

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**TİP 2 DİYABET HASTALARINDA KAN GLUKOZ
DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞKENLİĞİN PLAZMA VE
İDRAR OKSİDASYONUNA ETKİSİ**

Hazal TUZCU

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2012

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**TİP 2 DİYABET HASTALARINDA KAN GLUKOZ
DÜZEYLERİNDEKİ DEĞİŞKENLİĞİN PLAZMA VE
İDRAR OKSİDASYONUNA ETKİSİ**

Hazal TUZCU

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mutay Aslan**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından desteklenmiştir.(2010.02.0122.013)

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

Antalya, 2012

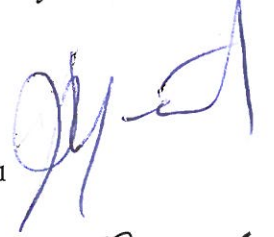
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir. 14.02.2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Üye : Prof. Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Üye : Prof. Dr. Tomris ÖZBEN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Üye : Prof. Dr. Akif ÇİFTÇİOĞLU
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



Üye : Doç. Dr. Narin DERİN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Enstitü Müdürü

ÖZET

Kardiyovasküler hastalık gelişimi için temel risk faktörlerinden birisi olan tip 2 diyabet, oksidatif stres oluşumu ile ilişkilidir. Bu çalışmanın temel amacı farklı tipte insülin tedavisi başlanan Tip 2 diyabet hastalarında tedavi öncesi ve sonrası glukoz düzeyindeki değişkenliğin oksidatif strese etkisini incelemektir. Bu amaç kapsamında Tip 2 Diyabetes Mellitus (DM) tanısı almış 24 hasta çalışmaya dahil edildi. Üç gruba ayrılan hastalara (her grup 8 hasta) birinci gün eski tedavi rejimi uygulandı ve ikinci günden itibaren 3 değişik tipte insülin analogu ve metformin başlandı. Birinci hasta grubuna subkütan Humalog Mix 50 (bifazik insülin lispro; %50 Insulin lispro -%50 protamine lispro) ve 2000 mg oral Metformin, ikinci hasta grubuna subkütan Novomix 30 Flexpen (bifazik insülin aspart; %30 aspart- %70 protamine aspart) ve 2000 mg oral Metformin, üçüncü hasta grubuna ise subkütan Lantus Solostar (insülin glarjin) ve 2000 mg oral Metformin uygulandı. Çalışmaya alınan hastaların kan glukoz düzeyleri deri altına yerleştirilen bir sensör aracılığı ile sürekli olarak 72 saat monitörize edildi. Continuous (=devamlı) Glukoz Monitorize edici Sistem (CGMS) uygulaması sonlandırıldıktan sonra elde edilen data ile günlük glisemik patern değerlendirildi. Tedavi öncesi ve sonrası glukoz düzeyindeki değişkenliğin oksidatif strese etkisini incelemek için plazma protein karbonil seviyeleri, plazma ve idrar 8-izoprostan düzeyleri ve plazma protein nitrasyonu ölçüldü. Hasta gruplarında nitrik oksit salınımını değerlendirmek için plazma nitrit ve nitrat miktarı belirlendi. Plazma protein karbonil ve nitrit/nitrat düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçülürken, 8-izoprostan düzeyleri ve plazma protein nitrasyonu enzyme-linked immünoassay yöntemine dayanan ölçüm kitiyle belirlendi. Tüm gruplarda insülin uygulaması sonrası 2nci günde ölçülen ortalama kan glukozu ve ortalama kan glukozu standard deviasyonları tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştı. Benzer şekilde plazma protein ve lipid oksidasyon parametreleri de tedavi sonrası 2nci günde tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalma gösterdi. Tedavi grupları arasında nitrik oksit salınımı farklılık göstermedi. Bu çalışmadan elde edilen veriler, tedavi öncesi ve sonrası glukoz düzeyindeki değişkenliğin oksidatif stres üzerinde etkili olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Diyabetes Mellitus, insülin, nitrik oksit, glukoz, oksidasyon.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of high dose insulin analog initiation therapy on glucose variability and oxidative stress in type 2 diabetes patients. Twenty four type 2 diabetic patients with HbA1c levels above 10% despite ongoing combination therapy with sulphonylurea and metformin were selected. Former treatment regimen was continued for the first day followed by substitution of sulphonylurea therapy with different insulin analogs such as, 0.4 U/kg/day lispro mix (50% insulin lispro protamine and 50% insulin lispro) (n=8); 0.4 U/kg/day insulin aspart (30% insulin aspart and 70% protamine insulin aspart) (n=8) and 0.4 U/kg/day insulin glargine (n=8). Glycemic profiles were determined over 72 hours by continuous glucose monitoring system (CGMS) and blood/urine samples were obtained from all patients at 24 and 72 hours. Plasma 8-isoprostane, protein carbonyl and nitrotyrosine levels were measured to evaluate oxidized lipids, oxidized and nitrated proteins, respectively. Plasma nitrite and nitrate levels were also determined to assess nitric oxide (NO) production in all experimental groups. The glucose patterns obtained from each patient on study days 1 and 3 were submitted to calculations and showed that overall glucose control was significantly better following treatment with insulin analog plus metformin compared to sulphonylurea and metformin alone. Treatment with insulin analog plus metformin also resulted in a significant reduction in glucose variability, as determined by decreased standard deviation of measured blood glucose concentrations. Plasma and urine 8-isoprostane, plasma protein carbonyl and nitrotyrosine levels were markedly decreased following treatment with insulin analog plus metformin. No significant difference was observed in plasma nitrite and nitrate values suggesting similar levels of NO production. These findings indicate that lowering blood glucose and glucose fluctuations using high dose insulin analogs plus metformin reduces oxidative stress over time. The present data also suggest that therapy in type 2 diabetes should also target the reduction of acute glucose fluctuations as well as hemoglobin A1c and mean glucose concentrations.

Key words: Diabetes mellitus, insulin, nitric oxide, glukoz, oxidation

TEŞEKKÜR

Bu araŐtırmanın planlanması ve yapılmasında yardımlarını esirgemeyen proje yürütücüsü ve akademik danışmanım Sayın. Prof. Dr. Mutay ASLAN'a, araŐtırmanın her aşamasında destek olan Dr. İbrahim ASLAN'a, araŐtırmanın her aşamasında özverili çalışmalarından dolayı AraŐ. Gör. Dr. Serdar DOĐAN'a ve bu süreç boyunca tüm desteklerinden dolayı aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
2.1. Tip 2 Diyabet	2
2.1.1. Tip 2 Diyabet Patogenezi	2
2.1.2. İnsülin	3
2.1.3. Tip 2 Diyabet Patogenezinde İnsülin Direnci	5
2.1.4. Periferik Dolaşımda Glukoz Düzeyinin Ayarlanması	6
2.2. Tip 2 Diyabet Mellitusda İnsülin Tedavisi	9
2.2.1. İnsülin Analogları	11
2.2.1.1. İnsülin Lispro	11
2.2.1.2. İnsülin Aspart	11
2.2.1.3. İnsülin Galarjin	12
2.3. Tip 2 Diyabetde Oksidatif Stress	12
MATERYAL VE METOD	14
3.1. Çalışmaya Alınacak Hasta Gruplarının Belirlenmesi	14
3.2. Kan Glukoz Düzeyleri ve Ölçümü	14
3.2.1. Kan Şekerinin Sürekli Olarak Moniterize Edilmesi	14
3.2.2. Çalışmaya Alınan Hasta Gruplarında Kan Glukozunun Monitorize Edilmesi	17
3.3. Protein Oksidasyonu	17
3.4. Plazma Protein Karbonil Seviyelerinin Ölçümü	18
3.5. Plazma ve İdrar Lipid Oksidasyonunun Ölçümü	19
3.6. Plazma Nitrit ve Nitrat Ölçümü	19
3.7. Protein Nitrasyonu	19
3.8. Protein Nitrasyonunun Ölçümü	20
3.9. Sonuçların Değerlendirilmesi	20

BULGULAR	22
4.1. Hasta Gruplarından Elde Edilen CGMS Verileri	22
4.2. Hasta Gruplarında Plazma Protein Karbonil Düzeyleri	23
4.3. Hasta Gruplarında Plazma ve İdrar 8-İzoprostan Düzeyleri	24
4.4. Hasta Gruplarında Plazma Nitrit ve Nitrat Seviyeleri	26
4.5. Hasta Gruplarında Plazma Protein Nitasyonu Seviyeleri	26
TARTIŞMA	28
SONUÇ	31
KAYNAKLAR	32
ÖZGEÇMİŞ	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	:	American Diabetes Association
AGE	:	Advanced glycation end-product
ALP	:	Alkalen fosfataz
ATP-az	:	Adenozin üç fosfataz
CGMS	:	Devamlı glukoz moniterize edici sistem
DAG	:	Diaçilgliserol
DAN	:	Diaminonaftalen
DCCT	:	Diabetes Control and Complications Trial
DHAP	:	Dihidroksiaseton fosfat
DM	:	Diyabetes mellitus
DNPH	:	Dinitrofenilhidrazin
DPP-IV	:	Dipeptidil peptidaz IV
F6P	:	Fruktoz-6-fosfat
GAPDH	:	Gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz
GIP	:	Gastrik inhibitör peptid
GLcNAc	:	UDP-N-asetilglukozamin
GLP-1	:	Glukagon benzeri peptid-1
GLUT	:	Glukoz transporter protein
GOx	:	Glukoz oksidaz
GSH	:	Glutasyon
H₂O₂	:	Hidrojen peroksit
HbA1C	:	Glikozile hemoglobin
IDF	:	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IGF-1	:	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
Il-6	:	Interlökin-6
IRS-1	:	İnsülin reseptör substrat-1
iNOS	:	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
MAPK	:	Mitojenik aktiviteli protein kinaz
NO	:	Nitrik oksit
NO₂-	:	Nitrit
NO₂Tyr	:	Nitrotirozin
NO₃⁻	:	Nitrat
O₂⁻	:	Süperoksit anyon radikali
OGTT	:	Oral glukoz tolerans testi
OH[•]	:	Hidroksil radikali
ONOO⁻	:	Peroksinitrit
PCK	:	Protein kinaz C
PI3	:	Fosfatidil inositol 3
ROS	:	Reaktif oksijen metabolitleri
TCA	:	Trikarboksilikasit
TNF-α	:	Tümör nekrozis faktör-alfa
Tyr[•]	:	Tirozil radikali
UKPDS	:	United Kingdom prospective diabetes study

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. Farklı dokularda yerleşmiş glukoz içi taşıyıcı proteinler	7
2.2. İnsülinin endokrin etkileri	9
4.1. Hasta gruplarında yaş, cinsiyet ve HbA1c verileri	22
4.2. Hasta gruplarından elde edilen CGMS verileri	22

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Pankreas β hücresinde insülin sentez ve sekresyonu	3
2.2.	İnkretin etki mekanizması	4
2.3.	İnsülinin kas ve yağ dokusu içindeki etkileri iki ana yolla olur	5
2.4.	İnsülinin periferik dokulara etkisi	7
2.5.	İnsülin reseptör uyarısı, fosforilasyon kaskadı ve periferik hücrelerde insülinin etkisi	8
2.6.	Kısa etkili insülin analoglarında monomerden dimer ve hegzamer oluşturma eğilimi azalmıştır	10
2.7.	Uzun etkili insülin analoglarında hegzamerden dimer ve monomer oluşturma eğilimi azalmıştır	11
2.8.	Mitokondrial elektron transport zincirinde süperoksit anyon oluşumu	12
2.9.	Mitokondrial süperoksit anyon oluşumuna bağımlı gelişen hiperglisemik komplikasyonlar	13
3.1.	Derinin katmanları ve glukoz sensörünün yerleşimi	15
3.2.	Glukoz sensörü	15
3.3.	Medtronic/minimed continuous glukoz monitorize edici sistem	16
3.4.	Working elektrodun yapısı	17
3.5.	Arjinin yan zincirinin ROS aracılı oksidasyonu ile protein karbonil oluşumu	18
3.6.	Protein karbonillerin belirlenmesi	18
4.1.	Hasta gruplarından elde edilen CGMS sonuçları	23
4.2.	Plazma protein karbonil düzeyleri	24
4.3.	Plazma protein karbonil western blot analizi	24
4.4.	Plazma 8-izoprostan düzeyleri	25

4.5.	İdrar 8-izoprostan düzeyleri	25
4.6.	Plazma nitrit ve nitrat seviyeleri	26
4.7.	Plazma protein nitrasyonu seviyeleri	27

GİRİŞ VE AMAÇ

Ortalama kan glukoz düzeyleri ve glikozile hemoglobin seviyeleri (HbA1c) benzerlik gösteren diabetik hastaların günlük kan glukoz profilleri çok farklı olabilir. Diyabetik hastalarda normal kan glukoz düzeyinden sapmalar, hem sayı, hem de süre yönünden değişkenlik gösterebilir. Diyabet komplikasyonları ve HbA1c ölçümleri ile belirlenebilen kan glukoz düzeyinin regülasyonu arasında kuvvetli bir ilişki vardır (1). Kan glukoz seviyelerindeki oynamaların, yüksek glukoz düzeyinin oluşturduğu komplikasyonlara ek olarak, diyabetik komplikasyonların oluşumunda “artı risk” oluşturmasının sebebi bilinmemektedir. Bu nedenle ortalama kan glukoz düzeyleri benzerlik gösteren iki diyabetik hastanın komplikasyon gelişimi açısından aynı riski taşıyıp taşımadıkları belirlenemez. Benzer HbA1c düzeylerine sahip hastalarda retinopati gelişiminin uygulanan anti-diyabetik tedavi protokolüne göre farklılık gösterdiği rapor edilmiştir (2). Görülen farklılığın kan glukoz düzeyindeki oynamalara bağımlı olabileceği belirtilmiştir. Açlık kan glukoz düzeyindeki oynamaların diyabetdeki kardiyovasküler komplikasyonların gelişimi yönünden de bir belirteç olduğu saptanmıştır (3). Tip 2 diyabet hastalarının tedavisinde hedeflenen önemli bir unsur, kan glukoz düzeylerinde stabilite sağlanmasıdır. Benzer şekilde, postprandial (yemek sonrası) hiperglisemi makrovasküler komplikasyon gelişimi için önemli bir risk belirteçidir (4). Son yıllarda yapılan çalışmalar, kan glukozundaki oynamaların diyabetde mevcut olan oksidatif stresi arttırdığını göstermiştir (5-7).

Yukarıda özetlenen çalışmalar temel alınarak gerçekleştirilen araştırma projemizde kan glukozundaki değişkenliğin plazmada oluşturduğu oksidan etki incelendi ve farklı insülin tedavilerinin bu mekanizmaya yanıtı değerlendirildi.

GENEL BİLGİLER

2.1. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet erişkin toplumda en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Gelişmiş ülkelerde toplumun %5-10'u tip 2 diyabetlidir (8). Genellikle orta ileri yaş hastalığı olarak kabul edilmekle beraber, son yıllarda daha genç yaşlarda tip 2 diyabet vakaları görülmeye başlanmıştır (9 , 10 , 11). Mikro ve makroanjiyopatik değişimlerden kaynaklanan kronik komplikasyonları nedeniyle diyabetin ulusal sağlık bütçeleri üzerindeki ekonomik yükü oldukça yüksektir (12). Tip 2 diyabet olguların %85'i kilolu veya obezdir. Görme kaybı, böbrek yetersizliği ve ayak amputasyonu nedenlerinin başında diyabet gelmektedir. Diyabetli olmayan yaşlılarına kıyasla tip 2 diyabetlilerde kardiyovasküler olay riski 2-4 kat daha yüksektir, ayrıca tip 2 diyabetlilerin %75'inde mortalite nedeni koroner arter hastalıklarından kaynaklanmaktadır (11 , 13).

