

**SEKONDER SÜLFONİLÜRE YANITSIZLIĞI GELİŞEN  
TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU HASTALARDA  
YOĞUN İNSÜLİN TEDAVİSİNİN  
SİSTEMİK NİTRİK OKSİT DÜZEYİ ve  
ADENOZİN DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

**Uzmanlık Tezi**

**Tıp Fakültesi**

**Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı**

**Gaziantep Üniversitesi**

**Rukiye DEVECİ**

## ÖZ

SEKONDER SÜLFONİLÜRE YANITSIZLIĞI GELİŞEN TİP 2 DİABETES MELLİTUS'LU HASTALARDA YOĞUN İNSÜLİN TEDAVİSİNİN SİSTEMİK NİTRİK OKSİT DÜZEYİ ve ADENOZİN DEAMİNAZ AKTİVİTESİNE ETKİSİ

DEVECİ, Rukiye

Uzmanlık tezi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI

Mayıs 2005, 85 Sayfa

Yangı, oksidatif stres ve apoptoz beta hücre hasarı ve beta hücre işlevinin bozulması ile ilişkili olarak sekonder sülfonilüre yanıtınlığında rol oynadığı ileri sürülen mekanizmalardır. Nitrik oksitin (NO) insülin salınımını uyarıcı, proinflatuar, apoptotik ve oksidatif stresle ilişkili bir molekül olması, adenozin deaminazın (ADA) benzer etkiler oluşturabilen adenozinin hücre içi ve dışı konsantrasyonlarını etkilemesi, ilerleyici beta hücre hasarının moleküler mekanizmalarının araştırılmasında önemli olabileceklerini göstermektedir. Bu çalışmaya sekonder sülfonilüre yanıtınlığı gelişmiş tip 2 Diabetes Mellitus'lu 24 hasta dahil edilmiştir. Tedavi öncesi, 3 günlük insülin infüzyonu ve 6 aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrası alınan kan örneklerinde serum NO düzeyi ve ADA aktivitesi saptanmıştır. NO düzeyleri kolorimetrik Griess reaksiyonuyla  $\text{NO}_2^-$  ve  $\text{NO}_3^-$  düzeyinde, ADA aktivitesi amonyak oluşumunun direk ölçümüne dayanan spektrofotometrik Giusti metoduyla ölçüldü. Yoğun insülin tedavisinden önce (ortanca: 25.-75. yüzdelikler, 18.8: 11.6-28.4  $\mu\text{mol/L}$ ), tedavinin 3. gününde (17.8: 9.7-33.6  $\mu\text{mol/L}$ ) ve 6. ayında (21.7: 16.0-33.9  $\mu\text{mol/L}$ ) saptanan NO düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ( $p>0.05$ ). Yoğun insülin tedavisinden önce (17.0: 14.6-21.7 U/L) saptanan ADA aktivitesi, 3. gün (20.5: 16.2-23.4 U/L) ve 6. ayda saptanan değerlerden (21.2: 16.6-22.5 U/L) anlamlı olarak düşüktü (sırası ile  $p=0.018$  ve  $p=0.010$ ).

Sonuçlarımız sekonder sülfonilüre yanıtınlığı gelişen Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda yoğun insülin tedavisi ile 3. gün ve 6. ayda serum NO düzeylerinde bir farklılık olmadığını, ADA aktivitesinin ise anlamlı olarak arttığını göstermektedir. Adenozin inflammatuar, apoptotik ve insülin salınımını baskılayıcı özellik gösteren bir molekül olduğu için yüksek ADA aktivitesinin tedavi sürecinde hücre ölümünü tetikleyen inflammatuar uyarının ortadan kalkması ile ilişkili olabileceği ve tedavi etkinliğinde rol oynayabileceği düşünülebilir.

Anahtar kelimeler: Adenozin deaminaz, apoptoz, nitrik oksit, sekonder sülfonilüre yanıtınlığı, tip 2 Diabetes Mellitus, yangı, yoğun insülin tedavisi

## ABSTRACT

EFFECTS OF INTENSIVE INSULIN TREATMENT ON SYSTEMIC NITRIC OXIDE  
LEVELS AND ADENOSINE DEAMINASE ACTIVITY  
IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS AND  
SECONDARY SULFONYLUREA FAILURE

DEVECİ, Rukiye

Residency Thesis, Department of Biochemistry and Clinical Biochemistry

Supervisor: Assoc. Proff. Dr. Ayşe Binnur Erbağcı

May 2005, 85 pages

Inflammation, oxidative stress and apoptosis are suggested to take part in secondary sulfonylurea failure associated with beta cell destruction and impaired beta cell function. Nitric oxide (NO) which stimulates insulin release, has proinflammatory, apoptotic and free radical effects and adenosine deaminase (ADA) exerting control on intra- and extracellular adenosine levels that possess similar effects, deserve to investigate in course of molecular mechanisms of progressive beta cell destruction. 24 patients with type 2 Diabetes Mellitus and secondary sulfonylurea failure were enrolled to this study. Serum NO levels and ADA activity were determined in blood samples obtained prior to the treatment, after 3 day length insulin infusion and after 6 month length multiple subcutane insulin administration. Nitric oxide levels were measured with colorimetric assay by the method of Griess reaction as levels of  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  in serum. ADA activities were estimated spectrophotometrically by the method of Giusti, which is based on direct measurements of the formation of ammonia. A statistically significant difference was not observed between NO levels determined before (median: 25th-75th percentiles, 18.8: 11.6-28.4  $\mu\text{mol/L}$ ), on 3rd day (17.8: 9.7-33.6  $\mu\text{mol/L}$ ) and on 6th month of intensive insulin therapy (21.7: 16.0-33.9  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p>0.05$ ). ADA activity determined before intensive insulin therapy (17.0: 14.6-21.7 U/L) was significantly lower than 3rd day (20.5: 16.2-23.4 U/L) and 6th month ADA activities (21.2: 16.6-22.5 U/L,  $p=0.018$  and  $p=0.010$  respectively).

According to our study systemic NO levels do not exhibit a significant difference in patients with type 2 Diabetes Mellitus and secondary sulfonylurea failure where ADA activity significantly increase on 3rd day and 6th month of intensive insulin therapy. As adenosine is characterised by inflammatory and apoptotic effects on beta cells and suppresses insulin secretion, it can be supposed that increase of ADA activity may be related to disappearance of the inflammatory signal which triggers the cell death and effectiveness of therapy.

Key words: Adenosine deaminase, apoptosis, inflammation, intensive insulin treatment, nitric oxide, secondary sulfonylurea failure, type 2 Diabetes Mellitus

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve özellikle de tez çalışmalarım süresince maddi ve manevi yardım ve desteklerini üzerimde hissettiğim kıymetli hocam, nadide insan Doç. Dr. Ayşe Binnur Erbağcı'ya, Biyokimya ve Klinik Biyokimya uzmanlık eğitimine başlamamda büyük rolü olan ve eğitimimin devamında hoşgörü ve yardımlarıyla daima yanımda olan bölüm başkanımız Prof. Dr. Mehmet Tarakçıoğlu'na, bilgi ve deneyimleriyle bizleri zenginleştiren bölüm hocalarımız Doç. Dr. Necat Yılmaz ve Yard. Doç. Dr. İclal Geyikli'ye, klinik tecrübelerini bizlerle paylaşan Doç. Dr. Ersin Akarsu'ya, çocuklarımın her türlü bakımını üstlenerek sorumluluklarımı hafifleten dadımız Ayşe Ellek'e, katkılarından dolayı aileme ve eşime teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Rukiye Deveci

## KISALTMALAR

ADA: Adenozin Deaminaz

ADP: Adenozin difosfat

AGE: İleri glikozile son ürünler

AMP: Adenozin monofosfat

ATP: Adenozin trifosfat

BGT: Bozulmuş glukoz toleransı

cAMP: Siklik adenozin monofosfat

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

DAG: Diaçil gliserol

dATP: Deoksi adenozin trifosfat

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksi ribonükleik asit

dNTP: Deoksi nükleotit trifosfat

ERK: Hücre dışı sinyal düzenleyici molekül (Extracelular signal regulated molercul)

ESR: Eritrosit sedimentasyon hızı

FAD: Flavin adenin dinükleotit

FMN: Flavin adenin mononükleotit

GLUT: Glukoz taşıyıcısı

GK: Glukokinaz

HbA1c: Glikozile hemoglobin

HDLc: Yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol

- HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
- HSP90: Isı şok proteini 90
- IL: İnterlökin
- INF: İnterferon
- IR: İnsülin reseptörü
- IRS: İnsülin reseptör substratı
- IP3: İnozitol trifosfat
- LDLc: Düşük dansiteli lipoprotein kolesterol
- MA: Molekül ağırlığı
- MAP: Mitojen aktive edici protein (Mitogen activated protein)
- MODY: Gençlerin erişkin tip diyabeti (Maturity Onset Diabetes of the Young)
- mRNA: Mesajcı ribonükleik asit
- NADPH: Redükte nikotin adenin dinükleotit fosfat
- NIDDM: İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus (Non insulin dependent diabetes mellitus)
- NF-  $\kappa$ B: Nükleer faktör  $\kappa$ B
- NHANES: Ulusal Sağlık ve Beslenme Araştırmaları (The National Health and Nutrition Surveys)
- NO: Nitrik oksit
- NOS: Nitrik oksit sentaz
- NPH: Nötral protamin hagedorn
- PNP: Pürin nükleozit fosforilaz
- PI: Fosfatidil inozitol
- PKC: Protein kinaz C

ROS: Reaktif oksijen türevleri

SUR-1: Sülfonilüre reseptörü 1

TNF: Tümör nekroz faktörü

UKPDS: Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması (The United Kingdom Prospective Diabetes Study)

UV: Ultraviole

VKİ: Vücut kitle indeksi

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	1997-2010 yılları için Dünya genelinde tip 1 ve tip 2 diyabetik hasta sayısına (milyon) yönelik tahmini değerler.....	11
Tablo 2.	DM'nin sınıflandırılması ve diğer glukoz intoleransı durumları.....	11
Tablo 3.	Diabetogenezde önemli bazı potansiyel monogenik defektleri taşıyan fareler ve ilgili fenotipik değişimler.....	16
Tablo 4.	Ayıraç körü, substrat körü, örnek körü, örnek ve standart tüplerinin içerikleri.....	54
Tablo 5.	Çalışma grubunun demografik verileri .....	56
Tablo 6.	Çalışma grubunda tedavinin farklı aşamalarında saptanan NO düzeyleri.....	56
Tablo 7.	Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi NO düzeyi ile sistolik ve diastolik kan basıncı arasındaki korelasyonlar.....	60
Tablo 8.	Tip 2 DM'li hastalarda beyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR...	60
Tablo 9.	Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi NO düzeyinin beyaz küre sayısı ve ESR ile korelasyonu.....	61
Tablo 10.	Çalışma grubunda tedavinin farklı aşamalarında saptanan ADA aktivitesi.....	61
Tablo 11.	Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi ADA düzeylerinin periferik kanda beyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR ile korelasyonlar...	65



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	İnsan insülinin amino asit dizilimi ve disülfit bağlarının yeri....	4
Şekil 2.	$K_{ATP}$ kanallarının alt birimlerinin şematik görünümü.....	6
Şekil 3.	Glukozla uyarılan bifazik insülin salınımı.....	6
Şekil 4.	İnsülin sinyali insülin reseptörü yoluyla hedef hücrelerde pleiotropik etkileri.....	8
Şekil 5.	Hedef hücrelerdeki insülin direncinin beta hücre hasarıyla birlikte Tip 2 DM'ye neden oluşu .....	13
Şekil 6.	İdeal insülin replasman tedavi profili.....	21
Şekil 7.	NO oluşumu.....	23
Şekil 8.	eNOS'un şematize yapısı.....	23
Şekil 9.	nNOS aracılı ERK sinyal ileti yolunun düzenlenmesinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 10.	ADA eksikliğinde dATP artışı.....	38
Şekil 11.	Adenin nükleozit ve adenin nükleotit yapısı.....	39
Şekil 12.	Pürin nükleotitlerin ürik asite yıkılması.....	40
Şekil 13.	Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisinin çeşitli aşamalarında saptanan NO düzeyleri..	57
Şekil 14.	Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında tedavi öncesi, tedavinin üçüncü günü ve altıncı ayındaki NO düzeyleri.....	58
Şekil 15.	Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi, tedavinin 3. günü ve 6. ayında saptanan NO düzeyleri.....	59
Şekil 16.	Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisinin çeşitli aşamalarında saptanan ADA aktivitesi	62
Şekil 17.	Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında tedavi	

	öncesi, tedavinin üçüncü günü ve üçüncü ayındaki ADA aktivitesi.....	63
Şekil 18.	Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi, tedavinin 3. günü ve 6. ayında saptanan ADA aktivitesi.....	64

## İÇİNDEKİLER

ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
1- GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2- GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Plazma Glukoz Konsantrasyonunun Düzenlenmesi.....	3
2.1.1 Metabolizma.....	3
2.2 İnsülin.....	3
2.2.1 Tarihçe.....	3
2.2.2 Yapısı.....	4
2.2.3 Sentezi.....	4
2.2.4 Salınımın Düzenlenmesi.....	5
2.2.5 Salınım Mekanizması.....	5
2.2.6 İnsülin Salınım Profili.....	6
2.2.7 İnsülin Sinyalinin Hücre İçi Etki Mekanizmaları.....	7
2.2.8 İnsülin Etkileri.....	8
2.3 Diabetes Mellitus.....	10
2.3.1 Epidemiyoloji.....	10
2.3.2 DM'nin Etiyolojik Sınıflaması.....	11
2.3.2.1 Tip 1 Diabetes Mellitus.....	11
2.3.2.2 Tip 2 Diabetes Mellitus.....	12
2.3.3 Tip 2 DM'nin Patogenezi.....	12
2.3.4 DM'nin Genetik Özellikleri.....	14
2.3.5 Glukotoksisite.....	17
2.3.6 Lipotoksisite.....	17
2.3.7 DM'de Tedavinin Hedefi.....	17
2.3.8 DM'nin Kronik Komplikasyonları.....	18
2.3.9 DM Tedavisinde Oral Hipoglisemik Ajanlar ve İnsülin.....	19
2.4 Nitrik Oksit.....	22
2.4.1 NO'nun Hücresel Kaynağı ve Biyosentezi.....	22
2.4.2 Nitrik Oksit Sentaz.....	23
2.4.3 NO Etki Mekanizması.....	25

2.4.4 NO'nun Serbest Radikal Etkileri.....	25
2.4.5 NO'nun Apoptotik Etkileri.....	26
2.4.6 Yıkımı.....	28
2.4.7 NO'nun Etkileri.....	28
2.4.8 NO'nun DM Oluşumuna Etkileri.....	29
2.4.9 NO'nun Diyabetik Komplikasyonların Patogenezinde Rolü.....	31
2.4.10 DM'nin NO'ya Etkisi.....	33
2.4.11 NO Ölçüm Yöntemleri.....	34
2.5 Adenozin Deaminaz.....	36
2.5.1 ADA'nın Klinik Önemi.....	37
2.5.2 Adenozin Deaminaz Eksikliği.....	38
2.5.3 Adenozin.....	38
2.5.4 ADA ve DM.....	43
3-GEREÇ ve YÖNTEM.....	45
3.1 Çalışmanın Tanımlanması ve Etik Kurallara Uygunluğu.....	45
3.2 Tip 2 DM'li Hastaların Seçimi.....	45
3.3 Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	46
3.4 Örneklerin Çalışmaya Uygunluğu ve Hazırlanması.....	47
3.5 Kullanılan Gereç ve Cihazlar .....	47
3.6 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	48
3.7 Yöntemler.....	48
3.7.1 Nitrik Oksit Ölçümü.....	48
3.7.2 Adenozin Deaminaz Ölçümü.....	52
3.8 Diğer verilerin Eldesi.....	55
3.9 İstatistiksel Analizler.....	55
4-BULGULAR.....	56
5-TARTIŞMA.....	66
6-SONUÇLAR.....	75
7-KAYNAKLAR.....	76

## 1- GİRİŞ ve AMAÇ

Diabetes Mellitus (DM) sürekli izlem ve tedavi gerektiren, akut ve kronik komplikasyonları ile hastanın yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, morbidite, mortalite ve topluma ekonomik yükü yüksek, kronik metabolik bir hastalıktır (1). Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde Tip 2 DM'nin insidans ve prevalansı dramatik bir şekilde artmaktadır (2). Prevalanstaki bu artış, tüm etnik gruplarda, kültür düzeylerinde, her iki cinsiyette ve yaşta görülmektedir (1). Daha agresif ve daha erken bir tedavi ile diyabet başlangıcının geciktirilebileceği veya önlenilebileceği, hastalığın seyrinin ve muhtemelen kronik komplikasyonların yavaşlatılabileceği son dönemlerde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (2).

Tip 2 DM, Amerika Birleşik Devletleri'nde ölüm nedenleri arasında dördüncü, Avrupa'da yetişkin körlük nedenleri arasında birinci sırada yer almaktadır. Nontravmatik alt ekstremité amputasyonları ve son dönem böbrek yetersizliklerinin yarısının, koroner kalp hastalıklarının üçte birinin sorumlusunun DM olduğu ileri sürülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde tüm sağlık harcamalarının 1/7'si diabetik hastalar için yapılmaktadır (3). Tip 2 DM ülkemizde de sık görülmesi nedeniyle en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Yetişkinlerde DM %7.2, bozulmuş glukoz toleransı (BGT) %6.7 oranında görülmektedir (4).

Tip 2 DM tedavisinde en sık kullanılan oral hipoglisemik ajanlar olan sülfonilürelere her yıl %5-10 oranında sekonder yanıtızsızlık gelişmekte ve bu durum ilerleyici beta hücre hasarının ifadesi olarak kabul edilmektedir. İlerleyici beta hücre hasarı sürecinin yavaşlatılması amacıyla insülin ile kurtarma ve replasman rejimleri önerilmektedir. Glukoz toksisitesi beta hücre fonksiyonunun azalması, insülin direncinin gelişmesi ve beta hücre apoptozunda ciddi etkileri olduğu bilinen bir fenomendir. Geçici insülin tedavisiyle glukotoksisitenin giderilmesi insülin salınımını ve direncini düzeltebilmekte ve sülfonilürelere karşı yeniden duyarlılık kazandırabilmektedir (5).

Tip 2 DM'de ilerleyici beta hücre hasarının oluşması, bu sürecin yavaşlatılması veya kısmen de olsa beta hücre işlevlerinin geri kazanılması, komplikasyonların geciktirilmesi ve/veya hastaların yaşam kalitesine sağlayacağı yarar açısından önem taşır. Bu sürece etkili mekanizmaların araştırılması tedavi etkinliğini artırabilecek yeni yaklaşımlar için yol gösterici olabileceğinden ilgi uyandırmaktadır (5).

Yangı, oksidatif stres, apoptoz ile beta hücre hasarı ve beta hücrelerinin insülin sekresyon işlevinin bozulması sekonder sülfonilüre yanıtızlığında rol oynadığı ileri sürülen mekanizmalardır. Endotel ve nöronal nitrik oksit sentaz (NOS) kaynaklı nitrik oksitin (NO) insülin salınımını uyarıcı etkisi, indüklenbilir NOS kaynaklı yüksek konsantrasyonlardaki NO'nun proinflamatuvar etki ve sitokrom C oksidaz işlevini engelleyerek çeşitli hücre gruplarında apoptozu uyarabilmesi, reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumunu artırarak direkt hücre hasarına yol açabilmesi ilerleyici beta hücre hasarı ve yoğun insülin tedavisinin moleküler mekanizmalarının araştırılmasında NO'nun önemli bir yeri olabileceğini göstermektedir (6). Benzer şekilde adenzin deaminaz (ADA) beta hücrelerinde inflamatuvar ve apoptotik etkili, insülin salınımını baskılayıcı özellik gösteren bir molekül olan adenzinin hücre içi ve dışı konsantrasyonlarını düzenlemekte (7, 8) ve sekonder sülfonilüre yanıtızlığı patogeneğinde rol oynaması olası bir enzim olarak dikkati çekmektedir.

Bu çalışma ile sekonder sülfonilüre yanıtızlığı gelişen tip 2 DM'li hastalarda, yoğun insülin tedavisinin beta hücre fonksiyonları ve/veya yıkımı üzerine etkileri bilinen moleküller olan NO ve ADA üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2- GENEL BİLGİLER

### 2.1 PLAZMA GLUKOZ KONSANTRASYONUNUN DÜZENLENMESİ

İnsan vücudu için primer enerji kaynağı olan glukoz besinlerle alınan karbohidratların sindirimi, glikojenoliz veya de novo glukoz sentezi ile sağlanabilir (3).

#### 2.1.1 METABOLİZMA

Heksozların metabolizması vücut gereksinimlerine göre: 1. Karbondioksit ve suya indirgenerek enerji üretimi, 2. Karaciğerde glikojen ya da yağ dokusunda trigliserit olarak depolama, 3. Ketaosit veya aminoasit ve proteine dönüşme ile sonuçlanır.

Karbohidratların sağlanması ve harcanmasındaki büyük dalgalanmalara karşı kan glukoz konsantrasyonu, vücutta çeşitli metabolik yolları kontrol eden hormonlar tarafından dar sınırlar içerisinde tutulur. Kan glukoz konsantrasyonunda kısa süreli bir düşme karaciğerde glikojenolizi aktifleştirir. Kırk iki saatten uzun süren açlıkta glukoneogenez, tüm glukoz üretimini karşılar. Toklukta ise glukoz karaciğer ve kasta glikojene, yağ dokusunda depo yağlara dönüştürülür. Kan glukozunu azaltıcı etkili insülin ile karşıt etkili glukagon, epinefrin, kortizol ve büyüme hormonları metabolik akışı düzenleyerek plazma glukoz konsantrasyonunu kontrol eden temel hormonlardır. Glukozun plazmadan uzaklaştırılması başlıca pankreasın insülin salgılama yeteneğine, insülinin glukozun periferik dokulara alımını sağlamasına ve hepatik glukoz üretimini baskılamasına bağlı olarak gerçekleşir. İnsülin bu etkiyi oluşturan tek düzenleyici sinyal molekülü olarak önem taşımaktadır (3).

### 2.2 İNSÜLİN

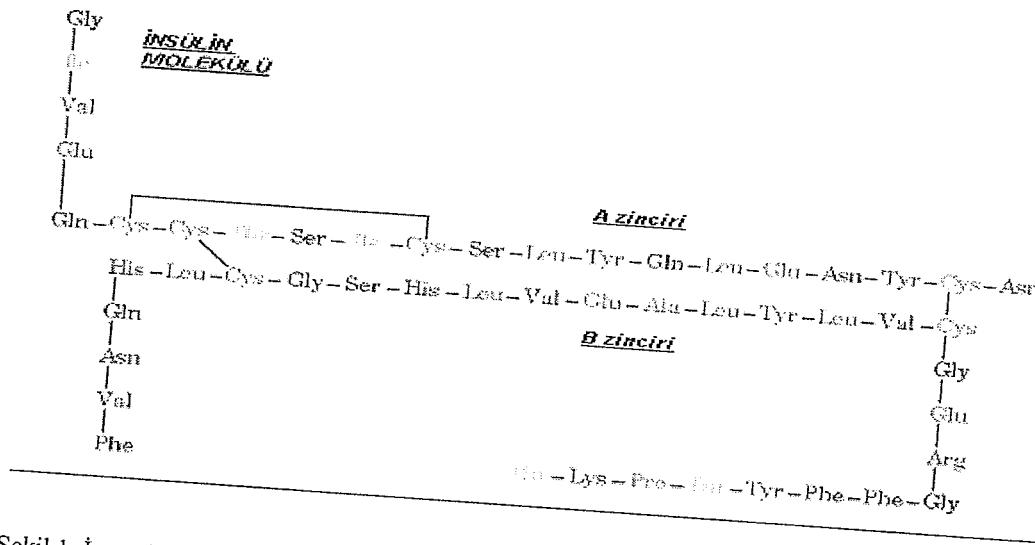
#### 2.2.1 TARİHÇE

İnsülin pankreas adacık beta hücrelerinden salgılanan, karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasına etkili polipeptit yapıda bir hormondur (9). İnsülin amino asit dizisi belirlenen ilk protein hormon, radyoimmünoassay yöntemiyle ölçülen ilk analit ve pratik kullanım için rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) teknolojisiyle üretilen ilk bileşiktir (3). İlk kez Banting ve Best 1922'de pankreas özütü hazırladılar ve anti-diyabetik

faktör olarak adlandırdılar. 1923 yılında Banting ve Macleod, “insülin izolasyonu” ile Nobel Tıp ödülünü kazandılar. 1923’te domuz pankreasından elde edilen insülin, hastalar üzerinde kullanılmaya başlandı. 1980’lerde gen mühendisliği tekniklerinin gelişmesi ile sınırsız miktarda ve antijenik olmayan rekombinant insan insülini üretmek mümkün oldu (10).

### 2.2.2 YAPISI

İnsan insülini 51 amino asitlik, molekül ağırlığı molekül ağırlığı (MA) 6000 olan heterodimerik küçük bir proteindir. İçerdiği 3 disülfid bağından ikisi A ve B polipeptit zincirleri arasında bulunur. Üçüncü disülfid bağı A zinciri içinde 6 ile 11. amino asitler arasında bulunur (11) (Şekil 1).



Şekil 1. İnsan insülinin amino asit dizilimi ve disülfid bağlarının yeri görülmektedir.

### 2.2.3 SENTEZİ

İnsülin, pankreatik beta hücrelerinin granüllü endoplazmik retikulumuna bağlı ribozomlarda, preproinsülin adı verilen yaklaşık 100 amino asitlik (MA 11.500) tek zincirli inaktif öncül bir molekül olarak sentezlenir (11). Amino ucunda bulunan sinyal dizisi preproinsülini endoplazmik retikulumuna yönlendirir. Sinyal dizisinin proteolitik olarak uzaklaştırılması ve üçüncü disülfid bağının oluşumuyla 86 amino asitlik (MA 9000) proinsülin meydana gelir (10). Proinsülin, golgi kompleksi sekretuar granülleri içinde hem depolanır hem de prokonvertaz 1 ve 2 endopeptidazları ile insülin ve C-peptide ayrılır.



İnsülin ve C-peptit, hücre membranından portal dolaşıma eş miktarlarda salınır. Az miktarda proinsülin ve peptit parçaları da dolaşıma katılır. Ancak proinsülin ayırıcı enzimler tarafından hızla insüline dönüştürüldüğü için dolaşımda saptanamaz. Bazal insülin sekresyon hızı yaklaşık 1 U/saat, total günlük sekresyon ise 40 U/gündür (3).

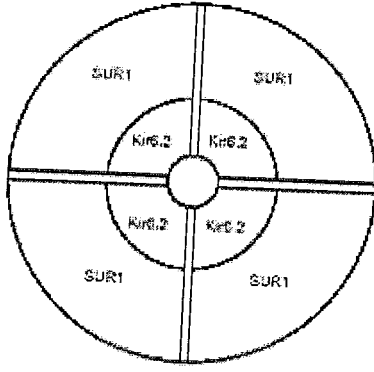
#### 2.2.4 SALINIMIN DÜZENLENMESİ

Plazma glukoz konsantrasyonundaki artış insülin sekresyonunun en önemli fizyolojik düzenleyicisidir (11). Sekresyon için eşik konsantrasyon 70-100 mg/dL'lik plazma glukoz düzeyidir (11, 12). 300-500 mg/dL glukoz konsantrasyonlarında ise en güçlü yanıt oluşur (11) ve insülinin ekzositotik salınması başlatılır. Glukagon da hem direkt etki ile hem de dolaylı olarak insülin sekresyonunu uyarır. Amino asitler, yağ asitleri ve keton cisimleri gibi diğer yakıtlar da insülin salgısını uyarabilir (3, 13). Sülfonilüreler ve  $\beta$ -adrenerjik agonistler, insülin salınımını uyaran farmakolojik ajanlardır. Hipoglisemi, somatostatin,  $\alpha$ -adrenerjik agonistler,  $\beta$ -adrenerjik blokerler, diazoksit, fenitoin, fenotiazidler ve nikotinik asit ise insülin salınımını baskılar (3).

#### 2.2.5 SALINIM MEKANİZMASI

Pankreas adacık beta hücrelerinde bulunan, metabolik sinyalleri elektriksel sinyallere dönüştüren, adenozin trifosfat (ATP) duyarlı K kanalları ( $K_{ATP}$  kanalları) kan glukoz konsantrasyonunun sensörleri gibi görev yapar ve insülin salgısının düzenlenmesini sağlar (14). Glukoz taşıyıcısı protein (GLUT) 2 aracılığı ile beta hücresi içine taşınan plazma glukozu glukokinaz ile glukoz-6 fosfata dönüştürerek glikolize girer. ATP/adenozin difosfat (ADP) oranındaki artış  $K_{ATP}$  kanallarının inhibisyonuna, beta hücrelerinin depolarizasyonuna ve bunun sonucu voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının aktivasyonuna neden olur. Hücreye  $Ca^{2+}$ 'nin girişi ile insülin sekresyonu meydana gelir (11, 14).  $K_{ATP}$  kanallarının yapısı Şekil 2'de görülmektedir.

$K_{ATP}$  kanalları, glukozun yanı sıra bazı farmakolojik ajanlar tarafından da düzenlenebilir. Tolbutamid, glibenklamid gibi sülfonilüreler, pankreatik hücrelerde  $K_{ATP}$  kanal aktivitesini baskılar ve Tip 2 DM tedavisinde kullanılır (14, 15).



