

30152

T. C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**GLİBENKLAMİDİN
ALLOKSAN DİABETİK SIÇANLARDA
SÜPEROKSİT DİSMUTAZ AKTİVİTESİNE
ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. CAHİDE ÖZNUR ONGUN

ANKARA - 1993



*Tez Yöneticim Sayın Doç. Dr. Nilgün ALTAN'a
teşekkür ederim.*

içİNDEKİLER

1. Giriş	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Serbest Radikaller	3
2.1.1. Aktif oksijen radikalleri ve oluşumları	4
2.1.2. Süperoksit radikali	5
2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD)	10
2.2.1. SOD'ın tipleri	12
2.3. Diabetes Mellitus	15
2.3.1. Tanımı, tipleri ve etyopatogenez	16
2.3.2. insülin ve etkileri	18
2.4. Diabet ve Serbest Oksijen Radikalleri	23
2.4.1. Aktif oksijen metabolitlerinin diabete etkisi	23
2.4.2. Aktif oksijen metabolitleri metabolizmasına diabetin etkisi	25
2.5. Diabetin Oral Tedavisi ve Sülfonilüreler	30
3. GEREĞ VE YÖNTEM	39
3.1. Kullanılan Gereçler	39
3.1.1. Deney hayvanları	39
3.1.2. Kullanılan aletler	39
3.1.3. Kullanılan kimyasal maddeler	39
3.2. Uygulanan Yöntemler	40
3.2.1. Deney hayvanlarının hazırlanması	40
3.2.2. Yöntemlerin uygulanması	42
3.3. Sonuçların analizi	44
4. BULGULAR	46

4.1. Sıçanların Genel özellikleri	46
4.2. Araştırmanın Sonucunda Elde Edilen Bulgular	46
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
6. ÖZET	59
7. YABANCI DİLDE ÖZET	60
8. KAYNAKLAR	61



1. GİRİŞ

Toksik etkili serbest oksijen radikallerinin, çok sayıda hastalığın patogeneğinde rol oynayabileceğinin anlaşılmasından sonra bu radikallerin vücuttaki eliminasyonunu sağlayan süperoksit dismutaz (SOD) enziminin önemi giderek artmaktadır ¹¹. Son yıllarda diabetik sıçanlarla yapılan deneysel çalışmalarda bu enzim aktivitesinde değişiklikler saptanmıştır.

Sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçlar insanlarda yetişkin tip diabetin metabolik kontrolünü sağlamak amacıyla özellikle son otuz yıldır kullanılmaktadır ⁸⁶. Sülfonilüre grubu ilaçlar tedavinin başlangıcında pankreastan insülin salgılanmasını uyararak hipergliseminin normale dönmesini sağlarlar. Ancak bu ilaçlar uzun süreli tedavi sonucu pankreasda, insülin biyosentezi ve insülin salgılanmasını azaltmaktadır. Ayrıca plazma insülin düzeyleri tedavi öncesi düzeylere hatta bununda altına düşmekte, buna karşın hipoglisemik etki sürmektedir. Bu nedenle bu grup ilaçların kronik antidiabetik etkilerinin mekanizmasında ekstrapankreatik etkilerinin rol oynadığı görüşü son yıllarda ağırlık kazanmıştır ².

Monosakkaritler nonenzimatik direk glikozilasyon reaksiyonuna ve oto-oksidatif glikozilasyona girebilmekte ve moleküler oksijeni indirgeyerek serbest oksijen radikallerinin oluşmasını sağlayabilmektedir ¹⁰⁸. Bilindiği gibi, metabolik bir hastalık olan diabetin başlıca klinik görünüşü hiperglisemidir ²⁰. Yüksek kan glikoz düzeyi organizmada

aşırı bir oksidatif strese neden olmaktadır ¹². Ayrıca diabetik dokularda serbest oksijen radikallerinin arttığı, ²⁴ ve hayvan modellerinde süperoksit dismutaz enzimi ile diabet oluşumunun önlendiği bildirilmiştir ^{39,43,102}. Özellikle doku SOD aktivitelerinde de önemli azalmalar elde edilmiştir ^{65,66,73}. Ancak bu bozuklukların insülin tedavisi ile geriye döndürüldüğünü gösteren araştırmalar henüz çok yetersiz sayıdadır, sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçlarla ise, bu bozuklukların giderilmesine dair hiçbir literatüre rastlanmamıştır. Öte yandan sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçların ekstra pankreatik etkilerinin insülin etkileriyle benzerlik gösterdiği bilinmektedir.