Heterojen bir hastalık olan diyabetin bu formunda, iki metabolik defekt söz konusudur. İnsülinin etkisi veya sekresyonu azalmıştır. Diğer taraftan insülin etkisindeki bozukluk nedeniyle insülin rezistansı (direnci) gelişmiştir. İnsülin sekresyonu da insülin direncini kompanse etmekten uzaktır. Genellikle, bu bozuklardan birisi ön plandadır (14 , 15). Hastalığın oldukça karmaşık bir genetik temeli vardır ve bir dizi aday gen sorumlu tutulmaktadır. Yaşam tarzından kaynaklanan düzensiz ve dengesiz beslenme ile birlikte, fizik aktivite azlığı gibi çevresel faktörler hastalığın ortaya çıkışını hızlandırmaktadır. Çoğu olguda hastalık tanı koyulmadan yıllarca önce başlamıştır (11 , 13 , 15).

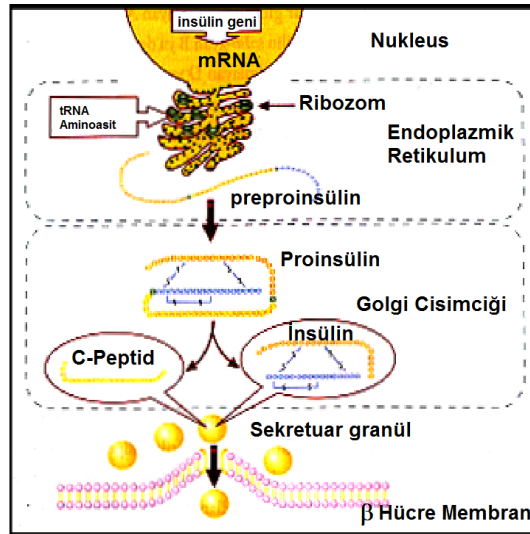
2.1.1. Tip 2 Diyabet Patogenezi

Tip 2 Diyabet Mellitus'a patogenetik yaklaşımda genetik ağırlığın çok belirgin olduğu görülür. Genetik yatkınlığı belirleyen ortak bir gen gösterilmemiştir; poligenik etki öngörülmektedir. Tip 2 DM, insülin direnci ve beta hücresi salgı kusuru ile ortaya çıkar. Hangisi önce ve ağırlıklıdır? İnsülin rezistansı ekzojen ve endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulması olarak tanımlanır. Beta hücresi de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca, insülin salınım eksikliği ve sonuçta diyabet gelişir. İnsülin direncinin gelişiminde reseptör ve özellikle postreseptör düzeyindeki bozukluklar daha önemli ve sıklıkla karşımıza çıkan durumlardır. Visseral yağ dokusu, subkutan yağ dokusuna göre insülin direnci gelişiminde önemli bir role sahiptir. Buradan açığa çıkan serbest yağ asitlerindeki artışlar iskelet kası ve karaciğerde insülin direncini artırmaktadır. Ancak obez kişilerin sadece %20'sinde diyabet gelişmektedir. O halde genetik olarak yatkın kişilerde, obeziteye bağlı olarak yükselen serbest yağ asitleri tip 2 diyabet geliştirmektedir. Visseral yağ dokusundan salınan tümör nekrozis faktör (TNF)-alfa'nın insülin direncine katkıları insülin reseptör substrat (IRS)-1'in serin fosforilasyonunu artırması, IRS-1 ekspresyonunu azaltması, tirozin kinaz aktivitesini

inhibe etmesi, IRS-1 ve fosfatidil inositol (PI) 3-kinaz arasındaki ilişkinin bozulması sebebiyle glukoz taşıyıcısı olan glukoz transporter protein (GLUT)-4 ekspresyonunu azaltması ile açıklanmaktadır. Adiponektin ise yine yağ hücrelerinde eksprese edilen TNF-alfa etkilerini bloke eden önemli bir adipositokindir. İnsülin direnci ortaya çıktığında adiponektin düzeyleri azalmaktadır. İncretinler gastrointestinal sistemden salgılanan insülinotropik küçük peptidlerdir. Bu peptidlerden tip 2 diyabet patogeneğinde önemli role sahip olan, glukagon benzeri peptid (GLP)-1'dir. Glukagon benzeri peptid-1, sadece glukoz ile tetiklenmiş insülin sekresyonunu değil, insülin biyosentezi ve insülin geni ekspresyonunu da uyarmaktadır. Bozulmuş glukoz toleransı bulunan kişilerde GLP-1 düzeyinin düşük olduğu ve tip 2 diyabetiklerde bunun daha da azaldığı kanıtlanmıştır. Tip 2 diyabetin önlenmesinde yaşam tarzı değişikliğinin (sağlıklı beslenme ve egzersiz) temel unsur olduğu kesindir. Ne yazık ki yaşam tarzı değişikliğinin 1 yıldan fazla sürdürülmediği gözlenmiştir. Bu sebeple hastalarda ilaç tedavileri ile tip 2 diyabet gelişimini önlemeye yönelik çalışmalar yapılmaktadır (16).

2.1.2. İnsülin

İnsülin geni 11. kromozomun kısa kolunda yer almaktadır. Öncü molekül olan pre-proinsülin [molekül ağırlığı (MA): 11500] önce proinsüline (MA: 9000) daha sonra C-peptidin ayrılması ile insüline dönüşmektedir (şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Pankreas β hücresinde insülin sentez ve sekresyonu

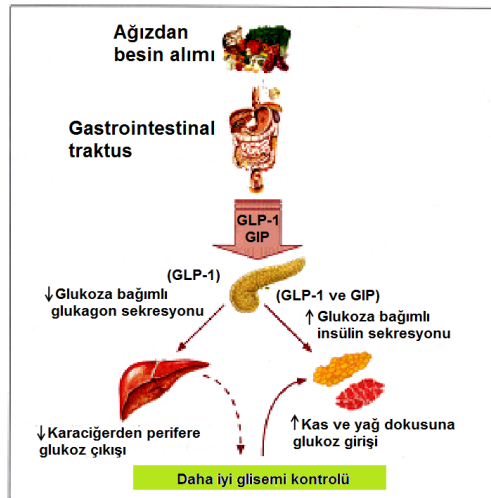
İnsülin (MA: 5808) 51 aminoasitten oluşan A (21 aminoasit) ve B (30 aminoasit) olmak üzere iki adet aminoasit zincirinden meydana gelmektedir. A ve B zincirleri birbirine iki adet disülfid bağı ile bağlanmıştır. A zincirinde 6. ve 11. aminoasitleri birbirine bağlayan bir tane de zincir içi (intrachain) disülfid bağı bulunmaktadır (17, 18).

Endojen insülinin dolaşımdaki yarı ömrü 3-5 dakikadır. Karaciğer, böbrek ve plasentada yer alan insülinaz enzimleri tarafından katabolizma edilmektedir.

Pankreastan salgılanan insülinin karaciğerden ilk geçişte %50'si kandan temizlenmektedir. 31 aminoasitten oluşan C-peptidin (MA:3000) biyolojik aktivitesi bilinmemektedir. C-peptid, β hücrelerinden insülin ile eşmolar miktarda salgılanır ve kandan karaciğer aracılığı ile temizlenerek böbreklerden atılır (19) (17).

İnsan pankreası günde ortalama 40-50 ünite insülin üretmektedir. İnsan vücudunda bazal ve uyarılmış (prandiyal) olmak üzere iki farklı şekilde insülin salgılanmaktadır. Bazal salgılanma egzogen uyarı olmaksızın (açlıkta) olan salgılanmadır. Uyarılmış salgılanma ise ağızdan besin alımına B hücresinin insülin sekresyon yanıtıdır. İnsülin salgılanmasının en önemli uyarıcı glukozdur. Kandaki glukozun besin alımı ile birlikte ani artışı önce kısa süreli bir insülin salgılanmasına neden olmakta (birinci faz) eğer kandaki glukoz konsantrasyonu hala yüksek seyrediyorsa hafifçe düşmeye başlayan insülin konsantrasyonu tekrar ikinci ve daha düşük amplitüdü bir pikle (ikinci faz) birlikte tekrar artmaktadır (17 , 18). İnsülin salgılanmasının diğer uyarıcıları mannoz, lösin, vagal uyarılar ve sülfonilüre gibi ilaçlardır. Glukagon benzeri peptid-1, gastrik inhibitör peptid (GIP), kolesistokinin, sekretin ve gastrin gibi enterik hormonlar, β adrenerjik uyarılar ve arjinin glukozun uyardığı insülin salgılanmasını artırıcı özelliğe sahiptir (20).

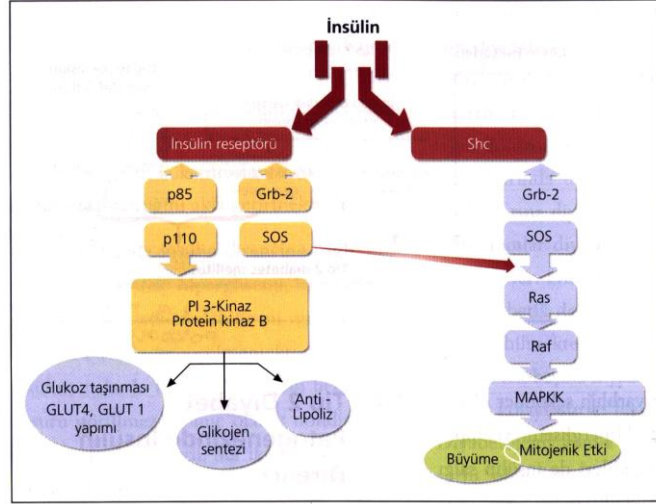
İnsülin sekresyonu; glukoz, aminoasit ve yağ asitleri gibi absorbe edilen sindirim ürünlerinin serum konsantrasyonları tarafından belirlenmektedir. İnsülin sekresyonu buna ek olarak intestinal entero-endokrin hücrelerden salgılanarak, enteroinsular aksın bir kolunu oluşturan ve inkretinler adı verilen insülin sekrete edici hormonlar tarafından da düzenlenmektedir. Glukagon benzeri peptid-1 ve GIP intestinal inkretin etkiden sorumlu olan başlıca inkretin hormonlardır. Glukagon benzeri peptid-1 ve GIP bu hormonlara duyarlı β hücrelerinde glukozla bağımlı insülin sekresyonunu uyarmak için önemli etki göstermektedirler. Her iki peptid aynı zamanda pankreas β hücre poliferasyonu ve sitoproteksiyonu da düzenlemektedirler. Glukagon benzeri peptid-1, gastrik boşalma, glukagon sekresyonu ve besin alımını inhibe ederken, GIP bu etkileri göstermemektedir. Hem GIP hem de GLP-1'in sekresyonunu takiben, başlıca dipeptidil peptidaz IV (DPP IV) tarafından hızla yıkımı nedeniyle kısa yarı ömürleri bulunmaktadır (21 , 22) (şekil 2.2.).



Şekil 2.2. İnkretin etki mekanizması

2.1.3. Tip 2 Diyabet Patogenezinde İnsülin Direnci

İnsülin rezistansı ekzojen veya endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulması olarak tanımlanır. İnsülinin hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokusudur. İnsülin karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. Aynı zamanda glukozun kas ve yağ dokusuna alınımını ve burada enerji kaynağı olarak depolanmasını sağlar (şekil 2.3.)



Şekil 2.3. İnsülinin kas ve yağ dokusu içindeki etkileri iki ana yolla olur.

İnsülin direnci gelişen ortamda, insülinin karaciğer, kas ve yağ dokusundaki bu etkilerine karşı direnç gelişir ve gerek hepatik glukoz çıkışında artış (hepatik insülin direnci) gerekse kas ve yağ dokusu içine alınamayan glukoz (periferik insülin direnci) ile kanda hiperglisemi gelişir. Hiperglisemiyi kompanse etmek için β hücresinden daha fazla insülin salınımı gerçekleşir. Fakat β hücresi de fonksiyonlarını kaybetmeye başlayınca, insülin salınım eksikliği ve sonuçta diyabet gelişir. Buradan da anlaşılacağı gibi insülin direnci ile başlayan prelinik dönem, insülin sekresyonunun azalması ile diyabetle sonuçlanır (23).

İnsülin direnci obezitede sık rastlanan bir durumdur. Ancak obez olmayan, oral glukoz tolerans testi (OGTT) normal sağlıklı kişilerin %25'inde de insülin direnci saptanmıştır. O halde diyabet gelişiminde genetik yatkınlık da önemli rol oynamaktadır (24).

İnsülin direnci prereseptör düzeyde (anormal beta hücre salgı ürünleri, dolaşan insülin antikorları, vb), reseptör düzeyinde (reseptör sayısında azalma, reseptör mutasyonları) ve postreseptör düzeyde (tirozin kinaz aktivitesinde azalma, reseptör sinyal sisteminde bozukluklar, glukoz transportunda azalma vb) gelişebilir. İnsülin direncinin gelişiminde reseptör ve özellikle postreseptör düzeydeki bozukluklar daha önemli ve sıklıkla karşımıza çıkan durumlardır (25).

Günümüz bilgileri ışığında yağ dokusunun artık bir endokrin organ olduğunu söyleyebiliriz. Yağ dokusundan salınan serbest yağ asitleri ve adipositokinler (TNF-

alfa, adiponektin, IL-6, leptin, agouti protein, rezistin vb) obezite ve diyabet gelişiminde birçok mekanizmada önemli rol oynarlar. Özellikle visceral yağ dokusu, subkutan yağ dokusuna göre insülin direnci gelişiminde önemli bir role sahiptir. Visceral yağ dokusunun artışının bir göstergesi de karaciğer içi yağlanmadır. Yine kas demetleri içindeki fasya altı yağ dokusu insülin direnci için bir gösterge olarak kabul edilmektedir (24).

2.1.4.Periferik Dolaşımda Glukoz Düzeyinin Ayarlanması

Periferik dolaşımda glukoz düzeyinin ayarlanmasında başlıca iki mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar dolaşıma glukoz girişi ve/veya periferik dokular tarafından glukozun dolaşımdan alınarak kullanılmasıdır. Birinci mekanizmada glukozun barsaklardan absorpsiyonunun ve/veya hepatik glukoz üretim ve periferik dolaşıma verilmesinin düzenlenmesi söz konusudur. İkinci mekanizmada periferik yağ ve iskelet kas dokusu önemli rol oynamaktadır (17).

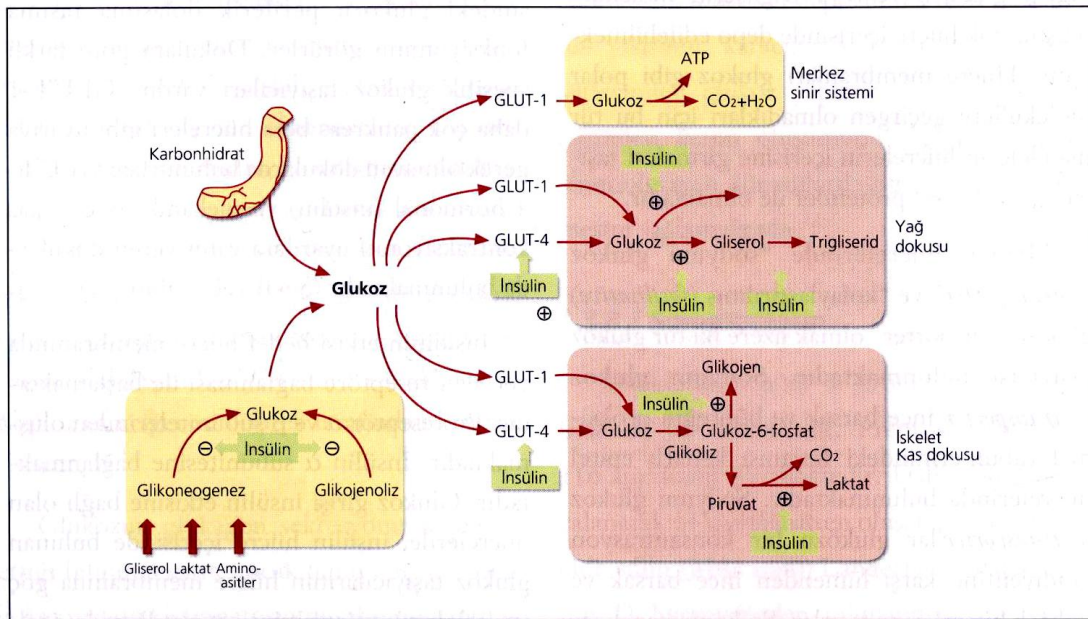
Glukoz, hücrelerin hemen hepsinin metabolizmasında çok önemli bir maddedir. Glukoz sadece enerji temin edilen bir madde olmayıp glikojen ve/veya trigliserid molekülü oluşturarak hücre içerisinde depo edilebilmektedir. Hücre membranları glukoz gibi polar moleküllere geçirgen olmadıkları için bu tür maddelerin hücrelerin içerisine girmeleri taşıyıcı (transporter) proteinler ile olmaktadır (17 , 26).