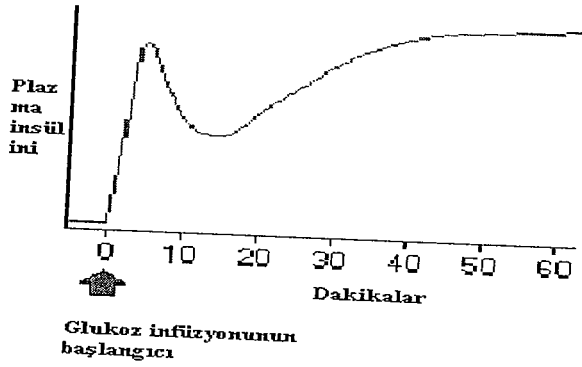
**Beta hücre K ATP kanalı bir heterooktamerdir.**

**4 adet K kanal alt ünitesi ve 4 adet de sülfonilüre alt ünitesinden oluşur.**

Şekil 2.  $K_{ATP}$  kanallarının alt birimlerinin şematik görünümü.  $K_{ATP}$  kanalı bir sülfonilüre reseptörüdür.

### 2.2.6 İNSÜLİN SALINIM PROFİLİ

Glukoz insülinin pankreastan iki fazda salınımına neden olur. İlk faz, intravenöz glukoz enjeksiyonundan 1-2 dakika sonra başlar ve 10 dakika sürer. Keskin bir pikle gösterilen bu faz, salgı granüllerinde depolanan insülinin hızlı salınımını temsil eder. Süregelen insülin sentezini yansıtan ikinci faz, ilk fazın bittiği noktada başlar, plazma normoglisemik olup yeniden insülin depolanana kadar, genellikle 60-120 dakika devam eder (Şekil 3) (3).



Şekil 3. Glukozla uyarılan bifazik insülin salınımını göstermektedir (14).

Glukoz tarafından uyarılan pankreas beta hücrelerinin insülin sekresyonunda 10 dakika süren 1. faz insülin salgısı, hepatic glukoz üretimini baskılar ve iki saat devam eden 2. faz insülin salgısını kolaylaştırır. Öğünler arasında devam eden düşük insülin düzeyi bazal

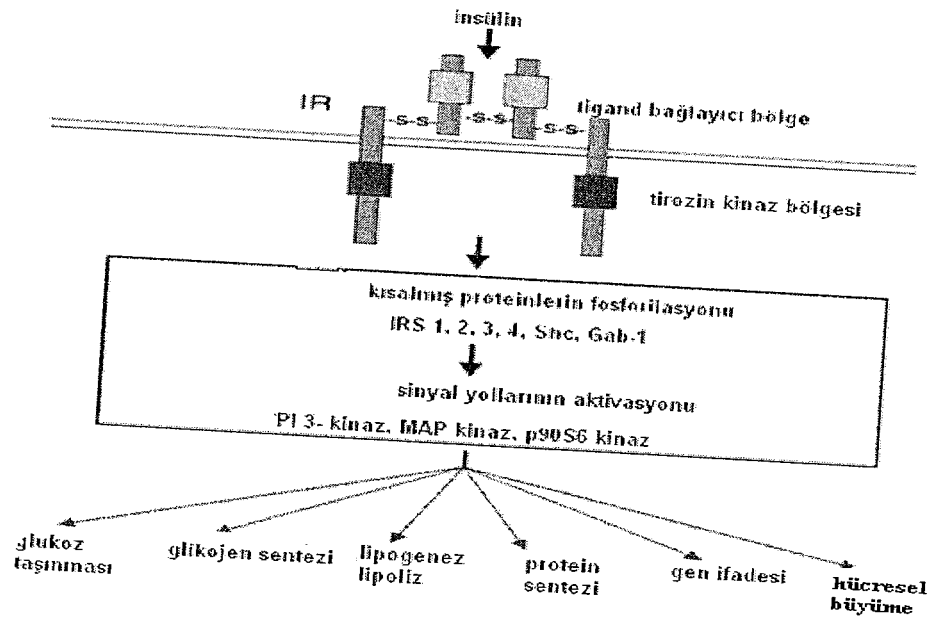
insülin olarak adlandırılır ve metabolik olayların devam etmesini sağlar. Normal beta hücresi kan glukoz düzeylerine lineer tarzda yanıt verir. Bu yanıtın eğimi açlıktan sonra daha keskindir ve uzun süre yüksek düzey glukozla maruz kalmakla düzleşir (5). İnsülin sekresyon profili ile ilgili çalışmalar, hormon salınımının pulsatil olduğunu göstermiştir. Yaklaşık her 10 dakikada bir tekrarlayan küçük salgı pikleri, 80-150 dakikalık daha geniş amplitüdümlü osilasyonlara süperempoze olmaktadır. Öğünler veya insülin salgısının diğer ana uyarıcıları bazalin 4-5 katı büyüklüğündeki pikleri uyarır. Sekresyonun bazal düzeye dönmesi genellikle 2-3 saat sürer. Bu normal salgı seyrindeki bozukluklar DM'de beta hücre disfonksiyonunun en erken belirtilerinden biridir (12). Beta hücre fonksiyonunun ilerleyici bozulmasıyla, glukozla ilk faz insülin yanıtı kaybolur fakat glukagon ve amino asitler gibi diğer uyarıcılara duyarlılık devam eder. Tip 2 DM'li hastaların çoğunda ikinci faz insülin yanıtı korunmasına rağmen ilk faz yanıt ve normal pulsatil insülin salınımı bozulmuştur. Tip 1 DM'li hastalarda ise insülin yanıtı çok azdır veya yoktur (3).

### 2.2.7 İNSÜLİN SİNYALİNİN HÜCRE İÇİ ETKİ MEKANİZMALARI

İnsülinin plazma membranındaki spesifik reseptörlere bağlanması sinyal iletimi ve hücre içi etkilerin başlangıç olayı olarak kabul edilir (3). İnsülin reseptörü (IR) tüm vücut dokularında yaygın olarak bulunsa da metabolik etkileri için ana hedef doku ve organlar kas, karaciğer ve yağ dokusudur (9).

IR, tirozin kinaz aktivitesine sahip membran reseptör ailesinin bir üyesidir (9) (Şekil 4).

Dört tip IRS tanımlanmıştır. IRS-1, insülinin hücre büyümesi üzerine olan etkilerinden, IRS-2 ise hormonun metabolik etkilerinden sorumludur (11). IRS'lerin fosforillenmesi, insülinin biyolojik etkilerini meydana getiren serin/treonin kinaz kaskadını aktive eder (3).



Şekil 4. İnsülin sinyali insülin reseptörü yoluyla hedef hücrelerde pleiotropik etkiler yapar.

### 2.2.8 İNSÜLİN ETKİLERİ

**Membran Transportuna Etkisi:** İnsülin bazı hücrelerde glukozun, konsantrasyon gradyentinden bağımsız olarak, kolaylaştırılmış difüzyonla taşınmasını artırır. Kas ve yağ hücrelerinde plazma membranından glukoz taşınmasının hızı, glukoz fosforilasyon hızını da belirler. Hücre içine glukoz taşınması, GLUT aracılığı ile gerçekleştirilir. Glukoz taşıyıcı ailesi, 11 değişik proteinden oluşur. İnsüline bağımlı glukoz taşınması, temel olarak GLUT4 izoformu aracılığıyla gerçekleştirir. İnsülin uyarısı ile yağ dokusu ve iskelet kasında hakim olan GLUT4'ün plazma membranına translokasyonu artar (16). Taşıyıcı translokasyonu sıcaklık ve enerjiye bağımlı, protein sentezinden bağımsızdır. İnsülinin hepatositlere glukoz girişi üzerine etkisi ise kolaylaştırılmış difüzyonla değil, glukokinazı indükleyerek indirekt yolla meydana gelir. İnsülin özellikle kas hücrelerine amino asit, K,  $Ca^{2+}$ , nükleozit ve inorganik fosfat girişini artırır (11).

**Karbohidratlara Etkileri:** İnsülinin karbohidrat metabolizmasına ana etkisi plazma glukozunun kontrol edilmesidir. İnsülin bu etkisini hücreye glukoz girişini, hücre içi glukoz kullanımını (glikoliz ve pentoz fosfat yolu), glukozun glikojen ve yağ olarak depolanmasını artırarak ve glukoneogenez ile glikojenolizi baskılayarak gerçekleştirir. İnsülin yokluğunda sadece beyin ve eritrositler, glukozu enerji kaynağı olarak kullanır. Bu metabolik

düzenlemenin hedef proteinleri karaciğerde glukokinaz, fosfofrüktokinaz ve pirüvat kinaz gibi glikoliz enzimleri ve glukoz 6 fosfatazıdır. İnsülinin glukoz taşınması, glikoliz ve glikojenez üzerindeki etkileri saniyeler ve dakikalar içinde fosforilasyon ve defosforilasyonla enzimlerin aktivasyon ve inaktivasyonu şeklinde olur. Uzun dönem etkileri ise karaciğerde glikoneogenezin anahtar enzimi olan fosfoenolpirüvat karboksikinaz miktarının azaltılması yoluyla glikoneogenezin inhibisyonudur (11).

**Protein Metabolizmasına Etkisi:** İnsülin, protein metabolizmasında genel olarak anabolik etkilere sahiptir; protein sentezini uyarıp, yıkımını yavaşlatır. Bu etkisini dokulara, özellikle kas hücrelerine nötral amino asitlerin alınmasını uyararak gösterir. İnsülinin iskelet kası, kalp kası ve karaciğerde protein sentezi üzerindeki etkileri başlıca translasyon düzeyinde olur (11).

**Lipit Metabolizmasına Etkisi:** Yağ dokusunun insüline duyarlılığı diğer dokulardan daha yüksektir ve insülinin ana hedef dokusunun yağ dokusu olduğu söylenebilir (17). İnsülin yağ dokusunda, asetil coA, redükte nikotinamid adenin nükleotit fosfat (NADPH) ve gliserol oluşturan metabolik yolların aktivasyonu ve yüksek asetil koA karboksilaz düzeylerini sağlayarak lipogenezi aktive eder. Hormona duyarlı lipaz inhibisyonu yolu lipolizi baskılayarak plazma serbest yağ asitlerinin azalmasına yol açar. İnsülin, düzeylerinin çok düşük olduğu sabah açlığında bile adipositlerde lipolizi baskılayabilir (13). İnsülin eksikliğinde bu inhibisyon kalkar; plazma serbest yağ asitleri ve keton cisimleri sentezi artar. İnsülin yokluğunda lipoprotein oluşum ve klirensi etkilenecek, plazma düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-c) ve çok düşük dansiteli lipoprotein kolesterol düzeyleri de artar (17).

**Hücre Replikasyonundaki Etkileri:** İnsülin, hücre kültürlerinde ve *in vivo* olarak hücre çoğalmasını uyarıcı etkisi nedeniyle büyümenin düzenlenmesinde gereklidir. Fibroblast büyüme faktörü, trombosit kaynaklı büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü, tümör ilerletici forbol esterleri, prostoglandin F2- $\alpha$ , vazopressin ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) analoglarının etkisini potansiyalize eder, siklusun G1 fazında duran hücrelerin siklus ilerleyişini uyarır (11).

**İnsülin ile İlişkili Gen Regülasyonu:** İnsülin, insülin salınması ve direnci, mitokondrial solunum hızı, enerji tüketimi, metabolik olarak aktif veya inaktif kas

hücrelerinin oluşumu, adipositlerin farklılaşması ve hücre büyümesine etkili genlerin düzenlenmesinde de rol oynar (16). İnsülinin transport, protein fosforilasyonu, enzim aktivasyonu veya inhibisyonu ve ribonükleik asit (RNA) sentezi gibi etkileri saniyeler veya dakikalar içinde meydana gelirken, protein, DNA sentezi ve hücre büyümesi gibi etkileri saatler içinde gerçekleşir (11).

## 2.3 DİABETES MELLİTUS

DM insülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve/veya insülin direnci sonucu ortaya çıkan, kendini hiperglisemi ile gösteren, karbohidrat, yağ ve protein metabolizması bozukluklarıyla karakterize, kronik, metabolik ve endokrin bir hastalıktır (18). Hedef dokularda insülin eksikliği veya etkisindeki anormallikler karbohidrat, lipit ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açar. Hiperglisemi semptomları arasında başlıca poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı bulunur. Bazı hastalarda, ketoasidoz ve nonketotik hiperozmolar koma gibi akut ve yaşamı tehdit eden hiperglisemik ataklar görülen DM, bazı olgularda ise semptomsuz, sinsice seyreder ve rastgele tanı alabilir (1).

### 2.3.1 EPİDEMİYOLOJİ

DM'nin prevalansı, ülkeler ve etnik gruplar arasında önemli farklılık gösterir. Papua Yeni Gine'deki kabilelerde, Eskimolar arasında ve Çin'de %1 olan prevalans, Avustralya yerlilerinde ve Arizona'daki Pima Kızılderililerinde %20-45'e kadar çıkar. DM prevalansındaki farklılığın, büyük olasılıkla genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (2). Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda 20-74 yaş grubunda 1988-1994 yılları arasında DM prevalansı %6.6, bilinmeyen DM olgularının ise yaklaşık %50 olduğu bildirilmiştir (19). Ülkemizde 1997-1998 yıllarında yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışmasına göre 20-80 yaş grubunda DM sıklığı %7.2, BGT ise %6.7 bulunmuş (4) bilinmeyen DM olgularının yaklaşık %30 olduğu tahmin edilmiştir (20). Tüm dünyadaki DM epidemisi ile ilgili tahmini değerler Tablo 1'de verilmiştir (2). DM çoğu ülkede ilk beş ölüm nedeninden biridir (2).

Tablo 1. 1997-2010 yılları için Dünya genelinde tip 1 ve tip 2 diyabetik hasta sayısına (milyon) yönelik tahmini değerler (2):

Diyabet tipi/yıl	1997	2000	2010
TİP 1	3.5	4.3	5.3
TİP 2	119.2	147.2	212.9
TİP 1+2	122.8	151.2	218.3

### 2.3.2 DM'İN ETİYOLOJİK SINIFLAMASI

Amerikan Diabet Birliği bozulmuş açlık glukozu adıyla yeni bir kategori ortaya atmış ve plazma açlık glukoz düzeyinin 6.1 ile 6.9 mmol/L olması ifadesi ile tanımlamıştır (2). DM'nin sınıflandırılması ve diğer glukoz intoleransı durumları Tablo 2'de özetlenmiştir (3).

Tablo 2. DM'nin sınıflandırılması ve diğer glukoz intoleransı durumları (3).

Diabetes Mellitus	Diğer glukoz intoleransı durumları
1. Tip 1 Diabetes Mellitus a)İdiopatik b) otoimmün	1. Bozulmuş glukoz toleransı
2. Tip 2 Diabetes Mellitus	2. Bozulmuş açlık glukozu
3. Gestasyonel Diabetes Mellitus	
4. DM'nin diğer spesifik tipleri	

#### 2.3.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 DM çocukluk döneminde en sık görülen DM sınıfıdır ve pankreas adacık beta hücrelerinin tam yıkımı ile seyreden otoimmün bir olay olarak tanımlanır (21). Beta hücrelerindeki yıkım genellikle otoimmün mekanizmalar yoluyla olur (3), tanı konulduğunda hastaların %65-90'ında adacık hücre antikorları tespit edilebilir (22). Bazı hastalarda otoimmüniteden bağımsız idiopatik beta hücresi yıkımı da görülebilir (3). Tüm DM olgularının yaklaşık %5-10'unu tip 1 diyabetik hastalar oluşturur. Tip 1 DM yaklaşık %75 oranında 30 yaşından önce başlamakla beraber herhangi bir yaşta da ortaya çıkabilir. Hastaların vücut ağırlığı genellikle normal sınırların altındadır. Hastalık genellikle ani başlangıç gösterir (3). Pankreasın beta hücrelerinin hızlı ilerleyen kütle ve fonksiyon kaybı

nedeniyle tip 1 diyabetik hastalarda insülin eksikliği vardır (23). Hiperglisemi ve ketoasidoz semptomları sık görülür. Bu hastalarda yaşamın devamı ve diyabetik komanın önlenmesi için mutlak insülin tedavisi gerekir (3).

### 2.3.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 DM, başlıca insülin direnci ve pankreas beta hücre disfonksiyonu ile karakterize kompleks, heterojen, poligenik bir hastalıktır (9). Bütün DM olgularının yaklaşık %90'ı tip 2 diyabetiklerden oluşur. Tip 2 diyabetiklerin tüm dünyadaki sayısı 2000 yılında yaklaşık 160 milyon olup, 2010 yılında 215 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (24). Tip 2 DM genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkar, son çalışmalarda çocuklarda da tip 2 DM olguları bildirilmektedir. Tip 2 DM'nin başlangıç yaşının giderek düşmesi obezite insidansının artması ile ilişkilendirilmektedir (21, 25).

Tip 2 DM İçin Risk Faktörleri: Primer korunma programlarının başarı ile uygulanabilmesi için risk faktörlerinin tanımlanması gereklidir. Tip 2 DM için değiştirilebilir risk faktörleri obezite, santral obezite, fiziksel aktivite yetersizliği, sigara ve alkol tüketimi, besin lif içeriğinin yetersiz olması ve doymuş yağların aşırı tüketilmesi olarak bildirilmiştir. Etnik köken, yaş, cinsiyet, genetik faktörler, tip 2 DM açısından pozitif aile öyküsü, gestasyonel DM, glukoz intoleransı, düşük doğum ağırlığı, hipertansiyon ve dislipidemi ise değiştirilemez olan risk faktörleridir (2). En yüksek DM gelişme riski BGT ve hiperinsülinemi durumlarında görülür. Her yıl BGT'si olan kişilerin %2-14'ünde tip 2 DM gelişir (2).

Tip 2 DM'den Korunma: Son zamanlarda yapılan klinik araştırmalar yaşam tarzını düzenleyen programların tip 2 DM'nin önlenmesinde etkili olduğunu göstermektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bir çalışmanın ilk sonuçlarına göre diyet ve düzenli egzersiz, BGT'si olan 3234 vakada tip 2 DM insidansını % 58 azaltmıştır (2).

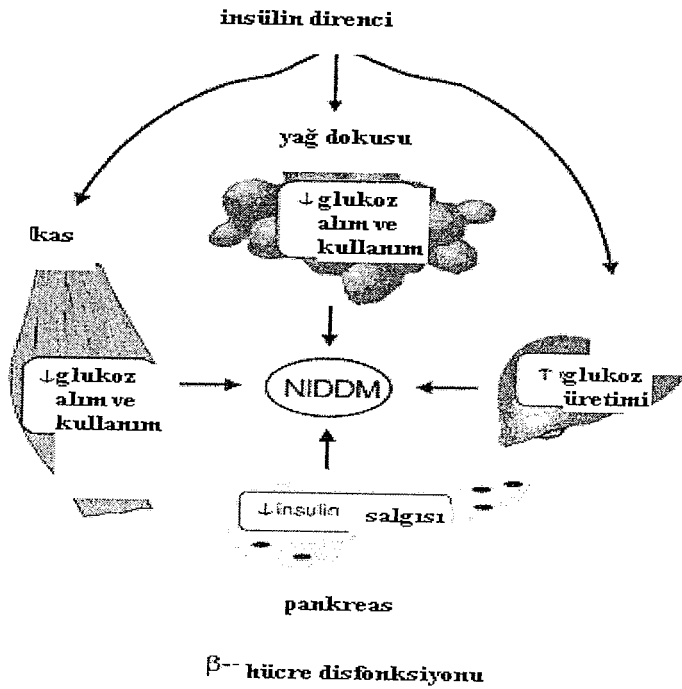
### 2.3.3 TİP 2 DM'İNİN PATOGENEZİ

Patofizyolojisi: Glukoz homeostazisi göz önüne alındığında, klinik olarak aşikar tip 2 DM, tipik olarak aşağıdaki sıra ile gelişen ve hastalık sürecinin farklı evrelerini temsil eden patofizyolojik fenomen ile karakterizedir: 1. İnsülin duyarlılığında azalma veya



insülin direnci, 2. Göreceli insülin yetersizliği ile birlikte pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu, 3. Karaciğerde glukoz üretiminde artış (16).

1. İnsülin direnci: Tip 2 DM'deki patolojik sürecin temelini insülin direncinin oluşturduğu düşünülür (3). İnsülin tarafından uyarılan glukoz alımında azalma veya insülin direnci, tip 2 DM gelişiminde en erken tespit edilebilen fonksiyon bozukluğudur (16). İnsülin direnci insülinin iskelet kası ve yağ dokusunda glukoz alımı ve kullanımını uyarma ve karaciğerde glukoz üretimini baskılama yeteneğini azaltır (Şekil 5) (9).



Şekil 5. Hedef hücrelerdeki insülin direnci beta hücre hasarıyla birlikte Tip 2 DM'ye neden olur (6).

Yapılan prospektif bir çalışmada her iki ebeveyni de tip 2 DM hastası olan çocuklarda insülin duyarlılığı ile birlikte insülin sekresyon şekli incelenmiştir. Çocuklar her 5 yılda bir kontrol edilmiş, insülin duyarlılığındaki azalma, tip 2 DM klinik olarak ortaya çıkmadan 20 yıl öncesinde tespit edilmiştir. Bunun aksine insülin sekresyonundaki değişiklikler belirgin hipergliseminin başlangıcından sadece 3-5 yıl öncesinde tespit edilebilmiştir (16). Şiddetli insülin direncinin mevcut olduğu hastalarda eğer insülin salgılanımı yeterli miktarda artırılabilirse glukoz seviyeleri normal seyredebilir (16). Normal glukoz toleransından tip 2 DM'ye geçiş, vücut ağırlığındaki artışla da ilişkilidir (3). İnsülin duyarlılığı sadece %5-10'luk vücut ağırlığı kaybında bile büyük oranda artar.

İnsülinin uyardığı glukoz alımı veya insülin duyarlılığı vücut kitle indeksinden (VKİ) çok, intramural hücresel lipit içeriği ile daha güçlü bir korelasyon gösterir. Pek çok insan ve hayvan çalışmasında intramyoselüler lipit kümelenmesinin insülin tarafından uyarılan glukoz alımı ile korelasyon gösterdiği vurgulanmıştır (16).

2. Göreceli insülin yetersizliği: Tip 2 DM'de 1. faz insülin salınımı yoktur ve 2. faz salınım gecikmiş ve uygunsuzdur. İnsülin sekresyonunda 1. fazın yokluğu veya pulsatil salgı düzenindeki değişiklikler, tip 2 DM gelişimine giden yolda beta hücre fonksiyon bozukluğunun ilk belirtileridir ve genellikle klinik belirtiler ortaya çıkmadan tespit edilebilir (9, 23). Normal kişilerde öğün zamanı meydana gelen keskin pikli insülin salınımı tip 2 diyabetik hastalarda gecikir, uzar ve miktarı yetersizdir. Tip 2 DM klinik olarak teşhis edildiğinde normal beta hücre kütlesi ve fonksiyonunun yalnızca %50'si kalır (5, 23). Birleşik Krallık Prospektif Diabet Çalışma grubu (The United Kingdom Prospective Diabetes Study-UKPDS), diyet, egzersiz, metformin, sülfonilüreler veya insülinle tedaviye rağmen zaman içinde beta hücre fonksiyonlarındaki bozulmanın devam ettiğini göstermiştir. Tiazolidindion'ların gestasyonel diyabeti olan kadınlarda beta hücre fonksiyonunu koruduğu görülmüştür, böylece potansiyel olarak diyabet gelişmesinin önlenmesi veya gecikmesi sağlanır (5). Beta hücre fonksiyonları Meglitinidler (faz 1) ve sülfonilürelerle (faz 2) uyarılabilen endojen insülin salgısı ile tahmin edilemez (5).

3. Karaciğerde glukoz üretiminde artış: Karaciğer açlık dönemlerinde iskelet kası ve yağ dokusundan gelen alanin, laktat, gliserol ve yağ asitleri gibi substratları kullanarak glukoneogenez ve glikojenoliz ile plazma glukoz düzeyini sürdürür. İnsülin glukozun hepatik glikojen olarak depolanmasını sağlar ve glukoneogenezi baskılar. Tip 2 DM'de insülin direnci, karaciğerde hiperinsülineminin glukoneogenezi baskılamada yetersiz kalmasına yol açar; bu durum açlık hiperglisemisi ve postprandiyal durumda karaciğerde glikojen depolanmasında azalma ile sonuçlanır (12).

#### 2.3.4 DM'İN GENETİK ÖZELLİKLERİ

Tip 2 DM klinik ve genetik olarak multifaktöriyel, heterojen bir hastalıktır. Yapılan genetik çalışmalar, DM'nin tek bir major gen değişikliğinden kaynaklanmadığını pek çok gen lokusunda meydana gelen değişikliklerin sonucunda ortaya çıktığını göstermiştir (16).

Ayrıca fiziksel aktivite ve diyet gibi yaşam şekli ile ilgili faktörler, DM'ye hassas fenotiplerin ortaya çıkışında çok önemli rol oynar (26).

Gençlerin Erişkin Tip Diabeti: Tip 2 DM'de genellikle çoklu gen bozukluğu olmakla beraber (26), gençlerde erken başlangıç gösteren ve Gençlerin Erişkin Tip Diabeti (Maturity Onset Diabetes of the Young-MODY) olarak adlandırılan tip 2 DM'nin nadir görülen bu formunda, tek gene bağlı otozomal dominant geçiş görülebilir. MODY'de hepatosit nükleer faktör-4 $\alpha$  (MODY 1), glukokinaz (MODY 2), hepatosit nükleer faktör-1 $\alpha$  (MODY 3), insülin promotor faktör-1 (MODY 4) ve hepatosit nükleer faktör-1 $\beta$  (MODY 5) gen mutasyonları saptanmıştır. MODY, klasik tip 2 diyabetikler gibi, genellikle diyet ve oral antidiyabetik ilaçlar ile tedavi edilirler ve uzun süreli insülin tedavisi gerektirmezler (27, 28).

Diabetojenik potansiyel taşıyan monogenik kusurlar Tablo 3'te görülmektedir.

Tablo 3. Diabetogenezde önemli bazı potansiyel monogenik defektleri taşıyan fareler ve ilgili fenotipik değişimler (9)

Global veya doku spesifik geni çıkarılmış fareler	Fenotipik değişimler	Kaynaklar
IR <sup>-/-</sup>	Diabetik ketoasidoz, erken postnatal ölüm	Joshi ve ark. (1996), Accili ve ark. (1996)
Kas IR <sup>-/-</sup>	Normal vücut glukoz dengesi, dislipidemi, artmış adipozite	Brüning ve ark. (1998), Kim ve ark. (2000)
Karaciğer IR <sup>-/-</sup>	Aşırı insülin direnci, açlık hiperglisemisi, $\beta$ -hücre hiperplazisi	Michael ve ark. (2000)
$\beta$ hücre IR <sup>-/-</sup>	Glukozla uyarılan ilk faz insülin salgısının yokluğu, yaşlanmayla birlikte glukoz intoleransı	Kulkarni ve ark. (1999)
IRS-1 <sup>-/-</sup>	Büyümenin gecikmesi, ılımlı insülin direnci, $\beta$ -hücre hiperplazisi, hiperinsülinemi	Araki ve ark. (1994), Tamemoto ve ark. (1994)
IRS-2 <sup>-/-</sup>	Şiddetli insülin direnci, azalmış beta hücre kütlesi, erken diabet	Withers ve ark. (1998), Kubota ve ark. (2000)
GLUT4 <sup>-/-</sup>	Orta derece insülin direnci, glukoz intoleransı, azalmış yağ kütlesi	Katz ve ark. (1995)
GLUT4 <sup>+/-</sup>	İnsülin direnci, diabet, hipertansiyon	Stenbit ve ark. (1997)
Kas GLUT4'ü eksik	İnsülin direnci, glukoz intoleransı	Zisman ve ark. (2000)
Yağ dokusu GLUT4'ü eksik	Kas ve karaciğerde insülin direnci, glukoz intoleransı, hiperinsülinemi	Abel ve ark. (2001)
GLUT2 <sup>-/-</sup>	Glukoz intoleransı, bozulmuş insülin salgısı, erken ölüm, diabet	Guillam ve ark. (1997)
GK <sup>-/-</sup> veya $\beta$ hücre GK <sup>-/-</sup>	Diabetik ketoasidoz, erken postnatal ölüm	Grupe ve ark. (1995), Terauchi ve ark. (1995)
GK <sup>+/-</sup> veya $\beta$ -hücre GK <sup>+/-</sup>	Bozulmuş insülin salgısı, ılımlı diabet	Grupe ve ark. (1995), Terauchi ve ark. (1995)
Karaciğer GK <sup>-/-</sup>	İlmlı hiperglisemi	Postic ve ark. (1999)

GK: Glukokinaz

### 2.3.5 GLUKOTOKSİSİTE

Kronik hiperglisemi, glukozla uyarılan insülin salgısını ve insülin gen ifadesini bozar. Kronik hipergliseminin beta hücre fonksiyonu üzerine etkileri üç ayrı fenomenle tanımlanır: Glukoz duyarsızlığı, beta hücre yorgunluğu ve glukotoksisite. Glukoz duyarsızlığı, kısa süre yüksek glukoz konsantrasyonuna maruz kalma sonucu meydana gelen, beta hücre ekzositotik mekanizmasının hızlı ve geri dönüşümlü fizyolojik adaptif yanıtsızlığıdır. Glukoz duyarsızlığı bu özelliği ile beta hücre yorgunluğundan ayrılır. Beta hücre yorgunluğu bir insülin salgılatıcı ajanın uzun süre kullanılmasının ardından hızlı salınabilen hücre içi insülin havuzunun tükenmesi olarak bilinir. Glukotoksisite ise yüksek konsantrasyonda glukozu uzun süre maruz kalma sonucu pankreas beta hücrelerinde meydana gelen, yavaş, ilerleyici ve geri dönüşümsüz etkilerdir. Beta hücre kusurlarıyla ilişkili bu etkilerin süresinin uzunluğu ile ilişkili olarak geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olması beta hücre yorgunluğu ile glukotoksisite arasında bir süregenlik olduğunu düşündürmektedir. Fonksiyonel değişikliklerin yanı sıra kronik hiperglisemi, apoptozu uyararak beta hücre kütlelerini azaltabilir (29).

