

130. Meyer LK, Ciaraldi TP, Henry RR, Wittgrove AC, Phillips SA. Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity. *Adipocyte*. 2013;2(4):217-226. doi:10.4161/adip.24953
131. Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, et al. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology*. 2009;50(4):1105-1112. doi:10.1002/hep.23129
132. Hamburg NM, McMackin CJ, Huang AL, et al. Physical inactivity rapidly induces insulin resistance and microvascular dysfunction in healthy volunteers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(12):2650-2656. doi:10.1161/ATVBAHA.107.153288
133. Taylor SI, Kadowaki T, Kadowaki H, Accili D, Cama A, McKeon C. Mutations in insulin-receptor gene in insulin-resistant patients. In: *Diabetes Care*. Vol 13. ; 1990:257-279. doi:10.2337/diacare.13.3.257
134. Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, et al. Insulin receptor substrate-1 gene mutations in NIDDM; implications for the study of polygenic disease. *Diabetologia*. 1995;38(4):481-486. doi:10.1007/BF00410287
135. Rung J, Cauchi S, Albrechtsen A, et al. Genetic variant near IRS1 is associated with type 2 diabetes, insulin resistance and hyperinsulinemia. *Nat Genet*. 2009;41(10):1110-1115. doi:10.1038/ng.443
136. Brown AE, Walker M. Genetics of Insulin Resistance and the Metabolic Syndrome. *Curr Cardiol Rep*. 2016;18(8). doi:10.1007/s11886-016-0755-4
137. Gutch M, Kumar S, Razi SM, Gupta K, Gupta A. Assessment of insulin sensitivity/resistance. *Indian J Endocrinol Metab*. 2015;19(1):160-164. doi:10.4103/2230-8210.146874
138. Nyakudya TT, Mukwevho E, Erlwanger KH. The protective effect of neonatal oral administration of oleanolic acid against the subsequent development of fructose-induced metabolic dysfunction in male and female rats. *Nutr Metab*. 2018;15(1). doi:10.1186/s12986-018-0314-7
139. Li W, Zhu C, Liu T, et al. Epigallocatechin-3-gallate ameliorates glucolipid metabolism and oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2020;17(6). doi:10.1177/1479164120966998
140. Zhu L, Sha L, Li K, et al. Dietary flaxseed oil rich in omega-3 suppresses

- severity of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in rats. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1). doi:10.1186/s12944-019-1167-4
141. Møller N, Gormsen L, Fuglsang J, Gjedsted J. Effects of ageing on insulin secretion and action. In: *Hormone Research*. Vol 60. ; 2003:102-104. doi:10.1159/000071233
 142. Ingelsson E, Langenberg C, Hivert MF, et al. Detailed physiologic characterization reveals diverse mechanisms for novel genetic loci regulating glucose and insulin metabolism in humans. *Diabetes*. 2010;59(5):1266-1275. doi:10.2337/db09-1568
 143. Liang J, Pei Y, Liu X, et al. The CDKAL1 gene is associated with impaired insulin secretion and glucose-related traits: The Cardiometabolic Risk in Chinese (CRC) study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015;83(5):651-655. doi:10.1111/cen.12838
 144. Ali O. Genetics of type 2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013;4(4):114.
 145. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003;52(10):2461-2474. doi:10.2337/diabetes.52.10.2461
 146. Ritzel RA, Meier JJ, Lin CY, Veldhuis JD, Butler PC. Human islet amyloid polypeptide oligomers disrupt cell coupling, induce apoptosis, and impair insulin secretion in isolated human islets. *Diabetes*. 2007;56(1):65-71. doi:10.2337/db06-0734
 147. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Tanaka Y, Takahashi H. Glucose toxicity in β -cells: Type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection. *Diabetes*. 2003;52(3):581-587. doi:10.2337/diabetes.52.3.581
 148. Patanè G, Anello M, Piro S, Vigneri R, Purrello F, Rabuazzo AM. Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibition. *Diabetes*. 2002;51(9):2749-2756. doi:10.2337/diabetes.51.9.2749
 149. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. *Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu*, 12. Ed. (İnternette) 2019, Ağustos. Erişim: 25.05.2020 [Http://Temd.Org.Tr/Admin/Uploads/Tbl_kilavuz](http://Temd.Org.Tr/Admin/Uploads/Tbl_kilavuz)

20190819095854-2019tbl_kilavuzb48da4.

150. Merck. *Glucophage 850 Mg- Kısa Ürün Bilgisi*.; 2018.
151. Rena G, Hardie DG, Pearson ER. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia*. 2017;60(9):1577-1585. doi:10.1007/s00125-017-4342-z
152. Horakova O, Kroupova P, Bardova K, et al. Metformin acutely lowers blood glucose levels by inhibition of intestinal glucose transport. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-11. doi:10.1038/s41598-019-42531-0
153. Lee H, Ko G. Effect of Metformin on Metabolic Improvement and Gut Microbiota. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(19):5935-5943. doi:10.1128/AEM.01357-14
154. Tyagi S, Gupta P, Saini A, Kaushal C, Sharma S. The peroxisome proliferator-activated receptor: A family of nuclear receptors role in various diseases. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011;2(4):236-240. doi:10.4103/2231-4040.90879
155. Ferre P. The Biology of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Relationship With Lipid Metabolism and Insulin Sensitivity. *Diabetes*. 2004;53(Supplement 1):S43-S50. doi:10.2337/diabetes.53.2007.s43
156. Mukherjee R, Hoener PA, Jow L, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. 2000;14(9):1425-1433. doi:10.1210/mend.14.9.0528
157. Skat-Rørdam J, Højland Ipsen D, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. A role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in non-alcoholic fatty liver disease. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;124(5):528-537. doi:10.1111/bcpt.13190
158. Sakamoto A, Hongo M, Furuta K, Saito K, Nagai R, Ishizaka N. Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model of angiotenSakamoto, A., Hongo, M., Furuta, K., Saito, K., Nagai, R., & Ishizaka, N. (2013). Pioglitazone ameliorates systolic and diastolic cardiac dysfunction in rat model . *Int J Cardiol*. 2013;167(2):409-415. doi:10.1016/j.ijcard.2012.01.007
159. Takada S, Hirabayashi K, Kinugawa S, et al. Pioglitazone ameliorates the lowered exercise capacity and impaired mitochondrial function of the skeletal muscle in type 2 diabetic mice. *Eur J Pharmacol*. 2014;740:690-696. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299914004506>. Accessed April 29, 2020.

160. Henney JE. Withdrawal of Troglitazone and Cisapride. *JAMA*. 2000;283(17):2228. doi:10.1001/jama.283.17.2228
161. Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*. 2007;356(24):2457-2471. doi:10.1056/NEJMoA072761
162. Home PD, Pocock SJ, Beck-Nielsen H, et al. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes in oral agent combination therapy for type 2 diabetes (RECORD): a multicentre, randomised, open-label trial. *Lancet*. 2009;373(9681):2125-2135. doi:10.1016/S0140-6736(09)60953-3
163. FDA Drug Safety Communication: FDA eliminates the Risk Evaluation and Mitigation Strategy (REMS) for rosiglitazone-containing diabetes medicines [web page on the Internet]. Erişim 23.05.2020, <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-drug>.
164. ACTOSTM (Pioglitazone Hydrochloride) Tablets [web page on the Internet]. Erişim 30.05.2020, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/1999/21073lbl.pdf.
165. Ryder REJ. Pioglitazone has a dubious bladder cancer risk but an undoubted cardiovascular benefit. *Diabet Med*. 2015;32(3):305-313. doi:10.1111/dme.12627
166. Wu JX, Ding D, Wang M, Kang Y, Zeng X, Chen L. Ligand binding and conformational changes of SUR1 subunit in pancreatic ATP-sensitive potassium channels. *Protein Cell*. 2018;9(6):553-567. doi:10.1007/s13238-018-0530-y
167. Sherifali D, Nerenberg K, Pullenayegum E, Cheng JE, Gerstein HC. The effect of oral antidiabetic agents on A1C levels: A systematic review and meta-analysis. *Diabetes Care*. 2010;33(8):1859-1864. doi:10.2337/dc09-1727
168. Kaku K, Inoue Y, Kaneko T. Extrapankreatic effects of sulfonylurea drugs. *Diabetes Res Clin Pract*. 1995;28:S105-S108. doi:10.1016/0168-8227(95)01078-R
169. Bayer. *Glucobay 50 Mg Tb.- Kısa Ürün Bilgisi.*; 2011.
170. Salcedo I, Tweedie D, Li Y, Greig NH. Neuroprotective and neurotrophic actions of glucagon-like peptide-1: An emerging opportunity to treat neurodegenerative and cerebrovascular disorders. *Br J Pharmacol*. 2012;166(5):1586-1599. doi:10.1111/j.1476-5381.2012.01971.x
171. Drucker DJ, Nauck MA. The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor

- agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes. *Lancet*. 2006;368(9548):1696-1705. doi:10.1016/S0140-6736(06)69705-5
172. Nauck MA, Friedrich N. Do GLP-1-Based Therapies Increase Cancer Risk? 2013. <http://care.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10>. Accessed April 29, 2020.
 173. Margarita Díaz-Flores, Baiza-Gutman LA. Biochemical Mechanisms of Vascular Complications in Diabetes. In: *The Diabetes Textbook*. Springer International Publishing; 2019:695-707.
 174. Cardiovascular diseases (CVDs) [web page on the Internet]. Erişim 24.05.2020, [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
 175. Einarson TR, Acs A, Ludwig C, Panton UH. Prevalence of cardiovascular disease in type 2 diabetes: A systematic literature review of scientific evidence from across the world in 2007-2017. *Cardiovasc Diabetol*. 2018;17(1). doi:10.1186/s12933-018-0728-6
 176. Sarwar N, Gao P, Kondapally Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease: A collaborative meta-analysis of 102 prospective studies. *Lancet*. 2010;375(9733):2215-2222. doi:10.1016/S0140-6736(10)60484-9
 177. Booth GL, Kapral MK, Fung K, Tu J V. Relation between age and cardiovascular disease in men and women with diabetes compared with non-diabetic people: a population-based retrospective cohort study. *Lancet*. 2006;368(9529):29-36. doi:10.1016/S0140-6736(06)68967-8
 178. Alldredge BK, Koda-Kimble MA, Young LY, Editörler. *10th Edition Applied Therapeutics - The Clinical Use Of Drugs Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2013*.
 179. Katakami N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *J Atheroscler Thromb*. 2018;25(1):27-39. doi:10.5551/jat.RV17014
 180. Jinnouchi Y, Sano H, Nagai R, et al. Glycolaldehyde-modified low density lipoprotein leads macrophages to foam cells via the macrophage scavenger receptor. *J Biochem*. 1998;123(6):1208-1217. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022062

181. Ritthaler U, Deng Y, Zhang Y, et al. Expression of receptors for advanced glycation end products in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol.* 1995;146(3):688-694.
182. Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for advanced glycation endproducts. *Nat Med.* 1998;4(9):1025-1031. doi:10.1038/2012
183. Vedantham S, Noh H, Ananthakrishnan R, et al. Human aldose reductase expression accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-/- mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(8):1805-1813. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226902
184. Lynch JJ, Ferro TJ, Blumenstock FA, Brockenauer AM, Malik AB. Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J Clin Invest.* 1990;85(6):1991-1998. doi:10.1172/JCI114663
185. Cosentino F, Eto M, De Paolis P, et al. High glucose causes upregulation of cyclooxygenase-2 and alters prostanoid profile in human endothelial cells: Role of protein kinase C and reactive oxygen species. *Circulation.* 2003;107(7):1017-1023. doi:10.1161/01.CIR.0000051367.92927.07
186. Harja E, Chang JS, Lu Y, et al. Mice deficient in PKC β and apolipoprotein E display decreased atherosclerosis. *FASEB J.* 2009;23(4):1081-1091. doi:10.1096/fj.08-120345
187. Fang JY, Lin CH, Huang TH, Chuang SY. In vivo rodent models of type 2 diabetes and their usefulness for evaluating flavonoid bioactivity. *Nutrients.* 2019;11(3). doi:10.3390/nu11030530
188. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. In: *Diabetes.* Vol 53. American Diabetes Association; 2004:S215-S219. doi:10.2337/diabetes.53.suppl_3.S215
189. Skovsø S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig.* 2014;5(4):349-358. doi:10.1111/jdi.12235
190. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: The fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism.* 2000;49(11):1390-1394. doi:10.1053/meta.2000.17721
191. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-

- fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res.* 2005;52(4):313-320. doi:10.1016/j.phrs.2005.05.004
192. Aydın AF, Bingül İ, Küçükgergin C, Doğan-Ekici I, Doğru Abbasoğlu S, Uysal M. Carnosine decreased oxidation and glycation products in serum and liver of high-fat diet and low-dose streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(5):278-288. doi:10.1111/iep.12252
 193. Ozturk Z, Gulpinar T, Vural K, Boyacioglu S, Korkmaz M, Var A. Effects of selenium on endothelial dysfunction and metabolic profile in low dose streptozotocin induced diabetic rats fed a high fat diet. *Biotech Histochem.* 2015;90(7):506-515. doi:10.3109/10520295.2015.1042050
 194. Bhandari U, Kumar V, Kumar P, Tripathi CD, Khanna G. Protective effect of pioglitazone on cardiomyocyte apoptosis in low-dose streptozotocin & high-fat diet-induced type-2 diabetes in rats. *Indian J Med Res.* 2015;142(5):598-605. doi:10.4103/0971-5916.171290
 195. Luo B, Li B, Wang W, et al. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model. 2014;9(8).
 196. Yu S, Cheng Y, Zhang L, et al. Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts anti-diabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1). doi:10.1186/s13287-019-1474-8
 197. Lee TI, Bai KJ, Chen YC, et al. Histone deacetylase inhibition of cardiac autophagy in rats on a high-fat diet with low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):594-601. doi:10.3892/mmr.2017.7905
 198. Hou J, Zheng D, Fung G, et al. Mangiferin suppressed advanced glycation end products (AGEs) through NF- κ B deactivation and displayed anti-inflammatory effects in streptozotocin and high fat diet-diabetic cardiomyopathy rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015;94(3):332-340. doi:10.1139/cjpp-2015-0073
 199. Shen X, Wang L, Zhou N, Gai S, Liu X, Zhang S. Beneficial effects of combination therapy of phloretin and metformin in streptozotocin-induced diabetic rats and improved insulin sensitivity: In vitro. In: *Food and Function.* Vol 11. Royal Society of Chemistry; 2020:392-403. doi:10.1039/c9fo01326a

200. Khan S, Jena G. Sodium butyrate reduces insulin-resistance, fat accumulation and dyslipidemia in type-2 diabetic rat: A comparative study with metformin. *Chem Biol Interact.* 2016;254:124-134. doi:10.1016/j.cbi.2016.06.007
201. Hu C, Su Q, Li F, et al. Duodenal-jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM rat model. *Obes Surg.* 2014;24(9):1453-1462. doi:10.1007/s11695-014-1230-1
202. Gheibi S, Jeddi S, Carlström M, Gholami H, Ghasemi A. Effects of long-term nitrate supplementation on carbohydrate metabolism, lipid profiles, oxidative stress, and inflammation in male obese type 2 diabetic rats. *Nitric Oxide - Biol Chem.* 2018;75:27-41. doi:10.1016/j.niox.2018.02.002
203. Zhang S, Zhang Q, Zhang L, Li C, Jiang H. Expression of ghrelin and leptin during the development of type 2 diabetes mellitus in a rat model. *Mol Med Rep.* 2013;7(1):223-228. doi:10.3892/mmr.2012.1154
204. Castro CA de, da Silva KA, Buffo MM, et al. Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(1):26-33. doi:10.1111/iep.12220
205. Li Y, Han L, Ding WY, et al. Prostaglandin F2 α receptor silencing attenuates vascular remodeling in rats with type 2 diabetes. *Exp Mol Pathol.* 2015;99(3):517-523. doi:10.1016/j.yexmp.2015.09.011
206. Huang L, Yang L, Luo L, Wu P, Yan S. Osteocalcin Improves Metabolic Profiles, Body Composition and Arterial Stiffening in an Induced Diabetic Rat Model. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2017;125(4):234-240. doi:10.1055/s-0042-122138
207. Li W bo, Zhao J, Liu L, et al. Silencing of activin receptor-like kinase 7 alleviates aortic stiffness in type 2 diabetic rats. *Acta Diabetol.* 2015;52(4):717-726. doi:10.1007/s00592-014-0706-8
208. Bhattacharjee N, Khanra R, Dua TK, et al. *Sansevieria roxburghiana* Schult. & Schult. F. (Family: Asparagaceae) attenuates type 2 diabetes and its associated cardiomyopathy. *PLoS One.* 2016;11(11). doi:10.1371/journal.pone.0167131
209. Ren X, Wei Q, Shao H, Sun Z, Liu N. A rat model of diabetic artery calcification. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(5):497-503. doi:10.3275/7865
210. Brodeur MR, Bouvet C, Bouchard S, et al. Reduction of advanced-glycation end