Bu nedenle sülfonilüre grubu ilaçların, SOD aktivitesi ile olan ilişkisi araştırmaya değer bulunarak araştırmamıza konu olarak seçildi. Bu amaçla sülfonilüre grubunun en yaygın olarak kullanılan ilaçlarından biri olan glibenklamid (glyburide) ele alındı. SOD kaynağı olarak ise bu ilacın, bu enzim üzerine direk etki gösterme olasılığının yüksek olabileceği ^{76,85} karaciğer ve böbrek dokuları kullanıldı. Araştırma sonucunun sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçların, diabetin neden olduğu bozuklukların giderilmesinde, bu ilaçların etki mekanizmalarının değerlendirilmesinde ve de diabetin patofizyolojisinin anlaşılmasında da ayrıca önem taşıyabileceğini düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. SERBEST RADİKALLER

Atom veya moleküller, yörüngelerindeki elektronlar eşleşmiş ve ters pozisyonda yer aldıklarında kararlı bir yapı gösterirler. Bu kararlı yapı eşleşmemiş elektron (e-) bulduklarında bozulur. Bu şekilde atomik veya moleküler yörüngesinde bir veya daha çok sayıda eşleşmemiş "e-" bulduran molekül yada molekül parçaları serbest radikaller olarak anılır. Bu eşleşmemiş "e-"lar belirli bir kimyasal reaktivite gösterir. Bu radikaller vücudun doku ve hücrelerinde çeşitli olaylar ve reaksiyonlar sonucunda oluşabilir. Bunlar; etkin radyasyon (radyolizis, fotolizis ve organik bileşenlerin termal yıkılması) ve redoks reaksiyonlarıdır (metal iyonlarla veya enzimlerle katalizlenen) ¹¹.

Moleküler oksijenin redüksiyonunun enzimler tarafından katalizlenebildiğinin varlığı ilk kez yüzyılın başlarında Bertrant ve Yoshida tarafından gösterilmiştir ve bu enzimler oksidazlar olarak anılmıştır. Daha sonraları oksidasyon enzimlerinin demir içerdikleri bildirilmiş ve yine hücrelerde "demir içeren enzimler tarafından oksijenin aktif hale getirilmesi" teorisi ön plana çıkmıştır. Ayrıca karbonmonoksidin hücresel solunumu inhibe ettiği ve solunum enzimlerinin hem bileşiğine sahip olduğu ortaya konmuştur. 1925 yılından başlayarak absorpsiyon spektroda incelemeler yapılarak sitokrom zincirinin olayda önemi ortaya çıkarılmış; 1953'de de daha ileri adımla foto-kimyasal etkili spektrum ile "sit a3-CO" bileşikleri açıklanmıştır ⁷⁷.

TABLO I : Moleküler oksijenin suya indirgenmesi. . 'lar herbir "e-"u göstermektedir.

1. Moleküler oksijen	(O ₂)	(↑ . O : O . ↑)
	
2. Sigma singlet oksijen	(Σ ¹ O ₂)	(↑ . O : O . ↓)
	
3. Delta singlet oksijen	(δ ¹ O ₂)	(O : O : ↑↓)
	
4. Süperoksit anyonu	(O ₂ ⁻)	(. O : O :)
	
5. Hidroperoksi radikali	(HO ₂ [•])	(. O : O : H)
	
6. Hidrojen peroksit	(H ₂ O ₂)	(H : O : O : H)
	
7. Hidroksil radikali	(HO [•])	(. O : H)
		..
8. Su	(H ₂ O)	(H : O : H)
		..

2.1.1. Aktif Oksijen Radikalleri ve Oluşumları:

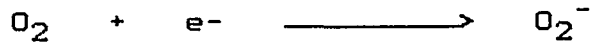
Moleküler oksijen temel enerji düzeyinde, aynı yönde eşleşmemiş iki adet "e-" içerir. Bu yüzden kararsız bir yapıda olan moleküler oksijen, biyolojik sistemlerde genelde indirgenerek, yani son yörüngelerine "e-" girişi ile oksijen radikallerini oluşturur. Bunlar şu şekilde sıralanabilir (Tablo I).