Memeli hücrelerinde “sodyum glukoz ko-transporter” ve “kolaylaştırılmış glukoz transporter” olmak üzere iki tür glukoz taşıyıcısı bulunmaktadır. Sodyum glukoz ko-transporter ince barsak ve böbreğin proksimal tübüllerindeki fırçamsı kenarlı epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Sodyum glukoz ko-transporter’lar glukozu bir konsantrasyon gradiyentine karşı lümeninden ince barsak ve böbrek hücrelerine taşırlar. Sodyum transportu konsantrasyon gradiyenti yönündeki işlemin yerine getirilmesinde rol oynar.

Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcıları bütün hücrelerin yüzeyinde vardır ve gradiyent konsantrasyonu yönünde hücre içerisine kolaylaştırılmış difüzyon ile glukoz transportu sağlamaktadır. Kolaylaştırılmış difüzyon sistemi enerji gerektirmeyen, glukoz taşıyıcı protein (GLUT) aracılığı ile olan pasif bir transport sistemidir. Glukoz taşıyıcı proteinler plazma membranına yerleşmişlerdir ve hücre membranında membranı 12 defa geçen bir zincir oluştururlar. Glukozu bağlar ve iki lipid tabaka arasından geçirerek hücre içerisine girmesini sağlarlar. Glukoz, konsantrasyon gradiyentinin durumuna bağlı olarak hücre içerisine girebilir veya çıkabilir. Kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcılar ince barsak ve böbreğin proksimal tübüllerindeki fırçamsı kenarlı epitel hücrelerinde de vardır ve bu hücrelerde hücre içerisindeki glukozu periferik dolaşıma taşıma fonksiyonunu gösterirler. Dokulara göre farklı spesifik glukoz taşıyıcıları vardır. Glukoz taşıyıcı protein-1 daha çok pankreas beta hücreleri gibi uyarıya gerek olmayan dokularda bulunurken GLUT-4 hormonal (insülin) ve mekanik (iskelet kas kontraksiyonu) uyarılara yanıt veren dokularda bulunmaktadır (17 , 26) (tablo 2.1) (şekil 2.4.).

Tablo 2.1. Farklı dokularda yerleşmiş glukoz içi taşıyıcı proteinler (GLUT)

GLUT-1:	Dokuların çoğunda bulunur ve bütün hücrelerin temel glukoz taşıyıcısıdır. Eritrosit, plesanta, fibroblast ve kan beyin bariyerindeki hücrelerin ana transporter'ıdır.
GLUT-2:	Karaciğer, pankreas beta hücrelerinde ve daha az olarak böbrek bazo lateral ve ince bağırsak epitelyum hücrelerinde bulunur.
GLUT-3:	Nöron hücrelerinde, plesanta labirent ve retina hücrelerinde bulunur.
GLUT-4:	İskelet kası, kalp kası ve yağ dokusunda bulunur.
GLUT-5:	İnce bağırsak ve böbrekte bulunur.

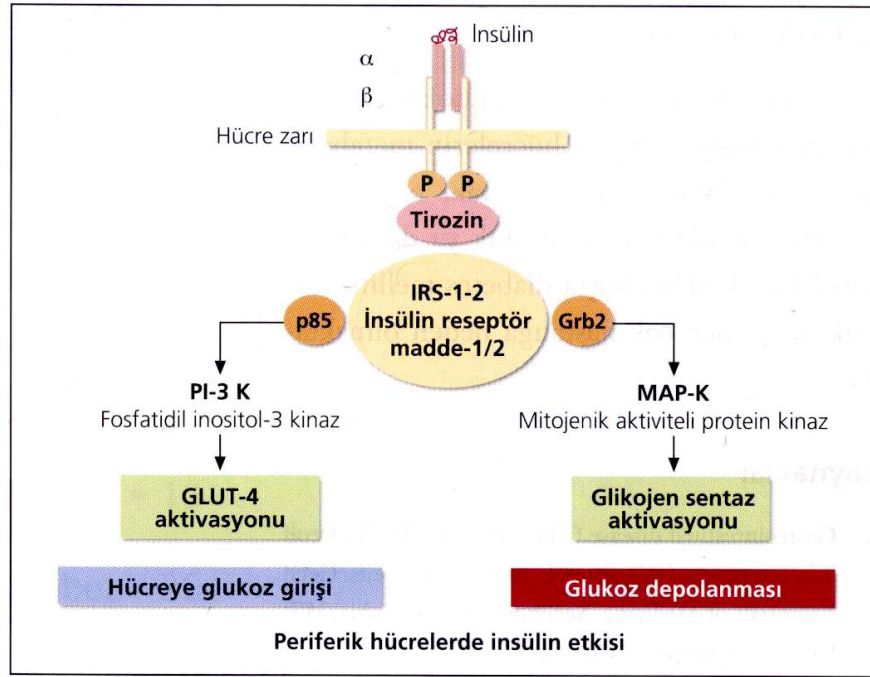


Şekil 2.4. İnsülinin periferik dokulara etkisi

İnsülinin etkisi hedef hücre membranında yer alan reseptöre bağlanması ile başlamaktadır. Bu reseptör α ve β subünitelerinden oluşmaktadır. İnsülin α subünitesine bağlanmaktadır. İnsülin hücre içerisinde bulunan glukoz taşıyıcılarının hücre membranına göç (translokasyon) etmesini artırır. Burada özellikle GLUT-4 göçünde artış ön planda olmaktadır. İnsülin kendine özgü membran reseptörüne bağlandığında hücre içerisindeki glukoz taşıyıcılar hızla yaklaşık bir dakika içerisinde hücre membranında ekzositoz ve membranı eriterek kanal açma mekanizmalarına benzer fonksiyon görecektir şekilde hücre membranına göç ederler. Glukoz taşıyıcıları hücrenin dış kısmı ile de temasa geçerek glukoz transportunu artırırlar.

İnsülinin hücre membranındaki reseptörün α -subünitesine bağlanması insülin reseptörünün β subünitesinde bulunan üç adet tirozini fosforile ederek bunlara tirozin kinaz aktivitesi kazandırır. Hücre içerisinde fosforile olabilme özelliğine sahip tirozin içeren birçok protein vardır. Tirozin fosforilasyonu protein kinaz veya protein

fosfataz enzimlerini aktifleştirerek hücre içi biyolojik etkide tetikleme rolü oynar. İnsülin reseptörünün β subünitesindeki otofosforilasyon insülin etkisinin anahtar rolündeki ilk adımıdır. Bundan sonraki adımlar protein kinaz ile proteinlerin fosforilasyonu ve hücre içi metabolik ve biyolojik aktivitelerin oluşturulmasıdır. İnsülin reseptöründe hücre içindeki en önemli madde insülin reseptör substrat-1 (IRS-1) dir. İnsülin reseptör substrat-1 tirozin ile fosforilize olduktan sonra (p85) ve Grb-2 adlı en az iki tip proteine bağlanır. p85; PI3-kinaz aracılığı ile katalitik aktiviteyi artırır. Bu yolak GLUT'lar aracılığı ile hücre içerisine glukoz girişini artırır. Grb-2; MAPK kinaz aktivitesini artırır. İnsülin reseptör ve post reseptör anomalileri insülin etkinliğini belirlemektedir (17) (şekil 2.5.)



Şekil 2.5. İnsülin reseptör uyarısı, fosforilasyon kaskadı ve periferik hücrelerde insülinin etkisi

İşlevi biten insülin, reseptörden ayrılır ve parçalanıp metabolize olur, glukoz taşıyıcıları da endositoza benzer bir mekanizma ile hızla hücre içerisine geç ederler ve glukoz transportu tekrar önceki bazal düzeyine döner.

İnsülin etkinliğini parakrin ve endokrin olarak göstermektedir. Salınan insülin α hücrelerine etki ederek parakrin yolla glukagon salınımını baskılar. Endokrin etkinliğini ise karaciğer, kas ve yağ dokusu üzerine göstermektedir (17) (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. İnsülinin endokrin etkileri

Karaciğer üzerine:
1.Glikojenolizi inhibe eder. 2.Serbest yağ asiti ve aminoasitlerin ketoasitlere dönüşümünü inhibe eder 3.Aminoasitlerin glukozu dönüşümünü inhibe eder 4.Glukozun glikojen olarak depolanmasını sağlar. 5.Trigliserid sentezini ve çok düşük dansiteli lipoprotein yapımını artırır.
Kas üzerine:
1.Aminoasit transportunu ve ribozomal protein sentezini artırarak protein sentezini artırır. 2.Glukoz transportunu ve glikojen sentetaz enzim aktivitesini artırarak ve fosforilaz enziminin etkinliğini azaltarak glikojen sentezini artırır.
Yağ dokusu üzerine:
1.Trigliserid depolanmasını artırır.

2.3.Tip 2 Diyabetes Mellitusda İnsülin Tedavisi

Diyabetes mellitus (DM) hem akut metabolik ve hem de kronik seyri sırasında mikro ve makrovasküler komplikasyonlara yol açabilen bir hastalıktır (27). Daha önceleri ölümcül seyrederken insülinin 1920’li yıllarda bulunuşu ve klinik kullanıma girmesi ile birlikte DM fatal bir hastalık olmaktan çıkmıştır (28). İnsülin tedavisinde en önemli hedef DM’a bağlı olarak gelişebilecek akut ve kronik komplikasyonların önlenmesidir. Bunun sağlanabilmesi için de hedeflenen bazı glisemik parametreler bulunmaktadır. Bunlar Amerikan Diyabet Birliği (ADA)’ne göre açlık kan şekerinin 90-130 mg/dl, 2.saat tokluk kan şekeri <180 mg/dl ve glukolize hemoglobin düzeyinin (A1c) <7 olması, Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF)’na göre açlık kan şekerinin <110 mg/dl, 2.saat tokluk kan şekerinin <140 mg/dl ve HbA1c’nin <6.5 olması olarak özetlenebilmektedir (28,29).

Tip 1 diyabetiklerde yapılan Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ve tip 2 diyabetiklerde yapılan United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) çalışmaları düzelmiş glisemi kontrolünün, diyabet hastalarında retinopati, nöropati ve nefropati gelişimini yavaşlattığını göstermiştir (30,31). Diyabette glisemi kontrolünün önemi, subkutan insülinin farmakokinetiğini düzeltmek için insülin moleküllerinin modifiye edilerek insülin analoglarının geliştirilmesi, hastaya endojen insülin sağlayacak beta hücrelerinin nakli ve subkutan uygulanan insülinin fizyolojik olmayan farmakokinetiğini düzeltmeye yönelik insülin uygulama yollarının denenmesi olmak üzere üç yeni alanda araştırmalara yol açmıştır (27).

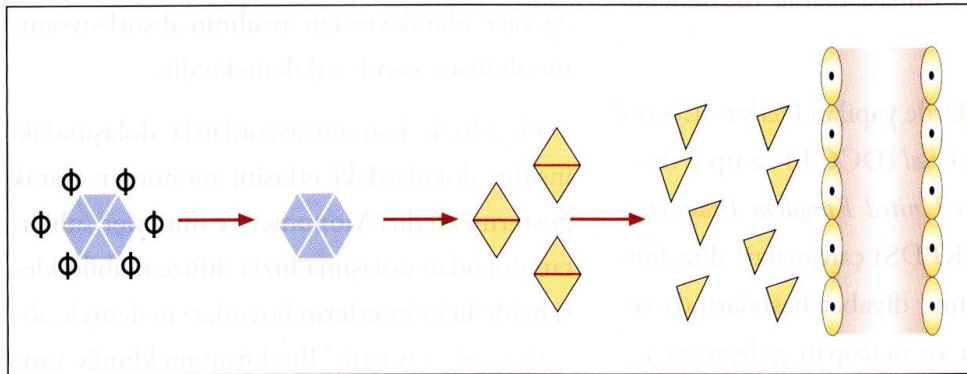
Klinik kullanımda olan insülin preparatlarının farmakokinetiğini düzeltmeye yönelik çalışmalar sonucu insülin preparatlarında önemli yenilikler elde edilmiştir. 1920’li yıllarda geliştirilen insülinler, sığır ve domuz pankreas ekstratlarından elde edilmekteydiler ve yüksek oranda antijenik özelliklere sahiptiler. Komplikasyonları önlemekte yetersiz kalmaktaydılar (28). Daha kaliteli bir yaşama ulaşmak için sürdürülen çabalar, 1980’li yıllarda endojen insülinle homolog yapıya sahip olan rekombinan insan insülininin bulunmasına ve kullanılmaya başlanmasına neden

olmuştur. Günümüzde rekombinant DNA teknolojisi ile insülin üretimi için genetik yapısı değiştirilmiş bakteri (E.coli) suşları ve mayalar (*Saccharomyces cerevisiae*) geliştirilmiştir (32). Rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen insan insülininin antijenik özelliği düşük olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda dimer ve hegzamer oluşturma eğiliminde olduğu görülmüştür (33). Bu durum egzojen olarak verilen insülinin absorpsiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir.

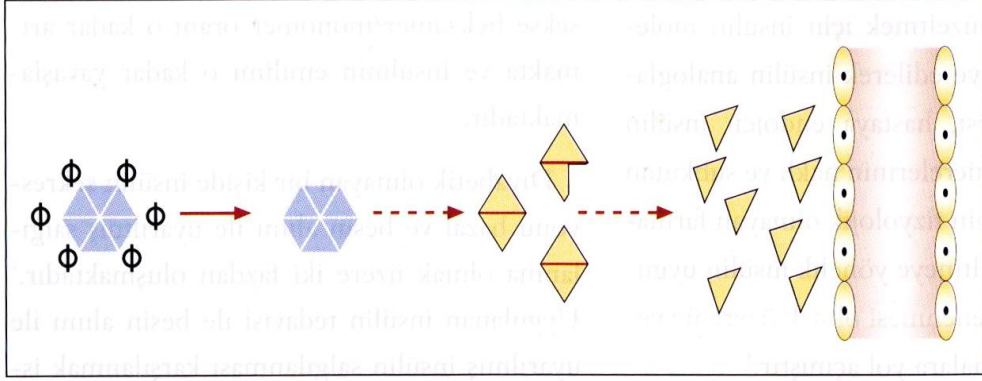
Fizyolojik konsantrasyonlarda dolaşımdaki insülin dokulardaki etkisini monomer olarak göstermektedir. Monomer ve dimerler subkutan dokudan dolaşıma hızla difüze olabildikleri halde hegzamerlerin boyutları nedeniyle absorpsiyonu yavaştır (34). Bu durumun kliniğe yansması insülin absorpsiyonu ve glukoz emilimi arasındaki uyumsuzluktur. Doz ne kadar yüksekse hegzamer/monomer oranı o kadar artmakta ve insülinin emilimi o kadar yavaşlamaktadır (27).

Diyabetik olmayan bir kişide insülin sekresyonu bazal ve besin alımı ile uyarılmış salgılanma olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır (28). Uygulanan insülin tedavisi ile besin alımı ile uyarılmış insülin salgılanması karşılanmak isteniyorsa insülinin monomerden dimer ve hegzamer oluşturma eğilimini azaltmak ya da engellemek glukoz emilimine uyum gösteren bir insülin absorpsiyonu sağlamaktadır (27) (şekil 2.10).

Bu yönde yapılan çalışmalar kısa etkili insülin analoglarının elde edilmesini sağlamıştır. Uygulanan insülin tedavisi ile bazal insülin salgılanması karşılanmak isteniyorsa hegzamerden dimer ve monomer oluşturma hızını azaltmak ve böylece enjeksiyon noktasında yavaş salınım yapan bir depo oluşturarak bazal insülin düzeyi sağlamak mümkün olabilmektedir (27) (şekil 2.11). Bu yönde yapılan çalışmalar da uzun etkili insülin analoglarının elde edilmesini sağlamıştır.



Şekil.2.6. Kısa etkili insülin analoglarında monomerden dimer ve hegzamer oluşturma eğilimi azalmıştır.