- products levels and inhibition of rage signaling decreases rat vascular calcification induced by diabetes. *PLoS One*. 2014;9(1). doi:10.1371/journal.pone.0085922
211. Sun X, Han F, Yi J, Hou N, Cao Z. The effect of telomerase activity on vascular smooth muscle cell proliferation in type 2 diabetes in vivo and in vitro. *Mol Med Rep*. 2013;7(5):1636-1640. doi:10.3892/mmr.2013.1350
 212. Tang ST, Su H, Zhang Q, et al. Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor-B/IB system through the activation of AMP-activated protein kinase. *Int J Mol Med*. 2016;37(6):1558-1566. doi:10.3892/ijmm.2016.2578
 213. Wang Y, Ying L, Chen Y ying, et al. Induction of heme oxygenase-1 ameliorates vascular dysfunction in streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *Vascul Pharmacol*. 2014;61(1):16-24. doi:10.1016/j.vph.2014.02.001
 214. Geng FH, Li GH, Zhang X, et al. Berberine improves mesenteric artery insulin sensitivity through up-regulating insulin receptor-mediated signalling in diabetic rats. *Br J Pharmacol*. 2016;173(10):1569-1579. doi:10.1111/bph.13466
 215. Davidson EP, Coppey LJ, Holmes A, Dake B, Yorek MA. Effect of treatment of high fat fed/low dose streptozotocin-diabetic rats with Ilepatril on vascular and neural complications. *Eur J Pharmacol*. 2011;668(3):497-506. doi:10.1016/j.ejphar.2011.07.016
 216. Cho YE, Basu A, Dai A, Heldak M, Makino A. Coronary endothelial dysfunction and mitochondrial reactive oxygen species in type 2 diabetic mice. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2013;305(10). doi:10.1152/ajpcell.00234.2013
 217. An XR, Li X, Wei W, Li XX, Xu M. Prostaglandin E1 Inhibited Diabetes-Induced Phenotypic Switching of Vascular Smooth Muscle Cells Through Activating Autophagy. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(2):757-767. doi:10.1159/000494240
 218. Gaikwad AB, Viswanad B, Ramarao P. PPAR γ agonists partially restores hyperglycemia induced aggravation of vascular dysfunction to angiotensin II in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res*. 2007;55(5):400-407. doi:10.1016/j.phrs.2007.01.015
 219. Tchoukalova YD, Sarr MG, Jensen MD. Measuring committed preadipocytes in human adipose tissue from severely obese patients by using adipocyte fatty acid

- binding protein. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(5):R1132-40. doi:10.1152/ajpregu.00337.2004
220. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: Their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. 2000;21(6):697-738. doi:10.1210/edrv.21.6.0415
 221. Wang W, Seale P. Control of brown and beige fat development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(11):691-702. doi:10.1038/nrm.2016.96
 222. Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004;84(1):277-359. doi:10.1152/physrev.00015.2003
 223. Giordano A, Frontini A, Castellucci M, Cinti S. Presence and distribution of cholinergic nerves in rat mediastinal brown adipose tissue. *J Histochem Cytochem*. 2004;52(7):923-930. doi:10.1369/jhc.3A6246.2004
 224. Seale P, Conroe HM, Estall J, et al. Prdm16 determines the thermogenic program of subcutaneous white adipose tissue in mice. *J Clin Invest*. 2011;121(1):96-105. doi:10.1172/JCI44271
 225. Jacene HA, Cohade CC, Zhang Z, Wahl RL. The relationship between patients' serum glucose levels and metabolically active brown adipose tissue detected by PET/CT. *Mol imaging Biol*. 2011;13(6):1278-1283. doi:10.1007/s11307-010-0379-9
 226. Jiang Y, Berry DC, Graff JM. Distinct cellular and molecular mechanisms for $\beta 3$ adrenergic receptor-induced beige adipocyte formation. *Elife*. 2017;6. doi:10.7554/eLife.30329
 227. Shabalina IG, Petrovic N, deJong JMA, Kalinovich A V., Cannon B, Nedergaard J. UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic. *Cell Rep*. 2013;5(5):1196-1203. doi:10.1016/j.celrep.2013.10.044
 228. Bartelt A, Heeren J. Adipose tissue browning and metabolic health. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(1):24-36. doi:10.1038/nrendo.2013.204
 229. Cook KS, Min HY, Johnson D, et al. Adipsin: A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. *Science (80-)*. 1987;237(4813):402-405. doi:10.1126/science.3299705
 230. Lehr S, Hartwig S, Sell H. Adipokines: a treasure trove for the discovery of biomarkers for metabolic disorders. *Proteomics Clin Appl*. 2012;6(1-2):91-101. doi:10.1002/prca.201100052

231. Fasshauer M, Blüher M. Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2015;36(7):461-470. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014
232. Blüher M. Adipokines - removing road blocks to obesity and diabetes therapy. *Mol Metab.* 2014;3(3):230-240. doi:10.1016/j.molmet.2014.01.005
233. Blüher M. Clinical relevance of adipokines. *Diabetes Metab J.* 2012;36(5):317-327. doi:10.4093/dmj.2012.36.5.317
234. Rodriguez-Granillo GA, Reynoso E, Capunay C, Carpio J, Carrascosa P. Pericardial and visceral, but not total body fat, are related to global coronary and extra-coronary atherosclerotic plaque burden. *Int J Cardiol.* 2018;260:204-210. doi:10.1016/j.ijcard.2018.01.106
235. von Düring ME, Jenssen T, Bollerslev J, Godang K, Hartmann A, Åsberg A. Arterial stiffness is associated with visceral fat mass in kidney transplanted patients—A nationwide cohort study. *Clin Transplant.* 2018;32(8). doi:10.1111/ctr.13341
236. Chandra A, Neeland IJ, Berry JD, et al. The relationship of body mass and fat distribution with incident hypertension: Observations from the dallas heart study. *J Am Coll Cardiol.* 2014;64(10):997-1002. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.057
237. Kocaman SA, Baysan O, Çetin M, et al. An increase in epicardial adipose tissue is strongly associated with carotid intima-media thickness and atherosclerotic plaque, but LDL only with the plaque. *Anatol J Cardiol.* 2017;17(1):56-63. doi:10.14744/AnatolJCardiol.2016.6885
238. Harada K, Harada K, Uetani T, et al. The different association of epicardial fat with coronary plaque in patients with acute coronary syndrome and patients with stable angina pectoris: Analysis using integrated backscatter intravascular ultrasound. *Atherosclerosis.* 2014;236(2):301-306. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.07.007
239. Dicker D, Atar E, Kornowski R, Bachar GN. Increased Epicardial Adipose Tissue Thickness as a Predictor for Hypertension: A Cross-Sectional Observational Study. *J Clin Hypertens.* 2013;15(12):893-898. doi:10.1111/jch.12201
240. Nakamori S, Nezafat M, Ngo LH, Manning WJ, Nezafat R. Left Atrial Epicardial Fat Volume Is Associated With Atrial Fibrillation: A Prospective Cardiovascular Magnetic Resonance 3D Dixon Study. *J Am Heart Assoc.* 2018;7(6).