### 2.3.6 LİPOTOKSİSİTE

Kronik hipergliseminin zarar verici etkilerine benzer şekilde, normal koşullarda beta hücrelerinin temel yakıtı olan yağ asitleri de uzun süren yüksek düzeyleri ile beta hücrelerine toksik etkilidir. Pankreas beta hücrelerinin yağ asitlerinin yüksek düzeylerine uzun süre maruz kalması bazal insülin salınımını artırır fakat glukozla uyarılan insülin salgısını baskılar. Ayrıca hiperglisemi varlığında yağ asitleri transkripsiyon faktör pankreatik-duodenum homeobox-1'in negatif düzenlemesi yoluyla insülin gen ifadesini baskılayabilir. Hem *in vitro* olarak hem de Zucker diabetik yağlı sıçanlarda yağ asitlerinin yüksek düzeylerinin, beta hücrelerinin apoptozunu uyardığı görülmüştür (29).

### 2.3.7 DM'DE TEDAVİNİN HEDEFİ

DM, major morbidite ve mortalite ile seyreden kronik bir hastalıktır. DM'de tedavinin hedefi, akut semptom ve komplikasyonları hafifletmek ve daha sonra uzun dönemde ortaya çıkabilecek sonuçları önlemektir. Çoğu kez ilk hedef kolayca gerçekleştirilebilirken, uzun dönem komplikasyonların önlenmesi daha büyük çaba

gerektirebilir (30). Postprandiyal hiperglisemi artmış mikro ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir. Kardiyovasküler hastalık riski ve tüm mortalite nedenleri artmış postprandiyal kan glukozunun yükselmesiyle artar (31).

### 2.3.8 DM'İNİN KRONİK KOMPLİKASYONLARI

Mikrovasküler Komplikasyonlar: Mikrovasküler hastalığın patogeneğinde pek çok farklı mekanizmanın etkisi vardır. Kronik hastalığın süresi, metabolik bozukluklar ve genetik faktörler, patolojik süreçte rol oynar. Klinik olarak belirgin diyabeti olmaksızın, tüm mikrovasküler komplikasyonların geliştiği vakalar bildirilmiştir (30).

Mikrovasküler hastalığın patogeneğinde yer alan mekanizmalar şunlardır:

1. İleri Glikozile Son Ürünlerin Oluşumu: Artan hücre içi glukozun hücrenel proteinlerin nonenzimatik glikozilasyon yoluyla ileri glikozilasyon son ürünlerin (AGE) oluşumuna yol açtığı bilinmektedir. Nonenzimatik glikozilasyon glukozun proteinlerin amino grubu ile etkileşmesi sonucu gelişir. AGE'nin kollajen, hücre dışı matriks proteinleri gibi proteinlere çapraz bağlandığı, ateroskleroza hızlandırdığı, glomerüler disfonksiyona katkıda bulunduğu, NO sentezini azalttığı, endotel disfonksiyonunu indüklediği, ekstraselüler matriks bileşimi ve yapısını değiştirdiği gösterilmiştir (10). AGE makrofaj AGE reseptörüne bağlanarak sonucu vasküler endotel hücrelerinde sinyal iletiliminde değişikliklere yol açar (30).
2. Aldoz Redüktaz Aktivitesinde Artış: Aldoz redüktaz enzimi, retina, böbrek ve nöronların hepsinde bulunur. Hiperglisemi, bu enzimin etkinliğinde artışa neden olur ve daha çok glukoz sorbitole dönüşür (30). Yüksek sorbitol konsantrasyonları hücrenel fizyolojiyi farklı yönlerde etkiler ve hücrenel disfonksiyona neden olabilir (12).
3. Sinyal Transdüksiyon Yollarında Değişiklikler: Hipergliseminin hücre içi sinyal iletiliminde etkili çeşitli moleküller aracılığı ile veya direkt olarak diaçil gliserol-protein kinaz C yolu etkinliğini artırdığı gösterilmiştir. Protein kinaz C'nin glukoz tarafından aktivasyonu *in vitro* olarak endotelial hücrelerde ve nöronlarda fibronektin, tip 4 kollajen, kontraktıl proteinler ve ekstraselüler matriks proteinleri genlerinin transkripsiyonunu değiştirir (12). Bu durum hücrede bazal membranda kalınlaşma, permeabilite artışı, pıhtılaşma,

kasılabilme yeteneğinde bozukluklar, angiogenezde artış ve kardiyomyopati gibi bir çok anormalliğe neden olur (30).

**Makrovasküler Hastalık:** Kardiyovasküler hastalık diyabetik hastalarda en önde gelen mortalite nedenidir. Ölümün büyük çoğunluğu koroner kalp hastalığına bağlıdır. Risk diyabetik olmayan kişilere göre, kadınlarda daha belirgin olmak üzere 2-4 kat daha fazladır. İlk kardiak olaydan sonra diyabetik hastaların %50'si 1 yıl içinde ölmekte ve bunların yarısı hastaneye dahi ulaşmamaktadır (30).

### 2.3.9 DM TEDAVİSİNDE ORAL HIPOGLİSEMİK AJANLAR VE İNSÜLİN

**Oral Hipoglisemik Ajanlar:** Tip 2 DM insülin eksikliği, insülin direnci ve artmış hepatik glukoz çıkışıyla karakterizedir. Tip 2 DM'yi tedavi etmek için kullanılan ilaçlar, bu metabolik anormalliklerin bir veya daha fazlasını düzeltmek için düzenlenmiştir. Günümüzde kendine özgü farmakolojik özellikler gösteren beş farklı hipoglisemik ajan sınıfı bulunmaktadır. Bunlar: Sülfonilüreler, meglitinidler, biguanidler, tiazolidindionlar ve alfa glukozidaz inhibitörleridir. Diyet ve egzersizle uygun glisemik kontrol sağlanamayan hastalarda tek oral ajanla tedavi denenir. Bir ajan seçilirken hem hastanın hem de ilacın spesifik özellikleri düşünülür. Bir oral ajan kullanarak uygun kan glukoz kontrolü sağlanamıyorsa, daha iyi glisemik kontrol elde etmek için farklı mekanizmalarla etki eden ajanlar tedaviye eklenebilir (32). Sülfonilüreler tip 2 DM tedavisinde kullanılan en popüler ve ucuz oral antidiyabetiklerdir. Başlangıçta sülfonilürelerle glisemik kontrolü sağlanmış tip 2 diyabetik hastaların, sekonder sülfonilüre yetersizliği sonucu glukoz kontrolü bozulabilir. Bu durum kan glukozunun dikkatle takibini gerektirir (21).

**Sülfonilüreler:** 1950'lerden bu yana sülfonilüreler oral antidiyabetik tedavinin önemli bir sınıfını oluşturmuş ve yan etkileri azaltılmış yeni kuşak sülfonilürelerin geliştirilmesiyle yeniden popülerite kazanmıştır. Sülfonilüreler pankreas beta hücrelerinden insülin salımını uyararak etkili olur ve periferik hedef dokularda (kas, yağ) hafif insülin direnci geliştirebilir. Ortalama glikozile hemoglobin (HbA1c) düzeylerini % 0.8 ile 2.0 ve açlık plazma glukoz konsantrasyonunu 60-70 mg/dL (3.3-3.9mmol/L) düşürür. Bu düşüş, tedavi öncesi plazma açlık glukozu yüksek olan hastalarda daha fazladır (32).

Sülfonilüre tedavisinin başlangıcında etkili en düşük doz kullanılır ve istenilen etkiye bir veya iki hafta aralıklarla doz artırılarak ulaşılır. Ne yazık ki sülfonilürelerle tedavi edilen bütün hastalarda uygun yanıt alınmaz. Primer yanıtızsızlık sülfonilüre tedavisine başlangıçta zayıf yanıt alınmasıdır (açlık plazma glukoz düzeyinin 20 mg/dL veya 1.1 mmol/L'den daha az azalması). Tip 2 diyabetik hastaların yaklaşık %20-25'inde sülfonilüre tedavisine primer yanıtızsızlık görülür. Sekonder yanıtızsızlık tedavinin başlangıcında iyi yanıt alınması (açlık plazma glukozunun 30 mg/dL veya 1.7 mmol/L'den daha büyük azalması) fakat daha sonra tedaviyle yeterli glisemik kontrolün sağlanamamasıdır. Bu fenomen her yıl hastaların yaklaşık %5-10'unda ortaya çıkar. Bu sakıncalara rağmen sülfonilürelerin maliyet ve etki açısından en potent glukoz düşürücü ajanlar olduğu gösterilmiştir (32, 33).

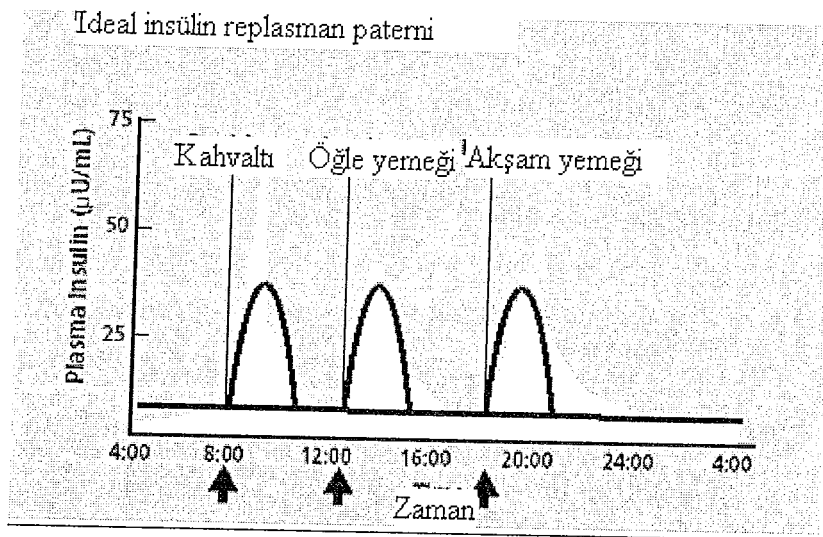
Etki Mekanizması: Sülfonilüreler, sülfonilüre reseptör-1 (SUR1) alt birimlerine bağlanmak yoluyla  $K_{ATP}$  kanalı kompleksinin kapanmasına yol açar. Geride biraz beta hücre fonksiyonu kalmışsa sülfonilürelerle birlikte insülin verilmesi günlük total insülin ihtiyacının azalmasını sağlar ve HbA1c seviyelerini daha aşağı çekebilir. Glukoz seviyeleri insülinle normalleştirilirse sülfonilüreler daha iyi absorbe edilebilir (5).

Sülfonilüre Tedavisinin Dezavantajları: Sülfonilüre tedavisinin çeşitli dezavantajları vardır: glukozdan bağımsız etkileri uzun süreli olduğu için aşırı ve uzamış hipoglisemi görülmesi, sülfonilüre grubu ilaçlara sonradan yanıtızsızlık gelişmesi (sekonder yanıtızsızlık) ve uzun süreli tedaviden sonra pankreas beta hücre hasarı bunlar arasındadır (34). Hipoglisemi sülfonilürelerin en tehlikeli yan etkisidir. Bütün sülfonilüreler kilo alımına neden olabilir, bu nedenle obez hastalar için en iyi ilk seçim değildir (32). Sekonder sülfonilüre yetersizliği görülen hastaların, oral tedavileri kesilerek insülin monoterapisine geçilir (21).

İnsülin Tedaviyle Beta Hücre Fonksiyonlarının Artırılması, Replasmanı veya Kurtarılması: Tip 2 DM'li hastalarda akut hastalık, cerrahi girişim, gebelik, glukoz toksisitesi, oral antidiyabetiklerin kontrendike veya yetersiz olması, ekzojen insülin tedavisinin başlıca endikasyonlarını oluşturmaktadır. Eğer beta hücre fonksiyonu varsa bazal insülinle 'artırma tedavisi' uygulanabilir. Bazal+bolus insülinle 'replasman tedavisine' ise beta hücrelerinin yorgunluğu durumunda gerek duyulur. Replasman tedavisi



normal salgı paternine uygunluk gösterecek şekilde düzenlenir. Replasman rejimlerinin birkaç hafta süre ile uygulanması ile yapılan 'kurtarma tedavisi' glukoz toksisitesini geri çevirebilir (5). Fizyolojik insülin profilinin yeniden oluşturulması için kullanılan kurtarma tedavisi ile erken ve yoğun glisemik kontrolün sağlanması, açlık glukoz düzeylerinde olduğu kadar postprandiyal glukoz kontrolünde de etkilidir ve beta hücre fonksiyonunun korunması, hastalık seyrinin yavaşlatılması ve DM'nin kronik komplikasyonlarının azaltılması için önerilir (23). İnsülin replasman tedavisi açlık, preprandiyal ve postprandiyal glukoz düzeylerine göre sistematik olarak yapılır. İdeal insülin replasman tedavisi Şekil 6'da görülmektedir. Bazal insülin tedavisinde uzun etkili insülinler (nötral protamin Hagedorn [NPH], ultralent, glargin gibi) kullanılır, günde bir veya iki kez enjekte edilerek altı gün devam edilir. Öğün zamanı bolus insülin tedavisi, kısa veya hızlı etkili insülinler kullanılarak (regüler, aspart, lispro gibi) yapılır, bu tedavi öğünle alınan besinlere karşılık gelir ve mevcut glukoz düzeyini düzeltir (5).



Şekil 6. İdeal insülin replasman tedavi profilini göstermektedir (5).

İnsülin tedavisini, oral antidiyabetiklerle tedaviye kıyasla glisemik kontrol ve komplikasyonların gelişimini engellemede daha başarılı bulan çalışmalar vardır. Tanıdan sonraki üç yıl içinde metformin veya sülfonilüre ile tedavi edilen hastaların yalnızca %33'ü %7'den daha az HbA1c düzeylerine sahiptir. UKPDS, HbA1c düzeyi %7 veya daha düşük olan hastalarda, başlıca retinal fotokoagülasyon olmak üzere mikrovasküler hastalık riskinde azalma bulmuş fakat kardiyovasküler hastalık riskinde benzer azalma saptanmamıştır. Glisemi, lipit ve kan basıncı kontrolünün bir kombinasyonu olan Steno-2

çalışmasında alışılmış tedaviyle kıyaslandığında insülin tedavisinde mortalitenin %50 azaldığı görülmüştür. Cerrahi yoğun bakım ünitelerinde tedavi edilen DM'li kritik hastalarda yoğun insülin tedavisi alışılmış tedaviyle kıyaslanışında morbidite ve mortalitenin azaldığı saptanmıştır. Miyokard infarktüsü geçiren hastalarda yoğun insülin tedavisi alışılmış tedaviyle kıyaslandığında ölüm riskinin %30 daha düşük olduğu görülmüştür (5).

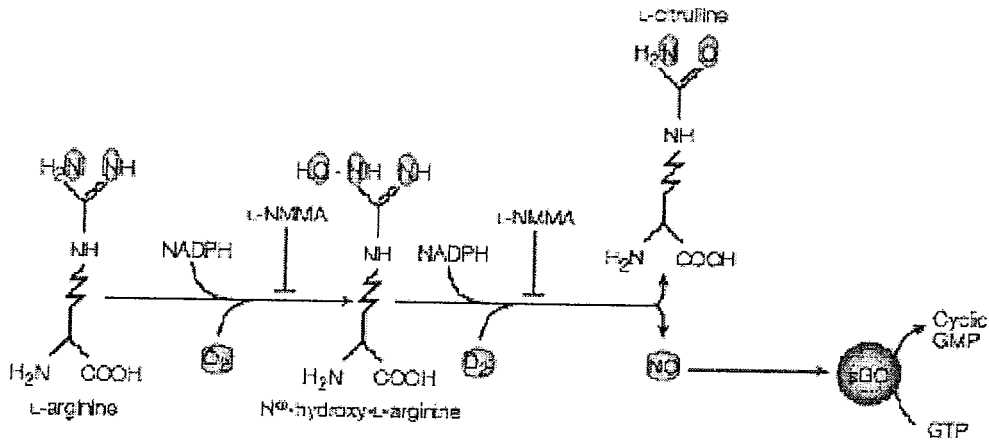
## 2.4 NİTRİK OKSİT

NO doku dağılımı yaygın, fizyolojik etkileri ileri derecede çeşitlilik gösteren küçük bir biyomoleküldür (35). Biyolojik etkileri ilk kez 1987'de tanımlanan, endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak adlandırılan biyolojik mesajcı molekülün (36) günümüzde NO gazı olduğu bilinmektedir (35). NO kısa yarı ömürlü (1-5 s) ve bir adet eşleşmemiş elektronu olan, göreceli olarak kararlı bir serbest radikaldir. Oksijen, süperoksit radikalleri ve geçiş metalleri ile (hemoproteinlerin demir atomu gibi) reaksiyona girebilir. Bu basit gaz zarlardan rahatlıkla difüze olabilen lipofilik bir bileşiktir ancak yüksek reaktivitesi, difüzyonunu sentez bölgesinden 1 mm çap uzaklığa kadar sınırlar (36).

### 2.4.1 NO'NUN HÜCRESEL KAYNAĞI VE BİYOSENTEZİ

NO epitelyal hücreler, nöronlar, makrofaj, nötrofil ve mast hücreleri gibi inflamatuvar hücreler, vasküler endotelyal hücreler, düz kas hücreleri, pankreas adacık hücreleri ve hepatositler gibi çeşitli hücre ve doku tiplerinde üretilir (36, 37, 10).

NO, L-argininden NOS enziminin katalizlediği iki basamaklı bir reaksiyonla oluşur (Şekil 7). Bir mol NO sentezi için ayrıca iki mol oksijen ve 1.5 mol NADPH kullanılır (38). NO L-arginin dışında gliseril trinitrat gibi vazodilatörlerin metabolizması sırasında ortaya çıkan nitritten de oluşturulabilir. NOS'un kimyasal inhibitörleri NO oluşumunu azaltmak için kullanılır. NO hemoglobin ve diğer hem proteinleriyle, sıkı bağlandığı için bu bileşenler ile baskılanır (35). Yüksek hemoglobin düzeylerinin NO için katabolik bir tuzak olduğu ileri sürülmüştür (39).

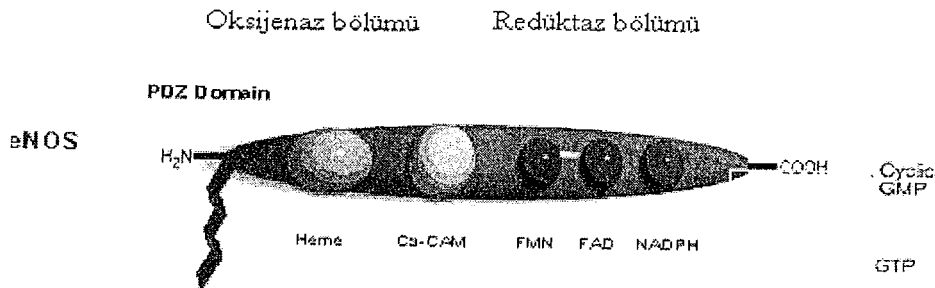


Şekil 7. NO oluşumu görülmektedir.

## 2.4.2 NİTRİK OKSİT SENTAZ

Sitozolik bir enzim olan, NOS'un üç ayrı izoenzimi protein saflaştırılması ve moleküler klonlama teknikleri ile tanımlanmıştır (35): 1. Yapısal nöral NOS (NOS-1 veya nNOS), 2. Uyarılabilir NOS (NOS-2 veya iNOS) ve 3. Yapısal endotelial NOS (NOS-3 veya eNOS) (36).

NOS'un yapısı: nNOS 161, iNOS 131, ve eNOS 133 kDa'dur. Gen lokusları farklı insan kromozomlarında bulunur (sırasıyla 12, 17 ve 7. kromozomlar) (36). NOS beş redoks kofaktörüyle çalışan çok kompleks bir enzimdir; NADPH, flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin adenin mononükleotit (FMN), hem ve tetrahidrobiopterin (35). NOS yapısal olarak redüktaz ve oksijenaz fonksiyonu gösteren iki ana bölüme ayrılan heterodimerik (40) bir enzimdir (Şekil 8).



Şekil 8. eNOS'un şematize yapısını göstermektedir.

NOS ifadesine etkili faktörler: iNOS ifadesi makrofajlar, nötrofiller, hepatositler, epitelyal, mezengial, endotelyal ve damar düz kas hücreleri gibi (41) çekirdekli tüm hücrelerde bulunur (42). iNOS indüksiyon mekanizmaları arasında de novo transkripsiyon ve yeni protein sentezi bulunur (41). TNF- $\alpha$ , interferon (INF)- $\gamma$  ve interlökin (IL)-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından indüklenebilir (36). iNOS indüksiyonu glukokortikoidler, trombin, transforme edici büyüme faktörü beta, IL-4, IL-8, IL-10, IL-13 gibi moleküller tarafından baskılanabilir. Tüm NOS izoenzimleri NADPH ve kalmodüline bağımlıdır. iNOS kalmodüline sıkıca bağlı bulunduğu için yeterli substrat ve uyarıcı varlığında yüksek konsantrasyonlarda (nM konsantrasyonlarda) NO üretir (41). Örneğin proinflamatuvar sitokinlere birkaç saat maruz kalma, saatler veya günlerce yüksek konsantrasyonlarda NO'nun salınımına neden olur (36). İnflamatuvar koşullar iNOS tarafından üretilen, göreceli olarak büyük miktarlardaki NO üretimi takip eden sitotoksik etkilerle ilişkilidir. NO nM konsantrasyonlarda fungal, bakteriyel, helmintik ve protozoal organizmalar ve tümör hücrelerine sitotoksik ve sitostatik etkili olabilir. Böbrek, ince bağırsak ve bronşial epitelde iNOS'un yapısal ifadesi de gösterilmiştir. iNOS indüksiyonu toksik veya koruyucu etkilere yol açabilir. iNOS ifadesinin sonuçlarını belirleyen faktörler arasında uyarıcı, doku tipi, iNOS ifadesinin uyarılma süresi ve dokunun redoks durumu yer alır. Son yıllarda bulgular iNOS'un toksisitesi üzerinde yoğunlaşmıştır. Makrofajlar ve damar düz kas hücrelerinde iNOS indüksiyonunun hücre salımını baskılayarak hücre disfonksiyonu ve ölümüne yol açabildiği gösterilmiştir (41).

Endotelyal ve nöronal izoenzimler yapısal enzimler olduğu için birlikte yapısal NOS (cNOS) grubunu oluşturur. cNOS trombositlerde, nöronal, epitelyal ve endotelyal hücrelerde bulunarak (36) sınırlı doku dağılımı gösterir (42). cNOS'un en önemli uyarıcıları arasında asetilkolin ve bradikinin gibi vazodilatör etkili moleküller bulunmaktadır (36).

Üç NOS izoenziminin subselüler lokalizasyonu farklılık göstermektedir. nNOS ve iNOS çözünür sitozolik proteinler olarak tanımlanmış, eNOS ise plazmalemmal kaveolada (transmembran bir protein olan kaveolinle karakterize plazma membranı invajinasyonları) gösterilmiştir (36).

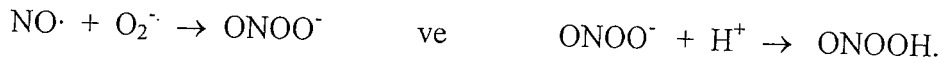
### 2.4.3 NO ETKİ MEKANİZMASI

Endotelyal ve nöronal kaynaklı NO etkilerini ikincil haberci olan siklik guanozin mono fosfat (cGMP) aracılığıyla yapar (35). NO sentez noktasından hızlıca yayılır, hücre membranlarını geçebilir, hem oluştuğu hücrelerde hem de hedef hücrelerde hücre içi moleküler bölgelerle etkileşir. NO'nun hedefi, çözünür guanilat siklazın hem bileşenidir. Çözünür guanilat siklaz GTP'nin cGMP'ye dönüşümünü katalize eder (36, 10), cGMP-bağımlı protein kinazları aktif hale dönüştürür (35). cGMP hücre dışına  $Ca^{2+}$  çıkışını ve endoplazmik retikulum ve mitokondria gibi organellerde  $Ca^{2+}$  depolanmasını uyararak sitozolik  $Ca^{2+}$  konsantrasyonlarının düşmesine yol açar. Hücre içi  $Ca^{2+}$  konsantrasyonunun düşmesi NO aracılı vasküler ve nonvasküler düz kas gevşemesinden, trombosit adezyon ve agregasyonunun inhibisyonundan, nötrofil kemotaksisinin baskılanmasından, santral ve periferik sinir sisteminde sinyal iletiminden sorumludur (41).

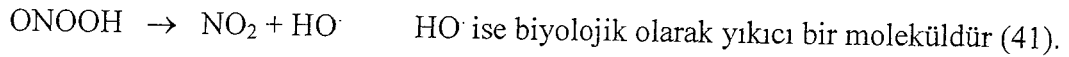
Günümüzde NO'nun cGMP'den bağımsız etkilerinin de olduğu bilinmektedir. NO'nun yüksek konsantrasyondaki lokal sitotoksik etkileri mitokondride anahtar rol oynayan demir sülfür enzimlerinin inhibisyonunu, siklooksijenazın aktivasyonunu ve sitokrom P<sub>450</sub> enzimlerinin baskılanmasını içermektedir. NO çeşitli hücrelerde gen transkripsiyonu ve translasyonunu düzenleyebilir; endotelyal hücrelerde c-fos'u aktive ederken nöronlarda c-fos promoteri ile ilişkili gen ifadesinde Ca etkisini artırır (41).

### 2.4.4 NO'NUN SERBEST RADİKAL ETKİLERİ

En önemli etkileşim potent sitotoksik bir molekül olan peroksinitrit anyonunu (ONOO) oluşturmak üzere süperoksit anyonuyla ( $O_2^-$ ) olur (36):



Peroksinitrit anyonu hücre içi veya yakınında iken çok önemli yaşamsal bileşenlere: zincir kesimi ile DNA'ya, peroksidasyon ile lipitlere, akonitaza, ve antioksidan miktarına zarar verebilir.  $NO \cdot$  ve  $O_2^-$ 'e atfedilen toksik etkilerin önemli bir kısmının peroksinitrit anyonuna ait olduğu düşünülmektedir (41). Güçlü bir oksidan olan peroksinitrit (ONOOH) ileri dekompozisyonla  $HO \cdot$  radikali oluşumuna yol açar:



ROS ve reaktif nitrojen türevleri ile meydana gelen oksidatif stres, hücre ölümü, nörolojik bozukluklar, inme, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, artrit, toksik şok ve akut reperfüzyon hasarı gibi doku hasarıyla karakterize hastalıklarla ilişkilendirilmektedir (41).

#### 2.4.5 NO'NUN APOPTOTİK ETKİLERİ

NO çeşitli hücre tiplerinde apoptozu indükleyebilir. Normal O<sub>2</sub> koşullarında toksik olmayan NO konsantrasyonlarının hipoksik koşullarda hücre ölümüne neden olabildiği, Bax'ın NO ile uyarılan apoptoza aracılık ettiği, Bcl-X<sub>L</sub>'nin NO ile uyarılan apoptozu önlediği gösterilmiştir (43).