1. Süperoksit radikali
2. Hidroksil radikali
3. Singlet oksijen, a) Delta singlet oksijen
b) Sigma singlet oksijen
4. Hidroperoksi radikali ve hidrojen peroksit ⁴⁷

Hidrojen peroksitin çiftleşmemiş "e-"nu yoktur, bu nedenle bir serbest radikal değildir. Ancak hem süperoksitin bir dismutasyon ürünü, hem de diğer toksik ürünlerin prekürsörü olmasından dolayı sıralamada yer almıştır.

Moleküler oksijenin reaktivitesinde artışa neden olan diğer bir yol ise, yörüngedeki eşleşmemiş bir "e-"nun düzlemini ters yönde değiştirmesidir. Singlet oksijen bu şekilde oluşur. Delta singlet oksijenin eşleşmemiş "e-"nu yoktur ve sigma singlet oksijen genelde bir reaksiyona girmediği zaman delta formuna yıkılır ²².

Moleküler oksijenin suya tam indirgenmesi 4"e-" girişi ile gerçekleşir. 1"e-" transferi ile süperoksit radikali oluşmaktadır ²¹.



Süperoksit sonraki bölümde anlatıldığı gibi bazı reaksiyonlara girerek diğer toksik radikalleri de oluşturabilmektedir. 2"e-" transferi ile redüksiyonda ise peroksi-durum oluşmaktadır. "e-" girişleri, ürünleri, meydana geliş reaksiyonları ve ökaryotik hücrelerdeki lokalizasyon örnekleri Tablo II de gösterilmiştir ²¹.

TABLO II : Oksijenin indirgenme reaksiyonlarının meydana geliş şekli, "e-" değişimleri, ürünleri ve ökaryotik hücrelerdeki lokalizasyon örnekleri ²¹.

Reaksiyon	Katalizleyen enzim	Lokalizasyon
1. $O_2 \xrightarrow{+1"e-"} O_2^-$	Ksantin oksidaz, NAD(P)H oksidaz	Granülosit membranı
2. $O_2^- \xrightarrow{-1"e-"} O_2 + H_2O_2$	SOD	Sitoplazma, mitokondri
3. $O_2 \xrightarrow{+2"e-"} H_2O_2$	Ürikaz, aminoasit oksidaz	Peroksisom
4. $H_2O_2 \xrightarrow{+2"e-"} 2 H_2O$	Peroksidaz	Granülositlerin sitoplazmik granülleri
5. $H_2O_2 \xrightarrow{-2"e-"} O_2 + H_2O$	Katalaz	Peroksisom
6. $H_2O_2 + O_2^- \xrightarrow{+3"e-"} OH\cdot + OH\cdot$	Metal katalizi ile Haber-Weiss Reaksiyonu	Granülosit
7. $O_2 \xrightarrow{+4"e-"} H_2O$	Sitokrom oksidaz	Mitokondri

2.1.2. Süperoksit radikali :

Oksijenin bir "e-" indirgenmesi ile süperoksit radikali oluşur, en dış yörüngesinde bir eşleşmemiş "e-" bulundurur. Oksijen ile yaşayan bütün canlılarda süperoksit radikali kaçınılmaz şekilde meydana gelir (Tablo III). Biyolojik sistemlerde oluşan süperoksitin biyolojik kaynakları şu şekilde özetlenmiştir;³⁸

- 1) Lökoflavinler, katekolaminler ve tetrahidropteridinler gibi otooksidasyona uğrayabilen küçük moleküller,
- 2) Monosit, nötrofil ve makrofaj gibi hücreler,

TABLO III : Hücrelerde serbest radikallerin kaynakları ²⁹

Endojen Kaynaklar

Mitokondrial elektron transport sistemi
Mikrozomal elektron transport sistemi
Kloroplast elektron transport sistemi
Oksidant enzimler

Ksantin oksidaz
indolamin dioksijenaz
Triptofan dioksijenaz
Galaktoz oksidaz
Siklooksijenaz
Lipooksijenaz
Monoaminoksidaz