doi:10.1161/JAHA.117.008232

241. Dale CE, Fatemifar G, Palmer TM, et al. Causal Associations of Adiposity and Body Fat Distribution with Coronary Heart Disease, Stroke Subtypes, and Type 2 Diabetes Mellitus: A Mendelian Randomization Analysis. *Circulation*. 2017;135(24):2373-2388. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.026560
242. Drolet R, Richard C, Sniderman AD, et al. Hypertrophy and hyperplasia of abdominal adipose tissues in women. *Int J Obes*. 2008;32(2):283-291. doi:10.1038/sj.ijo.0803708
243. Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *Int J Mol Sci*. 2019;20(9). doi:10.3390/ijms20092358
244. Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911-919. doi:10.1016/j.jaci.2005.02.023
245. Franssens BT, Hoogduin H, Leiner T, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Relation between brown adipose tissue and measures of obesity and metabolic dysfunction in patients with cardiovascular disease. *J Magn Reson Imaging*. 2017;46(2):497-504. doi:10.1002/jmri.25594
246. Stanford KI, Middelbeek RJW, Townsend KL, et al. Brown adipose tissue regulates glucose homeostasis and insulin sensitivity. *J Clin Invest*. 2013;123(1):215-223. doi:10.1172/JCI62308
247. Thoonen R, Ernande L, Cheng J, et al. Functional brown adipose tissue limits cardiomyocyte injury and adverse remodeling in catecholamine-induced cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2015;84:202-211. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.05.002
248. Lau WB, Ohashi K, Wang Y, et al. Role of adipokines in cardiovascular disease. *Circ J*. 2017;81(7):920-928. doi:10.1253/circj.CJ-17-0458
249. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;257(1):79-83. doi:10.1006/bbrc.1999.0255
250. Ryo M, Nakamura T, Kihara S, et al. Adiponectin as a biomarker of the metabolic syndrome. *Circ J*. 2004;68(11):975-981. doi:10.1253/circj.68.975
251. Kim DH, Kim C, Ding EL, Townsend MK, Lipsitz LA. Adiponectin levels and the risk of hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Hypertension*.

- 2013;62(1):27-32. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01453
252. Chow W-S, Cheung BMY, Tso AWK, et al. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)*. 2007;49(6):1455-1461. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.086835
 253. Fésüs G, Dubrovská G, Gorzelniak K, et al. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):719-727. doi:10.1016/j.cardiores.2007.05.025
 254. Xi W, Satoh H, Kase H, Suzuki K, Hattori Y. Stimulated HSP90 binding to eNOS and activation of the PI3-Akt pathway contribute to globular adiponectin-induced NO production: vasorelaxation in response to globular adiponectin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;332(1):200-205. doi:10.1016/j.bbrc.2005.04.111
 255. Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoadiponectinemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(1):85-89. doi:10.1161/01.atv.0000048856.22331.50
 256. Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma Adiponectin Levels and Risk of Myocardial Infarction in Men. *J Am Med Assoc*. 2004;291(14):1730-1737. doi:10.1001/jama.291.14.1730
 257. Liang K-W, Sheu WH-H, Lee W-L, et al. Decreased circulating protective adiponectin level is associated with angiographic coronary disease progression in patients with angina pectoris. *Int J Cardiol*. 2008;129(1):76-80. doi:10.1016/j.ijcard.2007.05.027
 258. Otsuka F, Sugiyama S, Kojima S, et al. Plasma Adiponectin Levels Are Associated With Coronary Lesion Complexity in Men With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(6):1155-1162. doi:10.1016/j.jacc.2006.05.054
 259. Okamoto Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2002;106(22):2767-2770. doi:10.1161/01.CIR.0000042707.50032.19
 260. Okamoto Y, Folco EJ, Minami M, et al. Adiponectin inhibits the production of CXC receptor 3 chemokine ligands in macrophages and reduces T-lymphocyte recruitment in atherogenesis. *Circ Res*. 2008;102(2):218-225.

- doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.164988
261. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, et al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem.* 2002;277(40):37487-37491. doi:10.1074/jbc.M206083200
 262. Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation.* 2002;105(24):2893-2898. doi:10.1161/01.CIR.0000018622.84402.FF
 263. Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* 1994;372(6505):425-432. doi:10.1038/372425a0
 264. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1(11):1155-1161. doi:10.1038/nm1195-1155
 265. Beltowski J. Leptin and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006;189(1):47-60. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2006.03.003
 266. Liu J, Yang X, Yu S, Zheng R. The leptin resistance. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Vol 1090. Springer New York LLC; 2018:145-163. doi:10.1007/978-981-13-1286-1_8
 267. Enriori PJ, Evans AE, Sinnayah P, Cowley MA. Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14 Suppl 5. doi:10.1038/oby.2006.319
 268. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. *Pharmacol Res.* 2017;122:1-7. doi:10.1016/j.phrs.2017.05.013
 269. Galletti F, D'Elia L, Barba G, et al. High-circulating leptin levels are associated with greater risk of hypertension in men independently of body mass and insulin resistance: Results of an eight-year follow-up study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(10):3922-3926. doi:10.1210/jc.2008-1280
 270. Asferg C, Møgelvang R, Flyvbjerg A, et al. Leptin, not adiponectin, predicts hypertension in the copenhagen city heart study. *Am J Hypertens.* 2010;23(3):327-333. doi:10.1038/ajh.2009.244
 271. Momin AU, Melikian N, Shah AM, et al. Leptin is an endothelial-independent vasodilator in humans with coronary artery disease: Evidence for tissue

- specificity of leptin resistance. *Eur Heart J.* 2006;27(19):2294-2299. doi:10.1093/eurheartj/ehi831
272. Rodríguez A, Fortuño A, Gómez-Ambrosi J, Zalba G, Díez J, Frühbeck G. The inhibitory effect of leptin on angiotensin II-induced vasoconstriction in vascular smooth muscle cells is mediated via a nitric oxide-dependent mechanism. *Endocrinology.* 2007;148(1):324-331. doi:10.1210/en.2006-0940
 273. Shek EW, Brands MW, Hall JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. *Hypertens (Dallas, Tex 1979).* 1998;31(1 Pt 2):409-414. doi:10.1161/01.hyp.31.1.409
 274. Satoh N, Ogawa Y, Katsuura G, et al. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: Leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes.* 1999;48(9):1787-1793. doi:10.2337/diabetes.48.9.1787
 275. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Kaneda Y, Guzmán M, Brownlee M. Leptin induces mitochondrial superoxide production and monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic endothelial cells by increasing fatty acid oxidation via protein kinase A. *J Biol Chem.* 2001;276(27):25096-25100. doi:10.1074/jbc.M007383200
 276. Bouloumié A, Marumo T, Lafontan M, Busse R. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells. *FASEB J.* 1999;13(10):1231-1238. doi:10.1096/fasebj.13.10.1231
 277. Russo I. The Prothrombotic Tendency in Metabolic Syndrome: Focus on the Potential Mechanisms Involved in Impaired Haemostasis and Fibrinolytic Balance. *Scientifica (Cairo).* 2012;2012.
 278. Mattu HS, Randeva HS. Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol.* 2013;216(1):T17-36. doi:10.1530/JOE-12-0232
 279. Muse ED, Feldman DI, Blaha MJ, et al. The association of resistin with cardiovascular disease in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2015;239(1):101-108. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2014.12.044
 280. Katsiki N, Athyros VG, Karagiannis A, Mikhailidis DP. Characteristics other than the diagnostic criteria associated with metabolic syndrome: an overview. *Curr Vasc Pharmacol.* 2014;12(4):627-641. doi:10.2174/15701611113119990131
 281. Kunnari A, Ukkola O, Päivänsalo M, Kesäniemi YA. High plasma resistin level

- is associated with enhanced highly sensitive C-reactive protein and leukocytes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2755-2760. doi:10.1210/jc.2005-2115
282. Verma S, Li S-H, Wang C-H, et al. Resistin promotes endothelial cell activation: further evidence of adipokine-endothelial interaction. *Circulation.* 2003;108(6):736-740. doi:10.1161/01.CIR.0000084503.91330.49
 283. Li Y, Wang Y, Li Q, et al. Effect of resistin on vascular endothelium secretion dysfunction in rats. *Endothelium.* 2007;14(4-5):207-214. doi:10.1080/10623320701617225
 284. Calabro P, Samudio I, Willerson JT, Yeh ETH. Resistin promotes smooth muscle cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Circulation.* 2004;110(21):3335-3340. doi:10.1161/01.CIR.0000147825.97879.E7
 285. Jung HS, Park KH, Cho YM, et al. Resistin is secreted from macrophages in atheromas and promotes atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2006;69(1):76-85. doi:10.1016/j.cardiores.2005.09.015
 286. Saddi-Rosa P, Oliveira CS, Giuffrida FM, Reis AF. Visfatin, glucose metabolism and vascular disease: A review of evidence. *Diabetol Metab Syndr.* 2010;2(1):21. doi:10.1186/1758-5996-2-21
 287. Yamawaki H, Hara N, Okada M, Hara Y. Visfatin causes endothelium-dependent relaxation in isolated blood vessels. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;383(4):503-508. doi:10.1016/j.bbrc.2009.04.074
 288. Kim S-R, Bae Y-H, Bae S-K, et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1783(5):886-895. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.01.004
 289. Cirillo P, Di Palma V, Maresca F, et al. The adipokine visfatin induces tissue factor expression in human coronary artery endothelial cells: another piece in the adipokines puzzle. *Thromb Res.* 2012;130(3):403-408. doi:10.1016/j.thromres.2012.06.007
 290. Horimatsu T, Kim HW, Weintraub NL. The role of perivascular adipose tissue in non-atherosclerotic vascular disease. *Front Physiol.* 2017;8(NOV):969. doi:10.3389/fphys.2017.00969
 291. Gálvez-Prieto B, Dubrovskaya G, Cano MV, et al. A reduction in the amount and

- anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res.* 2008;31(7):1415-1423. doi:10.1291/hypres.31.1415
292. Padilla J, Jenkins NT, Vieira-Potter VJ, Harold Laughlin M. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2013;304(7). doi:10.1152/ajpregu.00567.2012
 293. Contreras GA, Thelen K, Ayala-Lopez N, Watts SW. The distribution and adipogenic potential of perivascular adipose tissue adipocyte progenitors is dependent on sexual dimorphism and vessel location. *Physiol Rep.* 2016;4(19). doi:10.14814/phy2.12993
 294. Chang L, Villacorta L, Li R, et al. Loss of perivascular adipose tissue on peroxisome proliferator-activated receptor- γ deletion in smooth muscle cells impairs intravascular thermoregulation and enhances atherosclerosis. *Circulation.* 2012;126(9):1067-1078. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.104489
 295. Wójcicka G, Jamroz-Wiśniewska A, Atanasova P, Chaldakov GN, Chylińska-Kula B, Bełtowski J. Differential effects of statins on endogenous H₂S formation in perivascular adipose tissue. *Pharmacol Res.* 2011;63(1):68-76. doi:10.1016/j.phrs.2010.10.011
 296. Gao Y-J, Lu C, Su L-Y, Sharma AM, Lee RMKW. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol.* 2007;151(3):323-331. doi:10.1038/sj.bjp.0707228
 297. Lee RMKW, Lu C, Su L-Y, Gao Y-J. Endothelium-dependent relaxation factor released by perivascular adipose tissue. *J Hypertens.* 2009;27(4):782-790. doi:10.1097/HJH.0b013e328324ed86
 298. Lee YC, Chang HH, Chiang CL, et al. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. *Circulation.* 2011;124(10):1160-1171. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.027375
 299. Verlohren S, Dubrovskaya G, Tsang SY, et al. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. *Hypertension.* 2004;44(3):271-276. doi:10.1161/01.HYP.0000140058.28994.ec
 300. Costa RM, Neves KB, Tostes RC, Lobato NS. Perivascular adipose tissue as a

- relevant fat depot for cardiovascular risk in obesity. *Front Physiol.* 2018;9(MAR). doi:10.3389/fphys.2018.00253
301. Payne GA, Bohlen HG, Dincer ÜD, Borbouse L, Tune JD. Periadventitial adipose tissue impairs coronary endothelial function via PKC- β -dependent phosphorylation of nitric oxide synthase. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2009;297(1). doi:10.1152/ajpheart.00116.2009
 302. Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, et al. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation.* 2009;119(12):1661-1670. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.821181
 303. Henrichot E, Juge-Aubry CE, Pernin A, et al. Production of chemokines by perivascular adipose tissue: A role in the pathogenesis of atherosclerosis? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(12):2594-2599. doi:10.1161/01.ATV.0000188508.40052.35
 304. Antonopoulos AS, Margaritis M, Coutinho P, et al. Adiponectin as a link between type 2 diabetes and vascular NADPH oxidase activity in the human arterial wall: The regulatory role of perivascular adipose tissue. *Diabetes.* 2015;64(6):2207-2219. doi:10.2337/db14-1011
 305. Hirata Y, Kurobe H, Akaike M, et al. Enhanced inflammation in epicardial fat in patients with coronary artery disease. *Int Heart J.* 2011;52(3):139-142. doi:10.1536/ihj.52.139
 306. Verhagen SN, Vink A, van der Graaf Y, Visseren FLJ. Coronary perivascular adipose tissue characteristics are related to atherosclerotic plaque size and composition. A post-mortem study. *Atherosclerosis.* 2012;225(1):99-104. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2012.08.031
 307. Manka D, Chatterjee TK, Stoll LL, et al. Transplanted perivascular adipose tissue accelerates injury-induced neointimal hyperplasia: Role of monocyte chemoattractant protein-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34(8):1723-1730. doi:10.1161/ATVBAHA.114.303983
 308. Mooradian AD. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2009;5(3):150-159. doi:10.1038/ncpendmet1066
 309. Tan MH, Johns D, Strand J, et al. Sustained effects of pioglitazone vs. glibenclamide on insulin sensitivity, glycaemic control, and lipid profiles in

- patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med.* 2004;21(8):859-866. doi:10.1111/j.1464-5491.2004.01258.x
310. Yang H, Suh DH, Kim DH, et al. Metabolomic and lipidomic analysis of the effect of pioglitazone on hepatic steatosis in a rat model of obese Type 2 diabetes. *Br J Pharmacol.* 2018;175(17):3610-3625. doi:10.1111/bph.14434
 311. Kushner RF, Sujak M. Prevention of Weight Gain in Adult Patients With Type 2 Diabetes Treated With Pioglitazone. *Obesity.* 2009;17(5):1017-1022. doi:10.1038/oby.2008.651
 312. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, et al. Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(6):2784-2791. doi:10.1210/jcem.87.6.8567
 313. Kodama N, Tahara N, Tahara A, et al. Effects of pioglitazone on visceral fat metabolic activity in impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(11):4438-4445. doi:10.1210/jc.2013-2920
 314. Okada K, Hosooka T, Shinohara M, Ogawa W. Modulation of lipid mediator profile may contribute to amelioration of chronic inflammation in adipose tissue of obese mice by pioglitazone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;505(1):29-35. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.081
 315. Spencer M, Yang L, Adu A, et al. Pioglitazone treatment reduces adipose tissue inflammation through reduction of mast cell and macrophage number and by improving vascularity. *PLoS One.* 2014;9(7). doi:10.1371/journal.pone.0102190
 316. Bodles AM, Varma V, Yao-Borengasser A, et al. Pioglitazone induces apoptosis of macrophages in human adipose tissue. *J Lipid Res.* 2006;47(9):2080-2088. doi:10.1194/jlr.M600235-JLR200
 317. Cipolletta D, Feuerer M, Li A, et al. PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T reg cells. *Nature.* 2012;486(7404):549-553. doi:10.1038/nature11132
 318. Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(2):580-585. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.120
 319. Kovacova Z, Tharp WG, Liu D, et al. Adipose tissue natriuretic peptide receptor expression is related to insulin sensitivity in obesity and diabetes. *Obesity.*