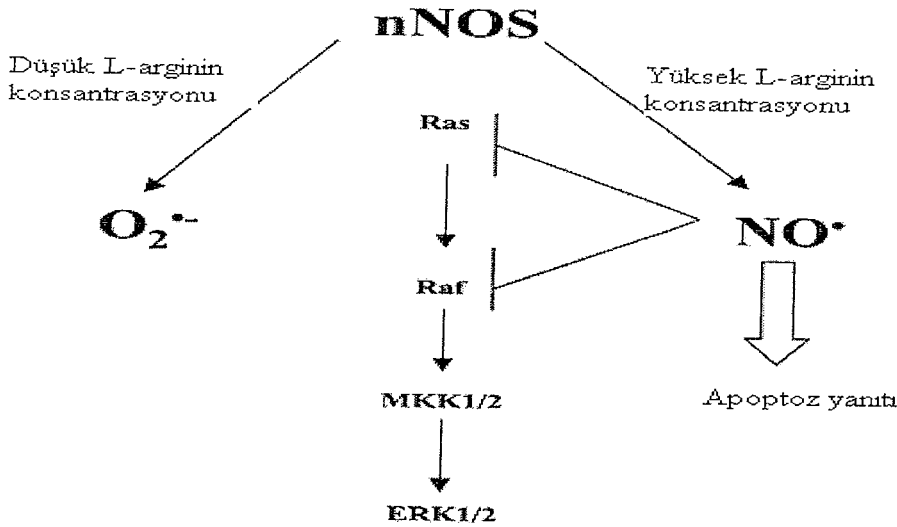
Son çalışmalar NO'nun bugüne kadar bilinen etkilerinin yanı sıra nitrozilasyon ve nitrasyon gibi proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonları, ROS'larla reaksiyon ve hem grubu bulunduran proteinlerle etkileşim yoluyla çeşitli diğer hücresel fonksiyonları da etkilediğini göstermektedir. Mitokondriyal sitokrom C oksidaz enzimi NO'nun etkileştiği proteinlerden biridir. Normal fizyolojik koşullarda sitokrom C oksidaz, oksijenin suya indirgenmesiyle sonuçlanan solunum zincirinin son elektron alıcısıdır. NO oksijenin yarışmalı inhibitörü olarak davranır ve sitokrom C oksidaz aktivitesinin inhibisyonuna yol açar. Normal oksijen koşullarında NO'nun hücresel solunum ve apoptozu düzenleyici rolü olduğu gösterilmiştir. Sitokrom C oksidazın NO ile inhibisyonu mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve sitoplazmaya sitokrom C serbestleşmesine yol açar. Sitokrom C sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ile reaksiyona girerek kaspaz 9'un aktivasyonuna yol açar. Aktive kaspaz 9 da kaspaz 3 ve 7'yi aktive ederek DNA fragmentasyonu ve laktat dehidrogenaz salımı gibi apoptotik değişimlerle sonlanır (43).

NO'nun süperoksitle etkileşimi sonucu meydana gelen peroksinitrit de NO ile indüklenen apoptoz için ileri sürülen bir diğer mekanizmada rol oynamaktadır. Peroksinitrit mitokondriyal elektron transportunu geri dönüşümsüz olarak inhibe eder, mitokondriyal membran geçirgenliğini bozarak hücre ölümüne neden olur (43).

Mitokondriyal DNA'sı olmayan, bu nedenle fonksiyonel elektron transport zinciri bulunmayan hücrelerin NO ile indüklenen hücre ölümüne dirençli olduğunun gösterilmesi,

NO ile indüklenen apoptoz için elektron transport zinciri fonksiyonunun önemini göstermektedir. Normal oksijen koşullarında apoptotik etkisi olmayan düşük konsantrasyondaki NO'nun, hipoksik koşullarda NO ile indüklenen hücre ölümüne karşı hücreleri duyarlaştırdığı bildirilmiştir (43).

Raines ve ark. nNOS tarafından üretilen NO'nun kaspaz aktivasyonuna yol açtığını ve bu izoenzimin NO üretiminin ortamdaki arginin substratı miktarı ile ilişkisini ortaya koyan bir deneysel çalışma gerçekleştirmişlerdir. Buna göre L-arginin substratının kullanılabilirliğine bağlı olarak nNOS hücre sinyal ileti yollarını ve fizyolojik fonksiyonları farklı olarak düzenleyebilen iki serbest radikal üretebilir. L-argininin hücresel düzeyleri yeterli olduğunda nNOS NO'yu oluşturarak Ras veya Raf1'i hedefleyen mekanizmalar yoluyla ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) aktivasyonunu baskılayabilir ve hücreleri apoptoza duyarlaştırabilir. L-arginin düzeyi düşük olduğunda nNOS primer olarak  $O_2^{\cdot-}$  oluşturur.  $O_2^{\cdot-}$ 'nin ERK yolunun aktivasyonunda küçük bir etkisi vardır ve hücre büyümesi, çoğalması, farklılaşması veya immün cevap gibi diğer fizyolojik olayların meydana gelmesine izin verebilir (Şekil 9) (44).



Şekil 9. nNOS aracılı ERK sinyal ileti yolunun düzenlenmesinin şematik gösterimi.

#### 2.4.6 YIKIMI

NO'nun intrinsik dayanıksızlığı, yıkımını hedefleyen özel mekanizma gereğini ortadan kaldırmaktadır. NO kendi yıkım ve inaktivasyonu için bir çok hedef moleküllerle etkileşir. Yıkımı ile meydana gelen biyoaktif serbest radikallerin (peroksinitrit anyonu, hidroksil radikali vb.) yanı sıra diğer inaktivasyon mekanizması da NO'nun nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) oluşturmak üzere moleküler oksijenle reaksiyonudur. Nitrit daha sonra hemoproteinlerin varlığında nitrata (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) yükseltgenir (36). NO, NO deposu veya taşıyıcısı olarak hareket edebilen S-nitrozotiyol oluşturmak üzere albümin ve doku plazminojen aktivatörü gibi tiyol içeren proteinlerle de reaksiyona girebilir (36).

NO metabolize olurken moleküler oksijen ile spontan olarak bağlanıp azot dioksit (NO<sub>2</sub>) oluşturur:  $NO \cdot + O_2 \rightarrow 2 NO_2$

Ömrü kısa olan NO'nun üretimi hakkında fikir sahibi olabilmek için NO<sub>2</sub>, nitrat ve nitrit ölçümleri yapılabilir (45).

#### 2.4.7 NO'NUN ETKİLERİ

NO aktivitesi tipik olarak NO üretiminden sorumlu enzimlerin aktivitesi ve miktarına, oksidan stresin düzeyine, hemoglobin ve glutatyon gibi antioksidan moleküller tarafından geri alım hızını içeren bir çok lokal faktöre bağlıdır. NO oksijen, süperoksit radikalleri veya geçiş metalleri ile reaksiyona girer ve reaktif nitrojen türevlerini oluşturabilir. NO, etkileri doku tipine, organizmanın içinde bulunduğu koşullara ve konsantrasyona göre farklılık gösterebilen pleotropik bir moleküldür. NO düşük konsantrasyonlarda periferik kan akışı, trombosit fonksiyonları, immün reaksiyonların düzenlenmesi, non-adrenerjik non-kolinerjik nörotransmisyon ve bellek gibi bir çok fizyolojik işlevi etkileyen bir sinyal molekülü olarak görev yapar. Yüksek konsantrasyonlarda ise tümör ve patojenlere karşı sitotoksik ve sitostatik savunma mekanizmasında yer alan bir ubiquitin mesajcı moleküldür (36, 46). Düşük konsantrasyonlarda antioksidan özelliği olan NO, yüksek konsantrasyonlarda prooksidan etkilidir (47). iNOS tarafından sağlanan yüksek konsantrasyondaki NO, tümör hücrelerini öldürücü, viral replikasyonu durdurucu ve çeşitli patojenleri etkisizleştirici immün etkiler gösterir (36).



Doku ve Organ Sistemlerine Etkileri: Kardiyovasküler sistem: Vasküler endotel hücrelerden sentezlenen NO düz kaslarda gevşemeye neden olur (48). Negatif inotropik etkili bir nörotransmitterdir (49). Kan basıncı ve vasküler tonusun düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun baskılanması, lökosit adezyonu ve düz kas hücre çoğalmasının önlenmesi yoluyla kardiyoprotektif etkiler gösterir (50). Endotel hücrelerinden NO'nun salınması pulmoner dolaşımında vasküler bazal tonusu düzenler ve hipoksik vazokonstrüksiyona karşı koyar (36).

Gastrointestinal sistem: NO yutma, özefageal distansiyon ve vagal efferent sinir uyarısıyla indüklenen alt özefageal sfinkterin gevşemesi için bir araçtır (51). Enterik nöronlardan salımı gastrik ve intestinal düz kasları gevşetir (48).

Solunum Sistemi: TNF- $\alpha$  ve IL-1 $\beta$  gibi alveoler makrofaj kaynaklı proinflamatuvar sitokinler ile iNOS'un uyarılması, solunum yolu yüzey sıvısının hipersekresyonu ve eozinofilik yangı ile karakterize akciğer hastalıklarının patogeneğinde önemli bir rol oynar (36, 46). nNOS kaynaklı NO ise solunum yolu düz kas gevşemesi ve düz kas proliferasyonunun baskılanması gibi bronkoprotektif etkiler gösterir (36).

Merkezi Sinir Sistemi: Bir serbest radikal gaz olan NO hücre ve dokulara hızlıca penetre olabildiği için beyindeki sinaptik iletide de önemlidir. Uzun dönemde öğrenme ve bellek fonksiyonları için esas olan hipokampustaki sinaptik plastisite oluşumunu artırır (48). Otonom sinir sistemine de etkileri bildirilmiştir (49).

Gentoüriner Sistem: Corpus kavernozumdan salınan NO penil ereksiyona aracılık eden kan damarlarını gevşetir (48). NO renal fonksiyonlar üzerinde potent bir modülatör olarak etki eder. Afferent ve efferent vasküler tonusu, glomerüler filtrasyonu ve afferent arteriyol üzerindeki belirgin etkiyle medüller kan akışını kontrol eder. Ayrıca NO natriüretik etkilere de sahiptir. Renal hemodinaminin NOS inhibitörlerine çok duyarlı olduğu gösterilmiştir (42).

#### 2.4.8 NO'NUN DM OLUŞUMUNA ETKİLERİ

NO'nun seviyesindeki değişiklikler DM'yi de içeren patolojik şartların oluşmasına katkıda bulunabilir (52).

NO'nun insülin salınımına etkisi: nNOS pankreasta alfa, beta, delta ve PP hücrelerinde, eNOS beta, delta ve PP hücrelerinde bulunur ve insülin dışında glukagon, somatostatin ve pankreatik polipeptidin salınımında düzenleyici olarak işlev görür. cNOS izoformu tarafından üretilen NO, beta hücrelerinde insülin salınım basamaklarının önemli bir modülatörü olarak görev yapabilir. Nakada ve ark. ekzojen NO'nun insülin salınımına etkisinin konsantrasyon bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Düşük NO konsantrasyonlarında uyarıcı, yüksek konsantrasyonlarda inhibitör etkiye yol açmaktadır (37).

NO'nun periferik insülin duyarlılığına etkisi: NO insülinin periferik etkilerinin bir aracı molekülü olarak ve direk etki ile kas hücresi içine glukoz girişini kolaylaştırır. İnsülinin *in vivo* glukoz taşınmasını artırmasına katkıda bulunan dolaylı mekanizmalardan birisi endotelden salınan NO'nun kan akışını artırmasıdır. NO direkt etki ile iskelet kasında insülin ve kas kasılması ile uyarılan sinyal ileti yollarından bağımsız bir mekanizmayla glukoz girişine aracılık eder. NOS'un nöronal ve endotelyal izoenzimleri iskelet kasında ifade edilir. Sodyum nitroprussid gibi NO donörlerinden sağlanan ekzojen NO, hücre yüzeyindeki GLUT4 düzeyini artırarak izole iskelet kaslarında glukoz taşınmasını uyarır. NOS inhibitörlerinden N<sup>G</sup>-monometil-L-arginin veya N<sup>G</sup>-nitro-L-arginin metil esterinin akut verilmesi belirgin insülin direnci, hipertansiyon ve/veya hiperglisemi gelişimi ile sonuçlanır. NOS blokajı ile iskelet kaslarına kan akışının azaldığı ve *in vivo* hiperinsülinemik-öglisemik klempe esnasında insülin aracılı glukoz girişinin bozulduğu saptanmıştır (53). Ragoobirsingh ve ark. çalışma grubuna NO donörü olan S nitrozoglutasyon (GSNO), kontrol grubuna plasebo olarak kaptopril verilen köpeklerde, GSNO'nun mononükleer beyaz kürelerdeki insülin reseptörü sayısını ve reseptörlerin insüline ilgisini azalttığı göstermişlerdir (52).

NO'nun beta hücre hasarına etkisi. Diğer hücre tipleriyle kıyaslandığında beta hücreleri yüksek sayıda mitokondri içermeleri ile ilişkili olarak daha yüksek oksidatif hasar riski ve apoptoza artmış duyarlılık taşımaktadır (6). NO'nun DM patogenezinde beta hücrelerine hasar verici etkisi ROS aracılığı ile, inflamatuvar olayın bileşeni olarak ve/veya apoptotik mekanizmalarla meydana gelebilir (6). Normalde beta hücrelerinde bulunmayan iNOS, proinflamatuvar ajanlara beta hücrelerinin maruz kalmasıyla ifade edilir ve üretilen yüksek miktardaki NO beta hücre hasarı ve nekrozla sonuçlanan beta hücre disfonksiyonuna neden olabilir. Kısa süreli glukoz maruziyet bile adacık beta hücrelerinde

NO aracılı beta hücre fonksiyon bozulması ile sonuçlanan iNOS indüksiyonuna yol açabilir. Tip 2 DM'de kronik hipergliseminin beta hücrelerine zarar verici etkileri iyi bilinmektedir (54).

İnsülin salgılayan beta hücreleri, oksidatif strese duyarlı hücrelerdir. Tip 1 DM'de otoimmün atak ve inflamatuvar sitokinlerin etkileriyle süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türevleri ile eş zamanlı NO oluşumunun, beta hücre disfonksiyonu veya hücre ölümüne neden olduğu gösterilmiştir. ROS ile ilişkili beta hücre fonksiyonu bozulması tip 2 DM'de de gösterilmiştir (6).

Beta hücre hasarının NO ve ROS aracılığı ile meydana geldiğine dair kanıtlar aşağıdaki gözlemlere dayanır: 1. Beta hücrelerinde serbest radikal savıcı enzimlerin düzeyleri düşüktür ve serbest radikalle indüklenen beta hücre hasarına duyarlılığa işaret etmektedir. 2. IL-1 veya IL-1 ve INF- $\gamma$  kombinasyonu ile meydana gelen beta hücre apoptozunda iNOS ifadesinin ve NO oluşumunun arttığı gösterilmiştir. 3. iNOS eksik adacıklarda, sitokinle indüklenen hücre ölümü daha az görülmektedir (55). 4. Pankreas beta hücrelerinde yüksek sayıda mitokondri içermeleri ile ilişkili olarak metabolizma oksijene daha bağımlıdır ve yüksek NO konsantrasyonları sitokrom C oksidazın oksijen ile reaksiyonunu yarışmalı olarak baskılayarak apoptoza yol açabilir (6, 55).

#### 2.4.9 NO'NUN DİABETİK KOMPLİKASYONLARIN PATOGENEZİNDE ROLÜ

Vasküler komplikasyonların oluşumuna etkisi: Makro ve mikrovasküler hastalık tip 2 diyabetik hastalarda morbidite ve mortalitenin en yaygın sebebidir. Diyabetik kardiyovasküler disfonksiyon nefropati, retinopati, nöropati, artmış inme riski, hipertansiyon, ve miyokard infarktüsü gibi çeşitli ciddi komplikasyonların gelişmesinin temelinde yatan büyük, önemli bir klinik problemi temsil eder. İyi kontrollü DM vakalarında bile görülebilen hiperglisemik ataklar, diyabetik komplikasyonların gelişmesini tetikleyen artmış oksidatif ve nitrozatif stres artışı ile yakın ilişkilidir (56).

Multifonksiyonel bir molekül olan NO, vasküler tonusu düşürücü ve vasküler düz kas hücrelerinde antiproliferatif etkileri ile DM'nin makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonları üzerinde etkili olabilmektedir. iNOS tarafından üretilen büyük

miktarlarda NO toksik, hasar verici bir ajandır, eNOS tarafından düşük konsantrasyonda üretilen NO ise endotel fonksiyonları için gereklidir (57). Obezite, tip 2 DM ve insülin direncinde görülen endotel disfonksiyonu, NO üretiminin azalması ve tüketimin artması ile NO sağlanabilirliğinin azalmasından kaynaklanabilir (58, 59). Endotelin-1 ve NO arasındaki denge vasküler komplikasyonların gelişiminde çok önemlidir: trombosit aktivitesi, lipid oksidasyonu, lökosit kemotaksisi, vasküler düz kas hücreleri ve mural fibroblastların proliferasyonu ve büyümesi gibi trombotik faktörlerin lokal üretiminin düzenlenmesi yoluyla NO antiaterosklerotik, endotelin-1 proaterosklerotik faktörler gibi etki eder (58).

Tip 2 DM'de endotelyal disfonksiyon patogenezi çok faktörlüdür; NO/endotelin-1 dengesinin bozulmasının yanı sıra oksidatif stres, dislipidemi ve hiperglisemi de ana etkenlerdir. Diyabetik dislipidemi trigliseritten zengin lipoproteinlerin birikimi, küçük yoğun LDL partiküllerinin artışı, azalmış HDL kolesterol ve artmış postprandiyal serbest yağ asidi akışı ile karakterizedir. Bu değişikliklerin oksidatif strese katkıda bulunabildiği ve eNOS aktivitesini direk olarak baskılayarak endotel disfonksiyonuna yol açabildiği ileri sürülmüştür (60).

Hiperglisemi ileri glikozile son ürünlerin oluşumu, protein kinaz C ve polyol yolunun aktivasyonu ile süperoksit anyonu ve peroksinitrit oluşumunu artırır. Peroksinitrit vasküler endotel, vasküler düz kas ve miyokardiyumdaki çeşitli biyomoleküllere saldırarak kardiyovasküler disfonksiyona neden olur (56).

Nitrozatif stres, poli (ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu gibi sinyal iletilişinin aşağı yollarında yer alan mekanizmalarla diyabetik nefropati, retinopati ve nöropatinin ilerleyişine ve gelişmesine de katkıda bulunur (56). Hiperglisemi AGE oluşumu yoluyla damar duvarı yapısı ve fonksiyonunun bozulmasına katkıda bulunur (60).

eNOS geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Özellikle, T-786C promoter gen bölgesinde intron 4 içinde 7-baz çifti tekrarı ve exon 7'de Glu298Asp, polimorfizmlerinin koroner arter hastalığı, hipertansiyon ve beyin infarktüsü gibi kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. 27-baz çifti tekrarı, ilerlemiş diyabetik retinopati ile ilişkili bulunmuştur. Bazı eNOS allellerinin tip 2 DM'de diyabetik makulopati riskini artırdığı bildirilmiştir (57). eNOS kaynaklı NO üretiminin azalması

sistemik veya intraglomerüler hipertansiyon nedeniyle glomerüler hasarın ilerlemesinde önemli bir risk faktörüdür. eNOS gen polimorfizmlerinin tip 1 ve 2 DM'deki nefropati ile ilişki bulunduğu da bildirilmiştir (61).

Yara iyileşmesi üzerine etkisi: Alt ekstremitelerinde pürülan veya nekrotik lezyonu olan 65 diyabetik hastada kontrol grubuna göre NO ile tedavi grubunda diyabetik ülser epitelizasyonunun 2 kat daha hızlı olduğu, yara iyileşme süresinin bütün fazlarının kısaltıldığı gözlenmiştir (62).

Gastrointestinal komplikasyonlara etkisi: nNOS geni nakavt farelerde pilor hipertrofisi ve gastrik dilatasyon görülmüştür. Spontan olarak DM gelişen fareler ile streptozosin ile indüklenmiş DM gelişen farelerin mide kas liflerinde nNOS ekspresyonu ve gevşeme azalmıştır. Watkins ve arkadaşları, diyabetik farelerin miyenterik nöronlarında nNOS proteini ve mRNA'sının azalmış olduğunu göstermişlerdir (63).

Genitoüriner komplikasyonlara etkisi: Diabette sık görülen erektil disfonksiyonda NO azalmasının önemli rolü vardır. NO intraselüler cGMP'yi oluşturmak için guanilat siklazı aktive ederek düz kas gevşemesi ve ereksiyon oluşmasına aracılık eder. cGMP fosfodiesteraz inhibitörü olan sildenafil, NO'nun penil kan akışını artırma süresini uzatıcı etkisi nedeni ile erektil disfonksiyon tedavisinde kullanılır (48).

#### 2.4.10 DM'İNİN NO'YA ETKİSİ

DM'de rastlanılan yüksek glukoz konsantrasyonlarının eNOS'un bradikinine yanıtını körleştirdiği, saf NO çözeltisine glukoz eklenmesinin ise NO konsantrasyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Brodsky ve arkadaşları bu çalışma ile hipergliseminin NO konsantrasyonlarını düşürerek diyabetik hastalarda hipertansiyon ve endotel disfonksiyonuna yol açabileceğini ileri sürmüşlerdir (64). Diğer çalışmalar yüksek glukoz konsantrasyonları veya glikozilasyon ürünlerinin, NO'nun biyoyararlanımını azaltıcı etkisini destekleyen bulgular saptamışlardır. Bu etkilerin glukoz tarafından prostanoit ve tromboksan A<sub>2</sub>'nin sentez veya etkisinin artması, protein kinaz C aktivasyonu, NO'nun tüketilmesi, NOS aktivitesinin inhibisyonu ve reaktif oksijen türevlerinin üretilmesi gibi yollarla sağlandığı gösterilmiştir (42).

DM ve obezitede yaygın olarak görülen artmış serbest yağ asitlerinin endotel hücrelerden NO üretimini engellediği gösterilmiştir. IRS-1, insülinle uyarılan eNOS aktivasyonu için kritiktir. Sığır aort endotel hücrelerinin insülininden önce insan serumunda bulunan serbest yağ asitleri ile karşılaşmasının IRS-1 ve eNOS fosforilasyonunu baskılayarak NO oluşumunu azalttığı gösterilmiştir. Serbest yağ asitleri dozla ilişkili şekilde inflamasyonla ilişkili transkripsiyonel bir faktör olan nükleer faktör  $\kappa$ B'nin oluşumunu artırmaktadır. Bu şekilde inflamasyon ve endotel disfonksiyonla ilişkili yollarla bağlantısını sağlayabilir (65).

DM böbrekte NO'nun biyoyararlanımını baskılayıcı veya artırıcı mekanizmaları tetikleyebilir. Erken dönem DM'de renal NO üretimi ve/veya aktivitesi artmıştır. İnsülinopenili şiddetli diyabetik vakalarda genel NO eksikliği söz konusudur (42).

Isı şok proteini 90 (HSP90) eNOS aktivitesini artırıcı etki gösteren şaperon proteinlerdendir. Diabetik hastalarda renal kortekste HSP90 ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (42); Lin ve ark. umbilikal ven endotel hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonlarının eNOS ile HSP90 etkileşimini bozduğunu göstermişlerdir (66).

#### 2.4.11 NO ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Klinik ve araştırma laboratuvarlarında NO veya metabolitlerinin biyolojik sıvılarda, solunum havasında ve dokularda ölçümü yapılabilmektedir. NO'nun yarı ömrü çok kısa olduğu için direk ölçümü zordur. Bu nedenle NO oksidasyonu sonucu oluşan nitrat ve nitrit iyonları olarak bilinen stabil son ürünleri saptayan analitik yöntemler daha yaygın olarak kullanılmaktadır (67).

Nitrit ve nitrat ölçümüne dayalı metodlar: NO'nun insan organizmasındaki stabil son ürünleri olan nitrit ve nitrat kolorimetrik, amperometrik, kromatografik ve florometrik olarak ölçülebilmektedir. Aköz solüsyonlarda nitrit analizi için en yaygın ölçüm yöntemi Griess kolorimetrik yöntemdir (45).

1-Griess kolorimetrik yöntemi: Bu teknik kimyasal veya enzimatik yöntemler ile nitratın nitrite dönüştürüldüğü bir ön aşamayı içerir. Örnekte bulunan nitrit 2 basamaklı diazotizasyon ile sülfanilik asitle diazonyum iyonu üretir. Diazonyum iyonlarının N-

(naftil)etilendiamin ile oluşturduğu renkli azo ürünleri spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu yöntemin nitrit için deteksiyon limiti 0.1-1  $\mu\text{M}$ 'dır (67, 45). Ancak bu yöntemde ürünün tam oluşmaması, çevre sıcaklığı ve Griess reaktiflerinin kolay bozulması gibi nedenlerle hata oranı yüksektir. Griess yönteminin diğer dezavantajları arasında reaksiyon basamaklarının sıkıcı ve zaman alıcı olması ve özellikle örnek başına maliyetin yüksek olması sayılabilir (67).

2-Nitrat ve nitritin amperometrik ölçümü: Nitrit ve nitratın iyon seçici elektrotlar ile direkt ölçümü herhangi bir ara kimyasal reaksiyona gereği ortadan kaldırarak zaman kaybını önler, ancak özel analizörlere gerek duyulur (67).

3- Florometrik yöntem: Florometrik yöntem NO oluşumunun bir göstergesi olarak nitritin 2,3-diaminonaftalen ile reaksiyonu temeline dayanır. Asidik şartlarda floresan 2,3-naftotriazol oluşur. Nitritin minimum deteksiyon miktarı 10-20 nM'dır. Bununla birlikte hücre kültürü ve biyolojik sıvılarda nitrit ve nitrat konsantrasyonlarının pM düzeylerde olabilmesi, biyolojik bileşenler veya kolorimetrik kimyasallar tarafından interfere edilmesi sakıncaları vardır (45).

4- Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC): İyon değişim, ters faz iyon çifti ve ters faz HPLC yöntemleri, ultraviyole (UV)- görünür ışık absorpsiyonu, iletkenlik, elektrokimyasal veya floresan dedektörler kullanarak biyolojik sıvılarda nitrit ve nitrat ölçümünde kullanılabilir. Klorit ve biyojenik aminler gibi interfere eden maddelerin uzaklaştırılması için ön saflaştırma adımlarına ve örneklerin filtrasyonuna gerek duyulur. Bu ön hazırlık işlemleri çevresel nitrat ve nitritle kontaminasyona ve geri kazanımın düşmesine neden olabilir. HPLC sistemlerinde floresans ve kemilüminesans deteksiyon, UV-görünür ışık absorpsiyonu, kondüktometrik, elektrokimyasal veya bazı floresans deteksiyonlara göre daha duyarlıdır (45).

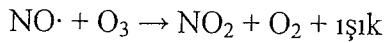
5- Gaz kromatografisi: Gaz kromatografik analizler uzun örnek hazırlama işlemlerine ve pahalı analitik cihazlara gerek duyar. Yeniden elde edilebilirliği zayıf olduğu için laboratuarlarda yaygın olarak kullanılmaz (45).

Gerçek zamanlı NO analizi: 1- Kemilüminesans yöntem ile gerçek zamanlı NO ölçümü: NO gibi biyolojik sıvılarda düşük konsantrasyonda bulunan ve stabil olmayan

radikallerin gerçek zamanlı analizlerinde kemilüminesans yöntemlerin yüksek duyarlılık gösterdiği bilinmektedir. NO için deteksiyon limiti yaklaşık 100 fM'dır. Pahalı cihazlara gerek duyulması, N-nitro-L-arginin, S-nitrozotiyoller ve nitrozodifenilamin gibi bazı bileşiklerin girişimi dezavantajları arasındadır (45).

2- Dokuda elektrokimyasal yöntemlerle gerçek zamanlı NO analizi: Sıklıkla elektrokimyasal porfirinik mikrosensörler kullanılarak direk dokuda (vasküler endotel hücreleri gibi) NO ölçümü yapılabilir. 0.5-8 µm çaplı küçük bir sensörle 0.1-1ms'de sonuç alınabilmesi ve nM konsantrasyonların saptanabilmesi avantajlarıdır. Porfirinik sensör *in vitro* veya *in vivo* izole tek hücre veya dokuda NO ölçümü için kullanılabilir (68). Dokunun redoks durumu, hidrojen peroksit varlığı ölçümleri etkileyebilir (69).

Soluk havasında NO Ölçümü: Soluk havasındaki NO'nun ölçümü için en sık kullanılan ölçüm tekniği ozonla reaksiyondan sonra ozon konsantrasyonundaki azalmanın UV absorpsiyon veya oluşan ışığın kemilüminesans yöntemle ölçülmesidir (46, 70).



## 2.5 ADENOSİN DEAMİNAZ

Adenosin Deaminaz (E.C.3.5.4.4.), adenosin ve 2'deoksiadenosinin, sırasıyla inozin ve 2'deoksiinozine hidrolitik deaminasyonunu kataliz eder. Bu reaksiyon pürinlerin ürik asite yıkımında yer almasının yanı sıra hipoksantin guanin fosforibozil transferaz enzimine hipoksantin substratı sağladığı için aynı zamanda pürin kurtarma yolunun da önemli bir basamağını oluşturmaktadır. ADA, 5' nükleotidaz ve adenosin kinaz ile birlikte hücre içi ve hücre dışı adenosin konsantrasyonlarının düzenlenmesinde de rol alır (8). ADA tüm memeli hücrelerinde ifade edilen 41 kDa'luk sitozolik bir ektoenzimdir (71). ADA 20. kromozomun uzun kolunda bulunan ve farklı kinetik özellikler ile ilişkili kodominant ADA\*1 ve ADA\*2 allelleri ile kontrol edilir (72). ADA\*1 bütün hücrelerde bulunmakla birlikte en fazla lenfosit ve monositlerde, ADA\*2 ise sadece monositlerde saptanmıştır (73).

ADA aktivitesinin T lenfositler başta olmak üzere lenfosit çoğalması, farklılaşması, olgunlaşması ve işlevi için esansiyel olduğu düşünülmektedir. Klinik laboratuvarlarda doku



veya biyolojik sıvılardaki ADA aktivitesi artışı hücre proliferasyonu ve/veya yıkım hızı değişikliklerinin veya T hücre aktivasyonunun non spesifik göstergesi olarak kabul edilir (74). ADA Pürin metabolizmasının anahtar enzimidir ve normal immün yeterlilik için gereklidir (75).