Fagositik hücreler

Nötrofiller
Monosit ve makrofajlar
Euzonofiller
Endotelial hücreler

Oto-oksidasyon reaksiyonları (örneğin, Fe⁺², epinefrin)

Eksojen Kaynaklar

Redoks potansiyelli maddeler (örneğin, paraquat, diquat, alloksan, doksorubisin)
ilaç oksidasyonları (örneğin, parasetamol;
karbontetraklorür)

Sigara içimi

iyonize radyasyon

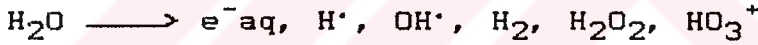
Güneş ışığı

Isı şoku

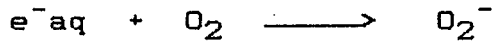
Okside glutatyon gibi maddeler

- 3) Redükte ferrodoksinler ve hemoproteinler gibi oto-oksidadasyona uğrayabilen proteinler,
- 4) Ksantin oksidaz gibi oksidatif enzimler,
- 5) Mitokondri, kloroplast, mikrozoimler ve nükleus gibi subsellüler organaller ³⁸.

Biyolojik sistemlerde gerçekleşen olaylar yanında süperoksit radikali çevresel etkenlerle de oluşabilmektedir. Alfa, beta, gama ve X ışınlarının iyonize edici özellikte olan elektromanyetik dalgaları, biyolojik sistemlerde süperoksit radikali oluşumuna neden olan dış etkenlerdir. Son yıllarda yapılan puls-radyoliz çalışmaları ile ışınların sulu bir ortamdan geçtikleri zaman, suyu iyonlarına ve çeşitli ürünlere parçaladıkları gösterilmiştir ⁹⁷.

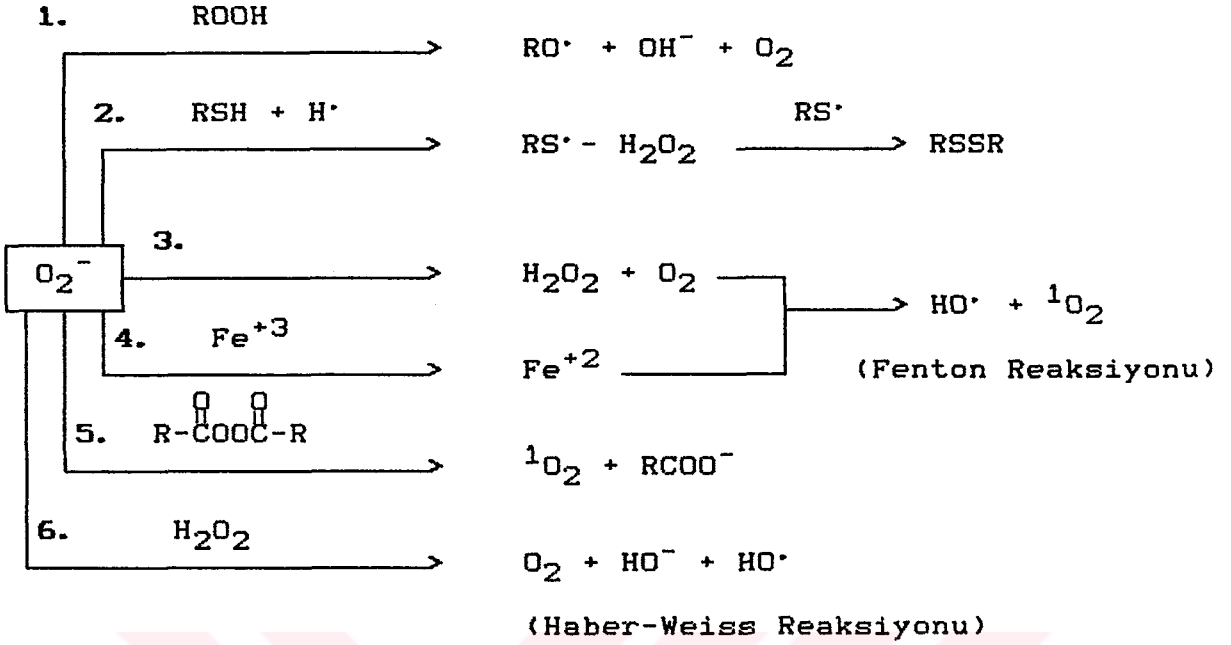


Ortamda oksijen varlığında, bu iyonlar diğer serbest radikalleri de oluştururlar. ör:



Süperoksit radikalinin neden olduğu reaksiyonlar aşağıdaki şekilde sıralanabilir (Şekil 1);

- 1) Hidroperoksi radikallerini oluşturur,
- 2) Tiyol radikalleri oluşturarak SH gruplarını disülfidlere oksitler,
- 3) Spontan dismutasyona uğrar,
- 4) Redükten özelliği ile $\text{Fe}^{+3} \longrightarrow \text{Fe}^{+2}$ dönüşümünü sağlar,



ŞEKİL 1 : Süperoksit radikalinin neden olduğu reaksiyonlar.

5) Diaçil peroksitlerle singlet oksijen ve peroksi radikalleri oluşumuna katılır,

6) Hidrojen peroksitle hidroksil radikali oluşturur ²².

Kısaca; hücre için zararlı olan serbest oksijen radikallerinin oluşumu doğal olarak kabul edilmelidir. Çünkü bunlar oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları sırasında açığa çıkabilmektedir, yüksek oksijen basıncında da bu ürünler önemli ölçüde artar. Moleküler oksijen doğal yapısı ile süperoksit anyonu oluşturur, süperoksitin hücre içi reaksiyonları ile de hidroksil radikali, singlet oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Bunlar; sülfidril enzim inaktivasyonu, hücre membranı lipid peroksidasyonu ve DNA yapısında değişmelere neden olarak çeşitli toksik etkiler gösterirler. Organizma bu toksik etki-

lere karşı çeşitli antioksidan korunma sistemleri geliştirmiştir ⁵².

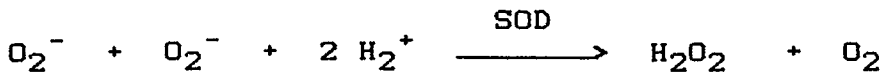
Antioksidanlar, sellüler lokalizasyonları yanında fonksiyonlarına göre de sınıflandırılmaktadır. Genelde, radikal oluşumunu önleyen (metal şelatörler, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, beta karoten, glutatyon, ürat..) antioksidanlar olarak iki kategoride incelenirler. Sellüler lokalizasyonuna göre sınıflama Tablo IV' de görülmektedir ¹¹.

TABLO IV : Biyolojik sistemlerden serbest oksijen radikallerinin uzaklaştırılması.

intrasellüler	Ekstrasellüler
*Antioksidan ve temizleyiciler	* Antioksidan ve temizleyiciler
Süperoksitdismutaz	Süperoksitdismutaz
Katalaz	Ürat
Glutatyon peroksidaz	Vitamin E
Vitamin C, A, E ve K	Seruloplazmin
Ürat	* Metal şelatörler
Tiyoller	Transferrin
Ubikinon	Albumin

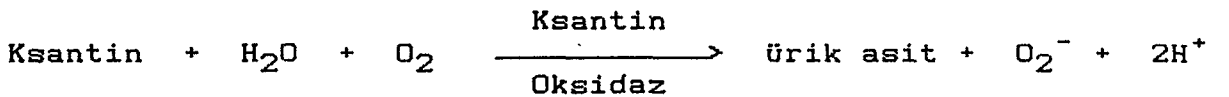
2.2. SÜPEROKSİT DiSMUTAZ (SOD)

SOD (EC.1.15.1.1) solunum yapan bütün hücrelerde bulunan ve oksijen radikalının dismutasyonunu katalizleyerek, hücreyi onların toksik etkisine karşı koruyan enzimdir ³⁷.



Mann ve Keilin tarafından 1939 yılında inek eritrositlerinde yapılan bir çalışmada, bakır içeren mavi bir protein elde edilip bu proteine "hemokuprein" adı verilmiş ve % 0.34 bakır içeren, molekül ağırlığı yaklaşık 34000 kadar olan bu bileşiğin enzimatik aktivite göstermediği bildirilmiştir. Daha sonra 1959 yılında Markowitz ve arkadaşlarınca yapılan çalışmalarda ise insan eritrositlerinde hemokupreine benzeyen bir protein elde edilmiş, yine enzimatik aktivite göstermeyen bu proteine "eritrokuprein" adı verilmiştir. Ayrıca daha sonraları insan beyninden izole edilen "serebrokuprein", inek ve at karaciğerinden izole edilen "hepatokuprein" gibi bakır içeren proteinlerinde enzimatik aktivitesi saptanmamıştır ⁷⁵.