- 2016;24(4):820-828. doi:10.1002/oby.21418
320. Phillips SA, Ciaraldi TP, Oh DK, Savu MK, Henry RR. Adiponectin secretion and response to pioglitazone is depot dependent in cultured human adipose tissue. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2008;295(4):E842. doi:10.1152/ajpendo.90359.2008
 321. Unal R, Yao-Borengasser A, Varma V, et al. Matrix metalloproteinase-9 is increased in obese subjects and decreases in response to pioglitazone. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(6):2993-3001. doi:10.1210/jc.2009-2623
 322. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. Pioglitazone induces mitochondrial biogenesis in human subcutaneous adipose tissue in vivo. *Diabetes.* 2005;54(5):1392-1399. doi:10.2337/diabetes.54.5.1392
 323. Burkey BF, Dong M, Gagen K, et al. Effects of pioglitazone on promoting energy storage, not expenditure, in brown adipose tissue of obese fa/fa Zucker rats: Comparison to CL 316, 243. *Metabolism.* 2000;49(10):1301-1308. doi:10.1053/meta.2000.9524
 324. Pop LM, Lingvay I, Yuan Q, Li X, Adams-Huet B, Maalouf NM. Impact of pioglitazone on bone mineral density and bone marrow fat content. *Osteoporos Int.* 2017;28(11):3261-3269. doi:10.1007/s00198-017-4164-3
 325. Grey A, Beckley V, Doyle A, et al. Pioglitazone increases bone marrow fat in type 2 diabetes: Results from a randomized controlled trial. *Eur J Endocrinol.* 2012;166(6):1087-1091. doi:10.1530/EJE-11-1075
 326. Chang L, Zhao X, Garcia-Barrio M, Zhang J, Eugene Chen Y. MitoNEET in Perivascular Adipose Tissue Prevents Arterial Stiffness in Aging Mice. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2018;32(5):531-539. doi:10.1007/s10557-018-6809-7
 327. Quesada I, Cejas J, García R, Cannizzo B, Redondo A, Castro C. Vascular dysfunction elicited by a cross talk between periaortic adipose tissue and the vascular wall is reversed by pioglitazone. *Cardiovasc Ther.* 2018;36(3). doi:10.1111/1755-5922.12322
 328. Kernan WN, Viscoli CM, Furie KL, et al. Pioglitazone after ischemic stroke or Transient Ischemic attack. *N Engl J Med.* 2016;374(14):1321-1331. doi:10.1056/NEJMoA1506930
 329. Schneider CA, Ferrannini E, DeFronzo R, Schernthaner G, Yates J, Erdmann E. Effect of pioglitazone on cardiovascular outcome in diabetes and chronic kidney

- disease. *J Am Soc Nephrol*. 2008;19(1):182-187. doi:10.1681/ASN.2007060678
330. Wilcox R, Kupfer S, Erdmann E. Effects of pioglitazone on major adverse cardiovascular events in high-risk patients with type 2 diabetes: Results from PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macro Vascular Events (PROactive 10). *Am Heart J*. 2008;155(4):712-717. doi:10.1016/j.ahj.2007.11.029
 331. de Jong M, van der Worp HB, van der Graaf Y, Visseren FLJ, Westerink J. Pioglitazone and the secondary prevention of cardiovascular disease. A meta-analysis of randomized-controlled trials. *Cardiovasc Diabetol*. 2017;16(1). doi:10.1186/s12933-017-0617-4
 332. Mittal D, Taliyan R, Sharma P, Yadav H. Effect of pioglitazone on the abrogated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in hyperlipidemic rat heart. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(1):59-63. doi:10.4103/0253-7613.174545
 333. Yuan M, Qiu M, Cui J, Zhang X, Zhang P. Protective effects of pioglitazone against immunoglobulin deposition on heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Endocrinol Invest*. 2014;37(4):375-384. doi:10.1007/s40618-013-0046-5
 334. Zhong W, Jin W, Xu S, et al. Pioglitazone induces cardiomyocyte apoptosis and inhibits cardiomyocyte hypertrophy via VEGFR-2 signaling pathway. *Arq Bras Cardiol*. 2018;111(2):162-169. doi:10.5935/abc.20180108
 335. Cersosimo E, Xu X, Upala S, Triplitt C, Musi N. Acute insulin resistance stimulates and insulin sensitization attenuates vascular smooth muscle cell migration and proliferation. *Physiol Rep*. 2014;2(8). doi:10.14814/phy2.12123
 336. Gao M, Chen T, Wu L, Zhao X, Mao H, Xing C. Effect of pioglitazone on the calcification of rat vascular smooth muscle cells through the downregulation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2017;16(5):6208-6213. doi:10.3892/mmr.2017.7308
 337. Soliman E, Behairy SF, El-maraghy NN, Elshazly SM. PPAR- γ agonist, pioglitazone, reduced oxidative and endoplasmic reticulum stress associated with L-NAME-induced hypertension in rats. *Life Sci*. 2019;239. doi:10.1016/j.lfs.2019.117047
 338. Sakamoto A, Higashikun Y, Hongo M, et al. Pioglitazone reduces vascular lipid accumulation in Angiotensin II-induced hypertensive rat. *J Atheroscler Thromb*. 2015;22(12):1225-1234. doi:10.5551/jat.28977
 339. Hamblin M, Chang L, Zhang H, Yang K, Zhang J, Chen YE. Vascular smooth

- muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor- γ mediates pioglitazone-reduced vascular lesion formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(2):352-359. doi:10.1161/ATVBAHA.110.219006
340. Ishibashi M, Egashira K, Hiasa K ichi, et al. Antiinflammatory and antiarteriosclerotic effects of pioglitazone. *Hypertension.* 2002;40(5):687-693. doi:10.1161/01.HYP.0000036396.64769.C2
 341. Martens FMAC, Visseren FLJ, De Koning EJP, Rabelink TJ. Short-term pioglitazone treatment improves vascular function irrespective of metabolic changes in patients with type 2 diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2005;46(6):773-778. doi:10.1097/01.fjc.0000187176.13403.05
 342. Majithiya JB, Paramar AN, Balaraman R. Pioglitazone, a PPAR γ agonist, restores endothelial function in aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cardiovasc Res.* 2005;66(1):150-161. doi:10.1016/j.cardiores.2004.12.025
 343. Jin J, Zeng H, Yang OU, Kong J. The endothelial protective effects of pioglitazone on insulin resistance in endothelial cells. *Clin Lab.* 2014;60(7):1129-1134. doi:10.7754/Clin.Lab.2013.130713
 344. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res.* 2008;2008:704045. doi:10.1155/2008/704045
 345. Guo Z, Qin Z, Zhang R, Li J, Yin Y. Effect of rosiglitazone on the expression of cardiac adiponectin receptors and NADPH oxidase in type 2 diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 2012;685(1-3):116-125. doi:10.1016/j.ejphar.2012.04.010
 346. Domon A, Katayama K, Sato T, Tochigi Y, Tazaki H, Suzuki H. Empagliflozin ameliorates symptoms of diabetes and renal tubular dysfunction in a rat model of diabetes with enlarged kidney (DEK). *PLoS One.* 2021;16(5 May). doi:10.1371/journal.pone.0251135
 347. Guo Z, Zhang R, Li J, Xu G. Effect of telmisartan on the expression of adiponectin receptors and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in the heart and aorta in type 2 diabetic rats. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:94. doi:10.1186/1475-2840-11-94
 348. Eraky SM, Abdel-Rahman N, Eissa LA. Modulating effects of omega-3 fatty acids and pioglitazone combination on insulin resistance through toll-like receptor 4 in type 2 diabetes mellitus. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.*

- 2018;136:123-129. doi:10.1016/j.plefa.2017.06.009
349. Zhao DD, Yu N, Li XK, et al. Antidiabetic and antioxidative effect of Jiang Tang Xiao Ke granule in high-fat diet and low-dose streptozotocin induced diabetic rats. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/475192
 350. Aronoff S, Rosenblatt S, Braithwaite S, Egan JW, Mathisen AL, Schneider RL. Pioglitazone hydrochloride monotherapy improves glycemic control in the treatment of patients with type 2 diabetes: a 6-month randomized placebo-controlled dose-response study. The Pioglitazone 001 Study Group. *Diabetes Care.* 2000;23(11):1605-1611. doi:10.2337/diacare.23.11.1605
 351. Dormandy JA, Charbonnel B, Eckland DJA, et al. Secondary prevention of macrovascular events in patients with type 2 diabetes in the PROactive Study (PROspective pioglitAzone Clinical Trial in macroVascular Events): A randomised controlled trial. *Lancet.* 2005;366(9493):1279-1289. doi:10.1016/S0140-6736(05)67528-9
 352. Sarruf DA, Yu F, Nguyen HT, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor- γ in key neuronal subsets regulating glucose metabolism and energy homeostasis. *Endocrinology.* 2009;150(2):707-712. doi:10.1210/en.2008-0899
 353. Wang YX. PPARs: Diverse regulators in energy metabolism and metabolic diseases. *Cell Res.* 2010;20(2):124-137. doi:10.1038/cr.2010.13
 354. Doehner W, Erdmann E, Cairns R, et al. Inverse relation of body weight and weight change with mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes and cardiovascular co-morbidity: An analysis of the PROactive study population. *Int J Cardiol.* 2012;162(1):20-26. doi:10.1016/j.ijcard.2011.09.039
 355. Miyazaki Y, Matsuda M, DeFronzo RA. Dose-response effect of pioglitazone on insulin sensitivity and insulin secretion in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2002;25(3):517-523. doi:10.2337/diacare.25.3.517
 356. Ceriello A, Johns D, Widell M, Eckland DJ, Gilmore KJ, Tan MH. Comparison of effect of pioglitazone with metformin or sulfonylurea (monotherapy and combination therapy) on postload glycemia and composite insulin sensitivity index during an oral glucose tolerance test in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2005;28(2):266-272. doi:10.2337/diacare.28.2.266