### 2.5.1 ADA'NIN KLİNİK ÖNEMİ

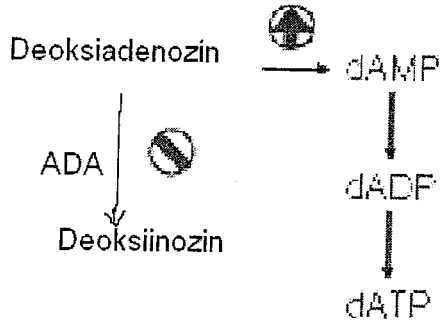
Normal dokunun hızlı ve uyarılmış büyümesi sırasında yüksek ADA aktivitesi hem pürin kurtarma yolunun aktif olduğunun hem de büyümekte olan hücrelere toksik etkili adenozin ve 2'deoksiadenozinin inaktivasyonunun sağlandığının belirteci olarak önem kazanır. Enzim özellikle hızlı doku çoğalması sırasında büyüme faktörleri ve sitokinlerin uyarısına duyarlıdır (76).

Yüksek serum ADA düzeyleri lenfoid malign hastalıklarda, pulmoner ve plevral tüberküloz, sarkoidoz, tifo gibi kronik T hücre aktivasyonu ile seyreden infeksiyöz ve noninfeksiyöz sistemik hastalıklarda, ilerleyici sistemik skleroz, dermatomyozit gibi bağ doku hastalıklarında, gastrointestinal sistem ve akciğer karsinomalarında saptanmıştır (74). Kolon kanserinde tümör proliferasyonu, invazyonu ve metastazı ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. ADA'nın karsinogenezde direk yolla değil ancak RNA ve DNA prekürsörleriyle ilişkili nükleozitlerin yeniden kullanımını sağlayarak, dokuların hızlı büyümesini destekleyen metabolik yolları etkilediği ifade edilmiştir. Bir ADA inhibitörü olan Deoksikoformisin ile tedavi edilen kolon karsinomlu hastalarda hücre büyümesinin baskılandığı gösterilmiştir. Artmış ADA aktivitesi hızlı büyüyen malignensilerde bir tümör belirteci olarak kullanılabilir (76).

ADA aktivitesi ve apoptoz arasında önemli bir ilişki bulunduğu gösterilmiş ve ADA eksikliğinin P<sub>53</sub> bağımlı apoptotik mekanizmaları tetiklediği ifade edilmiştir. ADA eksikliği p53'e bağımlı apoptotik mekanizmaları hızlandırırken p53 mutantlarda ADA aktivitesinde 2 ila 7.5 kat artış saptanmıştır. Bcl-2 ifadesindeki artışın apoptozu engelleyici etkisi ADA aktivitesi yokluğunda biriken deoksi (dATP) ile etkileşimini içermektedir (76).

### 2.5.2 ADENOSİN DEAMİNAZ EKSİKLİĞİ

Kalıtsal immün yetmezlikler T ve B hücreleri veya her ikisindeki kalıtsal bozukluktan kaynaklanır. ADA eksikliği, T ve B lenfositlerin uygun şekilde gelişemediği ciddi immün sistem hastalıklarına neden olur. ADA'nın yokluğu ribonükleotit redüktazın güçlü bir inhibitörü olan dATP'nin hücresel derişiminde 100 kat artışa neden olur (Şekil 10). dATP'nin yüksek düzeyleri T lenfositlerde diğer deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP) de genel bir eksikliğe yol açar (40).



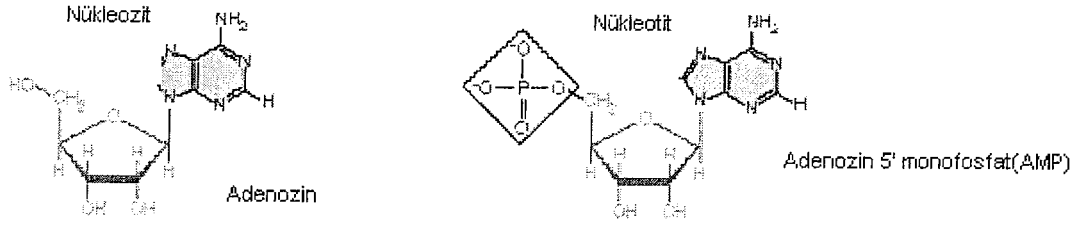
Şekil 10. ADA eksikliğinde dATP artışı görülmektedir.

Lenfoid doku ve hücreler pürin katabolizmasındaki bozukluklara karşı hassastır (77). ADA eksikliği tüm şiddetli kombine immün yetmezlik sendromu olgularının yaklaşık %15'ini oluşturur. ADA eksikliği otozomal resesif geçiş gösterir (75, 77).

### 2.5.3 ADENOZİN

Endojen pürin nükleozittir (Şekil 11) (8). İntraselüler olarak oluştuktan sonra hücre membranından difüze olarak ekstraselüler adenozin konsantrasyonlarını belirler, bazı ektoenzimler tarafından hücre dışında da meydana getirilir. Hedef hücrelerdeki reseptörlerine bağlanarak etkilerini gösterir. Adenozin reseptörleri kalp kası, düz kaslar, iskelet kasları, beyin, böbrekler, adipoz doku, immün sistem hücreleri ve vasküler endotelial hücreler gibi çeşitli doku ve hücre tiplerinde bulunur (8).

G proteini ile eşlenik reseptör ailesinin bir üyesi olan adenozin reseptörlerinin dört tipi tanımlanmıştır: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> ve A<sub>3</sub>. A<sub>1</sub> ve A<sub>2A</sub> yüksek afiniteli diğerleri ise düşük afinitelidir (8). A<sub>1</sub> ve A<sub>3</sub> adenilat siklaz aktivitesi üzerinde baskılayıcı, A<sub>2A</sub> ve A<sub>2B</sub> uyarıcı etkilere sahiptir (78).



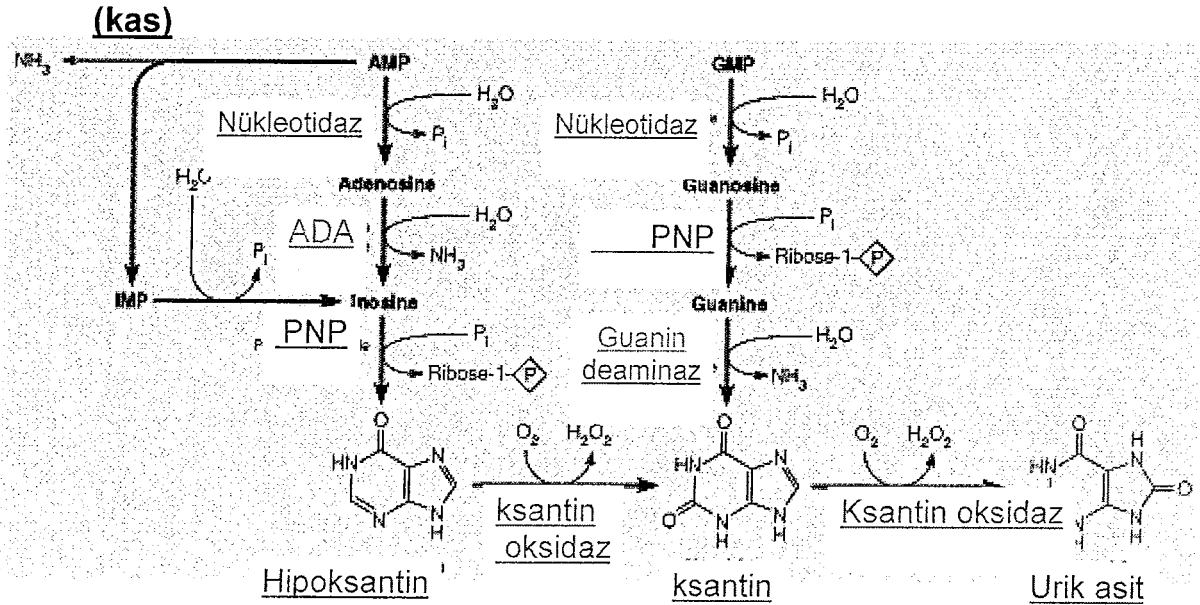
Şekil 11. Adenin nükleozit ve adenin nükleotit yapısı görülmektedir.

Normal şartlarda adenosin ekstraselüler alanda yapısal olarak düşük konsantrasyonda bulunur, ancak medikal stres, çeşitli metabolik yollarla dramatik bir artışa yol açabilir. Stres durumunda hücre içi adenosin yüksek konsantrasyonlara ulaşır ve özel nükleozit taşıyıcılarıyla hücre dışı boşluğa geçer. Normal koşullarda sağlıklı kişilerde hücre dışı adenosin konsantrasyonu  $<1 \mu\text{M}$  iken iskemik doku ve inflamasyonda  $100 \mu\text{M}$  kadar yüksek olabilir. (8).

Adenosin konsantrasyonlarına etkili sistemler: Adenosinin fizyolojik etkileri hücre yüzey reseptörlerini işgal etmesi ve hücre içi sinyal iletilerini başlatması ile ilişkilidir ve üretimi, salınımı, hücre alımı ve metabolizmasını etkileyen metabolik olaylarla belirlenir. Hücre dışı adenosin konsantrasyonunun en büyük kaynağını hücrelerden serbestleşen ATP, ADP, AMP gibi adenin nükleotitleri oluşturur. Nükleozit trifosfat defosforilaz ve 5' nükleotidaz gibi ektonükleotidazlar bu öncüllerin adenosine dönüşümünü kataliz eder. Endotelial hücreler adenin nükleotitlerin adenosine defosforilasyon kapasitesini etkileyen enzimlerin önemli bir kaynağı olarak kabul edilir. Nötrofiller endotelial tabakadan geçerken adenosin kaynağı olabilen AMP'yi serbestleştirir. Doku zedelenmesi bölgesinde trombositlerden salınan ADP de adenosine defosforile edilebilir (8). Adenosin konsantrasyonlarına etkili ikinci bileşen adenosinin ADA ve adenosin kinaz aktivitesi ile ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Adenosin konsantrasyonuna etkili metabolik yolların birbiri ile yakın ilişki içinde olduğu gözlenmiştir. Örneğin hipoksi ve iskemi durumlarında adenosin konsantrasyonlarını artıran 5' nükleotidaz aktivitesi artarken, adenosin konsantrasyonlarını azaltan adenosin kinaz enziminin aktivitesi de baskılanır (8).

Yıkımı: İnsanlar bir pürin nükleozit olan adenosini ürik asite kadar yıkabilir. Adenosin ve/veya deoksiadenozin önce ADA ile inozin ve/veya deoksiinozine

dönüştürülür. Bu reaksiyonla bir mol  $H_2O$  harcanıp bir mol  $NH_3$  çıkartılır. İnozinden de pürin nükleozit fosforilaz etkisiyle bir fosfat katılarak hipoksantin ve riboz-1P (deoksiriboz-1P) oluşur. Hipoksantin ksantin oksidazla ksantine, ksantin de aynı enzimle ürik asite yükseltgenir (Şekil 12). Oluşan ürik asit, böbrekler yoluyla atılır (79).



Şekil 12. Pürin nükleotitlerin ürik asite yıkılması (PNP: Pürin nükleozid fosforilaz)

Adenozin biyolojik doku ve sistemlerde çeşitli etkilere sahiptir:

Apoptoz: Adenozin epitelyal, endotelyal, düz kas hücreleri, immün ve nöronal hücreler gibi bir çok hücre tipinde çoğalma, hayatta kalım ve apoptozu düzenler. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalar adenozinin gelişim ile ilişkili apoptoz, iskemi, travma ve yaşlanma ile ilişkili nörodejenerasyon gibi patolojik olarak hücre ölümünün artması ile karakterize hastalıklar veya kanser gibi spontan apoptozun azalması ile ilgili hastalıklardaki rolünü göstermektedir. Reseptör aracılı veya reseptör aracısız mekanizmalarla adenozin analoglarının hücre ölümüne neden olduğuna dair çeşitli kanıtlar vardır. Szondy ve ark. adenozin analoglarının insan timositlerinde apoptozu en az iki farklı mekanizmayla tetikleyebileceğini göstermişlerdir. Jacobson ve ark.  $A_3$  reseptör agonistlerinin yaklaşık 10  $\mu M$  agonist konsantrasyonlarında 48 saatlik inkübasyondan sonra ve her hücre tipi için apoptotik etkileri başlatabileceğini bildirmiş ve %30-50 oranında apoptotik hücrelerin

varlığını saptamışlardır.  $A_3$  reseptörleri nM adenozin konsantrasyonlarında sitoprotektif etkilere,  $\mu\text{M}$  konsantrasyonlarda ise apoptotik hücre ölümüne neden olabilen, konsantrasyona bağımlı bifazik etkiler gösterir (78).

Antioksidan etkileri: Adenozin oksidatif hasardan hücrelerin korunmasında önemli rolü olan glutasyon peroksidazın aktivitesini ve ifadesini artırarak sitoprotektif etkiler gösterir (80).

Kardiyovasküler sistem: Ektraselüler bir sinyal molekülü olan adenozin kardiyovasküler sisteme koruyucu etkiler gösterir; potent negatif inotropik bir ajan, koroner vazodilatör ve endojen antiaritmiktir (8, 81). Adenozin kardiyoprotektif etkilerini iki farklı mekanizmayla ortaya çıkartır: Birincisi parankim hücre fonksiyonları üzerindeki direkt baskılayıcı etkisiyle dokunun enerji ihtiyacını azaltır. İkincisi ise koroner vazodilatasyon ile parankim hücrelerine besin ve oksijen sağlanmasının artırılmasıdır (8).

Merkezi Sinir Sistemi: Nöronal aktivite üzerinde potent inhibitör etkili bir nörotransmitterdir. Adenozinin güçlü antidepresan etkilerinin olduğu saptanmıştır. Metilksantin, kafein ve teofilinin uyarıcı etkilerini antagonize eder (82). *In vitro* koşullarda adenozinin epileptik nöbetlerin baskılanmasında rolü olduğu, presinaptik etkiyle glutamat salınımını azalttığı, post sinaptik etkiyle de nöronal aktiviteyi baskıladığı gösterilmiştir (83).

Solunum sistemi: Solunum yolu düz kasında bronkokonstrüksiyonu ve nötrofil aktive edici faktör salınımını uyarıcı etkileri bilinmektedir (8).

İmmün sistem: Doku hasarını izleyen dönemde yangı ve bağışıklık sisteminin bölgesel olarak kontrol edilmesi ile bağışıklık yanıtının doku zedelenmesine yol açmasını engeller ve doku bütünlüğünün sürdürülmesine katkı sağlar. Normal koşullarda  $<1 \mu\text{M}$  bulunan adenozin konsantrasyonu bağışıklık üzerinde zayıf etkiler gösterirken iskemik ve inflamatuvar koşullarda görülen yüksek konsantrasyonlarda, immün modülatör ve özellikle immün baskılayıcı etkilere yol açar. Adenozin  $A_{2A}$  reseptörleri yoluyla endotelial ve diğer hücrelere uyarılmış nötrofil yapışmasını, bakterisidal aktiviteyi, apoptozu, adezyon moleküllerinin ifadesini, sitokinler ve büyüme faktörlerinin salgısını ve lökotrien  $B_4$ 'ün sentezini baskılar.  $A_{2A}$  reseptörlerinin cAMP aracılı yollarla bütün nötrofil fonksiyonlarını

etkilediği, diğer adenozin reseptörlerinin ise membranla ilişkili fosfatazların aktivasyonu ve kemoatraktan reseptörlerin duyarsızlaştırılmasını da içeren cAMP'den bağımsız mekanizmalarla nötrofillerin süperoksit anyonu oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir. Bunun aksine A<sub>1</sub> reseptörleri aracılığıyla da immün uyarıcı etkiler göstererek nötrofil kemotaksis ve fagositozunu artırdığı bildirilmiştir. Genel olarak adenozinin antiinflamatuvar etkilerini A<sub>1</sub>'den çok A<sub>2A</sub> reseptörleri yoluyla yaptığı kabul edilmektedir (8). Mast hücreleri adenozinin immunosupresif etkilerinin bir istisnasını oluşturmaktadır. Adenozin mast hücrelerini başlıca A<sub>2B</sub> ve A<sub>3</sub> reseptörleri yoluyla uyararak histamin, serotonin, kemokinler ve konağa zarar verici proteazların serbestleştiği mast hücre degranülasyonuna yol açar (8).

Karbohidrat ve lipid metabolizmasına etkileri: Adenozinin A<sub>2B</sub> reseptörleri aracılığıyla karaciğerde insüline karşıt etkiler oluşturduğu, adipositlerde ise insülinin etkilerini kolaylaştırdığı görülmüştür (72). Domuzlarda yapılan bir çalışmada adenozin ve insülinin beta adrenerejiklerle uyarılan lipolizi birbirinden bağımsız olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Adenozin Gi proteinleri aracılığıyla oluşturduğu lipoliz inhibisyonunda insülinde daha etkili olmuştur. Endojen adenozinin ADA ile nötralizasyonu insülin yanıtını bazalin %30-60 üzerine çıkarmıştır (84).

Adenozin insülin benzeri etkiyle yağ dokusuna glukoz transportunu artırıcı etki gösterebilir. Bu özelliği ile adenozinin yağ dokusundaki net etkisi submaksimal insülin konsantrasyonlarında bile yani insülin reseptör bağlama kapasitesinde artış olmadan glukoz transportunu artırabilir. Adenozin hücre yüzeyinde bulunan GLUT4 düzeyini artırır (84). ADA yağ asidi sentez hızının yaklaşık %25 azalmasıyla ilişkilidir. Adenozin ADA ile yıkılarak veya adenozin reseptör blokajı ile insülinle uyarılan glukoz girişi azaltılır. Çizgili kaslara glukoz girişi insülinde bağımsız olarak kontraksiyonla da sağlanabilir. İnsülin ile kontraksiyonun glukoz girişi üzerine etkileri aditifdir. İnsülin yokluğunda adenozin kalpte kontraksiyonla glukoz girişini potansiyalize eder. Bunun aksine insülinle uyarılan glukoz girişi üzerine adenozinin baskılayıcı etkilerinin olduğunu bildiren çalışmalar da vardır (85).

İnsülin Salımına Etkileri: Beta hücreleri iki tip birbirine zıt etkili pürinerjik reseptöre sahiptir. P<sub>1</sub> adenozin reseptörü, P<sub>2</sub> ise ATP ve ADP reseptörleridir. Adenozin beta hücrelerinde Gi proteini ile eşlenik reseptörler aracılığıyla insülin sekresyonunu azaltır (7).

Üriner sistem: Adenozin mezengial hücrelerden de üretilebilen lokal bir hormondur. Glomerüler filtrasyon hızını azaltır, böbrek kan akımının metabolik düzenleyicisidir (86).

#### 2.5.4 ADA ve DM

Düşük ADA aktivitesi ile ilişkili genotip taşıyan tip 2 DM'li hastalarda yüksek vücut kitle indeksi eğilimi gösterilmiştir. Son çalışmalar adenozinin karaciğerde A<sub>2B</sub> reseptörleri ile insüline karşıt etkiler oluşturduğunu bildirilmektedir. Adipositlerde ise adenozin insülin etkisini artırmaktadır. ADA\*1 alleli ile ilişkili yüksek ADA aktivitesinin düşük adenozin konsantrasyonu ve adenozin reseptörlerinin aktivitesindeki azalma ile glukoz toleransını artırabileceği, düşük aktiviteyle karakterize ADA\*2 allelinin ise yüksek adenozin konsantrasyonunda ve artmış adenozin reseptör aktivitesiyle glukoz toleransında azalmaya yol açabileceği ileri sürülmüştür. Tip 2 DM'li hastalarda ADA genotipi ile açlık kan glukozu düzeyleri arasında ilişki saptanmıştır. ADA, tip 2 DM'de klinik bulguların ortaya çıkmasına katkıda bulunur (72).

ADA insülinin biyoaktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir enzimdir (87, 88). İnsülinin periferik etkisi ve glisemik kontrolde rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (87). İnsülin verilmesinden sonra ADA aktivitesinin farklı iskelet kas tipleri, kalp ve karaciğerde azaldığı gösterilmiştir. Streptozosinle DM geliştirilen hayvanlarda plazma insülin konsantrasyonunun büyük oranda azalmasıyla dokulardaki ADA aktivitesi artmıştır. Sonuç olarak lokal adenozin konsantrasyonunun plazma insülin konsantrasyonu tarafından etkilenebileceği kabul edilmiştir (89). Tip 1 ve tip 2 DM'de plazma glukozunun düzenlenmesiyle ADA\*2 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Zayıf kontrollü tip 2 DM'de ADA\*2 aktivitesinin HbA<sub>1c</sub> düzeyi ile direkt korele olduğu gösterilmiştir. Serum ADA\*2 aktivitesinin ölçümü hem tip 1 hem de tip 2 DM'nin klinik görünümünün daha iyi anlaşılmasında önemli olabilir (88). ADA gen lokusu ve MODY arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Kromozom 20q bölgesi tip 2 DM'ye yakınlık oluşturabilir (90).

Mezengial disfonksiyon ve proliferasyon diabetik glomerülopatinin tipik lezyonlarıdır. Kollajenazla tedavi edilmiş Sprague-Dowley ratlarının böbrek korteksinden izole edilen glomerüler mezengial hücreler yüksek glukoz (30 mmol/L) konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında, hiperglisemik şartların 5'nükleotidaz yoluyla adenozin üretimini, ADA yoluyla da yıkımını azalttığı bildirilmiştir (86).

VKİ 25 kg/m<sup>2</sup> veya daha düşük olan tip 2 diyabetik hastalarda ADA\*2 allelinin düşük, VKİ 34 kg/m<sup>2</sup>'den daha büyük olan hastalarda ise yüksek olduğu gözlenmiştir. VKİ ara grupta olan hastalarda normal hastalardan farklı bulunmamıştır. Adenozin A<sub>1</sub> reseptör aktivitesinin artması, tip 2 DM'de adipoziteye katkıda bulunabildiğine dair çeşitli deneysel kanıtlar vardır (91). ADA inhibitörü olan 2'deoksikoformisin'in tip 1 DM gelişmesindeki etkisi BB Wistar ratlarda çalışılmış. 1.5 mg dCF/kg/hafta tedavi edilen 61 erkek sıçanda tip 1 DM insidansı kontrollerde %78 iken tedavi grubunda %32 olmuştur (92).



### 3- GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 ÇALIŞMANIN TANIMLANMASI VE ETİK KURALLARA UYGUNLUĞU

Bu çalışmada tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtı zı zlığı gelişmiş hastalarda, kendi içinde kontrollü olarak tedavi öncesi, tedavinin 3. gününde ve 6. ayında alınan örneklerde serum NO düzeyi ve ADA aktivitesi saptandı. Ölçümler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

Çalışma öncesinde Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurulu'ndan bu klinik araştırmanın yapılmasının uygunluğuna dair onay alındı ve bütün hastalara Helsinki bildirgesinde belirtildiği gibi kendilerine yapılacak işlemler ve çalışma ile ilgili gerekli bilgiler verildi.

#### 3.2 TİP 2 DM'Lİ HASTALARIN SEÇİMİ

Çalışmaya Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Polikliniğine ayaktan başvuran, Amerikan Diyabet Birliği'nin 2004'te önerdiği DM tanı kriterleri esas alınarak, açlık plazma glukozu ölçümü ya da oral glukoz tolerans testi sonucuna göre Tip 2 DM tanısıyla izlenen, DM süreleri 4-32 yıl arasında olan, oral antidiyabetik kullanan ve oral antidiyabetik kullanımıyla iyi metabolik kontrol sağlanamayan 48 hasta dahil edildi.

Aşağıdaki kriterler çalışma dışı bırakılma nedeni olarak kabul edildi:

- İnsülin tedavisine geçmiş olan hastalar
- Düzenli ilaç kullanımı öyküsü olmayanlar
- Diyabetojenik ilaç kullananlar (glukokortikoidler, diüretikler, beta blokerler)
- Cerrahi girişim, akut miyokard infarktüsü gibi medikal stres faktörünün bulunduğu hastalar

-Hipertiroidizm, karaciğer ve böbrek yetersizliği, infeksiyon gibi eşlik eden sistemik hastalığı olanlar

-Alkol kullanım öyküsü olanlar

-Gebelik veya laktasyon döneminde olanlar

-Sülfonilürelere primer yanıtız olgular.

Yirmidört hafta süreyle izlenen hastalardan bu kriterleri taşıyan 24 hasta çalışma dışı bırakıldı. 26-75 yaşları arasında (ortanca; 25-75. yüzdellikler, 57; 52.3-64.3), 17'si kadın, 7'si erkek olmak üzere toplam 24 hasta çalışmaya dahil edildi. Hastalara ilk üç gün infüzyonla insülin tedavisi uygulanarak plazma glukozları 150 mg/dL'nin altında tutuldu. Daha sonra multipl subkutan insülin tedavisi ile devam edildi.

Bu çalışma süresince hastalar önceki diyet ve egzersiz programlarına devam ettiler. Hastalar ilk bir ay 2 haftada, daha sonra 4 haftada bir olmak üzere 6 ay süreyle kontrollere geldiler.

### 3.3 KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI VE SAKLANMASI

Hastalar şikayetleri, öyküleri alınıp fizik muayeneleri yapıldıktan sonra rutin biyokimya, tam kan sayımı, tam idrar tetkiki, elektrokardiyografi ve akciğer grafisi ile takip edilmişlerdi. Hastalardan NO ve ADA ölçümleri için kan örnekleri tedavi öncesi, üç günlük insülin infüzyon tedavisi ve altı aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrası olmak üzere toplam üç kez alındı. Bütün örnekler alınırken test sonuçlarının etkilenmemesi için kan verecekleri günün öncesinde ağır egzersiz yapmamaları, sigara veya alkol tüketmemeleri ve akşam yemeğinden sonra bir şey yememeleri önerildi. Sabah saat 8.00-10.00 arası hastaların antekubital venlerinden, oturur pozisyonda 19 G kelebekle plastik enjektöre 5 mL kan örnekleri alındı ve düz tüplere aktarıldı. Alınan kanın pıhtılaşması için oda ısısında 30 dakika bekletildi. Tüpler 3000 rpm'de 10 dak 10-18 °C'da santrifüj edilerek elde edilen serum ependorf tüplerine konuldu ve -80 °C'da analiz zamanına kadar saklandı.

### 3.4 ÖRNEKLERİN ÇALIŞMAYA UYGUNLUĞU VE HAZIRLANMASI

Venöz kandan elde edilen serum veya plazma, idrar örnekleri ve kültür ortamı NO ölçümü için uygundur. Uzun süre saklamak gerekiyorsa  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da veya daha aşağısında saklanması gereğine, örneklerin bir defadan fazla dondurulup çözülmemesine, belirgin hemoliz veya lipemi bulunmamasına dikkat edildi. Çalışma öncesinde dondurulmuş örneklerin oda ısısında çözünmesi beklendi. NO analizi için kullanılan örnekler çözüldükten sonra 13.000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.