Biyolojik sistemlerde ksantin oksidaz enzimi tarafından ksantinın aerobik oksidasyonu sonucu süperoksit radikali açığa çıkmaktadır ve bu radikaller ferrisitokrom c ve nitrobluetetrazolium gibi bileşikleri indirgemektedir ⁵⁶. Ksantin oksidaz, ksantin sisteminden süperoksit radikali çıkışı aşağıdaki reaksiyondaki gibidir;



1968 yılında Fridovich ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise eritrokuprein olarak bilinen proteinin, süperoksit dismutaz olduğu bildirilmiştir. insan eritrositlerinden saflaştırılan bu proteinin, "ksantin oksidaz - ksantin" deney sistemine eklenen sitokrom c'nin redüksiyonunu inhibe ettiği, bu proteinin bir enzim olduğu ve oksijen radikalının

dismutasyonunu sağladığı bildirilmiştir ⁷⁴. Bu enzimin katalizlediği reaksiyon spontan gerçekleşebilen bir reaksiyondur, süperoksit radikali sıvı ortamlarda kolaylıkla spontan dismutasyona uğrar. pH 7,4'de bu reaksiyonun hızı $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{sn}^{-1}$ dir, aynı reaksiyonun enzimatik yıkılım hızı ise $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{sn}^{-1}$ dir. Bu reaksiyon spontan dismutasyondan 10^4 kat daha avantajlıdır. Bu enzim aerobik hücrelerin yaşayabilmesi için gereklidir. Ayrıca, oksijen toksisitesinin önemli ajanı olarak görülen süperoksit radikalini yakalar bu şekilde oksijen toksisitesine karşı savunmada önemli rol oynar. Bu özelliklerinden dolayı enzime "süperoksit dismutaz" adı verilmiştir ³⁷.

2.2.1. SOD'nin Tipleri:

Canlılardaki SOD tipleri kofaktör olarak taşıdıkları metal iyonların cinsine bağlı olarak 3'e ayrılır ⁹;

1. Bakır ve Çinko içeren SOD :

Ökaryotik hücrelerin sitoplazmaları molekül ağırlığı 32000 civarında, disülfid bağı ile bağlanmış ve birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşan bir SOD içerir. Bu SOD evrimsel değişikliklere oldukça dirençlidir ve çeşitli türlerden elde edilen SOD arasında fazla fark yoktur ¹⁰³. Enzim aktivitesi için Cu^{+2} mutlak gereklidir ancak Zn^{+2} yerine kobalt, cıva ve kadmiyum geçebilir ve enzim aktivitesinde bir kayıp olmaz ¹⁰¹. Bu enzimin başlıca yapısal özelliği, bir silindir yapısında olmasıdır. Enzimin moleküler yapısı ve aminoasit dizilimi tam olarak aydınlatılmıştır ⁹⁹. Süperoksidin dismutasyonu Cu^{+2} ile sağlanır, bakır iyonu süperoksit radikali ile karşılaştığı

zaman sırasıyla redüksiyon ve oksidasyona uğrar ⁶¹. Cu-Zn SOD, siyanid tarafından geri dönüşümlü olarak inhibe olur. inhibisyon, siyanidin karbon atomunun SOD'ın bakır atomuna bağlanmasıyla meydana gelir. Hidrojen peroksit, enzimimin bakırını indirgeyebilir fakat hidrojen peroksit konsantrasyonu 10 μ M' ün üstünde olursa enzim geri dönüşümsüz olarak inhibe olmaktadır ³⁷.