357. Shen X, Li H, Li W, Wu X, Ding X. Pioglitazone prevents hyperglycemia induced decrease of AdipoR1 and AdipoR2 in coronary arteries and coronary VSMCs. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;363(1-2):27-35. doi:10.1016/j.mce.2012.07.005
358. Ding S, Shen Z, Chen Y, Sun S, Liu Q, Xie M. Pioglitazone can ameliorate insulin resistance in low-dose streptozotocin and high sucrose-fat diet induced obese rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(5):575-580. doi:10.1111/j.1745-7254.2005.00090.x
359. Kassam SI, Lu C, Buckley N, Gao YJ, Lee RMKW. Modulation of thiopental-induced vascular relaxation and contraction by perivascular adipose tissue and endothelium. *Br J Anaesth.* 2012;109(2):177-184. doi:10.1093/BJA/AES127
360. Baltieri N, Guizoni DM, Victorio JA, Davel AP. Protective Role of Perivascular Adipose Tissue in Endothelial Dysfunction and Insulin-Induced Vasodilatation of Hypercholesterolemic LDL Receptor-Deficient Mice. *Front Physiol.* 2018;9(MAR):229. doi:10.3389/FPHYS.2018.00229
361. Gonzaga NA, Awata WMC, do Vale GT, et al. Perivascular adipose tissue protects against the vascular dysfunction induced by acute ethanol intake: Role of hydrogen peroxide. *Vascul Pharmacol.* 2018;111:44-53. doi:10.1016/J.VPH.2018.08.010
362. Lee MH-H, Chen S-J, Tsao C-M, Wu C-C. Perivascular Adipose Tissue Inhibits Endothelial Function of Rat Aortas via Caveolin-1. *PLoS One.* 2014;9(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0099947
363. Reifemberger MS, Turk JR, Newcomer SC, Booth FW, Laughlin MH. Perivascular fat alters reactivity of coronary artery: Effects of diet and exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2007;39(12):2125-2134. doi:10.1249/mss.0b013e318156e9df
364. Bunker AK, Harold Laughlin M. Influence of exercise and perivascular adipose tissue on coronary artery vasomotor function in a familial hypercholesterolemic porcine atherosclerosis model. *J Appl Physiol.* 2010;108(3):490-497. doi:10.1152/japplphysiol.00999.2009
365. Vidigal CB, Novi DRBS, Moura KF, et al. Intrauterine exposure to metformin: Evaluation of endothelial and perivascular adipose tissue function in abdominal aorta of adult offspring. *Life Sci.* 2018;207:72-79. doi:10.1016/j.lfs.2018.05.050

366. Araujo HN, Victório JA, Silva CPV da, et al. Anti-contraction effects of perivascular adipose tissue in thoracic aorta from rats fed a high-fat diet: role of aerobic exercise training. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2018;45(3):293-302. doi:10.1111/1440-1681.12882
367. Li R, Andersen I, Aleke J, Golubinskaya V, Gustafsson H, Nilsson H. Reduced anti-contraction effect of perivascular adipose tissue on mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats: Role of Kv7 channels. *Eur J Pharmacol*. 2013;698(1-3):310-315. doi:10.1016/J.EJPHAR.2012.09.026
368. Buchanan TA, Meehan WP, Jeng YY, et al. Blood pressure lowering by pioglitazone. Evidence for a direct vascular effect. *J Clin Invest*. 1995;96(1):354-360. doi:10.1172/JCI118041
369. Nomura H, Yamawaki H, Mukohda M, Okada M, Hara Y. Mechanisms underlying pioglitazone-mediated relaxation in isolated blood vessel. *J Pharmacol Sci*. 2008;108(3):258-265. doi:10.1254/jphs.08117FP
370. Kunasegaran T, Mustafa MR, Achike FI, Murugan DD. Quercetin and pioglitazone synergistically reverse endothelial dysfunction in isolated aorta from fructose-streptozotocin (F-STZ)-induced diabetic rats. *Eur J Pharmacol*. 2017;799:160-170. doi:10.1016/j.ejphar.2017.02.022
371. Tugrul I, Dost T, Demir O, et al. Effects of a PPAR -gamma receptor agonist and an angiotensin receptor antagonist on aortic contraction responses to alpha receptor agonists in diabetic and/or hypertensive rats. *Cardiovasc J Afr*. 2016;27(3):164. doi:10.5830/CVJA-2015-080
372. Verma S, Bhanot S, Arikawa E, Yao L, McNeill JH. Direct vasodepressor effects of pioglitazone in spontaneously hypertensive rats. *Pharmacology*. 1998;56(1):7-16. doi:10.1159/000028177
373. Afzal S, Sattar MA, Akhtar S, et al. Effect of pioglitazone on vasopressor responses to adrenergic agonists and angiotensin II in diabetic and non-diabetic spontaneously hypertensive rats. *Pak J Pharm Sci*. 2018;31(3):747-754.
374. LE F, AP D, S V-F, et al. Fenofibrate and pioglitazone do not ameliorate the altered vascular reactivity in aorta of isoproterenol-treated rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2008;52(5):413-421. doi:10.1097/FJC.0B013E31818A8927
375. McLaughlin TM, Liu T, Yee G, et al. Pioglitazone increases the proportion of small cells in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity (Silver*

- Spring*). 2010;18(5):926-931. doi:10.1038/oby.2009.380
376. Kajita K, Mori I, Hanamoto T, et al. Pioglitazone enhances small-sized adipocyte proliferation in subcutaneous adipose tissue. *Endocr J*. 2012;59(12):1107-1114. doi:10.1507/endocrj.ej12-0259
 377. Margaritis M, Antonopoulos AS, Digby J, et al. Interactions between vascular wall and perivascular adipose tissue reveal novel roles for adiponectin in the regulation of endothelial nitric oxide synthase function in human vessels. *Circulation*. 2013;127(22):2209-2221. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.001133
 378. Martens FMAC, Rabelink TJ, op 't Roodt J, de Koning EJP, Visseren FLJ. TNF- α induces endothelial dysfunction in diabetic adults, an effect reversible by the PPAR- γ agonist pioglitazone. *Eur Heart J*. 2006;27(13):1605-1609. doi:10.1093/eurheartj/ehl079
 379. Astapova O, Leff T. Adiponectin and PPAR γ : cooperative and interdependent actions of two key regulators of metabolism. *Vitam Horm*. 2012;90:143-162. doi:10.1016/B978-0-12-398313-8.00006-3
 380. Katsiki N, Mikhailidis DP, Banach M. Leptin, cardiovascular diseases and type 2 diabetes mellitus. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(7):1176-1188. doi:10.1038/aps.2018.40
 381. Ghantous CM, Azrak Z, Hanache S, Abou-Kheir W, Zeidan A. Differential Role of Leptin and Adiponectin in Cardiovascular System. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:534320. doi:10.1155/2015/534320
 382. Lembo G, Vecchione C, Fratta L, et al. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. *Diabetes*. 2000;49(2):293-297. doi:10.2337/diabetes.49.2.293
 383. Vecchione C, Maffei A, Colella S, et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. *Diabetes*. 2002;51(1):168-173. doi:10.2337/diabetes.51.1.168
 384. Bełtowski J. Leptin and the regulation of endothelial function in physiological and pathological conditions. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2012;39(2):168-178. doi:10.1111/j.1440-1681.2011.05623.x
 385. Hida K, Wada J, Eguchi J, et al. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A*. 2005;102(30):10610-10615. doi:10.1073/pnas.0504703102
386. Mori K, Tsuchiya K, Nakamura S, et al. Ipragliflozin-induced adipose expansion inhibits cuff-induced vascular remodeling in mice. *Cardiovasc Diabetol*. 2019;18(1):83. doi:10.1186/s12933-019-0886-1
 387. Ida S, Murata K, Kaneko R. Effects of pioglitazone treatment on blood leptin levels in patients with type 2 diabetes. *J Diabetes Investig*. 2018;9(4):917-924. doi:10.1111/jdi.12783
 388. Tripathy D, Daniele G, Fiorentino T V., et al. Pioglitazone improves glucose metabolism and modulates skeletal muscle TIMP-3-TACE dyad in type 2 diabetes mellitus: A randomised, double-blind, placebo-controlled, mechanistic study. *Diabetologia*. 2013;56(10):2153-2163. doi:10.1007/s00125-013-2976-z
 389. Nishio K, Sakurai M, Kusuyama T, et al. A randomized comparison of pioglitazone to inhibit restenosis after coronary stenting in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006;29(1):101-106. doi:10.2337/diacare.29.01.06.dc05-1170
 390. Ljubkovic M, Gressette M, Bulat C, et al. Disturbed fatty acid oxidation, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in left ventricle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2019;68(10):1924-1933. doi:10.2337/DB19-0423
 391. Mali V, Haddox S, Hornersmith C, Matrougui K, Belmadani S. Essential role for EGFR tyrosine kinase and ER stress in myocardial infarction in type 2 diabetes. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2018;470(3):471-480. doi:10.1007/S00424-017-2097-5
 392. Ivanova EA, Orekhov AN. The role of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in atherosclerosis. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2). doi:10.3390/IJMS17020193
 393. McAlpine CS, Werstuck GH. Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase and glycogen synthase kinase-3 α/β regulate foam cell formation. *J Lipid Res*. 2014;55(11):2320-2333. doi:10.1194/JLR.M051094
 394. Wang Y, Rijal B, Xu M, et al. Renal denervation improves vascular endothelial dysfunction by inducing autophagy via AMPK/mTOR signaling activation in a rat model of type 2 diabetes mellitus with insulin resistance. *Acta Diabetol*. 2020;57(10):1227-1243. doi:10.1007/s00592-020-01532-6
 395. Munasinghe PE, Riu F, Dixit P, et al. Type-2 diabetes increases autophagy in the