Şekil.2.7. Uzun etkili insülin analoglarında heksamerden dimer ve monomer oluşturma eğilimi azalmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda günümüzde klinik pratikte kullanılacak insülin alternatiflerinde çeşitlilik söz konusudur.

2.3.1.İnsülin Analogları

2.3.1.1.İnsülin Lispro

İnsülin lispro, insan insülinin B zincirinde yer alan 28. aminoasit prolin ile 29. aminoasit lizin yer değiştirilmesi ile elde edilmiştir. Moleküler yapıdaki bu değişiklik lispronun rekombinant insan insülinine göre dimer oluşturma eğiliminin 300 kat daha düşük olmasını sağlamakta ve enjeksiyonu takiben emilimi kolaylaştırmaktadır (35). İnsülin lispro subkutan enjeksiyonu takiben 15.dakikada etki göstermeye başlamakta, pik serum düzeylerine ortalama 1 saat içinde ulaşmakta 3.5-4.5 saat içinde etkisi sona ermektedir. Etkisi kısa sürede başladığı için hemen öğün öncesi enjeksiyonu önerilmektedir. Rekombinant insan insülinine göre daha kısa sürede, daha yüksek pik yaptığı ve bazal düzeye daha hızlı indiği için hipoglisemi riski daha düşüktür (36 , 37). Alerjik reaksiyon geliştirme riski, yan etki profili ve immünojenite yönünden değerlendirildiğinde rekombinant insan insülininden farksızdır (27).

Lispro ve regüler insan insülininin insülin reseptörüne afiniteleri benzerdir (27). Lispronun insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) reseptörüne afinitesi regüler insüline göre %50 daha fazladır ancak in vitro koşullarda yapılan çalışmalarda her ikisinin de hücre bölünmesini benzer şekilde etkilediği gösterilmiştir (35).

2.3.1.2. İnsülin Aspart

İnsan insülinin B zincirindeki 28. aminoasit olan prolin, aspartik asit ile yer değiştirmiştir. Bu değişim negatif yüklü aminoasitlerin birbirini itmesine ve sonuçta bu analogun heksamer oluşturmaksızın monomer ve dimerler şeklinde ortamda bulunmasına neden olmaktadır (38 , 39). İnsan insülini ile karşılaştırıldığında reseptör bağlanma afinitesi %88'dir. İnsülin ve IGF-1 reseptörlerine bağlanma ve glukozu düşürme etkinliği yönünden insan insülinine benzer özelliklere sahiptir (40 ,

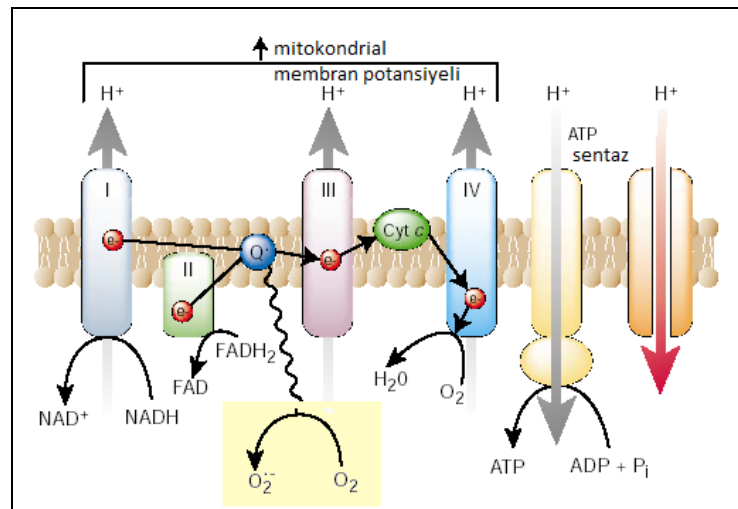
41). Etki başlangıcı ve devam süresi insan insülinine göre kısadır (28). İnsülin aspartın etki süresi 10-20 dakikada başlamakta, maksimum serum konsantrasyonuna 60 dakikada ulaşmakta ve etkinliği 3-5 saat sürdürmektedir (36) (42). Bu nedenle postprandiyel hipoglisemi riskinin daha az olduğunu bildiren çalışmalar bulunmaktadır (43). B28 aspart iyi tolere edilmekte, etki süresi abdominal bölgeye subkutan enjeksiyon sonrası uyluk ve deltoid bölgesine enjeksiyona göre en kısa olarak bildirilmektedir (44). Transgenik fare modelinde antikor oluşumu gösterilmemiştir (45).

2.3.1.3. İnsülin Glarjin

Proinsülininden insüline dönüşümün bir ara formu olan diarjinil insülinin A zincirinde 21.aminoasit olan asparjinin glisin ile yer değiştirmiş şeklidir. A21'deki glisin, molekülün stabilitesini ve biyoyararlılığını artırmaktadır. Bu değişiklikler insan insülininin izoelektrik noktasını pH 5.4'ten 7.0'a kaydırarak enjeksiyon yerinin nötral pH'sında analogu daha az çözünür hale getirmekte, enjeksiyon sonrası daha nötral pH'ya geçiş insülinin enjeksiyon noktasında presipite olmasına yol açarak yavaş salınan bir depo görevi görmesine neden olmaktadır (28). Absorbsiyonu yavaş olmakta ve 24 saat süren bazal insülin düzeyi sağlamaktadır (27 , 28 , 46).

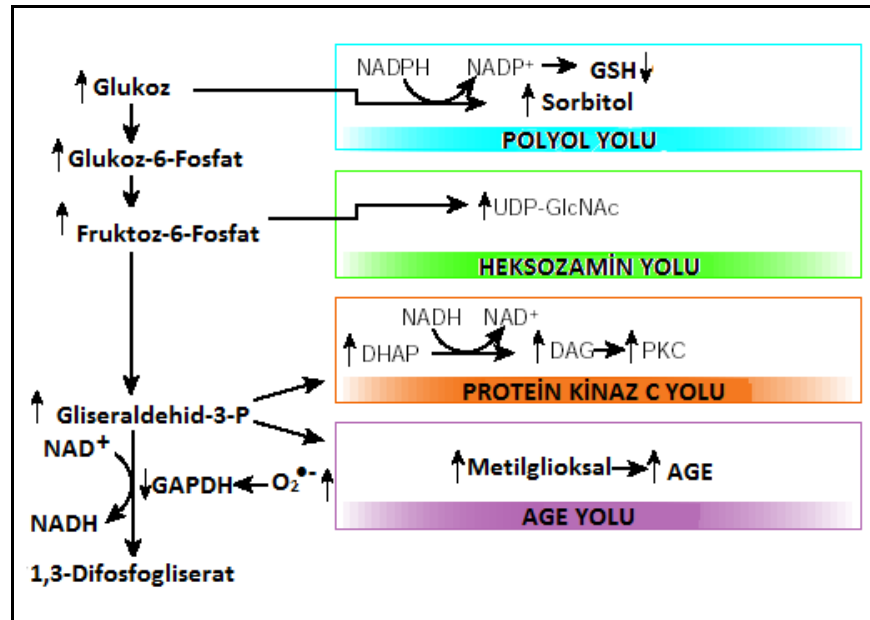
2.5. Tip 2 Diyabette Oksidatif Stress

Diyabette oksidatif stres oluşumunun mekanizması aydınlatılmıştır (47). Yüksek kan şekere bağlı olarak hücre içinde glukoz yıkımı artar ve trikarboksilikasit (TCA) siklüsünde artmış miktarda indirgenmiş (elektron donör) bileşikler oluşur (NADH ve FADH₂). Bu bileşiklerin mitokondrial elektron transportuna elektronlarını aktarmaları sonucunda mitokondrial membranlar arası boşluğa proton pompalanarak yüksek membran potansiyeli oluşur. Oluşan yüksek membran potansiyeli kompleks III'de elektron akışını inhibe eder. Mitokondrial elektron transport zincirinde ilerleyemeyen elektronlar moleküler oksijene aktarılarak süperoksit anyon (O₂•-) oluşumuna neden olur (şekil 2.15).



Şekil..2.8. Mitokondrial elektron transport zincirinde süperoksit anyon oluşumu (Ref: Nature 414:813–820, 2001)

Hiperglisemiye bağımlı olarak indüklenen mitokondrial süperoksit anyon oluşumu hiperglisemik komplikasyonların oluşumuna neden olan 4 farklı yolu aktif hale getirir (47) (şekil 2.16). Fazla $O_2^{\bullet-}$ oluşumu glikolitik yolda yer alan gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimini inhibe eder. Bu enzimin inhibe olması sonucunda glikolitik yolda biriken gliseraldehid-3-fosfat kullanılmak üzere farklı metabolik yollara sapar. Gliseraldehid-3-fosfat'dan dihidroksiaseton fosfat (DHAP) meydana gelir. Didihroksiaseton fosfat'dan, protein kinaz C (PKC) aktivatörü, diaçilgliserol (DAG) oluşur. Gliseraldehid-3-fosfat, metilglioksal oluşumuna da öncülük eder. Metilglioksal, hücre içinde ileri-glikasyon ürünü (advanced glycation end-product; AGE) oluşumu için önemli bir prekürsördür. Biriken fruktoz-6-fosfat (F6P), UDP-N-asetilglukozamin (GlcNAc) oluşumunu artırır ve proteinlerde modifikasyona neden olur. UDP-N-asetilglukozamin, proteinlere serin amino asitinin -OH grubu yoluyla bağlanır. Hücre içinde artan glukoz polyol yoluna girerek sorbitol oluşturur. Bu esnada NADPH kullanımına neden olarak hücre içinde GSH miktarını azaltır.



Şekil.2.9. Mitokondrial süperoksit anyon oluşumuna bağımlı gelişen hiperglisemik komplikasyonlar (Ref: Nature 414:813–820, 2001).

MATERYAL VE METOD

3.1. Çalışmaya Alınacak Hasta Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmaya Tip 2 Diyabetes Mellitus (DM) tanısı almış 24 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen hastalar 18 yaş ve üzerinde ve HbA1c ortalamaları % 10'nun üzerinde ölçüldü. Çalışmaya dahil edilen hastaların aldıkları kalori standardize edildi. Üç gruba ayrılan hastalara (her grup 8 hasta) birinci gün eski tedavi rejimi uygulandı ve ikinci günden itibaren 3 değişik tipte insülin analogu ve metformin başlandı. Hastalara uygulanan tedavi tip 2 DM tedavisinde uygulanmakta ve Amerikan Klinik Endokrinoloji Birliği tarafından önerilen protokoller içerisinde yer almaktadır (48). Birinci hasta grubuna 0.4 U/kg/gün dozunda subkütan Humalog Mix 50 üç doza bölünerek (bifazik insülin lispro; %50 Insulin lispro -%50 protamine lispro) 2000 mg oral Metformin ile beraber, ikinci hasta grubuna 0.4 U/kg/gün dozunda subkütan Novomix 30 Flexpen iki doza bölünerek (bifazik insülin aspart; %30 aspart-%70 protamine aspart) 2000 mg oral Metformin ile beraber, üçüncü hasta grubuna ise 0.4 U/kg/gün dozunda subkütan Lantus Solostar tek doz (insülin glarjin) 2000 mg oral Metformin ile beraber uygulandı.

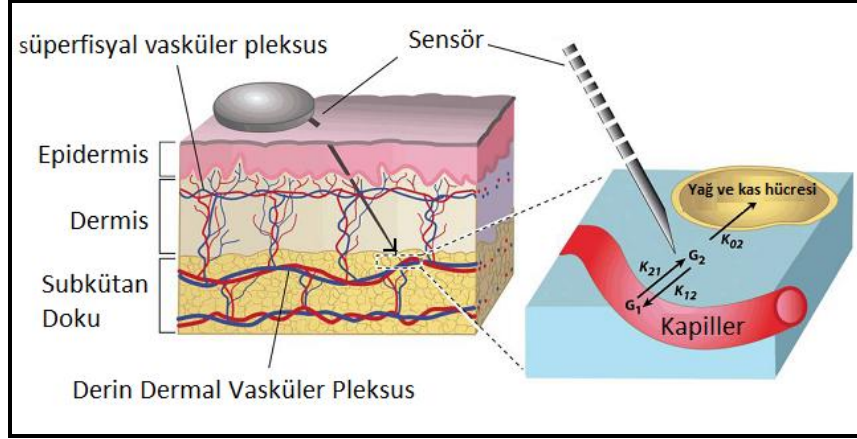
3.2. Kan Glukoz Düzeyleri Ve Ölçümü

Kan glukozu genellikle venöz plazmada ölçülür. Plazma glukoz konsantrasyonunun 100 mg/dL altında ölçülmesi klinik olarak referans sınırları içinde kabul edilir (48). Kan glukoz düzeyi arteriyel ve venöz seviyeler arasında 3-5 mg/dl farklılık gösterir. Bu fark yemek sonrasında artar (49). Venöz kanda glukoz düzeyi daha düşüktür çünkü kapiller geçiş sırasında bir miktar glukoz, dokulara difüzyon gösterir. Arteriyel ve kapiller kanda glukoz miktarı eşit düzeydedir (50).

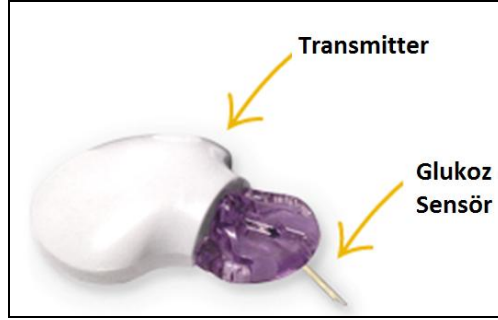
Glukometre aracılığı ile ölçülen kan glukozu tam kandaki glukoz miktarını tayin eder. Plazma glukoz düzeyi ölçümü, tam kandan yapılan ölçüme göre daha yüksektir. Hematokrit seviyelerinin %50'nin üzerinde olması glukometre ile yapılan glukoz ölçümlerinde yanlış düşük sonuca (false low) sebep olurken, hematokrit seviyelerinin %40'ın altında olması ise yanlış yüksek sonuca (false high) neden olur (51). Glukoz ölçümü yapılacak kanın transportunda meydana gelen gecikme, glukoz düzeylerinde saat başı %5-7 oranında bir azalmaya sebebiyet verir (52).

3.2.1. Kan Glukozunun Sürekli Olarak Moniterize Edilmesi

Kan glukozunun gün boyunca devamlı olarak ölçümü [Continuous (=devamlı) Glukoz Monitorize edici Sistem (CGMS)] deri altına yerleştirilen glukoz sensörleri ile mümkün olabilmektedir. Glukoz sensörünün deri altına yerleşimi şekil 2.6'da, glukoz sensörünün kendisi ise şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil.3.1. Derinin katmanları ve glukoz sensörünün yerleşimi
(Ref: Diabetes Technology & Therapeutics. June 2009, 11(s1): S-11-S-16).



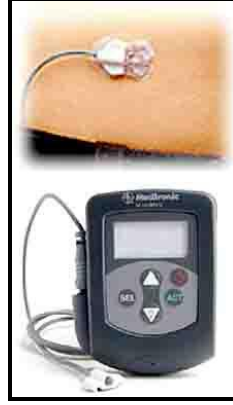
Şekil.3.2. Glukoz sensörü

Glukozun kapiller damarlardan interstiyel sıvıya difüzyonu kandaki konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Plazma ve interstiyel sıvı arasındaki glukoz dinamiği iki kompartmant modeli ile açıklanabilir (53). Bu modele göre interstiyel sıvıdaki glukoz konsantrasyonu aşağıda verilen denkleme göre hesap edilir.

$$dV_2G_2/dt = K_{21}V_1G_1 - (K_{12} + K_{02})V_2G_2$$

G1= Plazma glukoz konsantrasyonu; G2= İnterstiyel sıvıdaki glukoz konsantrasyonu; K12= Kapillerden glukoz transportunun ileri akış hızı; K21= Kapillerden glukoz transportunun geri akış hızı; K02= subkütan dokuya alınan glukoz; V1= Plazma volümü; V2= interstiyel sıvı volümü.