### 3.5 KULLANILAN GEREÇ VE CİHAZLAR

- Çeşitli ayarlanabilir otomatik pipet (Socorex, İsveç)
- Cam pipetler ve çeşitli cam malzemeler
- Ependorf tüpler
- Santrifüj (NF 800 R, masaüstü santrifüj, Nüve, Türkiye)
- Mikroplak sallayıcısı (Vibramax 100, Heidolgh Ins., Almanya)
- Mikroplak okuyucu (ELx 800 Universal Microplate Reader, Bio-Tek, ABD)
- Spektrofotometre (UV-1601 Shimadzu, Japonya)
- Karıştırıcı (VF2, Janke Kunkel, İKA Labortechnik, Almanya)
- Benmari (BM 402, Nüve, Türkiye)
- Hassas terazi (Sartorius-Basic)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ikamag RH, Janke Kunkel, İKA Labortechnik, Almanya)
- pH metre (Hanna instrument 8521, İtalya)

### 3.6 KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- Adenozin hemisülfat tuzu ( $C_{10}H_{13}N_5O_4 \cdot 1/2H_2SO_4$ , A 7636, Sigma, ABD).
- Amonyum sülfat  $((NH_4)_2SO_4$ , A675017, Merck, Almanya)
- Potasyum dihidrojen fosfat ( $KH_2PO_4$ , 60230, Fluka Chemica, İsveç)
- Disodyum hidrojen fosfat dihidrat ( $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ , 1.06580, Merck, Almanya).
- Fenol ( $C_6H_6O$ , 16017, Riedel-deHaën, İsveç)
- Sodyum Nitroprussid ( $Na_2(Fe[CN]_5NO) \cdot 2H_2O$ , 826 K4688340, Merck, Almanya)
- Sodyum hidroksit ( $NaOH$ , 1.06462, Merck, Almanya).
- Sodyum hipoklorit ( $NaOCl$ , teknik sodyum hipoklorit)

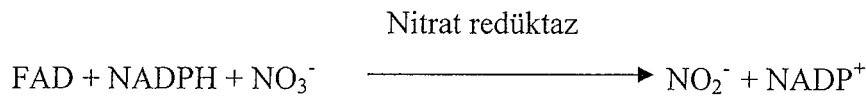
### 3.7 YÖNTEMLER

#### 3.7.1 NİTRİK OKSİT ÖLÇÜMÜ

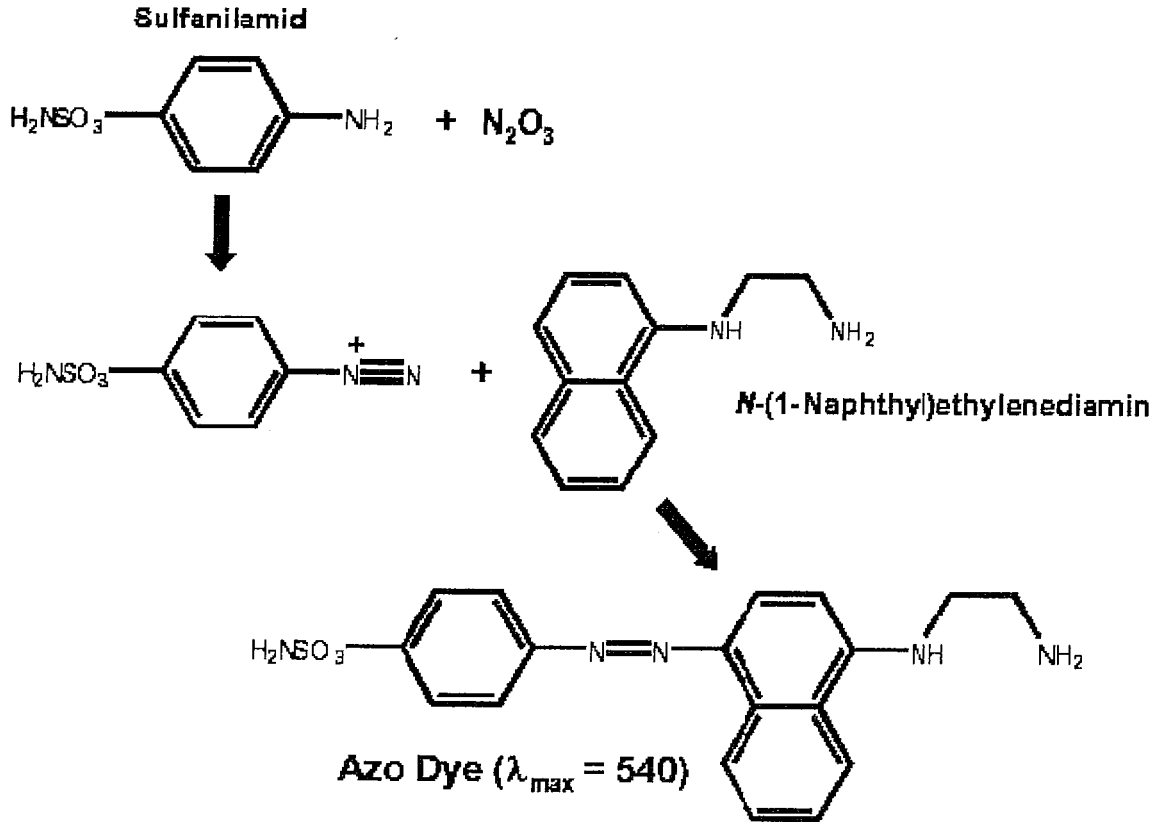
Serum NO düzeyleri ticari enzimatik, kolorimetrik iki basamaklı nitrat-nitrit analiz reaktifleri üreticinin önerilerine uygun şekilde kullanılarak saptandı (Nitrate/Nitrite colorimetric assay kit, Cayman Chemical Co, Ann Arbor, MI, ABD).

Test Prensipleri:

İlk basamakta örneğe nitrat redüktaz ve reaksiyon için gerekli koenzimler eklenerek örnek içindeki nitratın nitrite dönüşümü sağlanır.



İkinci basamakta sülfanilamid ile örnekte bulunan nitritin reaksiyonu sonucu diazonyum iyonları meydana gelir. Diazonyum iyonlarının N-(naftil)etilendiamin ile oluşturduğu renkli azo ürünleri spektrofotometrik olarak 540 nm'de ölçülür.



### 3.7.1.1 Reaktiflerin Saklanması ve Test Öncesi Hazırlayıcı İşlemler

NO test reaktifleri mikropaklar üreticinin önerilerine uygun olarak sırası ile -20 °C'da ve 2-8 °C'da, nemden korunarak çalışma tarihine kadar saklandı.

#### 3.7.1.1.1 Çalışma Tamponunun Hazırlanması

Çalışma tamponu hazırlamak için şişe içeriği 100 mL HPLC derecesinde su ile seyreltildi. Bu tampon liyofilize formda olan diğer reaktiflerin hazırlanması, standart ve örneklerin dilüsyonu için kullanıldı. +4°C'da saklandı.

#### 3.7.1.1.2 NO Standartları

Total NO ölçümü için nitrat standardı kullanıldı. Liyofilize toz 1.0 mL çalışma tamponu ile sulandırılarak hazırlandı. Sulandırılmış standartlar +4°C'da saklandı

(Hazırlandıktan sonra +4°C'da 4 ay stabildir). Çalışma yapılacağı gün stok standart solüsyonundan 0.1 mL, çalışma tamponundan ise 0.9 mL alınarak çalışma standardı hazırlandı.

#### 3.7.1.1.3. Nitrat Redüktaz

Şişe içeriği 1.2 mL çalışma tamponuyla sulandırıldı ve kullanım sırasında buz üzerinde tutuldu, kullanımda değilken -20 °C'da saklandı.

#### 3.7.1.1.4 Enzim Kofaktörü

Şişe içeriği 1.2 mL çalışma tamponuyla sulandırıldı ve kullanım sırasında buz üzerinde tutuldu, kullanımda değilken -20 °C'da saklandı.

#### 3.7.1.1.5 Griess Reaktifi 1 ve 2

Griess 1 reaktifi sülfanilamid, Griess 2 reaktifi ise N-(1-Naftil) etilendiamin içeren kullanıma hazır solüsyonlardı. +4°C'da saklandı.

#### 3.7.1.2 Testin Uygulanışı

Ölçüm yapılırken standartlar ve serum örnekleri, 96 kuyucuklu mikropipler kullanılarak aynı seride çalışıldı. 7 adet nitrat standardı ve 1/2 oranında seyreltilmiş serum örnekleri kuyucuklara konuldu. Kör ve standartlar çift olarak çalışıldı. Üzerine enzim kofaktörleri ve nitrat redüktaz eklenip nitratın nitrite tamamen dönüşmesi için 3 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Birinci inkübasyondan sonra sülfanilamid içeren Griess reaktifi 1 ve ardından N-(1-Naftil) etilendiamin içeren Griess reaktifi 2 seri bir şekilde eklenerek 10 dakikalık ikinci inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon bitiminde substratın enzimatik yıkımının derecesi 540 nm dalga boyunda mikropipler okuyucuda absorbans ölçümüyle tespit edildi. Ölçülen absorbans, serumdaki NO konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. NO standartları ile çizilen standart eğri grafiğinden, çalışılan örneklerin NO konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.7.1.3 Testin Analitik Performansı

İnterferanslar: Alkil aminler, çoğu şekerler, lipitler veya tiyol grubu içermeyen amino asitlerle etkileşim bildirilmemiştir. Büyük miktarda antioksidanlar renk oluşumu reaksiyonunu etkileyebileceği, azid, askorbik asit, ditiotreitol ve merkaptolanolün ise 100  $\mu\text{M}$  kadar düşük konsantrasyonlarda olduğunda renk oluşumu ile girişim meydana getirebileceği bildirilmiştir. 50 mM'dan daha büyük fosfat konsantrasyonlarının nitratın nitrite dönüşüm reaksiyonunu etkileyebileceği belirtilmiştir.

Duyarlılık: Nitrat analizi için maksimum örnek miktarı (80  $\mu\text{L}$ ) kullanıldığında testin, en düşük ölçüm sınırı 2.5  $\mu\text{M}$ 'dır. Plazma örnekleri  $\frac{1}{2}$  oranında seyreltildiği için bu sınır daha da yüksektir. 35  $\mu\text{M}$  konsantrasyona kadar lineer okuma yapılabilir.

### 3.7.1.4 NO Ölçüm Basamakları

Bütün kitler ve örneklerin sıcaklığının oda ısısına gelmesi beklendi. Çalışma öncesi santrifüj edilmiş örneklerin alt-üst edilerek karıştırılmamasına dikkat edildi. Mikroplakta kullanılacak mikropalak kuyucukları işaretlenerek kör, standart ve örneklerin hangi kuyucuklara konulacağı önceden belirlendi.

Ölçüm basamakları şu şekildedir:

1. Kör kuyucuklarına 200  $\mu\text{L}$  su konuldu, bu kuyucuklara çalışma süresince diğer reaktiflerden herhangi biri eklenmedi.
2. Standart kuyucuklarına sırasıyla 80, 75, 70, 65, 60, 55, 50 ve 45, örnek kuyucuklarına ise 40'ar  $\mu\text{L}$  çalışma tamponu eklendi.
3. Çalışma standardından standart kuyucuklarına sırasıyla 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35  $\mu\text{L}$  eklenerek hacim 80  $\mu\text{L}$  olacak şekilde 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35  $\mu\text{M}$ 'lık nitrat standartları oluşturuldu.
4. Örnek kuyucuklarına 40  $\mu\text{L}$  serum örneği eklenerek hacim 80  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı.
5. Yarı otomatik bir pipet ile enzim kofaktöründen standart ve örnek kuyucuklarına 10'ar  $\mu\text{L}$  eklendi.

6. Nitrat Redüktaz karışımından standart ve örnek kuyucuklarına 10'ar  $\mu\text{L}$  eklendi ve mikropalak kapak ile kapatıldı. Pipetleme işlemlerinde hacimler çok küçük olduğu için pipet uçları standart ve örnek kuyucuklarında yıkanarak her defasında değiştirildi.
7. Reaksiyonun daha iyi oluşabilmesi için mikropalak, 30 dakikası mikropalak sallayıcıda, 300 rpm'de olmak üzere, toplam 3 saat oda ısısında inkübe edildi.
8. Standart ve örnek kuyucuklarına 50  $\mu\text{L}$  Griess reaktifi 1 eklendi.
9. Hızlı bir şekilde standart ve örnek kuyucuklarına 50  $\mu\text{L}$  Griess reaktifi 2 eklendi ve 10 dakika tekrar inkübe edildi.
10. Mikropalak kuyucuklarındaki çözeltinin absorbansı, mikropalak okuyucu ile 540 nm dalga boyunda okundu.

#### 3.7.1.5 Hesaplama

Standart ve örneklerin absorbansları suya karşı okundu. Standart konsantrasyonları ve absorbansı arasındaki lineer ilişki grafik çizilerek saptandı.  $\frac{1}{2}$  oranında seyreltilmiş olan örneklerin absorbansı standart absorbans-konsantrasyon grafiğinden saptanan faktörle çarpıldıktan sonra seyreltme faktörü ile düzeltilerek konsantrasyonları hesaplandı.

### 3.7.2 ADENOZİN DEAMİNAZ ÖLÇÜMÜ

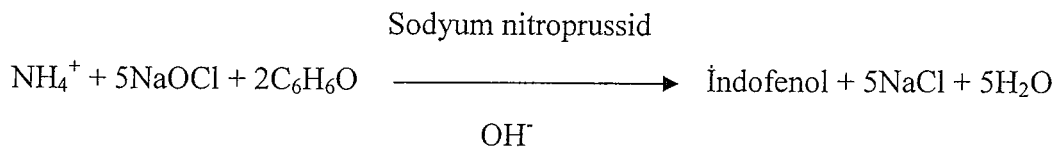
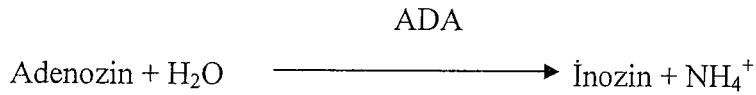
ilhan ve ark. ile Erel ve ark.'nın çalışmalarında kullandıkları Modifiye Bertholet yöntemi olarak da bilinen Giusti yöntemiyle kolorimetrik olarak çalışıldı (93, 94).

#### 3.7.2.1 Prensip

Giusti yöntemi, ADA aktivitesi ölçümü için substrat olarak adenzin kullanılarak elde edilen amonyum iyonunun sodyum hipoklorit ve fenol/nitroprussid ile birlikte alkali solüsyonda koyu mavi renkli indofenol oluşturması ilkesine dayanan Bertholet yönteminin modifiye şekli olarak tanımlanmıştır. Sodyum nitroprussid katalizör olarak kullanılmış ve  $\text{NH}_4^+$  konsantrasyonunun değişimiyle orantılı olarak indofenol oluşumu (mavi rengin şiddeti) da değişmiştir.



Bu çalışmada, adenzin yerine adenzin hemisülfat kullanılmış ve ürün olarak inozin ve amonyum sülfat oluşmuştur.



### 3.7.2.3 ADA Ölçümü İçin Gerekli Çözeltiler

- Substrat çözeltisi: %0.379'luk adenzin hemisülfat çözeltisi
- Fosfat tamponu: pH 6.5, 0.1 M potasyum dihidrojen fosfat ve disodyum hidrojen fosfat dihidrat tamponu
- Fenol çözeltisi: 0.106 M fenol ve 0.168 mM sodyum nitroprussid çözeltisi
- Alkali hipoklorit çözeltisi: 1 M sodyum hidroksit ve 0.11 M sodyum hipoklorit çözeltisi
- Stok standart solüsyon: 15 mM amonyum sülfat  $(\text{NH}_3)_2\text{SO}_4$  çözeltisi
- Çalışma standardı: 75  $\mu\text{M}$  amonyum sülfat çözeltisi

### 3.7.2.4 Çözeltilerin hazırlanması

#### 3.7.2.4.1 Substrat çözeltisi hazırlanması

Substrat olarak Adenzin hemisülfat tuzu kullanıldı. 0.0379 g Adenzin Hemisülfat tuzu fosfat tamponu ile 10 mL'ye tamamlandı, çözünmenin gerçekleşmesi için ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırıldı. Substrat her çalışmadan önce taze olarak hazırlandı.

#### 3.7.2.4.2 Fosfat tamponunun hazırlanması

Fosfat tamponu için 6.8 g potasyum dihidrojen fosfat ve 8.89 g disodyum hidrojen fosfat dihidrat tartıldı ve distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. konsantre HCl ve doymuş

NaOH çözeltileri kullanılarak tampon pH'sı 6.5'a ayarlandı. Fosfat tamponu +4°C'da saklandı.

#### 3.7.2.4.3 Fenol Çözeltisinin Hazırlanması

5 g fenol ve 0.025 g Sodyum Nitroprussid tartılarak distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. +4°C'da saklandı.

#### 3.7.2.4.4 Alkali-Hipoklorit Çözeltisinin Hazırlanması

62.5 mL 1 N sodyum hidroksit ve 8.2 mL sodyum hipoklorit distile su ile 500 mL'ye tamamlandı. +4°C'da saklandı.

#### 3.7.2.4.5 Stok standart solüsyonun hazırlanması

15 mM'lık stok standart çözeltisi hazırlamak için 0.198 g amonyum sülfat tartılır 100 mL'ye distile suyla tamamlanır.

#### 3.7.2.4.6 Çalışma Standardının Hazırlanması

15 mM'lık amonyum sülfat stok solüsyondan 75 µM çalışma standardı hazırlamak için 0.25 mL amonyum sülfat stok solüsyon 50 mL fosfat tamponu içerisinde eritilir.

#### 3.7.2.5 Deneyin Yapılışı

Fosfat tamponu, substrat çözeltisi ve örneklerin absorbansının elimine edilmesi için kullanılan çeşitli kör tüpleri ile örnek tüplerinin bileşenleri Tablo 4'te görülmektedir.

Tablo 4. Ayıraç körü, substrat körü, örnek körü, örnek ve standart tüplerinin içerikleri

	Ayıraç körü	Substrat körü	Örnek körü	Örnek	Standart
Fosfat tamponu (mL)	0.95	-	0.95	-	-
Substrat (mL)	-	0.95	-	0.95	-
Örnek (mL)	-	-	0.05	0.05	-
Standart (mL)	-	-	-	-	0.95
Distile su (mL)	0.05	0.05	-	-	0.05

Tablo 4’te belirtildiği şekilde deney tüplerine sırasıyla çözeltiler eklendi, tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı ve vorteks ile karıştırıldıktan sonra 37°C benmaride 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde tüplerin hepsine sırası ile 3’er mL fenol çözeltisi ve 3’er mL alkali hipoklorit çözeltisi eklendi. Tüpler vorteksle karıştırıldı, ağzı kapatıldı ve 37°C’da 15 dakikalık ikinci inkübasyonun ardından oluşan ürünün absorbansı, 625 nm dalga boyunda değerlendirildi.

### 3.7.2.6 Enzim aktivitesinin hesaplanması

$\Delta A_{\text{standart}} (A) = A_{\text{standart}} - A_{\text{ayıraç körü}}$

$\Delta A_{\text{ör}} (B) = A_{\text{ör}} - A_{\text{örnek körü}}$

$\Delta A_{\text{kör}} (C) = A_{\text{substrat körü}} - A_{\text{ayıraç körü}}$

ADA aktivitesi (U/L) =  $[(B-C)/A] \times \text{kalibrasyon faktörü}$

(Kimyasal formülde amonyum iki mol olduğu için standart konsantrasyonu 2 ile çapılır).

Kalibrasyon faktörü =  $[(\text{toplam hacim}/\text{örnek hacmi}) \times \text{standart kons.}] / \text{inkübasyon süresi}$

Kalibrasyon faktörü =  $[(1/0.05) \times (75 \times 2)] / 60$

Kalibrasyon faktörü = 50

Sonuçlar U/L olarak rapor edildi.

## 3.8 DİĞER VERİLERİN ELDESİ

Tam kanda beyaz küre sayısı, mutlak lenfosit sayısı, eritrosit sedimentasyon hızı (ESR) ve arteryel tansiyon ile ilgili veriler hastaların dosyalarından retrospektif olarak temin edildi.

## 3.9 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Verilerin kaydı ve istatistiksel analizlerde; SPSS 10.0 (SPSS Inc.) istatistik programı kullanıldı. Sonuçlar ortanca, 25 ve 75. yüzdeler şeklinde verildi. Tedavi gruplarının karşılaştırılmasında bağımlı gruplarda iki ortalama arasındaki farkın önemliliği testi uygulandı. Verilerin kendi arasındaki korelasyonlar Spearman’s rho korelasyon analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde 0.05’den küçük p değeri anlamlı olarak kabul edildi.

#### 4- BULGULAR

Bu çalışmaya, tip 2 DM tanısıyla izlenen sekonder sülfonilüre yanıtızlığı gelişmiş 26-75 yaş arası (ortanca; 25.-75. yüzdellikler, 61; 54-65 yıl) 17 kadın, 7 erkek olmak üzere toplam 24 hasta dahil edildi. Hastaların 18'inin hipertansif olduğu saptandı. Hastaların demografik verileri Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. Çalışma grubunun demografik verileri (ortanca: 25.-75. yüzdellikler)

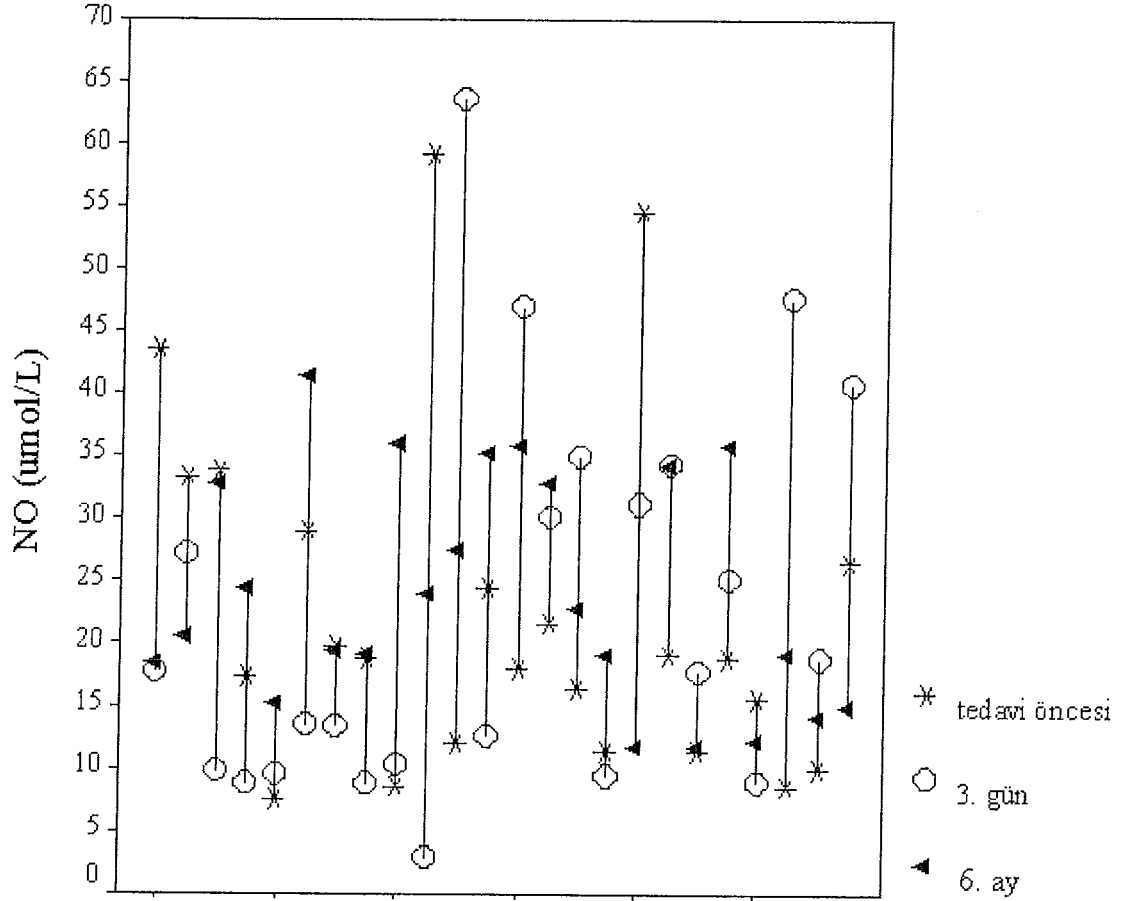
	Tip 2 DM'li hastalar n: 24
Yaş (yıl)	61 (54-65)
Cinsiyet	17K/ 7E
Diastolik kan basıncı (mmHg)	90 (70-90)
Sistolik kan basıncı (mmHg)	150 (140-165)

Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızlığı gelişmiş hastalarda, tedavi öncesi, üç gün infüzyonla insülin tedavisi sonrası ve 6 ay multipl supkutan insülin tedavisi sonrası alınan örneklerde saptanan NO düzeyleri Tablo 6, Şekil 13, 14 ve 15'de gösterilmiştir.

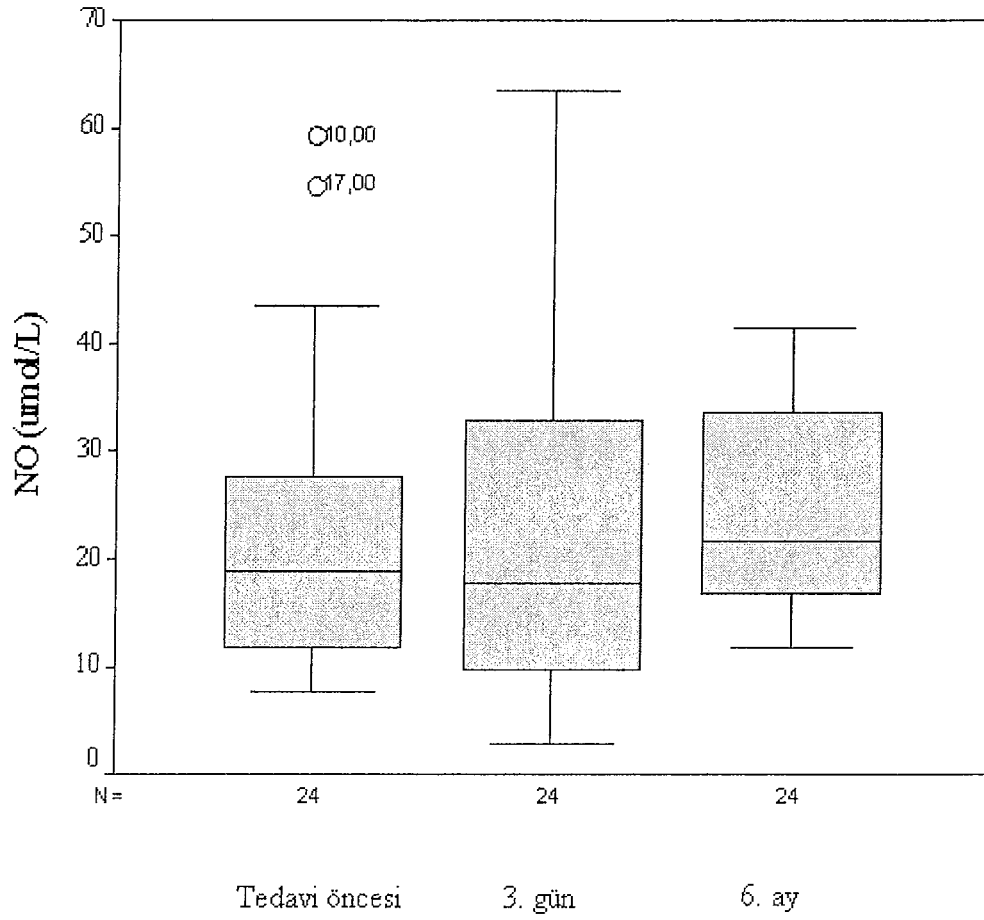
Tablo 6. Çalışma grubunda tedavinin farklı aşamalarında saptanan NO düzeyleri (ortanca: 25.-75. yüzdellikler)

	Tedavi öncesi n: 24	3. gün n: 24	6. ay n: 24	p
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	18.8 (11.6-28.4)	17.8 (9.7-33.6)	21.7 (16.0-33.9)	>0.05

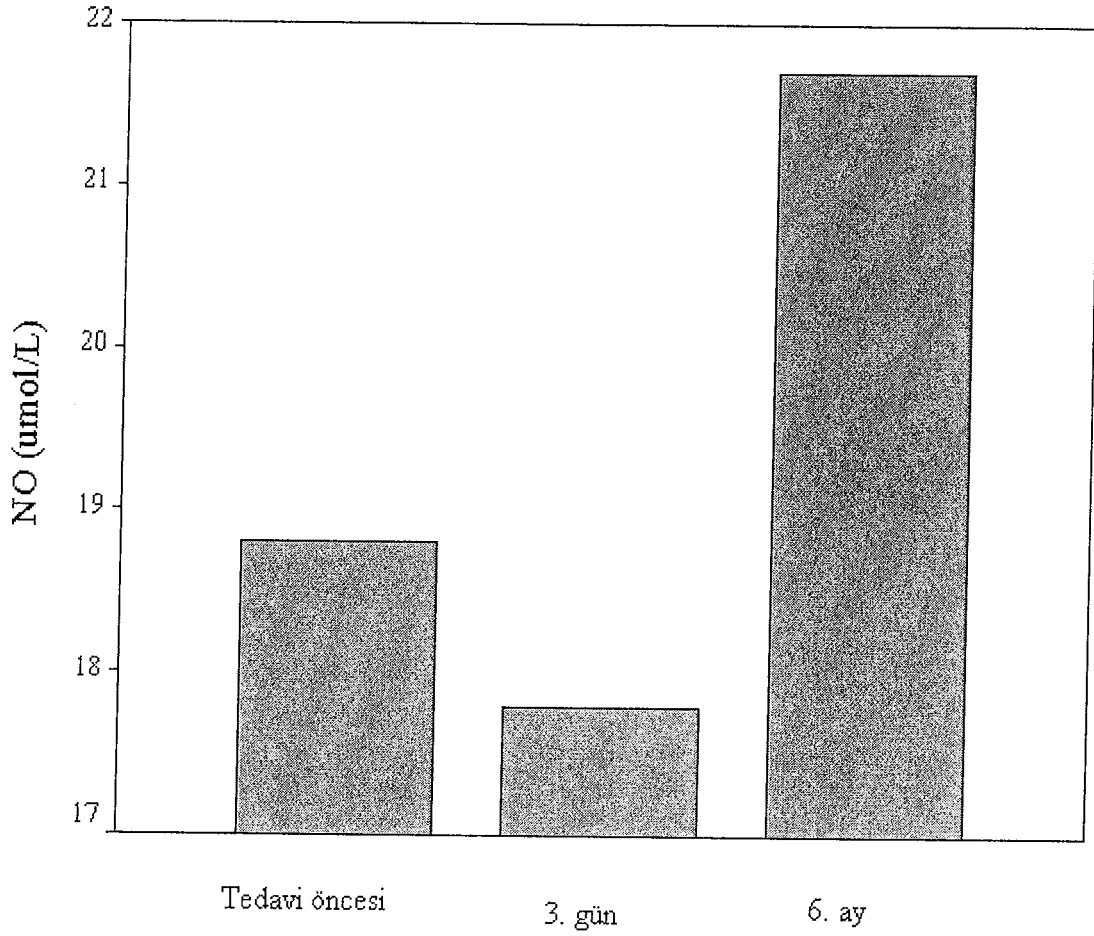
Hastaların insülin tedavisi öncesi NO düzeyleri 18.8 (11.6-28.4)  $\mu\text{mol/L}$ , 3 günlük insülin infüzyonu sonrası 17.8 (9.7-33.6)  $\mu\text{mol/L}$  ve 6 aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrası 21.7 (16.0-33.9)  $\mu\text{mol/L}$  olarak saptanmıştır. Tedavinin farklı dönemlerindeki NO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemektedir ( $p>0.05$ ).