- human heart through promotion of Beclin-1 mediated pathway. *Int J Cardiol.* 2016;202:13-20. doi:10.1016/j.ijcard.2015.08.111
396. Dewanjee S, Vallamkondu J, Kalra RS, John A, Reddy PH, Kandimalla R. Autophagy in the diabetic heart: A potential pharmacotherapeutic target in diabetic cardiomyopathy. *Ageing Res Rev.* 2021;68:101338. doi:10.1016/J.ARR.2021.101338
 397. Shamsi BH, Ma C, Naqvi S, Xiao Y. Effects of pioglitazone mediated activation of PPAR- γ on CIDEA and obesity related changes in mice. *PLoS One.* 2014;9(9):e106992. doi:10.1371/journal.pone.0106992
 398. Bogacka I, Xie H, Bray GA, Smith SR. The effect of pioglitazone on peroxisome proliferator-activated receptor- γ target genes related to lipid storage in vivo. *Diabetes Care.* 2004;27(7):1660-1667. doi:10.2337/diacare.27.7.1660
 399. Kim H, Haluzik M, Gavrilova O, et al. Thiazolidinediones improve insulin sensitivity in adipose tissue and reduce the hyperlipidaemia without affecting the hyperglycaemia in a transgenic model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 2004;47(12):2215-2225. doi:10.1007/s00125-004-1581-6
 400. Li H, Zhou B, Xu L, et al. Circulating PGRN is significantly associated with systemic insulin sensitivity and autophagic activity in metabolic syndrome. *Endocrinology.* 2014;155(9):3493-3507. doi:10.1210/en.2014-1058
 401. Lin IC, Wu CW, Tain YL, Chen IC, Hung CY, Wu KLH. High fructose diet induces early mortality via autophagy factors accumulation in the rostral ventrolateral medulla as ameliorated by pioglitazone. *J Nutr Biochem.* 2019;69:87-97. doi:10.1016/j.jnutbio.2019.03.014
 402. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, et al. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell Metab.* 2006;3(3):211-222. doi:10.1016/j.cmet.2006.01.011
 403. Yoshiuchi K, Kaneto H, Matsuoka TA, et al. Pioglitazone reduces ER stress in the liver: Direct monitoring of in vivo ER stress using ER stress-activated indicator transgenic mice. *Endocr J.* 2009;56(9):1103-1111. doi:10.1507/ENDOCRJ.K09E-140
 404. Hong SW, Lee J, Cho JH, et al. Pioglitazone attenuates palmitate-induced inflammation and endoplasmic reticulum stress in pancreatic β -cells. *Endocrinol Metab.* 2018;33(1):105-113. doi:10.3803/ENM.2018.33.1.105

405. Chen F, Lai J, Zhu Y, et al. Cardioprotective Effect of Decorin in Type 2 Diabetes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11. doi:10.3389/fendo.2020.479258
406. Huang DW, Lo YM, Chang WC, et al. Alleviative effect of *Ruellia tuberosa* L. on NAFLD and hepatic lipid accumulation via modulating hepatic de novo lipogenesis in high-fat diet plus streptozotocin-induced diabetic rats. *Food Sci Nutr*. 2020;8(10):5710-5716. doi:10.1002/FSN3.1868
407. Dwivedi DK, Jena GB. NLRP3 inhibitor glibenclamide attenuates high-fat diet and streptozotocin-induced non-alcoholic fatty liver disease in rat: studies on oxidative stress, inflammation, DNA damage and insulin signalling pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2020;393(4):705-716. doi:10.1007/S00210-019-01773-5
408. Zhou W, Ye S. Rapamycin improves insulin resistance and hepatic steatosis in type 2 diabetes rats through activation of autophagy. *Cell Biol Int*. 2018;42(10):1282-1291. doi:10.1002/CBIN.11015
409. Yang H, Suh DH, Kim DH, et al. Metabolomic and lipidomic analysis of the effect of pioglitazone on hepatic steatosis in a rat model of obese Type 2 diabetes. *Br J Pharmacol*. 2018;175(17):3610-3625. doi:10.1111/bph.14434
410. DeFronzo RA, Inzucchi S, Abdul-Ghani M, Nissen SE. Pioglitazone: The forgotten, cost-effective cardioprotective drug for type 2 diabetes. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2019;16(2):133-143. doi:10.1177/1479164118825376
411. Elbe H, Vardı N, Orman D, Taşlıdere E, Yıldız A. Ameliorative effects of aminoguanidine on rat aorta in streptozotocin-induced diabetes and evaluation of α -SMA expression. *Anadolu Kardiyol Derg*. 2014;14(8):679-684. doi:10.5152/akd.2014.5047
412. Badalzadeh R, Layeghzadeh N, Alihemmati A, Mohammadi M. Beneficial Effect of Troxerutin on Diabetes-Induced Vascular Damages in Rat Aorta: Histopathological Alterations and Antioxidation Mechanism. *Int J Endocrinol Metab*. 2015;13(2):25969. doi:10.5812/IJEM.25969
413. Langenfeld MR, Forst T, Hohberg C, et al. Pioglitazone Decreases Carotid Intima-Media Thickness Independently of Glycemic Control in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus. *Circulation*. 2005;111(19):2525-2531. doi:10.1161/01.CIR.0000165072.01672.21

414. Cusi K, Orsak B, Bril F, et al. Long-term pioglitazone treatment for patients with nonalcoholic steatohepatitis and prediabetes or type 2 diabetes mellitus a randomized trial. *Ann Intern Med.* 2016;165(5):305-315. doi:10.7326/M15-1774
415. Mizoguchi M, Tahara N, Tahara A, et al. Pioglitazone attenuates atherosclerotic plaque inflammation in patients with impaired glucose tolerance or diabetes: A prospective, randomized, comparator-controlled study using serial FDG PET/CT imaging study of carotid artery and ascending aorta. *JACC Cardiovasc Imaging.* 2011;4(10):1110-1118. doi:10.1016/j.jcmg.2011.08.007



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

PPAR- γ AGONİSTİ PİOGLİTAZONUN PERİVASKÜLER ADİPOZ DOKU ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLIK RAPORU

% 6	% 5	% 1	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	seraymercimekci.com İnternet Kaynağı	% 1
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
3	temd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
4	Submitted to Fatih University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	www.tfd.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Sakarya University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<% 1
9	adudspace.adu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1