Sensörden alınan glukoz sinyali, belirli aralıklarla glukometre ile ölçülen glukoz düzeyleri ile kalibre edilmelidir (54). Yapılan bu kalibrasyonlar ile sensör sinyali kan glukoz değerine dönüştürülür. Sensör tarafından alınan glukoz sinyali transmitter aracılığı ile vücutta taşınan monitöre iletilir. İkinci jenerasyon aletlerde transmitter wireless ileti yaparken birinci jenerasyon cihazlarda kısa bir kabloyla monitöre bağlıdır (54) (Şekil 2.8).

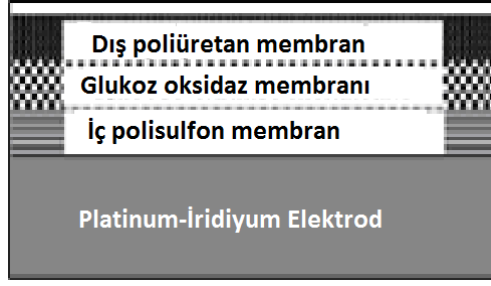


Şekil.3.3. Medtronic/minimed continuous (=devamlı) glukoz monitorize edici sistem (CGMS)

Sensör tarafından ölçülen interstisyel glukoz düzeyi, plazmadaki şeker düzeyini birkaç dakika geriden takip eder. Bu süreye “lag süresi” denir. Hızlı kan şekeri değişimlerinde bu süre 5-10 dakikayı bulabilir (55).

Glukoz sensörleri enzim-bağımlı amperometrik sistem ile glukoz konsantrasyonunu tayin ederler (56). Bu sistemlerde glukoz, glukoz oksidaz (GOx) enzimi tarafından okside olur ve glukonik aside dönüşür. Glukozdan alınan elektronlar moleküler oksijene (O_2) verilerek hidrojen peroksit oluşur (H_2O_2). Oluşan H_2O_2 biosensör içerisinde yer alan 0.7 V’luk bir elektrod tarafından (GOx working electrode-Platinum iridium yapısında) okside edilerek oksijen ve suya dönüştürülür. Hidrojen peroksitin oksidasyonu sırasında açığa çıkan akım karşı elektroda iletilir (Counter electrode). Elektrodun gerçekleştirdiği oksidasyon sırasında açığa çıkan akım, kan glukoz konsantrasyonu ile korelasyon gösterir.

Bu sistemin ilk oluşturulduğu zamanlarda kullanımını kısıtlayan bir unsur, H_2O_2 ’nin oksidasyonunu sağlayan elektrodun 0.7 V’da ortamda bulunan diğer bazı maddeleri de okside etmesiydi (örn, asetaminofen ve askorbat) (57). Bu sebepten dolayı “GOx working elektrod” etrafına kısmi geçirgen bir membran (iç polisulfon membran) konarak sadece H_2O_2 ve daha küçük moleküllerin geçişine izin verildi. Bu membran için uygun bir yapı maddesi sellüloz asetat ve nafion’dan oluşan sulfonlanmış bir kopolimerdi (58). Sistemin kullanılmasında ikinci bir kısıtlayıcı unsur ise fizyolojik sıvılardaki düşük oksijen konsantrasyonunun glukoz oksidaz enziminin reaksiyonunu engellemesiydi. Bu durumda sistemde oluşan düşük akım, glukoz azlığından değil, oksijen düşüklüğünden kaynaklanmaktaydı. Bu engeli aşmak için sistemin etrafına ikinci bir seçici membran (dış poliüretan membran) ilave edildi ve glukozun geçişine oranla oksijenin geçişi daha kolay hale getirildi (56). Sistemde bulunan bu ikinci membran lag süresini uzattı ancak oksidasyona bağlı oluşan akımın glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılı olmasını sağladı. Glukoz biosensöründe working elektrodun yapısı şekil 2.9’da gösterilmiştir.



Şekil. 3.4. Working elektrodun yapısı (Ref: Biosens Bioelectron. 2002 Mar;17(3):181-9).

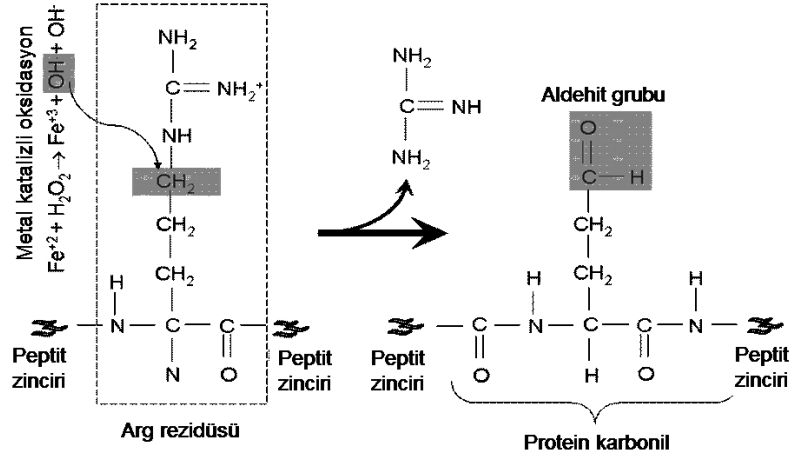
Glukoz sensörünün kullanımında üçüncü kısıtlayıcı unsur ise enzim içeren membranın makrofajlar, proteinler ve protein fragmanları tarafından kirletilmesidir (59). Bu sebepten dolayı oksijen geçirgen dış membranın varlığı enzim membranı için koruyucu bir işlev de görmektedir. Bu koruyucu bariyere rağmen sensörde bulunan enzim zamanla yıkıma uğrar (60). Bu sebepten dolayı her sensör için kullanım süresini FDA 72 saat ile sınırlandırmıştır.

3.2.2. Çalışmaya Alınan Hastaların Kan Glukozunun Monitorize Edilmesi

Çalışmaya alınan hastaların endokrinoloji servisine yatışı yapıldıktan sonra kan glukoz düzeyleri deri altına yerleştirilen bir sensör aracılığı ile sürekli olarak 72 saat süresince monitörize edildi. CGMS uygulaması sonlandırıldıktan sonra elde edilen data ile günlük glisemik patern izlendi. Çalışmaya alınan hastalara birinci gün eski tedavi rejimi uygulandı, kan ve 24 saatlik idrar örnekleri alındı. Üçüncü gün (72 saat) sonunda hastalardan tekrar kan ve 24 saatlik idrar örnekleri toplandı. Toplanan kan örneklerinde protein/lipid oksidasyonu ölçüldü ve nitrat/nitrit tayini yapıldı. İdrar örneklerinde ise lipid oksidasyon ürününün atılımına bakıldı.

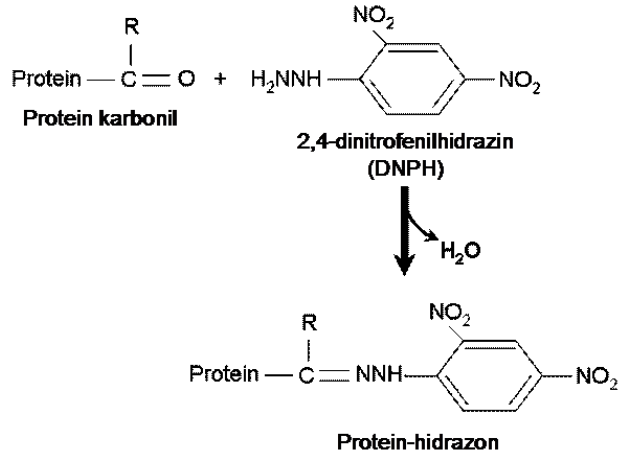
3.3. Protein Oksidasyonu

Protein karbonil oluşumu genellikle protein oksidasyonunu gösteren bir parametredir (61). Karbonil gruplarının ölçümü; oksidatif stresin proteinler üzerinde meydana getirdiği hasarın miktarının belirlenmesinde iyi bir belirteç olarak düşünülmektedir. Şekerlerin ve membran lipidlerinin ROS aracılı oksidasyonunu takiben oluşan karboniller; biyolojik aktivitelerinin değişmesine neden olan ve genellikle yapısal proteinler ile CO-proteinler (karbonil grubu taşıyan proteinler) olarak bilinen bileşikler oluşturabilir (62). Proteinlerdeki reaktif karbonil grupları protein yan zincirlerinin direk oksidasyonu ile de oluşabilir (63). Reaktif oksijen türleri aminoasit rezidü yan zincirlerini keton ya da aldehit türevlerine okside edebilir. Histidin, arjinin ve lizin ROS-aracılı protein karbonil oluşumuna en hassas aminoasitlerdir (64) (şekil 3.5).



Şekil.3.5. Arjinin yan zincirinin ROS aracılı oksidasyonu ile protein karbonil oluşumu

Proteine bağlı karbonilleri ölçen birçok metod; karbonillenmiş protein yan zincirlerinin 2,4 dinitrofenil-hidrazin (DNPH) ile kovalent reaksiyonu ve 2,4-dinitrofenil-hidrazon gruplarının spesifik anti-dinitrofenil (DNP) antikoru ile belirlenmesine dayanır. DNPH reaksiyonula üretilen protein hidrazon aynı zamanda spektrofotometrik olarak 360-385 nm arası bir absorbansta da ölçülebilir (63) (şekil 3.6).



Şekil..3.6. Protein karbonillerin belirlenmesi

3.4. Plazma Protein Karbonil Seviyelerinin Ölçümü

Protein oksidasyonunun en yaygın ve genel göstergesi protein karbonil miktarıdır. Demir ve bakır gibi kolay indirgenen ve oksitlenen iyonlar proteinlerde kation bağlayıcı bölgelere bağlanıp, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ile reaksiyona girebilirler. Bu reaksiyon sonucunda lizin, arginin, prolin ve histidin gibi aminoasitlerin amin yan zincirleri karbonillere dönüşür. Protein örneklerinde karbonil miktarını belirleyip ölçmek için en uygun yöntem, protein

karbonilleri ile 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) arasında reaksiyon oluşturmaktır. Son ürün olarak gösterilen protein hidrazon 360-385 nm'de absorbanans vererek spektrofotometrik olarak tayin edilir.

Protein karbonil miktarının kalitatif tayini PAGE-western blot yöntemiyle de yapılmıştır. Tedavi gruplarından alınan plazma örneklerinde protein konsantrasyonu 595 nm'de Coomassie reaktifi kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümde bovine serum albumini de standard olarak kullanılmıştır. Plazma örnekleri 20 µg protein içerecek şekilde dilüe edildikten sonra %12 SDS ve sonrasında 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) ile 15 dk oda ısısında inkübe edildi. Örnekler %15'lik poliakrelamid jelle tatbik edilerek elektroforetik ayırım sağlandı. Jelde ayrılan proteinler, selüloz asetata transfer edilerek western blot analizi gerçekleştirildi. Ayrılan doku proteinleri primer anti protein karbonil antikoruna içerisinde (1:150 dilüsyonda) bir gece bekletildikten sonra HRP-bağlı sekonder antikor (1:300 dilüsyonda) ile muamele edildi. Reaktif doku proteinleri kemilüminesans yöntemiyle belirlendi. SDS-PAGE ile ayrılan doku proteinleri eş zamanlı olarak protein boyaması ile de jelde görüntülendi.

3.5. Plazma ve İdrar Lipid Oksidasyonunun Ölçümü

Plazmada izoprostanlar fosfolipidlerin oksidasyonu sonucunda oluşan eikosanoidlerdir. Oksidatif stresin arttığı durumlarda plazma ve idrar seviyeleri yükselir. Sağlıklı insanlardan elde edilen plazmada 8-izoprostan seviyesi 40-100 pg/ml'dir ve bu düzey yaşla birlikte artış gösterir. 8-izoprostan tayininden önce elde edilen plazma örnekleri afinite kolon purifikasyonuna tabi tutuldular. Bu sayede enzim immünoassay öncesi örnekler 8-izoprostandan zengin hale getirildi. 8-izoprostan miktarının tayini kompetatif enzim immünoassay ile yapıldı. Reaksiyon ortamına izoprostan antikoruna ile beraber alkalen fosfataza (ALP) bağımlı 8-izoprostan ve örnek ilave edildi. Daha sonra alkalen fosfatazın substratını içeren reaktif ilave edildi. Reaktif ALP ile reaksiyona girdikten sonra 412 nm'de ölçülen sarı renk oluşumuna neden oldu. 412 nm'de ölçülen absorbanans, örnekteki izoprostan miktarı ile ters orantı gösterdi.

3.6. Plazma Nitrit ve Nitrat Ölçümü

İn vivo olarak nitrik oksit son metabolik ürünleri nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻)'dır ve biyolojik sistemlerde genellikle bu şekilde tanımlanır. Nitrik oksit metabolitlerinin ölçülmesinde sistemde var olan tüm nitrat, nitrat redüktaz enzimi ile nitrite dönüştürülür. Oluşan nitrit 2,3,-diaminoaphthalene (DAN) ile reaksiyona girerek 1-naphthotriazole oluşturur. Oluşan ürün florometrik olarak ölçülür.

3.7. Protein Nitrasyonu

Aromatik nitrasyon patolojik koşullar, NO ve oksidatif stresi içine alan sinyalizasyon olaylarının aracısı olarak tanınır. Çok sayıda in vitro biyokimyasal çalışma protein tirozin rezidülerinin nitrasyonunun proteinin fonksiyonunu değiştirebildiğini göstermiştir (65). 3-nitrotirozin, 3-bromotirozin ve 3-klorotirozinin protein nitrasyonunun seçici markırları olduğu gösterilmiştir (66). Gerçekten de protein 3-nitrotirozin (NO₂Tyr) tayini genellikle hem insan hastalık dereceleri hem

de hayvan modellerinde NO'dan türeyen oksidanların tanısal markırı olarak kullanılır (67). Western blotlama, enzim-bağı immunosorbent assay (ELISA), immünokimya, HPLC ve mass spektrometriyi içeren birçok teknik çeşitli hastalık seviyelerinde NO₂Tyr oluşumunun belirlenmesinde kullanılır (67).

3.8. Plazma Protein Nitrasyonunun Ölçümü

Peroksinitrit oluşumu protein tirozin rezidülerinin nitrasyonuna sebebiyet verir. Bu modifikasyon, oluşan nitrojen radikallerinin ($\cdot\text{NO}_2$) aromatik aminoasitlerle reaksiyona girmesiyle meydana gelir. 3-Nitrotirozin oluşumu için nitrojen dioksit ($\cdot\text{NO}_2$), tirozil radikali (Tyr \cdot) ile reaksiyona girmelidir. Bu reaksiyon, difüzyon ile sınırlandırılacak bir hızda ($3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) meydana gelir ve iki basamaklı olarak gerçekleşir. İlk olarak, proteinde bulunan Tyr aminoasidi hücre içinde oluşan radikaller ile oksidasyona uğrayarak tirozil radikalini (Tyr \cdot) oluşturur. İkinci olarak, Tyr \cdot nitrojen dioksit ($\cdot\text{NO}_2$) ile reaksiyona girerek nitrotirozini (NO₂Tyr) oluşturur. Tirozin nitrasyonunda hız kısıtlayıcı basamak, nitrojen dioksit ($\cdot\text{NO}_2$) oluşumudur. Nitrojen dioksit ($\cdot\text{NO}_2$), nitrik oksit'den (NO) köken alan nitrit (NO₂-) molekülünün oksidasyonu ile oluşur. Enzimatik ve non-enzimatik olarak meydana gelen $\cdot\text{NO}_2$, proteinlerde bulunan tirozin nitrasyonu için hız kısıtlayıcı faktördür (68). Plazmada protein nitrotirozin miktarı enzyme-linked immünoassay yöntemine dayanan ölçüm kitiyle belirlenmiştir.

3.9. Sonuçların Değerlendirilmesi

1.CGMS uygulamasında kan glukoz düzeyindeki değişkenlik gün içinde elde edilen verilerin Standard Deviasyonu (SD) olarak bildirildi. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi, her gün için elde edilen SD değeri cihaz tarafından hesap edilmektedir.

2.Kan glukoz düzeylerindeki variabilitayı gösteren günlük SD değerleri ve biyokimyasal ölçüm verilerinin tedavi öncesi ve sonrası sonuçları arasındaki farklılık 2 yönlü varyans analizi ile belirlendi.