Şekil 13. Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisinin çeşitli aşamalarında saptanan NO düzeyleri her birey için ayrı noktalar halinde görülmektedir.



Şekil 14. Tip 2 DM’li sekonder sülfonilüre yanıtıslığı olgularında tedavi öncesi, tedavinin üçüncü günü ve altıncı ayındaki NO düzeyleri. Orta hattaki yatay çizgiler ortancayı, dikdörtgenin alt ve üst kenarları 25. ve 75. yüzdelikleri, dikey çizgiler en küçük ve en büyük değerleri temsil etmektedir. Uç değerler ayrı noktalar halinde verilmiş ve örnek numaraları gösterilmiştir.



Şekil 15. Tip 2 DM’li hastalarda tedavi öncesi, tedavinin 3. günü ve 6. ayında saptanan NO (ortanca) düzeyleri görülmektedir.

Tedavi öncesi dönemde saptanan NO düzeyleri ile sistolik ve diastolik kan basıncı arasında bir korelasyon olasılığı Spearman rho korelasyon analizi ile araştırılmış ve anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 7).

Tablo 7. Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi NO düzeyi ile sistolik ve diastolik kan basıncı arasındaki korelasyonlar

	Sistolik KB (mmHg)	Diastolik KB (mmHg)
NO ( $\mu\text{mol/L}$ )	r: 0.278 p: 0.381	r: 0.317 p: 0.342

Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtı zıllığı gelişmiş hastalarda retrospektif olarak hasta dosyalarından sağlanan, periferik kanda total beyaz küre sayısı, mutlak lenfosit sayısı ve ESR Tablo 8'de sunulmuştur.

Tablo 8. Tip 2 DM'li hastalarda beyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR (ortanca: 25.-75. yüzdellikler)

	Tip 2 DM'li hastalar n: 24
Beyaz küre / $\mu\text{L}$	9120 (6135-10570)
Lenfosit/ $\mu\text{L}$	2220 (1335-3140)
ESR mm/saat	8 (3-36.5)

Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi saptanan NO düzeyleri ile beyaz küre sayısı ve ESR arasında bir korelasyon olasılığı Spearman rho korelasyon analizi ile araştırılmış ve anlamlı bir ilişki saptanmamıştır ( $p>0.05$ ) (Tablo 9).



Tablo 9. Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi NO düzeyinin beyaz küre sayısı ve ESR ile korelasyonu

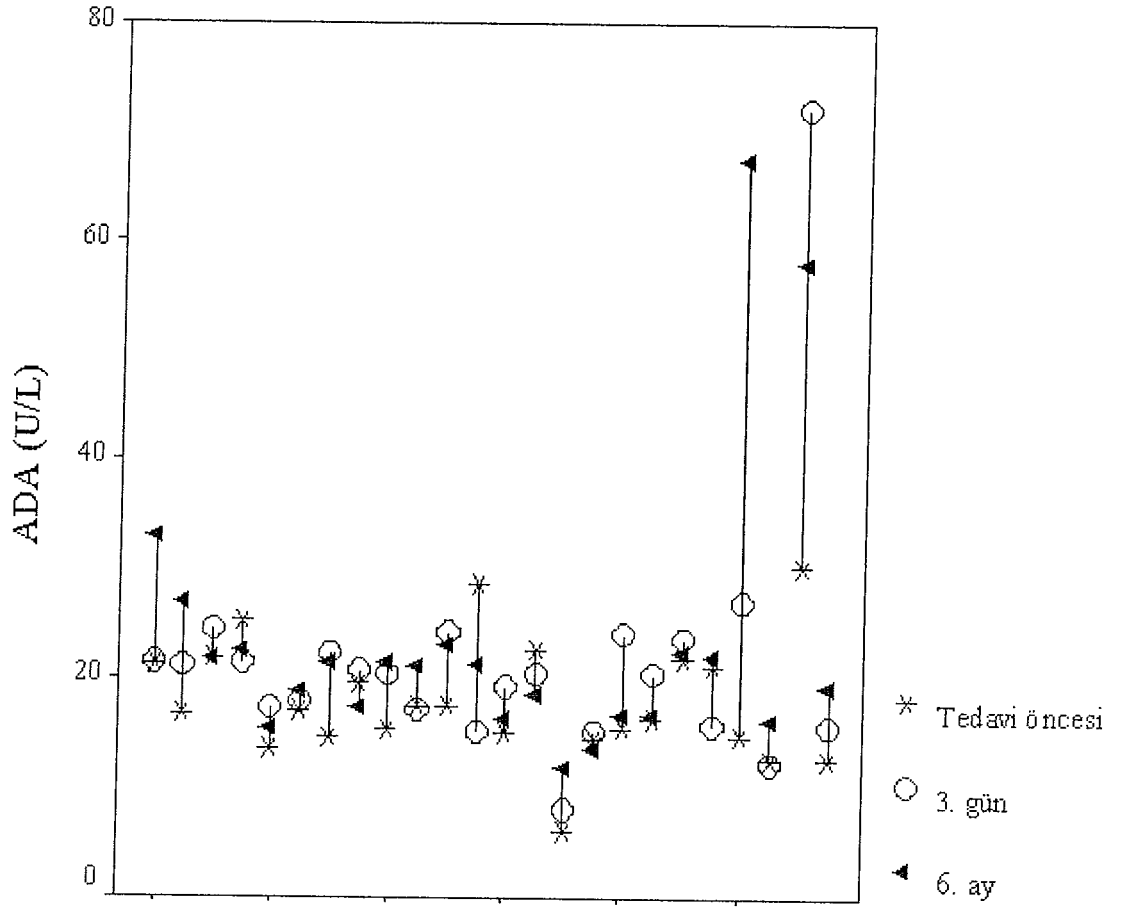
	Beyaz küre hücre/ $\mu$ L	ESR mm/saat
NO ( $\mu$ mol/L)	r: 0.347 p: 0.123	r: -0.077 p: 0.778

Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtı zı zlığı gelişmiş hastalarda, tedavi öncesi, üç gün infüzyonla insülin tedavisi sonrası ve 6 ay multipl supkutan insülin tedavisi sonrası alınan örneklerde saptanan ADA aktivitesi Tablo 9, Şekil 16, 17 ve 18'de gösterilmiştir.

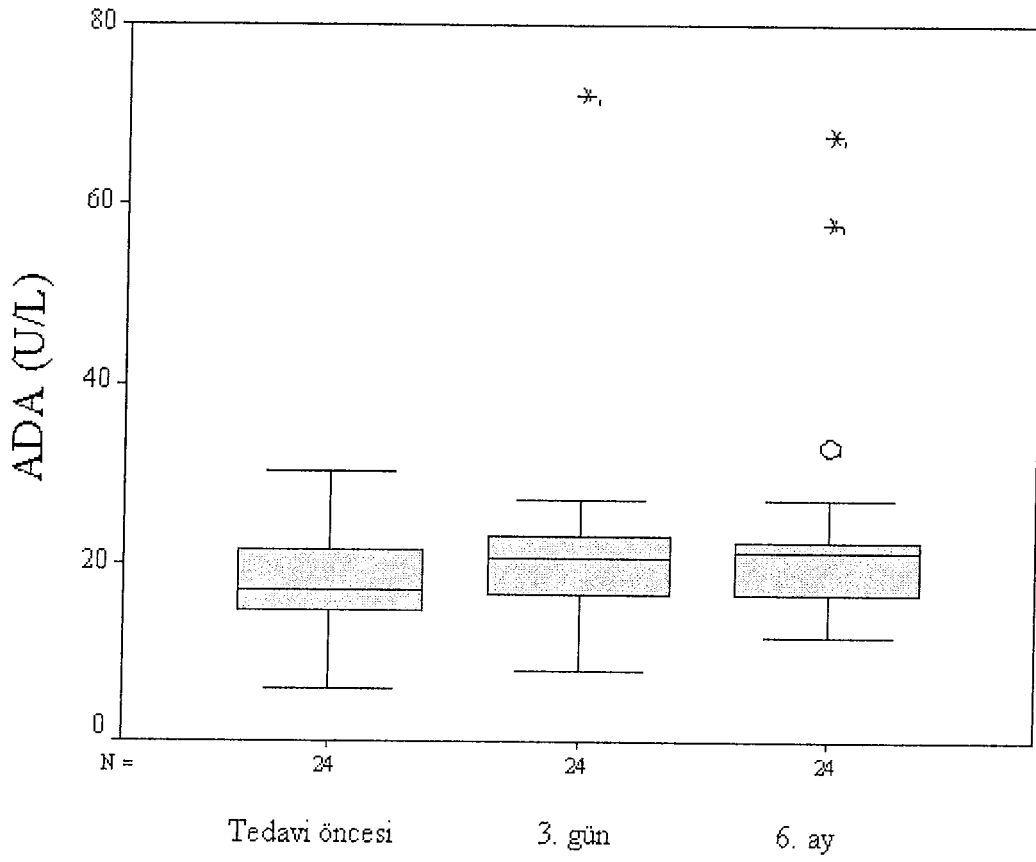
Tablo 10. Çalışma grubunda tedavinin farklı aşamalarında saptanan ADA aktivitesi (ortanca: 25.-75. yüzdelikler)

	Tedavi öncesi n:24	3. gün n:24	6. ay n:24	p
ADA (U/L)	17.0 (14.6-21.7)	20.5 (16.2-23.4)	21.2 (16.6-22.5)	<0.05

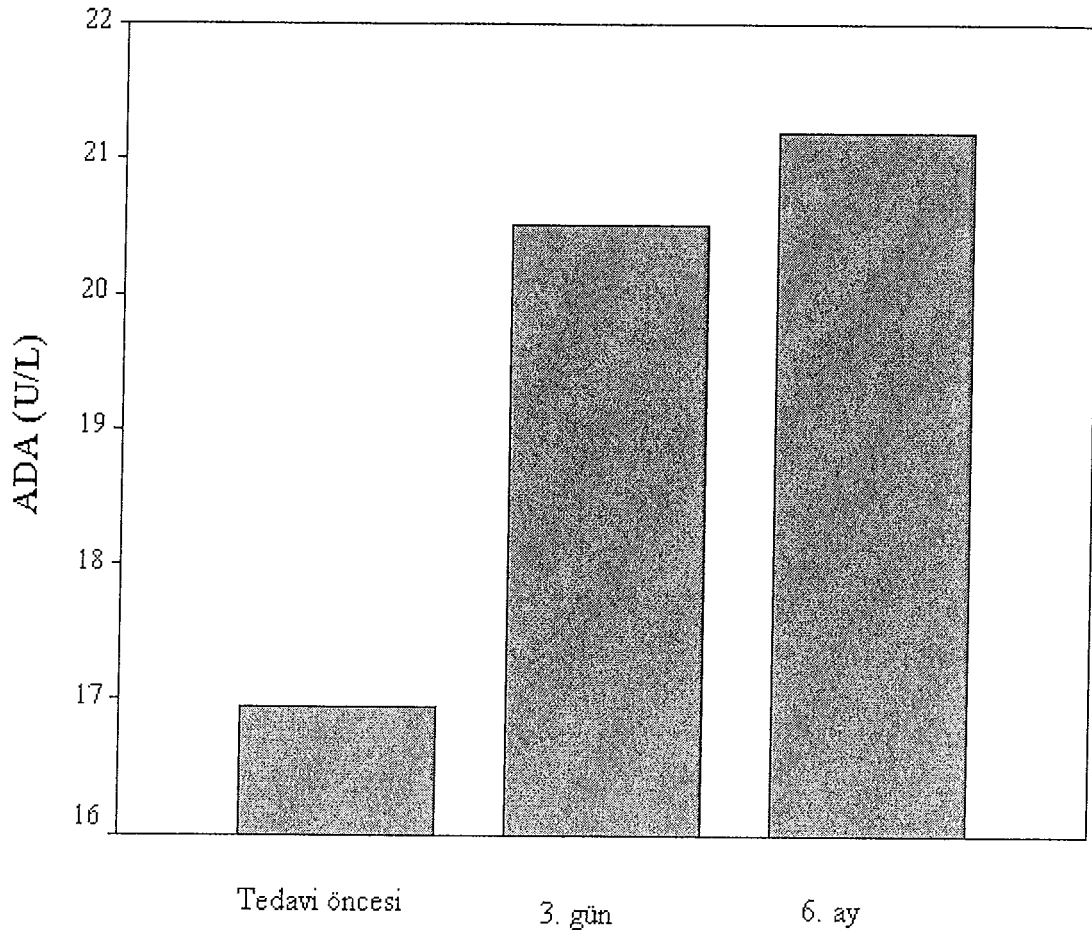
Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtı zı zlığı gelişmiş hastalarda ADA aktivitesi (ortanca:25.-75. yüzdelikler) insülin tedavisi öncesinde (17.0: 14.6-21.7 U/L), 3 günlük insülin infüzyonu sonrası (20.5: 16.2-23.4 U/L) ve 6 aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrasına göre (21.2: 16.6-22.5 U/L) anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırası ile  $p<0.018$ ,  $p<0.010$ ). Tedavinin 3. günü ile 6. ayında saptanan ADA aktiviteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ).



Şekil 16. Tip 2 DM'li sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisinin çeşitli aşamalarında saptanan ADA aktivitesi her birey için ayrı noktalar halinde görülmektedir.



Şekil 17. Tip 2 DM’li sekonder şülfonilüre yanıtıslığı olgularında tedavi öncesi, tedavinin üçüncü günü ve üçüncü ayındaki ADA aktivitesi. Orta hattaki yatay çizgiler ortancayı, dikdörtgenin alt ve üst kenarları 25. ve 75. yüzdellikleri, dikey çizgiler en küçük ve en büyük değerleri temsil etmektedir. Uç değerler ayrı noktalar halinde gösterilmiştir.



Şekil 18. Tip 2 DM’li hastalarda tedavi öncesi, tedavinin 3. günü ve 6. ayında saptanan ADA aktivitesi (ortanca) görülmektedir.

Tip 2 DM’li sekonder sülfonilüre yanıtı zıllığı gelişmiş hastalarda retrospektif olarak hasta dosyalarından sağlanan periferik kanda toplam beyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR’nin tedavi öncesi alınan örneklerde saptanan ADA aktivitesi ile olası korelasyonları değerlendirilmiş ve anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Tip 2 DM'li hastalarda tedavi öncesi ADA düzeylerinin periferik kanda beyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR ile korelasyonları

	Beyaz küre sayısı (hücre/ $\mu$ L)	Lenfosit sayısı (hücre/ $\mu$ L)	ESR (mmHg)
ADA (U/L)	r: 0.008 p: 0.973	r: 0.081 p: 0.742	r: 0.080 p: 0.770

## 5- TARTIŞMA

Sekonder sülfonilüre yanıtıslığı sülfonilüre tedavisi alan hastalarda her yıl %5-10 oranında ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda alternatif tedaviler denenerek, gerekli görüldüğünde oral antidiyabetik kombinasyonlarına başvurulmaktadır. Bu yöntemlerle hipergliseminin etkin şekilde kontrolü sağlanamadığında ise insülin tedavisine geçilmektedir (33). Sekonder sülfonilüre yanıtıslığı alternatif oral antidiyabetik tedavi seçeneklerinden daha etkin olması ve insülin tedavisine göre hasta için daha kolay uygulanabilir olmasının yanı sıra beta hücre işlev ve/veya kütesinin azalmasının bir belirteci olarak da önem taşımaktadır (5, 33).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sekonder sülfonilüre yanıtıslığı olgularında yoğun insülin tedavisinin geçici uygulaması ile beta hücre fonksiyonlarının kısmen geri kazanılabildiğini göstermektedir (5, 95). Yapılan araştırmalarda sekonder sülfonilüre yanıtıslığı olgularında yoğun insülin tedavisi sonrasında hastaların ekzojen insülin gereksiniminde azalma ve insülin direncinde düşme belirlenmiştir (96).

Tiryaki yaptığı çalışmada 3 günlük insülin infüzyonu ve 6 aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrasında hastaların ekzojen insülin gereksiniminde azalma ve insülin direncinde düşme ile birlikte proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1 $\beta$  ve akut faz reaktanı olan C reaktif proteinin sistemik düzeylerinde anlamlı bir düşme saptamışlardır (96). Dupuy ve ark. hiperglisemisi kontrol altına alınamayan tip 2 diyabetik hastalara üç gün süreyle insülin infüzyon tedavisi sonrası multipl subkutan insülin tedavisi uygulamış ve 250 hastayı ortalama 3.5 yıl takip etmişlerdir. Bu hastaların %45'inde oral antidiyabetik ajanlarla glisemi kontrolünün yeniden sağlanabildiği görülmüştür (95). Bu çalışmalar sekonder sülfonilüre yanıtıslığının patogeneğinde yangının rolü olabileceğini ve insülin tedavisi ile en azından bazı hastalarda bu sürecin yavaşlatılabileceğini veya kısmen geri döndürülebileceğini göstermektedir. Pankreas adacık beta hücrelerinde normal koşullarda iNOS ifadesine rastlanılmazken TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  gibi proinflamatuvar sitokine maruz

kalma sonrası büyük miktarda ifade edilmektedir (54). Ayrıca pankreas adacıklarında meydana gelen lokal inflamatuvar olay ve kemotaksis sonrasında göç eden monosit ve nötrofillerde de iNOS'nun indüksiyonu ile NO'nun sitotoksik etkiler gösterdiği nM konsantrasyonlara ulaşabilmektedir (41).

Sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında apoptoz artışı beta hücre kütlelerinde azalmaya yol açtığı bilinen bir diğer mekanizmadır. Proinflamatuvar sitokinler, hiperglisemi, ROS ve NO beta hücre apoptozunu indükleyebilen veya patogeneğinde yer alan mediatörler olarak bildirilmiştir. Örneğin IL-1 $\beta$  nükleer faktör kapa B (NF-kappaB) aktivasyonu ve Fas ifadesinin uyarılması ile beta hücre apoptozunu başlatabilmektedir (6). Yapılan diğer çalışmalarda IL-1 $\beta$  aracılı beta hücre apoptozunda NO'nun aracı bir molekül olabileceği ileri sürülmüş ve bu hipotez IL-1 veya IL-1 ve INF- $\gamma$  kombinasyonu ile meydana gelen beta hücre apoptozunda iNOS ifadesinin ve NO oluşumunun artmasının gösterilmesi ve iNOS eksik adacıklarda, sitokinle indüklenen hücre ölümünün daha az görülmesi ile desteklenmiştir (55).

Fridlyand ve Philipson ROS aracılığıyla meydana gelen apoptozun hiperglisemi ile indüklenebileceğini göstermişlerdir. Mitokondriyal süperoksit üretiminin normale çekilmesi ile hipergliseminin oluşturduğu hasara yol açan ana yolların da engellenmesi, beta hücrelerinde hiperglisemiye bağlı olarak meydana gelen artmış glukoz metabolizmasının muhtemelen elektron transport zincirinin artmış aktivitesi sırasında açığa çıkan ROS'lar aracılığı ile beta hücre hasarına yol açabileceğini göstermektedir (6).

ROS'un beta hücre ölümü veya hasarındaki rolünü araştıran çalışmalar adacıklarda bulunan antioksidan enzimlerin ifadesinin artışı ile bazı oksiradikallerin hasar verici etkisinin azaltılabileceğine dayanmaktaydı. Bu gözlem daha sonra transgenik farelerde de doğrulandı. Serbest radikaller beta hücrelerinde direkt protein, lipit ve nükleik asit hasarı ile mitokondriya ve hücre hasarına yol açarak veya makromolekül ve organel hasarı olmadan hücre içi sinyal yollarını uyararak hücre ölümüne neden olabilmektedir. Beta hücrelerde hücre içi sinyal ileti sistemlerini ilgilendiren apoptotik yol intrinsik olarak ROS aracılığı ile veya ekstrinsik olarak proinflamatuvar sitokinler tarafından uyarılabilmekte ve NF- $\kappa$ B'nin ve strese duyarlı diğer hedeflerin aktivasyonunu

içermektedir. Ins-1 beta hücre serilerini de içine alan çeşitli hücre modelinde ROS aracılı mitokondriyal fonksiyon değişikliğinin apoptozu indüklediğini göstermiştir. Eğer beta hücrelerde de aynı mekanizma gerçekleşiyorsa beta hücrelerinin proinflamatuvar sitokinlere duyarlılığı ROS'ların aşırı üretimi ve serbest radikal savıcı enzimlerin yetersiz düzeyleri ile açıklanabilir (6).

Beta hücre apoptozunda NO'nun hem inflamatuvar hem de ROS oluşumu ile ilgili olarak apoptozu uyarıcı etkilerinin yanı sıra yüksek konsantrasyonlarda beta hücreleri gibi oksidatif metabolizmanın önem kazandığı dokularda direkt sitokrom C oksidaz fonksiyonunun bozulması ile de apoptoza yol açabildiği bilinmektedir. Pankreas beta hücreleri yüksek sayıda mitokondri içermeleri ile ilişkili olarak oksijene bağımlı metabolizma özelliği gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda NO sitokrom C oksidazın oksijen ile reaksiyonunu yarışmalı olarak baskılayarak apoptoza yol açabilir (43) Sitokrom C oksidazın NO ile inhibisyonu mitokondriyal membran potansiyelinde azalma ve sitoplazmaya sitokrom C serbestleşmesine yol açar. Sitokrom C sitoplazmada apoptotik proteaz aktive edici faktör 1 ile reaksiyona girerek kaspaz 9'un aktivasyonuna yol açar. Aktive kaspaz 9 da kaspaz 3 ve 7'yi aktive ederek DNA fragmantasyonu ve laktat dehidrogenaz salımı gibi apoptotik değişimlerle sonlanır (43).

İnsülin tedavisi ile beta hücre fonksiyonunun kısmen de olsa geri kazanılabilmesi, tedavi sırasında etkilenen mekanizmanın beta hücre kütesinden çok işlevi olduğunu düşündürmektedir. NO insülin salınımı ve periferik insülin duyarlılığına etkileri nedeniyle DM patogenezi ve sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisi ile beta hücre fonksiyonlarının geri kazanılması sürecinde önem taşıyan bir moleküldür. Pankreas beta hücrelerinde bulunan eNOS ve nNOS izoenzimlerinin ürettiği NO beta hücrelerinde insülin salınımını düzenleyici role sahiptir (37). NO'nun yüksek konsantrasyonlarda insülin salınımına baskılayıcı, düşük konsantrasyonlarda ise uyarıcı etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca NO'nun direkt etki ile iskelet kaslarına kan akışını artırarak glukoz taşınmasını uyarması da insülin duyarlılığına katkıda bulunan mekanizmalardandır (37). Bu nedenle NO yoğun insülin tedavisi ile beta hücre işlevinin kazanılması ve periferik insülin direncinin azalmasında da rol oynayabilir .



Görülüyor ki sekonder sulfonilüre yanıtızsızlığı patogeneğinde rol oynadığı bilinen ve yoğun insülin tedavisi ile kısmen geri dönerek klinik iyileşme sağlayan beta hücre apoptozu, yangı ve periferik insülin direnci gibi mekanizmaların tümünde NO aracı bir molekül veya direkt etken olarak önemli bir rol üstlenmektedir ve yoğun insülin tedavisi sonrasında NO düzeylerinin azalması beklenebilir.

Yapılan çeşitli klinik çalışmalarda DM'de serum NO düzeyleri araştırılmıştır. Lo ve ark. tip 1 diyabetik çocuklarda NO düzeylerinin sağlıklı kardeşlerinden daha düşük olduğunu bulmuşlardır. Ancak tip 2 DM'li hastalarda yapılan çalışmalarda ise tip 1 DM'den farklı sonuçlar elde edilmiştir (97). Abou-Seif ve Youssef ise tip 2 DM'de NO düzeylerinin yüksek, süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitelerinin ise düşük olduğunu saptamışlar ve tip 2 DM'de oksidatif stresin varlığını göstermişlerdir (98). Özden ve ark. tip 2 DM'de NO düzeylerinin sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğunu göstermişler, proliferatif ve nonproliferatif diyabetik retinopatilerde diyabetik retinopatisi olmayanlardan daha yüksek bulmuşlardır (99). Aksun ve ark. ise tip 2 DM'li hastalarda serum NO düzeyleri ile mikroalbuminüri ve glomerüler hiperfiltrasyon saptanan hastalarda NO düzeylerinin daha yüksek olduğunu bildirmişler, diyabetik nefropati gelişiminde rolü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (100).

Yaptığımız klinik çalışmada sekonder sulfonilüre yanıtızsızlığı olgularında yoğun insülin tedavisine yanıt olarak hastaların sistemik NO düzeylerinde anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak bu çalışmada sistemik NO düzeylerinin hücresel kaynağı belirlenmemiştir. İnsan organizmasında tüm dokuların kütesine oranla beta hücre kütesinin çok küçük olması, beta hücre hasarıyla ilişkili NO değişiminin dolaşımdaki NO düzeylerine yansımalarının saptanamamasına yol açan faktörlerden biri olarak düşünülebilir. NO'nun beta hücre hasarındaki rolünün gösterilmesi için doku düzeyinde NO seviyelerinin ve farklı NOS izoenzimlerinin ifadesindeki farklılıkların saptanması, bu faktörlerin olaya katılım oranları hakkında daha doğru bilgi sağlayabilir (35, 36).

Çalışmamızda sistemik NO düzeyleri daha stabil ürünler olan nitrit ve nitratın kolorimetrik yöntemle ölçülmesiyle saptanmıştır. Elektrokimyasal veya kemiluminesans yöntemlerle gerçek zamanlı NO ölçümü Griess kolorimetrik yöntemde interferansa yol açan faktörlerin eliminasyonu ile sistemik NO düzeyleri hakkında daha doğru bilgi

sağlayabilir. Ancak NO yarı ömrü çok kısa bir molekül olduğu için sistemik NO düzeyindeki kısa süreli dalgalanmaların bu yöntemle yapılan NO analizini daha az etkilemesi beklenmektedir (45, 46). Ayrıca Griess yönteminin NO analizi için en yaygın olarak kullanılan yöntem olması sonuçlarımızın meta-analiz yöntemi ile diğer çalışmalarla karşılaştırılmasına olanak tanımaktadır.

Glisemik kontrol, kan basıncı, diyabet süresi, hiperlipidemi, enfeksiyon, yangı ve doku oksijenasyonu gibi hastalar arasındaki bireysel farklılıklar NO değişiminin bazı hastalara sınırlı kalmasına ve çalışma grubunda tedavi sonrası saptanan NO düzeylerinin tedavi öncesi değerlere olan farkının istatistiksel anlamlılığa ulaşmamasına yol açabilir. Örneğin yüksek glukoz konsantrasyonları ve AGE'nin NO'nun biyoyararlanımını azaltıcı etkisi, hipergliseminin beta hücre dışındaki bazı dokularda iNOS indüksiyonuna yol açması (6, 54), eNOS ile HSP90 etkileşimini bozması (66), endotel disfonksiyon farklılıkları, serbest yağ asitlerinin eNOS baskılamasına yol açması (60) hiperglisemi derecesi ile ilişkili olarak bireysel farklılıkların nedeni olabilir.

Yaptığımız çalışmada NO düzeyleri ile tedavi öncesi kan basınçları arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır. Hipertansif hastaların hipertansiyonları antihipertansif ilaçlarla kontrol edilmekteydi. Bu da NO düzeylerinin kan basıncı üzerindeki primer belirleyici rolünü ortadan kaldırmaktadır. Ayrıca tedavi öncesi kan basınçlarının ölçümü ile NO ölçümü için örnek alımının eş zamanlı olarak gerçekleştirilmemiş olması da beklenen bu ilişkinin saptanmamasında rol oynayabilir. Eş zamanlı alınan örneklerde tedavi öncesi ve sonrası saptanan kan basınçları bu konuda daha yeterli bilgi sağlayabilir.

Bu çalışmada inflamatuvar/antiinflamatuvar dengede rolü olan adenzinin hücre içi ve dışı konsantrasyonlarını düzenleyen ADA'nın rolü de araştırılmıştır (8). ADA işlevi ortamdan adenzinin uzaklaştırılması olan bir enzim olduğu için ADA artışının doku ve sistemik adenzin düzeylerinde düşme ile birlikte seyretmesi beklenir. Zira değişen koşullara göre adenzin konsantrasyonuna etkili farklı metabolik yolların adenzin konsantrasyonunu aynı yönde etkilemek üzere eşgüdüm ile çalıştığı bilinmektedir. Örneğin hipoksi ve iskemi durumlarında adenzin konsantrasyonlarını artıran 5'nükleotidaz aktivitesi artarken, adenzin konsantrasyonlarını azaltan adenzin kinaz ve ADA enziminin aktivitesi de baskılanır (8).

Adenozin etkileştiği çeşitli reseptörler aracılığıyla birbirinden farklı etkiler meydana getirebilen pleotropik bir moleküldür.  $A_1$  reseptörleri ile pankreas beta hücrelerinde inflamatuvar etkiler,  $A_{2B}$  ve  $A_3$  reseptörleri aracılığıyla mast hücrelerinde degranülasyon,  $A_{2A}$  reseptörleri aracılığıyla da yüksek konsantrasyonlarda antiinflamatuvar, immün baskılayıcı etkiler gösterebilen bir moleküldür.  $A_3$  reseptörleri nM konsantrasyonlarda sitoprotektif etkili iken  $\mu$ M konsantrasyonlarda her hücre tipinde apoptoza yol açabilmektedir (8).