3.Hastalardan yapılan CGMS kaydı ile elde edilen veriler ise Tablo 4.1'de sunulmuştur. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

4.Tedavi gruplarında plazma protein karbonil düzeyleri şekil 4.2'de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

5.Tedavi gruplarında plazma 8-İzoprostan düzeyleri şekil 4.4'de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

6.Tedavi gruplarında idrar 8-İzoprostan düzeyleri şekil 4.5’de gösterilmiştir. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir

7.Tedavi gruplarında plazma nitrit ve nitrat düzeyleri şekil 4.6’da gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

8.Tedavi gruplarında plazma protein nitrasyon (nitrotirozin) düzeyleri şekil 4.7’de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Sunulan verilerin istatistiksel değerlendirmesi iki yönlü varyans analizi ile yapılmıştır. Gruplararası ve grup içi istatistiksel farklılık ise Tukey testi ile belirlenmiştir.

BULGULAR

4.1. Hasta Gruplarından Elde Edilen CGMS Verileri

Hastalara ait yaş, cinsiyet ve HbA1c verileri tablo 4.1’de verilmiştir. Her üç hasta grubundan CGMS ile elde edilen bir data örneği şekil 4.1’de gösterilmiştir. Hastalardan yapılan CGMS kaydı ile elde edilen veriler ise Tablo 4.1’de sunulmuştur. Tüm ilaç gruplarında tedavi sonrası 2nci günde ölçülen ortalama kan glukozu ve kan glukozu standard deviasyonları tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştı.

Tablo 4.1. Hasta Gruplarında Yaş, Cinsiyet ve HbA1c Verileri

	Yaş	Cinsiyet	HbA1c (%)
Bifazik İnsülin Lispro (n=8)	54.25 ± 16.10	4K/4E	11.94 ± 3.08
Bifazik İnsülin Aspart (n=8)	46.5 ± 9.7	4K/4E	11.91 ± 1.99
Insulin Glarjin (n=8)	52.25 ± 6.48	3K/5E	11.48 ± 1.85

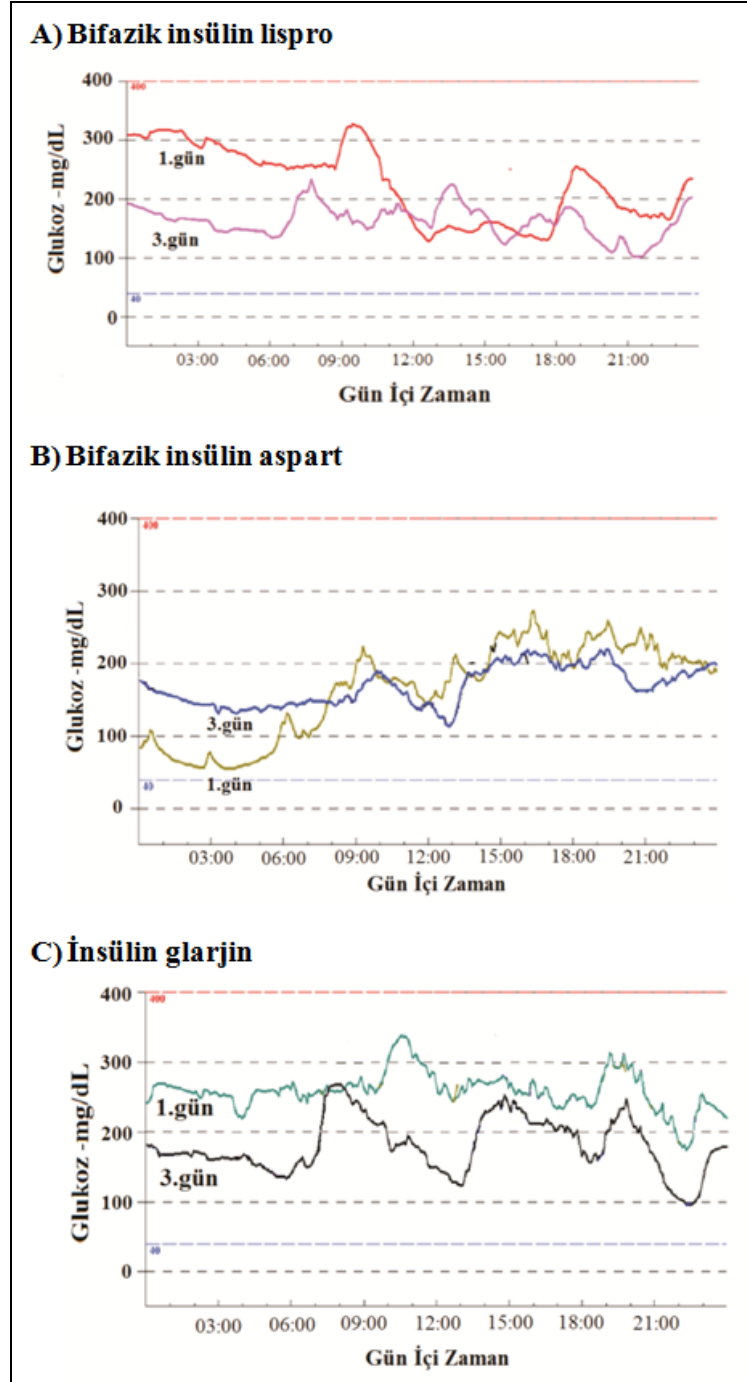
SD, standard deviasyon; K, kadın; E, erkek; HbA1c, glikolize hemoglobin.
Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Hasta Gruplarından Elde Edilen CGMS Verileri

	Tedavi Öncesi Ortalama Kan Şekeri (mg/dl)	Tedavi Öncesi Kan Şekeri SD	Tedavi Sonrası Ortalama Kan Şekeri (mg/dl)	Tedavi Sonrası Kan Şekeri SD
Bifazik İnsülin Lispro (n=8)	227 ± 65.91	67.25 ± 28.53	183.25 ± 77.09 a	39.38 ± 16.99 b
Bifazik İnsülin Aspart (n=8)	187.75 ± 51.17	45.88 ± 17.06	165.88 ± 50.08 a	32.5 ± 14.35 b
Insulin Glarjin (n=8)	231.63 ± 30.87	38.75 ± 10.59	182.75 ± 32.85 a	32.25 ± 9,5 b

SD, standard deviasyon.

Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir, a: p=0,019 tedavi öncesi aynı grup ile kıyaslandığında; b: p=0,003 tedavi öncesi aynı grup ile kıyaslandığında.

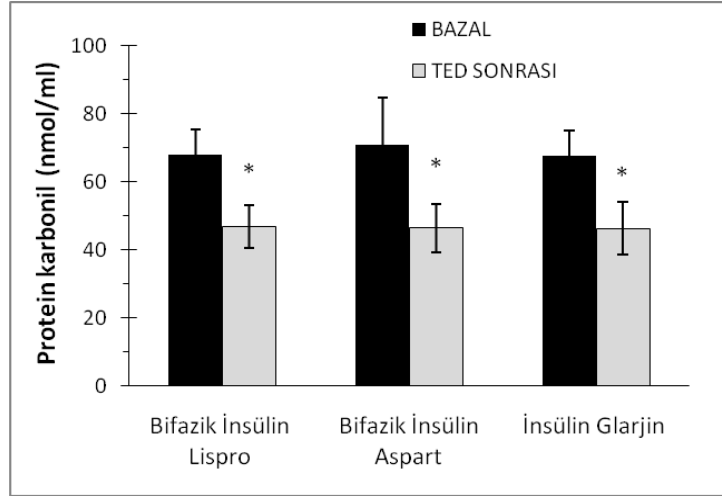


Şekil 4.1. Hasta gruplarından elde edilen CGMS sonuçları

4.2. Hasta Gruplarında Plazma Protein Karbonil Düzeyleri

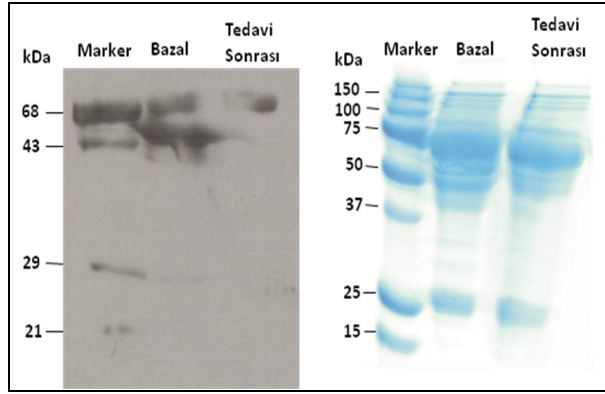
Tedavi gruplarında plazma protein karbonil düzeyleri şekil 4.2’de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm SD olarak verilmiştir. Tedavi öncesi tüm gruplarda plazma protein karbonil düzeyleri (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 68.01 ± 7.34 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 70.94 ± 13.79 ; Insulin Glarjin (n=8), 67.84 ± 7.20 nmol/ml) tedavi sonrasına göre (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 46.78 ± 6.29 ; Bifazik İnsülin

Aspart (n=8), 46.42 ± 7.04 ; Insulin Glarjin (n=8), 46.39 ± 7.89 nmol/ml) anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.001$).



Şekil.4.2. Plazma protein karbonil düzeyleri

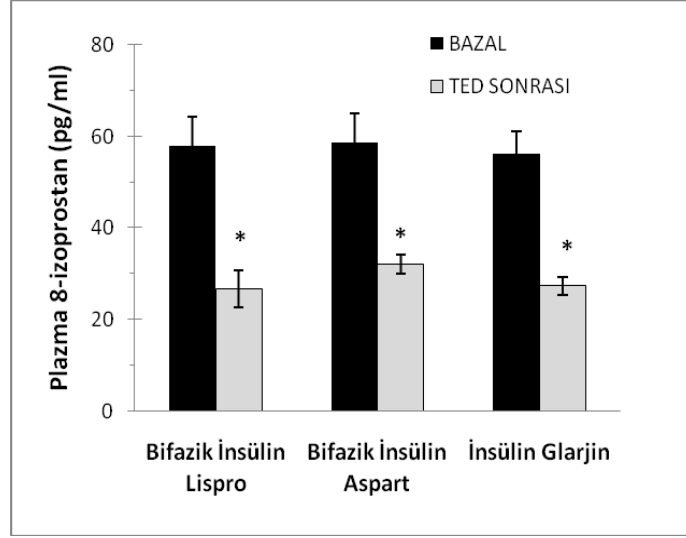
Protein karbonil miktarının kalitatif tayini western blot analizi ile yapıldı. Sonuçlar şekil 4.3’de gösterilmektedir. Tedavi öncesi ile kıyaslandığı zaman, plazma protein karbonil miktarı tedavi sonrasında azalma göstermiştir (Şekil 4.3). Protein boyaması ise tüm kuyucuklara benzer oranlarda protein yüklendiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Plazma protein karbonil western blot analizi

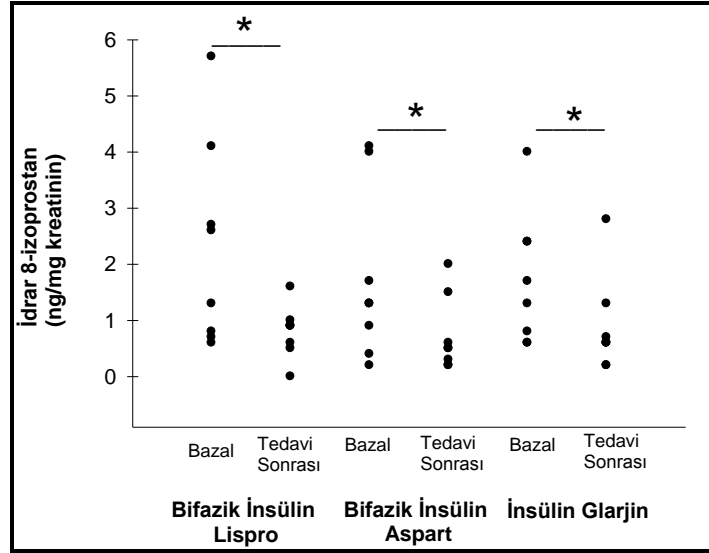
4.3. Hasta Gruplarında Plazma ve İdrar 8-İzoprostan Düzeyleri

Tedavi gruplarında plazma 8-İzoprostan düzeyleri şekil 4.4’de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Tedavi öncesi tüm gruplarda plazma 8-izoprostan düzeyleri (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 57.98 ± 6.3 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 58.73 ± 6.23 ; Insulin Glarjin (n=8), 56.11 ± 4.89 pg/ml) tedavi sonrasına göre (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 26.67 ± 4.04 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 32.10 ± 1.97 ; Insulin Glarjin (n=8), 27.36 ± 2.02 pg/ml) anlamlı olarak daha yüksekti ($p < 0.001$).



Şekil.4.4. Plazma 8-izoprostan düzeyleri

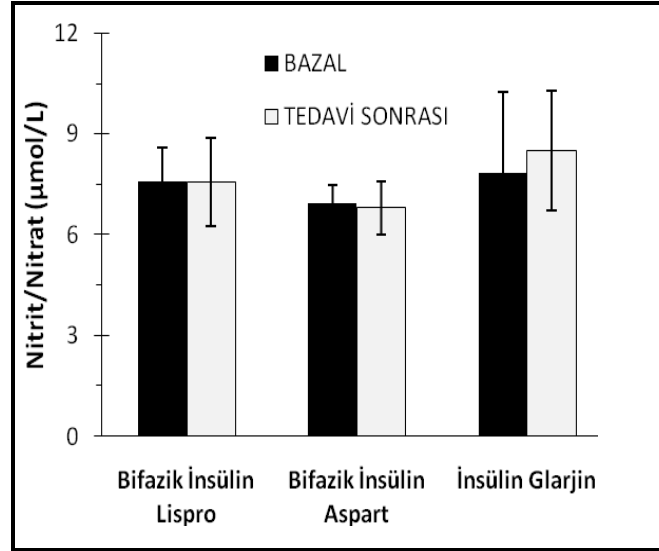
Tedavi gruplarında idrar 8-İzoprostan düzeyleri şekil 4.5’de gösterilmiştir. Tedavi öncesi tüm gruplarda idrar 8-izoprostan düzeyleri (ortalama \pm SD) (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), $2.31 \pm 1,84$; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), $1,76 \pm 1,51$; İnsulin Glarjin (n=8), $1,72 \pm 1,17$ ng/mg kreatinin) tedavi sonrasına göre (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 0.81 ± 0.46 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 0.71 ± 0.66 ; İnsulin Glarjin (n=8), 0.87 ± 0.86 ng/mg kreatinin) anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.002$).



Şekil.4.5. İdrar 8-izoprostan düzeyleri

4.4. Hasta Gruplarında Plazma Nitrit ve Nitrat Seviyeleri

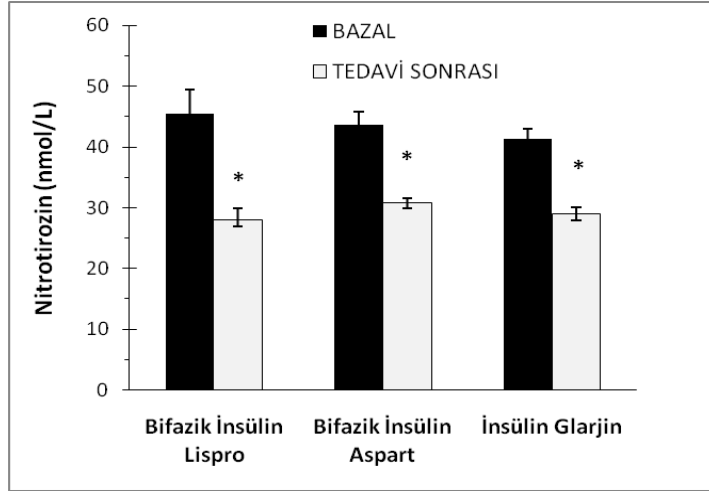
Tedavi gruplarında plazma nitrit ve nitrat düzeyleri şekil 4.6'da gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Tedavi öncesi tüm gruplarda plazma nitrit/nitrat düzeyleri (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 7.6 ± 0.99 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 6.95 ± 0.52 ; İnsülin Glarjin (n=8), $7.83 \pm 2.4 \mu\text{mol/L}$) tedavi sonrasına göre (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 7.56 ± 1.3 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 6.8 ± 0.79 ; İnsulin Glarjin (n=8), $8.5 \pm 1.77 \mu\text{mol/L}$) anlamlı bir farklılık göstermedi.



Şekil 4.6. Plazma nitrit ve nitrat seviyeleri

4.5. Hasta Gruplarında Plazma Protein Nitrazyonu Seviyeleri

Tedavi gruplarında plazma protein nitrazyon (nitrotirozin) düzeyleri şekil 4.7'de gösterilmiştir. Değerler ortalama \pm standard hata (SEM) olarak verilmiştir. Tedavi öncesi tüm gruplarda plazma nitrotirozin düzeyleri (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 45.11 ± 3.88 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 43.61 ± 2.11 ; İnsülin Glarjin (n=8), $41.36 \pm 1.63 \text{ nmol/L}$) tedavi sonrasına göre (Bifazik İnsülin Lispro (n=8), 28.01 ± 1.91 ; Bifazik İnsülin Aspart (n=8), 30.86 ± 0.76 ; İnsulin Glarjin (n=8), $28.93 \pm 1.11 \text{ nmol/L}$) anlamlı bir farklılık gösterdi ($p < 0.001$).



Şekil 4.7. Plazma nitrotirozin seviyeleri

TARTIŞMA

Kan glukoz konsantrasyonunun ortalama seyrini gösteren HbA1c düzeyleri ile kardiyovasküler diabetik komplikasyonlar arasında kuvvetli bir ilişki gösterilmiştir (69 , 70 , 71). Ancak, kan glukoz konsantrasyonundaki günlük oynamaların diabetik komplikasyonlar açısından ilave bir risk oluşturup oluşturmadığı halen kesinlik kazanmamıştır. 1995 yılında yayınlanan “Diyabet Kontrolü ve Komplikasyonları” raporunda benzer HbA1c düzeyine sahip diyabetik hastalarda retinopati gelişim riskinin uygulanan tedaviye bağımlı olduğu gösterilmiştir (72). İntensif tedavi uygulanan hastalarda klasik tedavi uygulanan hastalara göre daha az diabetik retinopati görülmüştür (73). Bu durum klasik tedavi uygulanan hastalarda kan glukoz konsantrasyonlarındaki değişkenliğin daha fazla olduğunu göstermektedir.

Yaşlı tip 2 diyabet hastalarında açlık plazma glukoz düzeylerindeki instabilite, kardiyovasküler mortalite oluşumu yönünden risk teşkil etmektedir (73). Bu tip hastaların tedavisinde glukoz stabilitesinin sağlanması hedeflenmektedir. Endotelial disfonksiyon, diyabetik kardiyovasküler komplikasyonların oluşumunda etkindir (74 , 75). Kan glukoz konsantrasyonunun yüksek olması oksidatif stress aracılığı ile endotelial disfonksiyon oluşturur (76).

Osilasyon gösteren glukoz düzeyleri 24 saatlik bir dönemde endotelial fonksiyonu bozmuştur. Osilasyon gösteren glukoz düzeyleri ile meydana gelen endotelial fonksiyon bozukluğu, yüksek seyirli sabit glukoz'a göre daha fazladır (77). Yapılan pek çok çalışma, kan glukoz konsantrasyonlarında görülen akut yükselmenin endotelial fonksiyonu hem normal hem de diyabetik bireylerde bozduğunu göstermiştir (78 , 81). Ancak bu raporların tümünde tek bir glukoz yükselmesinin etkileri araştırılmıştır. Mevcut çalışmamızda fluktuasyon gösteren glukoz düzeylerinin plazma ve idrar oksidatif markırları üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Oral glukoz tolerans testi yapılan normal bireylerde oluşan kan glukoz konsantrasyonu ile endotelial disfonksiyon arasında direkt ilişki gösterilmiştir (81). Yapılan başka bir çalışmada ise insanlarda osilasyon gösteren glukoz düzeylerinin yüksek seyirli sabit glukoz'a göre daha kötü etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Osilasyon gösteren yüksek seyirli sabit glukozun hücre kültürü ve hayvan modellerinde etkileri incelenmiştir (82 , 85). Osilasyon gösteren glukoz varlığında protein kinaz C, NADPH oksidaz, indüklenebilen nitrik oksit sentaz (iNOS) ve inflamatuvar markerlar, yüksek seyirli sabit glukoz'a göre daha yüksektir (82 , 87). Osilasyon gösteren glukoz varlığında hücreler antioksidan savunma mekanizmalarını da yeterince arttıramazlar (88). Bu durumun varlığı, diyabetik komplikasyonların gelişmesine elverişli bir ortam hazırlar.

Bu çalışmanın temel amacı farklı tipte insülin tedavisi başlanan Tip 2 diyabet hastalarında tedavi öncesi ve sonrası glukoz düzeyindeki değişkenliğin oksidatif

strese etkisini incelemektir. Çalışmamızda yüksek doz insülin analogları ile başlatılan tedavi sonrasında plazma protein karbonil düzeyleri, kan glukoz düzeylerine benzer şekilde, anlamlı olarak azalmıştır. Yapılan pekçok çalışma diyabetik hastalarda sağlıklı bireylere göre protein karbonil düzeyinin daha yüksek olduğunu rapor etmiştir (89 , 90). Daha yakın zamanda yapılan çalışmalar ise glisemik kontrolün protein oksidasyonu üzerindeki etkisini göstermiştir. Bir çalışmada HbA1c düzeyi %7'nin üzerinde olan 17 hastada ve %7'nin altında olan 23 hastada plazma protein karbonil düzeyi ölçülmüştür. Kötü glisemik kontrolü olan hasta grubunda plazma protein karbonil düzeyi anlamlı olarak artış göstermiştir (91). Benzer şekilde yapılan diğer iki çalışmada, diyabetik retinopati ve nefropatisi olan tip 2 diyabetes mellituslu hastalarda plazma protein karbonil düzeylerinin komplikasyonsuz tip 2 diyabetes mellituslu hastalara göre anlamlı olarak artış gösterdiği görülmüştür (92 , 93). Farklı bir çalışmada, mikroangiopatisi olan 26 tane tip 2 diyabetes mellitus hastasında ve 28 tane komplikasyonu olmayan tip 2 diyabetes mellitus hastasında protein karbonil düzeyleri ölçülmüştür. Protein karbonil düzeyleri komplikasyonu olan diyabetik hastalarda komplikasyonsuz gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (94). Protein karbonil düzeylerindeki artışın tip 2 diyabetes mellituslu hastalarda insülin rezistansı (HOMA-IR) korelasyon gösterdiği bulunmuştur (95). Sunulan çalışmamızda ilk defa farklı insülin analogları ile kan glukozu regüle edilerek CGMS eşliğinde 72 saatlik glisemik kontrol izlenmiş ve tedavi gruplarında plazma protein karbonil düzeylerindeki değişkenlik belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler ortalama kan glukozundaki ve glukoz fluktuasyonlarındaki azalmanın benzer şekilde plazma protein karbonil düzeylerinde de azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Yaptığımız çalışma farklı insülin analoglarının plazma protein karbonil düzeylerini benzer şekilde azalttığını göstermiştir.

Yüksek doz insülin analogları plazma nitrotirozin düzeylerini de anlamlı olarak azaltmıştır. Diyabetik hastalarda plazma nitrotirozin düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre daha yüksek olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (96 , 97). Literatürde var olan çalışmalar nitrotirozin oluşumunda postprandial hipergliseminin rolünü de göstermiştir (98). Literatürde yayınlanan bir çalışmada insülin aspart (0.15 U/kg/gün) veya regüler insülin (0.15 U/kg/gün) verilen hastalarda açlık plazma nitrotirozin düzeylerine bakılmıştır. İnsülin aspartın hem plazma glukoz düzeylerini hem de plazma nitrotirozin miktarını regüler insüline göre anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (98). Sunulan çalışmamızda ilk defa yüksek dozda (0.4 U/kg/gün) farklı insülin analogları ile kan glukozu regüle edilerek CGMS eşliğinde 72 saatlik glisemik kontrol izlenmiş ve tedavi gruplarında plazma nitrotirozin düzeylerindeki değişkenlik belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler ortalama kan glukozundaki ve glukoz fluktuasyonlarındaki azalmanın plazma nitrotirozin düzeylerinde de azalmaya neden olduğunu göstermiştir. İnsülin analogları ile 48 saat yapılan tedavi sonrasında plazma nitrotirozin düzeylerindeki belirgin azalma nitrozile proteinlerin kandan temizlendiğini göstermektedir. Bu bulgu nitrozile plazma proteinlerinin normal plazma proteinlerine göre artmış transendotelial transportunu ortaya koyan mekanizmayı destekler niteliktedir (99). Yaptığımız çalışmada farklı insülin analoglarının benzer şekilde plazma nitrotirozin düzeylerini azalttığını görülmüştür.

Yüksek doz insülin analogları ile başlatılan tedavi sonrasında plazma ve idrar 8-izoprostan düzeyleri, kan glukoz düzeylerine benzer şekilde, anlamlı olarak

azalmıştır. Yapılan pekçok çalışma glukoz düzeylerindeki oynamaların plazma ve idrar 8-izoprostan düzeylerini arttırdığını göstermiştir (100 , 101). Sunulan çalışmamızda ilk defa yüksek dozda (0.4 U/kg/gün) farklı insülin analogları ile kan glukozu regüle edilerek CGMS eşliğinde 72 saatlik glisemik kontrol izlenmiş ve tedavi gruplarında plazma ve idrar 8-izoprostan düzeylerindeki değişkenlik belirlenmiştir. Elde ettiğimiz veriler ortalama kan glukozundaki ve glukoz fluktuasyonlarındaki azalmanın plazma ve idrar düzeylerinde de azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Yaptığımız çalışmada farklı insülin analoglarının benzer şekilde plazma ve idrar 8-izoprostan düzeylerini azalttığı görülmüştür. Farklı insülin tedavilerinin oksidatif stres ve glisemik kontrol üzerindeki etkilerini inceleyen değişik çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada 60 tane tip 2 diyabet hastasına oral diyabetik, 31 tane tip 2 diyabet hastasına ise oral antidiyabetik ve insülin tedavisi verilmiştir. Oral antidiyabetik tedavisi alan tip 2 diyabet hastalarında 24 saatlik 8-izoprostan miktarı insülin ve oral antidiyabetik verilen gruba göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (102). Diğer bir çalışmada 17 tane tip 2 diyabet hastasına bazal bolus insülin, 20 tane tip 2 diyabet hastasına ise miks terapi verilmiştir. İki grup arasında idrar 8-izoprostan düzeyleri arasında fark görülmemiştir (103). Oral antidiyabetik verilen 24 tane tip 2 diyabet hastasında 48 saat süresince CGMS ile kan glukozu izlenmiştir. Bu çalışmada idrar 8-izoprostan düzeyleri ve glukoz variabilitesi arasında bir ilişki bulunamamıştır (104). Başka bir çalışmada 61 tane tip 2 diyabet hastasına oral antidiyabetik, 30 tane tip 2 diyabet hastasına düşük doz insülin (<0.4 U/kg/gün) ve oral antidiyabetik, 31 tane tip 2 diyabet hastasına ise yüksek doz insülin (>0.4 U/kg/gün) ve oral antidiyabetik verilmiştir. İnsülin ve oral antidiyabetik verilen gruplarda, oral antidiyabetik verilen gruba göre 24 saatlik 8-izoprostan düzeyi anlamlı olarak düşmüştür (105). Bu çalışmadan elde edilen veriler bizim çalışmamızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda yüksek doz insülin analogları ile başlatılan tedavi sonrasında plazma nitrit ve nitrat düzeylerine de bakılmıştır. Tedavi öncesi tüm gruplarda plazma nitrit/nitrat düzeyleri tedavi sonrasına göre anlamlı bir farklılık göstermedi. Tip 2 diyabetde plazma nitrit/nitrat düzeylerini rapor eden çalışmalar arasında çelişki vardır. Yapılan bazı çalışmalar tip 2 diabetik hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek nitrit/nitrat düzeyleri rapor ederken (106 , 108) diğer çalışmalar iki grup arasında fark olmadığını rapor etmektedir (109). Glisemik kontrolün plazma nitrit/nitrat düzeylerine olan etkisini inceleyen bir çalışmada kan glukoz düzeyleri haftalık olarak izlenmiş ve açlık kan glukoz düzeyleri ile plazma nitrit/nitrat düzeyleri arasında bir ilişki bulunamamıştır (110). Bu çalışma mevcut çalışmamızı destekler niteliktedir.

SONUÇLAR

Tüm ilaç gruplarında tedavi sonrası 2nci günde ölçülen ortalama kan glukozu ve ortalama kan glukozu standard deviasyonları tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalmıştı. Benzer şekilde plazma protein ve lipid oksidasyon parametreleri de tedavi sonrası 2nci günde tedavi öncesine göre anlamlı olarak azalma gösterdi. Tedavi grupları arasında nitrik oksit salınımı farklılık göstermedi. Bu çalışmadan elde edilen veriler, tedavi öncesi ve sonrası glukoz düzeyindeki değişkenliğin oksidatif stres üzerinde etkili olduğunu ve farklı insülin analoglarının oksidatif stresi azaltma yönünde benzer etkilere sahip olduğunu göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longer complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977–986, 1993.
2. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 44:968–983, 1995.
3. Muggeo M, Verlato G, Bonora E, Zoppini G, Corbellini M, de Marco R: Long-term instability of fasting plasma glucose, a novel predictor of cardiovascular mortality in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Verona Diabetes Study. *Circulation* 96:1750–1754, 1997
4. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, et al: Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med* 164:2090–2095, 2004
5. Horvarth EM, Benko R, Kiss L, Muranyi M, Pek T, Fekete K, Barany T, Somlai A, Csorda s A, Szabo C Rapid ‘glycaemic swings’ induce nitrosative stress, activate poly- (ADP-ribose) polymerase and impair endothelial function in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetologia* 52:952–961, 2009.
6. Ceriello A, Esposito K, Piconi L, Ihnat MA, Thorpe JE, Testa R, Boemi M, Giugliano D. Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes* 57:1349–1354. 2008
7. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 295:1681–1687, 2006.
8. Lakso M. Epidemiology and diagnosis of type 2 diabetes. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D, eds. *Textbook of Type 2 Diabetes*. New York: Martin Dunitz Taylor&Francis Group; 2003.p. 1-12.
9. International Diabetes Federation, World Diabetes Foundation. *Diabetes Atlas*. 2nd ed. Brussels: International Diabetes Federation Publ., 2003

10. Balkau B, Eschwège E. The diagnosis and classification of diabetes and impaired glucose regulation. In: Pickup JC, Williams G, eds. *Textbook of Diabetes*. 3rd ed. Vol. I. Masschusetts, Oxford, Victoria, Berlin, Turin: Blackwell Sci.; 2003. Ch. 2.1-2.13.
11. Zimmet P, Williams J, de Courten M. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. In: Wass JAM, Shalet SM, Gale E, Amiel S, eds. *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford, New York: Oxford University Press; 2002. p. 1635-46.
12. Williams R. Public health problems of diabetes mellitus and its cost to the community. In: Williams G, Pickup J, eds. *Textbook of Diabetes*. 2nd ed. Vol. I. Cambridge: Blackwell Sci; 1997. Ch. 4.1-4.4.
13. Satman İ. Diabetes mellitus'un epidemiyolojisi. In: Yenigün M, Altuntaş Y, eds. *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. p. 69-83.
14. Hales N, O'Rahilly S. The aetiology of type 2 diabetes. In: Wass JAM, Shalet SM, Gale E, Amiel S, eds. *Oxford Textbook of Endocrinology and Diabetes*. Oxford: Oxford University Press; 2002. p. 1682-8.
15. Müller-Wieland D, Kotzka J, Goldstein GJ. Pathogenesis of type 2 diabetes. In: Goldstein BJ, Müller-Wieland D, eds. *Textbook of Type 2 Diabetes*. New York: Martin Dunitz Taylor&Francis Group; 2003. p 13-28.
16. İmamoğlu Ş. Diabetes mellitus. Multidisipliner yaklaşımla tanı, tedavi ve izlenim Deomed Medikal Yayıncılık 2009. Chapter 4. p.54.
17. Masharani U, German MS. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. *Basic and Clinical Endocrinology*. 8th ed. New York: McGraw Hill Companies; 2007. p. 661-747.
18. İnsülin, glucagon and diabetes mellitus. In: Guyton AC, ed. *Textbook of Medical Physiology*. 7th ed. Japan: Igaku-Shoin/ Saunders; 1986. p. 923-36.
19. Gastrointestinal disease (The pancreas). In: Andreoli TE, Carpenter CCJ, Plum F, Smith LHJr, eds. *Cecil Essential of Medicine*. Second ed. Philadelphia, WB Saunders Company; 1990. p. 253-309.
20. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986; 46-52.
21. Drucker DJ. Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 161-71.
22. Jiris JM, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) in biology and pathology. *Diabetes Metab Res Rev* 2005; 21:91-117.