Çalışmamızda sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularında tedavi öncesi, yoğun insülin tedavisinin 3. günü ve 6. ayında ölçülen ADA aktiviteleri karşılaştırılmış, tedavi öncesi ile kıyaslandığında tedavinin 3. günü ve 6. ayında ADA aktivitesinin istatistiksel olarak daha yüksek olduğunu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Tedavinin 3. günü ile 6. ayı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ( $p > 0.05$ ) ancak 6. ayda elde edilen değerlerin tedavi öncesi ADA aktivitesinden farkının önemlilik katsayısı ( $p$ ) 3. gün değerlerine göre daha düşüktür ( $p < 0.018$ ;  $p < 0.010$ ). Bu sonuçlar ADA aktivitesinin yoğun insülin tedavisi sürecinde arttığını göstermekte ve değişimin tedavi süresi ile olası ilgisine dikkat çekmektedir.

Sonuçlarımız tedavi öncesi dönemdeki göreceli olarak düşük ADA aktivitesi ile ilişkili yüksek adenozin konsantrasyonlarının, patogenezinde yangının önemli rol oynadığı bilinen beta hücre hasarında etkili olabileceğini düşündürmektedir. Adenozinin  $A_{2A}$  reseptörleri yoluyla endotelial ve diğer hücrelere uyarılmış nötrofil yapışmasını, bakterisidal aktiviteyi, apoptozu, adezyon moleküllerinin ifadesini, sitokinler ve büyüme faktörlerinin salgısını ve lökotrien B<sub>4</sub>'ün sentezini baskılayarak antiinflamatuvar etkiler gösterdiği bilinmektedir. Ancak pankreas adacıklarında immün uyarıcı etkiler göstererek nötrofil kemotaksis ve fagositozu uyarıcı etkili  $A_1$  reseptörlerinin bulunması, adenozinin beta hücre hasarında inflamatuvar sürece katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (8).

Reseptör aracılı veya reseptör aracısız mekanizmalarla adenozin analoglarının hücre ölümüne neden olduğuna dair çeşitli kanıtlar vardır. Szondy ve ark. adenozin analoglarının insan timositlerinde apoptozu en az iki farklı mekanizmayla

tetikleyebileceğini göstermişlerdir. Jacobson ve ark. adenozin reseptör agonistlerinin yaklaşık 10  $\mu$ M agonist konsantrasyonlarında 48 saatlik inkübasyondan sonra ve her hücre tipi için apoptotik etkileri başlatabileceğini bildirmiştir (79). Bu nedenle yüksek adenozin konsantrasyonlarının beta hücrelerinde apoptoza yol açması da olasıdır.

Hillaire-Buys ve ark izole sıçan pankreasında adenozinin A<sub>1</sub> reseptörleri aracılığı ile insülin salınımını baskıladığını göstermiştir (7). Bunu destekleyen insanlarda yapılmış bir çalışma bulunmamasına rağmen sonuçlarımız tedavi öncesi dönemde göreceli olarak düşük ADA aktivitesi ile ilişkili yüksek adenozinin beta hücre işlevini de olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Adenozin karbohidrat ve lipit metabolizmasına yağ dokusu ve çizgili kaslarda glukoz girişini atırarak insüline benzer, karaciğerde ise insüline karşıt etkiler meydana getirmektedir. Adenozinin periferik dokulara farklı etkilerinin klinik sonuçlara net yansımalarının ne olduğu bilinmemektedir. Ancak klinik çalışmalarla DM sürecinde yüksek ADA aktivitesi saptandığı görülmektedir. Erbağcı ve ark. tip 2 DM'li hastalarda serum ADA aktivitesini sağlıklı kontrollerden yüksek bulmuşlar, ADA aktivitesi ile HbA1c oranları arasında anlamlı korelasyon saptamışlardır (74). Kurtul ve ark. benzer sonuçlar elde etmiş ve artmış ADA aktivitesinin insülin tedavisi endikasyonunun belirteci olabileceği şeklinde değerlendirmişlerdir (87). Hoshino ve ark hem ADA1 hem de ADA2 izoenzim aktivitelerinin sağlıklı kontrollere göre tip 1 ve tip 2 diyabetiklerde arttığını saptamışlardır. Hiperglisemisi kontrol altında olmayan hastalarda hospitalizasyonla hipergliseminin kontrol edilmesi tip 1 ve tip 2 DM'de ADA2 izoenziminin anlamlı düzeyde azalması ile ilişkili bulunmuş, ADA1 aktivitesinde ise anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. ADA2 aktivitesinin zayıf kontrollü tip 2 diyabetiklerde HbA1c ile direk korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (88). Bu çalışmalar yüksek ADA aktivitesinin muhtemelen düşük adenozin konsantrasyonlarına yol açarak, periferik insülin direncini artırmış olabileceğini desteklemekte ve adenozinin yağ dokusu ve çizgili kaslara etkisinin plazma glukoz konsantrasyonlarının kontrolünde karaciğere olan etkilerinden nicel olarak daha önemli olabileceğini göstermektedir.

Yoğun insülin tedavisi ile hipergliseminin kontrol edilmesi yüksek glukoz düzeylerin hem ROS oluşumunu artırarak hem de proinflamatuvar sitokinleri etkileyerek yol açtığı apoptoz, yangı ve serbest radikal aracılı etkilerin sonlanması veya azalmasına yol açar (5, 6). Reaktif oksijen türevlerinin insülin gen transkripsiyonunu azaltıcı etkisi ortadan kalkmış olur. Benzer şekilde insülin tedavisi ile plazma serbest yağ asitlerinin düzeyinin düşmesi de beta hücrelerini koruyucu ve işlevini artırıcı etkiler sağlar (29). Yoğun insülin tedavisi sürecinde bu ve benzeri mekanizmalarla yangıyı uyarıcı sinyallerin azalması veya ortadan kalkması adenozin konsantrasyonlarının azalmasına ve bunu sağlayan metabolik yolların düzenlenmesine yol açabilir. Sonuçlarımıza göre ADA aktivitesinde tedavi sonrasında saptanan artışının bu düzenlemeden kaynaklandığı düşünülebilir.

Bu çalışma grubunda NO düzeylerinde ve ADA aktivitesinde sistemik yangı ile meydana gelebilecek değişikliklerinin elimine edilebilmesi için akut faz reaktanı olarak ESR ve beyaz küre sayıları ölçüt alınmıştır. Ancak bu veriler retrospektif olarak hasta dosyalarından sağlandığı için alınan kan örnekleri eş zamanlı değildir, elimizde tedavinin ileri dönemlerine ilişkin veri bulunmadığı için bu dönemdeki yangı aktivasyonu ile ilgili değerlendirme yapılamamaktadır. Mevcut bulgular, başlangıç ESR'si yüksek olan hastalarda NO düzeylerinin düştüğünü göstermekte ancak olgu sayısının yetersiz olması nedeniyle istatistiksel anlamlılığa ulaşmamaktadır. ESR ve beyaz küre sayılarının sistemik yangı için yeterince hassas olmaması da bir sakınca oluşturmaktadır. Çalışmanın planlanması aşamasında daha hassas bir belirtecin eş zamanlı olarak ölçümü katkı sağlayabilir ve NO'nun beta hücre hasarıyla ilişkisini daha net ortaya koyabilir.

Bu çalışmada hastalarda mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların varlığı ile ilgili bilgi sağlanamadığından bu komplikasyonlarla NO'nun ilişkisi değerlendirilememiştir. NO'nun DM'de vasküler komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı iyi bilinmektedir (60). Trombosit aktivitesi, lipid oksidasyonu, lökosit kemotaksisi, vasküler düz kas hücreleri ve mural fibroblastların proliferasyonu ve büyümesi gibi trombotik faktörlerin lokal düzenlenmesi yoluyla antiaterosklerotik etkiler gösterir (58). NO üretiminin azalması veya tüketiminin artması yoluyla biyoerişilebilirliğinin azalması tip 2 DM'de mikrovasküler ve makrovasküler

komplikasyonlar ile endotelyal disfonksiyon patogenezinde önemli bir etken olarak bildirilmiştir (42, 58, 59). Kronik komplikasyonların varlığı ile ilgili detaylı bilgi sağlanan bir çalışma grubunda NO düzeylerinin ölçümü ile bu ilişki değerlendirilebilir.

Sonuç olarak çalışmamız sekonder sülfonilüre yanıtızsızlığı olgularının yoğun insülin ile tedavisinin sistemik NO düzeylerine anlamlı etkisinin olmadığını, ADA aktivitesinin tedavi öncesine göre 3. gün ve 6. ayda anlamlı düzeyde arttığını göstermiştir. Bulgularımız önceden yapılan çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, ADA aktivitesindeki artışın tip 2 DM'nin tedavisi sonucunda beta hücre hasarı ve yangıyı tetikleyen mekanizmaların etkinliğinin azalmasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

## 6- SONUÇLAR

Sekonder sülfonilüre yanıtı zı zlığı gelişmiş tip 2 DM'li olgularda yoğun insülin tedavisiyle yapılan bu çalışmada:

1. Tedavi öncesi NO düzeyleri ile 3 günlük ve 6 aylık tedavi sonrası NO düzeyleri arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).
2. Tedavi öncesi alınan kan örneklerinden çalışılan NO düzeyleri ile sistolik ve diastolik kan basıncı arasında anlamlı bir korelasyon gösterilememiştir ( $p>0.05$ ).
3. Tedavi öncesi saptanan NO düzeyleri ile beyaz küre sayısı ve ESR arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).
4. Tedavi öncesi dönemde saptanan ADA aktivitesi 3 günlük insülin infüzyon ve 6 aylık multipl subkutan insülin tedavisi sonrasında ölçülen ADA aktivitesine göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur (sırası ile  $p=0.018$  ve  $p=0.010$ ).
5. ADA aktivitesi tedavi öncesi dönemle kıyaslandığında tedavinin 6. ayında artış 3. günündeki artıştan istatistiksel olarak farklı değildir ( $p>0.05$ ).
6. Tedavinin 3. günü ile 6. ayı arasındaki ADA aktivitesinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).
7. Tedavi öncesi alınan kan örneklerinden saptanan ADA aktivitesi ile toplambeyaz küre sayısı, lenfosit sayısı ve ESR arasında anlamlı bir korelasyon saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

## 7- KAYNAKLAR

1. Alper G. Diyabet. In: Onat T, Emerk K, Sözmén EY (eds). İnsan Biyokimyası (1<sup>th</sup>ed.). Ankara, Palme Yayıncılık, 2002:248-256.
2. Laakso M. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi ve tanısı. In: Goldstein BJ, Müler-Wieland D (eds). Tip 2 Diabet (1<sup>th</sup>ed.) (Çev. AC Akman). İstanbul, Düzey matbaası, 2004: 1-12.
3. Sacks DB. Carbohydrates. In: Burtis CA, Ashwood ER (eds). Tietz Textbook Of Clinical Chemistry (3<sup>th</sup>ed.). Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1999: 750-808.
4. Satman I, Yılmaz MT, Baştar I, Şengül A, Sargın M, Salman F, et al. Diabetes Epidemiology Study in Turkey: first step data results. Diabetes 1998; 47: 1480-1488.
5. Mayfield JA, White RD. Insulin therapy for type 2 diabetes: Rescue, augmentation, and replacement of beta-cell function. Am Fam Physician 2004; 70: 489-512.
6. Fridlyand LE, Philipson LH. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta cells?. Diabetes 2004; 53: 1942-1948.
7. Hillaire-Buys D, Chapal J, Bertrand G, Petit P, Loubatieres-Mariani MM. Purinergic receptors on insulin-secreting cells. Fundam Clin Pharmacol 1994; 8: 117-27.
8. Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. Trends Immunol 2004; 25: 33-39.
9. Baudry A, Leroux L, Jackerott M and Joshi RL. Genetic manipulation of insulin signaling, action and secretion in mice Insights into glucose homeostasis and pathogenesis of type 2 diabetes. EMBO Rep 2002; 3: 323-328.
10. Nelson DL, Cox MM. Memeli Metabolizmasının Entegrasyonu ve Hormonal Regülasyonu. In: Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Çev. N Kılıç). Ankara, Palme yayıncılık, 2005: 869-906.



11. Granner DK, Hormones of the pancreas and gastrointestinal tract. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds). Harper's Biochemistry (25<sup>th</sup>ed.) Stamford, Appleton & Lange. 1999: 610-626.
12. Powers AC. Diabetes Mellitus. In: Harrison İç Hastalıkları (Çev. Y Sağlıker). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2004: 2109-2137.
13. Montgomery R, Conway TW, Spector AA, Chappel D. Moleküler Endokrinoloji: Hücre yüzeyinde etki gösteren hormonlar. In: Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım (Çev. N Altan). Ankara, Palme Yayıncılık, 2000: 556-586.
14. Shyng SL, Ferrigni T, Shepard JB, Nestorowicz A, Glaser B, Permutt MA et al. Functional analyses of novel mutations in the sulfonylurea receptor 1 associated with persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. Diabetes 1998; 47: 1145-1151.
15. Riedel MJ, Bora P, Steckley D, de Vries G, Light PE. Kir6.2 polymorphisms sensitize beta-cell ATP-sensitive potassium channels to activation by acyl coA as a possible cellular mechanism for increased susceptibility to type 2 diabetes? Diabetes 2003; 52: 2630-2635.
16. Müller-Wieland D, Kotzka J, Goldstein BJ. Tip 2 diyabetin patogenezi. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D. Tip 2 Diabet (1<sup>th</sup>ed.) (Çev. AC Akman). İstanbul, Düzey matbaası, 2004: 13-28.
17. Mayes PA. Lipid Transport and Storage. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry (25<sup>th</sup>ed.) Stamford, Appleton & Lange. 1999: 268-284.
18. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalin S, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları. Ankara, Güneş Kitabevi. 1997; 2-30.
19. Haris MI, Flegal KM, Little RR, Wiedmeyer HM, Byrd-halt DD. Prevalance of diabetes, impaired glucose tolerance in US. Adults. The third national health and nutrition examination survey, 1988-1994. Diabetes Care 1998; 21: 518-524.
20. Satman I, Yılmaz MT, Dinççağ N, Karşıdağ K. The TURDEP Group: Comparison of the prevalance of diabetes and of IGT in two surveys performed in Turkey and in the Turkish population of Northern Cyprus. EDESG 33rd Annual meeting of the European

- Diabetes Epidemiology Study Group. Abbaye des Vaux de Cernay, France, 1998; Oral poster presentation No.1.
21. Abduelkarem AR, Sackville MA, Morgan RM, Hildredt AJ. Is it time to change diabetic disease nomenclature?. *Pharm World Sci* 2004; 26: 3-5.
22. Sabbah E, Savola K, Kulmala P, Veijola R, Vähäsalo P, Karjalainen J, et al. Diabetes-associated autoantibodies in relation to clinical characteristics and natural course in children with newly diagnosed type 1 diabetes. The childhood diabetes in Finland study group. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1534-1539.
23. Rolla A. The pathophysiological basis for intensive insulin replacement. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004; 28: 3-7.
24. Amos AF, McCarty DJ, Zimmet P. The rising global burden of diabetes and its complications: estimates and projections to the year 2010. *Diabet Med* 1997; 14: 1-85.
25. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 2000; 23: 381-389.
26. McCarthy M, Mensel S. The genetics of type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 195-199.
27. Winter WE, Nakamura M, House DV. Monogenic diabetes mellitus in youth: The MODY syndromes. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1999; 28: 765-785.
28. Fajans SS, Bell GI, Polonsky KS. Molecular mechanisms and Clinical Pathophysiology of Maturity-Onset Diabetes Young. *N Engl J Med* 2001; 345: 971-980.
29. Poitout V Robertson RP. Minireview: Secondary  $\beta$ -cell failure in type 2 diabetes; a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 2002; 143: 339-342.
30. Cooppan R. Diabetes Mellitusta Glukoz Kontrolünün hedefleri, Mantiğı ve Glukoz Monitörizasyonu. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D. *Tip 2 Diabet (1<sup>th</sup>ed.)* (Çev. AC Akman). İstanbul, Düzey matbaası, 2004: 29-38.

31. Bastyr EJ, Stuart CA, Brodows RG, Schwartz S, Graf CJ, Zagar PA, et al. Therapy focused on lowering postprandial glucose, not fasting glucose, may be superior for lowering HbA1c. *Diabetes Care* 2000; 23: 1236–1241.
32. Luna B, Feinglos MN. Oral agents in the management of type 2 diabetes mellitus. *Am Fam Physician* 2001; 63: 1747-1780.
33. Bryan J, Vila-Carriles WH, Zhao G, Babenko AP, Bryan LA. Toward linking structure with function in KATP channels. *Diabetes* 2004; 53: 104-112.
34. Itabashi N, Okada K, Muto S, Fujita N, Ohta T, Miyazaki JI, et al. A novel enhancer of insulinotropic action by high glucose (JTT-608) stimulates insulin secretion from pancreatic b-cells via a new cellular mechanism. *J pet*, 2001; 297: 953–96.
35. Murray RK. Muscle the Cytoskeleton. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26<sup>th</sup>ed.) Stamford, Appleton & Lange. 2003: 556-579.
36. Ricciardolo FLM. Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax* 2003; 58: 175-182.
37. Nakada S, Ishikawa T, Yamamoto Y, Kaneko Y, Nakayama K. Constitutive nitric oxide synthases in rat pancreatic islets: direct imaging of glucose-induced nitric oxide production in beta-cells. *Eur J Physiol* 2003; 447: 305–311.
38. Kılıç K, Kılıç A. Nitrik Oksit: Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Ankara, Palme yayıncılık, 2003: 9-29.
39. Natali A, Toschi E, Baldeweg S, Casolaro A, Baldi S, Sironi AM et al. Haematocrit, type 2 diabetes, and endothelium dependent vasodilatation of resistance vessels. *Eur J Heart* 2005; 26: 464–471.
40. Nelson DL, Cox MM. Amino asitler, Nükleotitler ve ilişkili Moleküllerin Biyosentezi. In: *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri* (Çev. N Kılıç). Ankara, Palme yayıncılık, 2005: 818-868.

41. Cuzzocrea S, Riley DP, Caputi AP, Salvemini D. Antioxidant Therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Jpet* 2001; 53: 135-159.
42. Komers R, Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284: 1121-1137.
43. Lee VY, McClintock DS, Santore MT, Budinger GRS, Chandel NS. Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277: 16067-16074.
44. Raines KW, Cao GL, Porsuphatana S, Tsai P, GM, Shapiro P. Nitric oxide inhibition of ERK1/2 activity in cells expressing neuronal nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2004; 279: 3933-3940.
45. Gharavi N, El-Kadi AOS. Measurement of nitric oxide in murine hepatoma hepa1c1c7 cells by reversed phase HPLC with fluorescence detection. *J Pharm Pharmaceut Sci* 2003; 6: 302-307.
46. Measurement of exhaled nitric oxide in the diagnosis and management of asthma and other respiratory disorders. [medpolicy.bluecrossca.com/policies/medicine/nitric\\_oxide.html](http://medpolicy.bluecrossca.com/policies/medicine/nitric_oxide.html) 25.04.2005
47. Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicol Sci* 2001; 59: 5-16.
48. Breddt DS. Nitric oxide signaling in brain: potentiating the gain with YC-1. *Mol Pharmacol* 2003; 63: 1206-1208.
49. Hintze TH. Prologue: Nitric oxide-hormones, metabolism, and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: 2253-2255.
50. Naseem KM. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med* 2005; 26: 33-65.
51. Luiking YC, Weusten BLAM, Portincasa P, Van Der Meer R, Smout AJPM, Akkermans LMA. Effects of long-term oral L-arginine on esophageal motility and gallbladder dynamics in healthy humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1998; 274: 984-991.

52. Ragoobirsingh D, McGrowder D, Dasgupta T, Brown P. The effect of nitric oxide on glucose metabolism. *Mol Cell Biochem* 2004; 263: 29-34.
53. Higaki Y, Hirshman MF, Fujii N, Goodyear LJ. Nitric oxide increases glucose uptake through a mechanism that is distinct from the insulin and contraction pathways in rat skeletal muscle. *Diabetes* 2001; 50: 241-247.
54. Feltstrom JJ, Lundquist I, Salehi A. Glucose stimulates the expression and activities of nitric oxide synthases in incubated rat islets: an effect counteracted by GLP-1 through the cyclic AMP/PKA pathway. *Cell Tissue Res* 2005; 319: 221-230.
55. Kawasaki E, Abiru N, Eguchi K. Prevention of type 1 diabetes: from the view point of beta cell damage. *Diabetes Res Clin Pract* 2004; 66: 27-32.
56. Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, Szabo C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem* 2005; 12: 267-75.
57. Awata T, Neda T, Iizuka H, Kurihara S, Ohkubo T, Takata N, et al. Gene is associated with diabetic macular edema in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2004; 27: 2184-2190.
58. Mather KJ, Mirzamohammadi B, Lteif A, Steinberg HO, Baron AD. Division of endothelin contributes to basal vascular tone and endothelial dysfunction in human obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 3517-3523.
59. Barbato JE, Zuckerbraun BS, Overhaus M, Raman KG, Tzeng E. Nitric oxide modulates vascular inflammation and intimal hyperplasia in insulin-resistance and the metabolic syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005 Feb 25; [Epub ahead of print].
60. Woodman RJ, Chew GT, Watts GF. Mechanisms, significance and treatment of vascular dysfunction in type 2 diabetes mellitus: focus on lipid-regulating therapy. *Drugs* 2005; 65: 31-74.
61. Taniwaki H, Ishimura E, Matsumoto N, Emoto M, Inaba M, Nishizawa Y. Relations between ACE gene and eNOS gene polymorphisms and resistive index in type 2 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes Care* 2001; 24: 1653-1660.

62. Shulutko AM, Antropova NV, Kriuger IuA. NO-therapy in the treatment of purulent and necrotic lesions of lower extremities in diabetic patients. *Khirurgiia (Mosk)* 2004; 12: 43-6.
63. Vella A, Camileri M. Diabetes Mellitusun Gastrointestinal ve Otonomik Komplikasyonları. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D. *Tip 2 Diabet (1<sup>th</sup>ed.)* (Çev. AC Akman). İstanbul, Düzey matbaası, 2004: 275-288.
64. Brodsky SV, Morrishow AM, Dharia N, Gross SS, Goligorsky MS. Glucose scavenging of nitric oxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 280: 480-486.
65. Kim F, Tysseling KA, Rice J, Pham M, Haji L, Gallis BM, et al. Free Fatty Acid Impairment of Nitric Oxide Production in Endothelial Cells Is Mediated by IKK beta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 Feb 24 [Epub ahead of print].
66. Lin LY, Lin CY, Ho FM, Liau CS. Up-regulation of the association between heat shock protein 90 and endothelial nitric oxide synthase prevents high glucose-induced apoptosis in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2005; 94: 194-201.
67. Nitric Oxide Measurement System. <http://www.shelfscientific.com/cgi-bin/tame/newlaz/non.tam> 25.04.2005
68. Brovkovich V, Stolarczyk E, Oman J, Tombouliau P, Malinski T. Direct electrochemical measurement of nitric oxide in vascular endothelium. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 19: 135-43.
69. Nagase S, Ohkoshi N, Ueda A, Aoyagi K, Koyama A. Hydrogen peroxide interferes with detection of nitric oxide by an electrochemical method. *Clin Chem* 1997; 43: 1246.
70. Nitric Oxide Monitor. <http://www.twobtech.com/nitricoxidemon.php>, 14.04.2005
71. Pratibha K, Anand U, Agarwal R. Serum adenosine deaminase, 5' nucleotidase and malondialdehyde in acute infective hepatitis. *Indian Journal Clinical Biochemistry* 2004; 19: 128-131.
72. Bottini N, Gloria-Bottini F, Borgiani P, Antonacci E, Lucarelli P, Bottini E. Type 2 diabetes and the genetics of signal transduction: a study of interaction between adenosine deaminase and acid phosphatase locus 1 polymorphisms. *Metabolism* 2004; 53: 995-1001.

73. Alrokayan S. Adenosine Deaminase: An aid to diagnose tuberculosis. *J Med Sci* 2003; 3: 30-45.
74. Erbağcı AB, Araz M, Köylüoğlu O, Özdemir Y, Tarakçıoğlu M. Elevated adenosine deaminase activity is not implicated in microvascular complication of type 2 diabetes mellitus except HbA1c. *Turkish Journal endocrinology and metabolism*, 2000; 3: 95-99.
75. Shu Q, Frieden C. Relation of enzyme activity to local/global stability of murine adenosine deaminase:  $^{19}\text{F}$  NMR studies. *J Mol Biol* 2005; 345: 599-610.
76. Kocic G, Stanojevic G, Nagorni A, Brankovic B, Pavlovic D, Jevtovic T. Diagnostic Importance of adenosine deaminase activity for progression and invasion of human colon tumors. *Medicine and Biology*, 2003; 10: 76–78.
77. Montgomery R, Conway TW, Spector AA, Chappel D. Nükleotit Metabolizması. In: *Biyokimya Olgu Sunumlu Yaklaşım* (Çev. N Altan) Ankara, Palme Yayıncılık, 2000: 427-463.
78. Jacobson KA, Hoffmann C, Cattabeni F, Abbracchio MP. Adenosine-induced cell death: evidence for receptor-mediated signalling. *Apoptosis* 1999; 4: 197–211.
79. Rodwell VW. Metabolism of Purine and Pyrimidine Nucleotides. In: Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Illustrated Biochemistry* (26<sup>th</sup>ed.) Stamford, Appleton & Lange. 2003: 293-302.
80. Zhang Y, Handy DE, Loscalzo J. Adenosine-dependent induction of glutathione peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress. *Circ Res* 2005; 96: 831-7.
81. Vallon V, Chen M, Yang T, Briggs J, Schnermann J. Molecular and functional evidence for expression of adenosine receptors in Zebrafish. *Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35: 581-606.
82. Phillis J W, Wu P H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. *Prog Neurobiol* 1981; 16: 137-239.

83. Huber A, Padrun V, Deglon N, Aebischer P, Mohler H, Boison D. Grafts of Adenosine-releasing cells suppress seizures in kindling epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7611-7616.
84. Mills SE. Regulation of porcine adipocyte metabolism by insulin and adenosine. *J Anim Sci* 1999; 77: 3201-3207.
85. Han DH, Hansen PA, Nolte LA, Holloszy JO. Removal of adenosine decreases the responsiveness of muscle glucose transport to insulin and contractions. *Diabetes* 1998; 47: 1671-1675.
86. Kocic G, Djordjevic V, Vlahovic P, Kocic R, Pavlovic D, Jevtovic T. Antioxidants modulate adenosine metabolism in rat mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Ren Fail* 2002; 24: 691-701.
87. Kurtul N, Pence S, Akarsu E, Kocoglu H, Aksoy Y, Aksoy H. Adenosine deaminase activity in the serum of type 2 diabetic patients. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2004; 47: 33-5.
88. Hoshino T, Yamada K, Masuoka K, Tsuboi I, Itoh K, Nonaka K, Oizumi K. Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1994; 25: 97-102.
89. Rutkiewicz J, Gorski J. On the role of insulin in regulation of adenosine deaminase activity in rat tissues. *FEBS Lett* 1990; 271: 79-80.
90. Baroni MG, Alcolado JC, Needham EW, Pozzilli P, Stocks J, Galton DJ. Sib-pair analysis of adenosine deaminase locus in NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 1640-3.
91. Bottini E, Bottini GF. Adenosine deaminase and body mass index in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 1999; 48: 949-51.
92. Thliveris JA, Begleiter A, Kobrinsky NL, Verburg L, Dean HJ, Johnston JB. Prevention of insulin-dependent diabetes mellitus by 2'-deoxycoformycin in the BB Wistar rat. *Biochem Pharmacol* 1993; 46: 1071-5.



93. İlhan A, Şahin DA, Armutçu F, Gürel A, Akyol Ö. The indices of mobile phone-induced oxidative stress in plasma and erythrocytes: The effect of Ginkgo biloba on the parameters. *Journal of Neurological sciences* 2004; 21: 1984-2004.
94. Erel Ö, Kocyigit A, Gurel MS, Bulut V, Seyrek A, Ozdemir Y. Adenosine Deaminase Activities in Sera, Lymphocytes and Granulocytes in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 491-494.
95. Dupuy O, Mayaudon H, Palou M, Sarret D, Bordier L, Bauduceau B. Optimized transient insulin infusion in uncontrolled type 2 diabetes: evaluation of a pragmatic attitude. *Diabetes Metab* 2000; 26: 371-375.
96. Tiryaki Ö: Sekonder sülfonilüre yanıtı zıllığı gelişmiş tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda insülin tedavisiyle glukotoksisitenin düzeltilmesi ve beta hücre rezervi üzerine etkisi. Uzmanlık tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Gaziantep, 2004, s.39-47.
97. Lo HC, Lin SC, Wang YM. The relationship among serum cytokines, chemokine, nitric oxide, and leptin in children with type 1 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2004; 37: 666–672.
98. Abou-Seif MA, Youssef A. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161–170.
99. Özden S, Tatlıpınar S, Biçer N, Yaylalı V, Yıldırım C, Özbay D, et al. Basal serum nitric oxide levels in patients with type 2 diabetes mellitus and different stages of retinopathy. *Can J Ophthalmol* 2003; 38: 393-6.
100. Aksun SA, Özmen B, Özmen D, Parıldar Z, Senol B, Habif S, et al. Serum and urinary nitric oxide in Type 2 diabetes with or without microalbuminuria: Relation to glomerular hyperfiltration. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 343–348.