23. Yki-Jaervinen H. Insulin resistance in type 2 diabetes. In: Pickup JC, Williams G, eds. Textbook of Diabetes. Oxford: Blackwell Science; 2003.Ch.22.p. 22.1-22.19.
24. Wilding JPH. Obesity and nutritional factors in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. In: Pickup JC, Williams G, eds. Textbook of Diabetes. Oxford: Blackwell Science; 2003. Ch. 21.p.21.1-21.16.
25. White MF. Insulin receptor signalling and regulation. In: Pickup JC, Williams G, eds. Textbook of Diabetes. Oxford: Blackwell Science; 2003.Ch.14.p. 14.1-14.17.
26. James DE, Piper RC. Insulin resistance, diabetes, and the insulin-regulated trafficking of GLUT-4. □ *Cell Biol* 1994; 126: 1123-6.
27. Mudular SR, Lindberg FA, Joyce M, et al. Insulin aspart (B28 Asp-Insulin) : a fast acting analog of human insulin. *Diabetes Care* 1999; 22: 1501-6.
28. Masharani U, German MS. Pancreatic hormones and diabetes mellitus. In: Greenspan FS, Gardner DG, eds. Basic and Clinical Endocrinology. 8th ed. New York: McGraw Hill Companies; 2007.p.661-747.
29. Cohen A, Horton ES. Progress in the treatment of type 2 diabetes: new pharmacologic approaches to improve glycemic control. *Curr Med Res Opin* 2007; 23:905-17
30. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *N Engl □ Med* 1993; 329: 977-86.
31. UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352: 854-65.
32. Weir GC. Insulin therapy and its complications. In: Kenneth BL, ed. Principles and Practise of Endocrinology and Metabolism. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins; 2001.p. 1348-60.
33. Brange J, Owens DR, Kang S, Volund A. Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care* 1990; 13: 923-54.
34. Kang S, Brange J, Burch A, Volund A, Owens DR. ubcutaneous insulin absorption explained by insulin's physicochemical properties. Evidence from absorption studies of soluble human insulin and insulin analogues in humans. *Diabetes Care* 1991; 14: 942-8.

35. Holleman F, Hoekstra JBL. Insulin lispro. *N Engl J Med* 1997; 337: 176-83.
36. Couper JJ, Prins JB. Practice Essentials 2: Recent advances in therapy of diabetes. *Med J Aust* 2003; 179: 441-7.
37. Colquit J, Royle P, Waugh N. Are analogue insulins better than soluble in continuous subcutaneous insulin infusion? Results of a meta-analysis. *Diabet Med* 2003; 20: 863-6.
38. Brange J, Ribel U, Hansen JF, et al. Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications. *Nature* 1988; 333: 679-82.
39. Kang S, Creagh F, Peters JR, Brange J, Volund A, Owens DR. Comparison of subcutaneous soluble human insulin and insulin analogues (AspB9, GluB27; AspB10; AspB28) on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care* 1991; 14: 571-7.
40. Drejer K, Kruse V, Larsen UD, Hougaard P, Bjorn S, Gammeltoft S. Receptor binding and tyrosine kinase activation by insulin analogues with extreme affinities studied in human hepatoma HepG2 cells. *Diabetes* 1991; 40: 1488-95.
41. Kang S, Brange J, Burch A, Volund A, Owens DR. Absorption kinetics and action profiles of subcutaneously administered insulin analogues (AspB9GluB27, AspB10, AspB28) in healthy subjects. *Diabetes Care* 1991; 14: 1057-65.
42. Bode BW, Strange P. Efficacy, safety, and pump compatibility of insulin aspart used in continuous subcutaneous insulin infusion therapy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24: 69-72.
43. Bott U, Ebrahim S, Hirschberger S, Skovlund SE. Effect of the rapid-acting insulin analogue insulin aspart on quality of life and treatment satisfaction in patients with type 1 diabetes. *Diabet Med* 2003; 20: 626-34.
44. Muduliar SR, Lindberg FA, Joyce M, et al. Insulin aspart (B28 asp-insulin): a fast-acting analog of human insulin: absorption kinetics and action profile compared with regular human insulin in healthy nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 1999; 22: 1501-6.
45. Ottesen JL, Nilsson P, Jami J, et al. The potential immunogenicity of human insulin and insulin analogues evaluated in a transgenic mouse model. *Diabetologia* 1994; 37: 1178-85.
46. Wang F, Carabino JM, Vergara CM. Insuline glargine: a systemic review of a long-acting insulin analogue. *Clin Ther* 2003; 25: 1541-77.

47. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813–820, 2001.
48. AACE Diabetes Mellitus Guidelines, *Endocr Pract.* 2007;13(Suppl 1) 2007.
49. Glassberg BY: The arteriovenous difference in blood sugar content. *Arch Intern Med* 46:605–609, 1930.
50. Foster B: Studies in carbohydrate metabolism. *J Biol Chem* 1:291–301, 1922.
51. Burrin JM, Alberti KG: What is blood glucose: can it be measured? *Diabet Med* 7:199–206, 1990.
52. Chan AY, Swaminathan R, Cockram CS: Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin Chem* 35:315–317, 1989.
53. Rebrin K, Steil GM, van Antwerp WP, Mastrototaro JJ: Subcutaneous glucose predicts plasma glucose independent of insulin: implications for continuous monitoring. *Am J Physiol* 277:E561–E571, 1999.
54. Medtronic MiniMed: Medtronic Guardian REAL-Time Continuous Monitoring System user guide. Northridge, Calif., Medtronic MiniMed, 2007.
55. Cengiz E, Tamborlane WV. A tale of two compartments: interstitial versus blood glucose monitoring. *Diabetes Technol Ther.* Jun;11 Suppl 1:S11-6, 2009.
56. Ward WK, Jansen LB, Anderson E, Reach G, Klein JC, Wilson GS. A new amperometric glucose microsensor: in vitro and short-term in vivo evaluation. *Biosens Bioelectron.* Mar;17(3):181-9, 2002.
57. Palleschi G, Rahni MA, Lubrano GJ, Ngwainbi JN, Guilbault GG. A study of interferences in glucose measurements in blood by hydrogen peroxide based glucose probes. *Anal Biochem.* Nov 15;159(1):114-21, 1986.
58. Zhang Y, Hu Y, Wilson GS, Moatti-Sirat D, Poitout V, Reach G. Elimination of the acetaminophen interference in an implantable glucose sensor. *Anal Chem.* Apr 1;66(7):1183-8, 1994.
59. Wisniewski N, Klitzman B, Miller B, Reichert WM. Decreased analyte transport through implanted membranes: differentiation of biofouling from tissue effects. *J Biomed Mater Res.* Dec 15;57(4):513-21, 2001.
60. Valdes TI, Moussy F. In vitro and in vivo degradation of glucose oxidase enzyme used for an implantable glucose biosensor. *Diabetes Technol Ther.* Autumn;2(3):367-76, 2000.

61. Stadtman, E.R. and C.N. Oliver, Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem*, 1991. **266**(4): p. 2005-8.
62. Shacter, E., Protein oxidative damage. *Methods Enzymol*, 2000. **319**: p. 428-36.
63. Reznick, A.Z. and L. Packer, Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol*, 1994. **233**: p. 357-63.
64. Stadtman, E.R. and B.S. Berlett, Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol*, 1997. **10**(5): p. 485-94.
65. Cassina, A.M., et al., Cytochrome c nitration by peroxyxynitrite. *J Biol Chem*, 2000. **275**(28): p. 21409-15.
66. MacPherson, J.C., et al., Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *J Immunol*, 2001. **166**(9): p. 5763-72.
67. Aslan, M., et al., Nitric oxide-dependent generation of reactive species in sickle cell disease. Actin tyrosine induces defective cytoskeletal polymerization. *J Biol Chem*, 2003. **278**(6): p. 4194-204.
68. Schopfer FJ, Baker PR and Freeman BA. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem Sci* 28:646-654, 2003.
69. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of longer complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 329:977–986, 1993
70. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 352:837–853, 1998
71. Stettler C, Allemann S, Juñi P, Cull CA, Holman RR, Egger M, Krahenbühl S, Diem P: Glycemic control and macrovascular disease in types 1 and 2 diabetes mellitus: Meta-analysis of randomized trials. *Am Heart J* 152:27–38, 2006
72. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group: The relationship of glycemic exposure (HbA1c) to the risk of development and progression of retinopathy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes* 44:968 –983, 1995

73. Muggeo M, Verlato G, Bonora E, Zoppini G, Corbellini M, de Marco R: Long-term instability of fasting plasma glucose, a novel predictor of cardiovascular mortality in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: the Verona Diabetes Study. *Circulation* 96:1750 – 1754,1997
74. Ceriello A, Hanefeld M, Leiter L, et al: Postprandial glucose regulation and diabetic complications. *Arch Intern Med* 164:2090 –2095, 2004
75. Esper RJ, Nordaby RA, Vilarino JO, Paragano A, Cacharro'n JL, Machado RA: Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovasc Diabetol* 5:4, 2006
76. Ceriello A, Taboga C, Tonutti L, Quagliaro L, Piconi L, Bais B, Da Ros R, Motz E: Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. *Circulation* 106:1211–1218, 2002
77. Brownlee M: Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 414:813– 820, 2001
78. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F: Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* 95:1783–1790, 1997
79. Beckman JA, Goldfine AB, Gordon MB, Creager MA: Ascorbate restores endothelium-dependent vasodilation impaired by acute hyperglycemia in humans. *Circulation* 103:1618 –1623, 2001
80. Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA: Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 97:22–28, 1996
81. Kawano H, Motoyama T, Hirashima O, Hirai N, Miyao Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Yasue H: Hyperglycemia rapidly suppresses flow-mediated endothelium-dependent vasodilation of brachial artery. *J Am Coll Cardiol* 34:146 –1454, 1999
82. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A: Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 52:2795–2804, 2003
83. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A: Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin

expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: the distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production. *Atherosclerosis* 183:259–267, 2005

84. Azuma K, Kawamori R, Toyofuku Y, Kitahara Y, Sato F, Shimizu T, Miura K, Mine T, Tanaka Y, Mitsumata M, Watada H: Repetitive fluctuations in blood glucose enhance monocyte adhesion to the endothelium of rat thoracic aorta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2275–2280, 2006
85. Otsuka A, Azuma K, Iesaki T, Sato F, Hirose T, Shimizu T, Tanaka Y, Daida H, Kawamori R, Watada H: Temporary hyperglycaemia provokes monocyte adhesion to endothelial cells in rat thoracic aorta. *Diabetologia* 48:2667–2674, 2005
86. Polhill TS, Saad S, Poronnik P, Fulcher GR, Pollock CA: Short-term peaks in glucose promote renal fibrogenesis independently of total glucose exposure. *Am J Physiol Renal Physiol* 287:F268–F73, 2004
87. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D: Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes* 51:1076–1082, 2002
88. Piconi L, Quagliaro L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Ceriello A: Constant and intermittent high glucose enhances endothelial cell apoptosis through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes Metab Res Rev* 22:198–203, 2006
89. Telci A, Cakatay U, Salman S, Satman I, Sivas A. Oxidative protein damage in early stage Type 1 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2000 Dec;50(3):213-23
90. Odetti P, Garibaldi S, Noberasco G, Aragno I, Valentini S, Traverso N, Marinari UM. Levels of carbonyl groups in plasma proteins of type 2 diabetes mellitus subjects. *Acta Diabetol.* 1999 Dec;36(4):179-83
91. Cakatay U. Protein oxidation parameters in type 2 diabetic patients with good and poor glycaemic control. *Diabetes Metab.* 2005 Dec;31(6):551-7
92. Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H. The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008 Apr;92(4):548-51.
93. Pan HZ, Zhang L, Guo MY, Sui H, Li H, Wu WH, Qu NQ, Liang MH, Chang D. The oxidative stress status in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Acta Diabetol.* 2010 Dec;47(Suppl 1):71-6.

94. Martín-Gallán P, Carrascosa A, Gussinyé M, Domínguez C Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications. *Free Radic Biol Med.* 2003 Jun 15;34(12):1563-74.
95. Sarkar P, Kar K, Mondal MC, Chakraborty I, Kar M. Elevated level of carbonyl compounds correlates with insulin resistance in type 2 diabetes. *Ann Acad Med Singapore.* 2010 Dec;39(12):909-4
96. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia.* 2001 Jul;44(7):834-8.
97. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, Faludi AA, Monte O, Xavier HT, Pereira TV, Abdalla DS. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clin Biochem.* 2008 Dec;41(18):1454-60.
98. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B, Marra G, Tonutti L, Taboga C, Motz E. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care.* 2002 Aug;25(8):1439-43
99. Predescu D, Predescu S, Malik AB. Transport of nitrated albumin across continuous vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct 15;99(21):13932-7.
100. Zheng F, Lu W, Jia C, Li H, Wang Z, Jia W. Relationships between glucose excursion and the activation of oxidative stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes or impaired glucose regulation. *Endocrine.* 2010 Feb;37(1):201-8.
101. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol JP, Colette C. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA.* 2006 Apr 12;295(14):1681-7
102. Monnier L, Colette C, Mas E, Michel F, Cristol JP, Boegner C, Owens DR. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia.* 2010 Mar;53(3):562-71.
103. Sakamoto M, Inoue G, Tsuyusaki K, Usui K, Watanabe M, Irie J, Atsuda K, Yamada S. Comparison of oxidative stress markers in type 2 diabetes: basal bolus therapy versus twice daily premixed insulin analogs. *Intern Med.* 2010;49(5):355-9.

104. Siegelaar SE, Barwari T, Kulik W, Hoekstra JB, DeVries HJ. No relevant relationship between glucose variability and oxidative stress in well-regulated type 2 diabetes patients. *J Diabetes Sci Technol*. 2011 Jan 1;5(1):86-92
105. Monnier L, Colette C, Michel F, Cristol JP, Owens DR. Insulin therapy has a complex relationship with measure of oxidative stress in type 2 diabetes: a case for further study. *Diabetes Metab Res Rev*. 2011 May;27(4):348-53.
106. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, İşimer A. Oxidative stress and nitric oxide related parameters in type II diabetes mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem*. 2001 Feb;34(1):65-70.
107. Nunes SF, Figueiredo IV, Soares PJ, Costa NE, Lopes MC, Caramona MM. Semicarbazide-sensitive amine oxidase activity and total nitrite and nitrate concentrations in serum: novel biochemical markers for type 2 diabetes? *Acta Diabetol*. 2009 Jun;46(2):135-40.
108. Pereira EC, Ferderbar S, Bertolami MC, Faludi AA, Monte O, Xavier HT, Pereira TV, Abdalla DS. Biomarkers of oxidative stress and endothelial dysfunction in glucose intolerance and diabetes mellitus. *Clin Biochem*. 2008 Dec;41(18):1454-60.
109. Catalano M, Carzaniga G, Perilli E, Jun T, Scandale G, Andreoni S, Carotta M. Basal nitric oxide production is not reduced in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Vasc Med*. 1997 Nov;2(4):302-5
110. Francesconi F, Mingardi R, deKreutzenberg S, Avogaro A. Effect of metabolic control on nitrite and nitrate metabolism in type 2 diabetic patients. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Jul;28(7):518-21.

ÖZGEÇMİŞ

Hazal Tuzcu 23.07.1985 tarihinde Samsun'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Antalya'da tamamladı. 2008 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2009 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı. Halen Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda eğitimini sürdürmektedir. Yabancı dili İngilizce'dir.