2. Manganez içeren SOD :

E.Coli B ve Str. mutans'dan elde edilen SOD, katalitik aktivitesi dışında ökaryotik hücrelerin sitozolünden elde edilen Cu-ZnSOD'dan tamamen farklıdır. Bu bakterial enzim aynı eşit büyüklükte iki alt üniteden oluşur ve her alt ünite başına bir Mn⁺² içeren dimer yapısındadır. Molekül ağırlığı yaklaşık 40000 kadardır. Mitokondrial SOD, prokaryotlardaki bu MnSOD'a çok benzer; sadece mitokondrial enzim iki yerine dört alt ünite içeren molekül ağırlığı 80000 kadar olan bir tetramerdir. Mitokondrial ve bakteriel enzim birbirine çok benzerken, mitokondrial ve sitoplazmal enzim arasında hiç bir benzerlik yoktur. İnsan karaciğer mitokondrisinden de MnSOD izole edilmiştir. MnSOD siyanür tarafından inhibe olmaz; kloroform ve etanol gibi bileşikler MnSOD'ı inhibe ederken Cu-ZnSOD'ı etkilemez ⁷.

3. Demir içeren SOD :

E.coli B, hücredeki yerleşme yerlerine, taşıdıkları prostetik metal gruplarına, oksijenasyon değişimlerine karşı verdikleri cevaba ve fonksiyonlarına göre farklı iki tipte SOD içerirler. Bunlardan birisi hücrenin matriksinde yerleşen MnSOD, diğeri periplazmik aralıkta bulunan FeSOD'dır. Her

molekül başına bir demir atomu içeren enzimin molekül ağırlığı 38700'dür ve eşit ağırlıkta iki alt üniteden oluşmuştur ³⁷. Çalışmalar, periplazmik aralıkta bulunan FeSOD'ın eksojen kaynaklı süperoksit radikaline karşı koruyucu olarak rol oynarken, hücrelerin matriksinde yer alan MnSOD'ın endojen kaynaklı süperoksit radikallerinin toksisitesine karşı etkili olduğunu göstermiştir ⁴⁶.

SOD'ın alt tiplerini incelemek açısından insan doku ve hücre kültürlerinde de birçok çalışmalar yapılmış ve başlıca 2 tip SOD belirlenmiştir ¹³; düşük molekül ağırlıklı ve KCN'e en hassas Cu-Zn içeren enzim ki bu total SOD'ın % 85'ini oluşturmaktadır. Diğeri ise molekül ağırlığı yüksek, KCN'e dayanıklı Mn içeren enzimdir ve total enzimin % 15'idir ⁹³.

Son yıllarda plazma, lenf ve sinovial sıvı gibi ekstrasellüler sıvılarda SOD'ın major izoenzimi ekstrasellüler süperoksit dismutaz (EC-SOD) izole edilmiş ancak bu izoenzimin dokularda da bulunabildiği gösterilmiştir. Total plazma EC-SOD konsantrasyonları türler arasında belirgin fark gösterirken, doku konsantrasyonları oldukça birbirine yakındır. EC-SOD, moleküler ağırlığı yaklaşık 30000 dalton olan tetramerik bir glikoproteindir. Her subüniti başına birer atom Cu ve Zn atomu içermesi, siyanid, azid ve dietilditiyokarbamat ile inhibe olması ve katalizlediği reaksiyon sonucunda H₂O₂ üretmesi açısından CuZn-SOD'a benzer ancak aminoasit dizilimleri tamamen farklıdır ⁵⁹.

2.3. DiABETES MELLİTUS

M.ö. 1550 tarihinde Mısır'da bulunan Eber papiruslarında da diabetin poliürik durumuna benzeyen bir hastalıktan bahsedilmiştir. M.S. 3-6. yüzyıllarda ise ilk kez diabetes mellitus adının kullanıldığını görmekteyiz. "Diabetes" fazla idrar çıkarıldığını belirtmek üzere Yunancadan türetilmiştir "mellitus" ise yine Yunanca tatlı-bal anlamına gelen bir sözcüğün türevidir. 1674 yılında, Willis diabetik hastaların idrarlarının tatlı olduğunu, bundan bir yüzyıl sonra 1776 yılında da Mathew Dobson bu hastaların idrarları gibi serumlarında da fazla şeker bulunduğunu saptamış; sözü edilen şekerin glukoz olduğu da 1815 yılında bulunmuştur. Sonraları Langerhans 1861 yılında, pankreas hücrelerinin adacık şeklinde yapılar içerdiği ve diabetik semptomların gelişiminde bu spesifik bölgenin rolü olduğunu düşünmüştü⁶⁹; 1889 da Minkowski ve Mering, pankreasın yaşam için gerekliliği açısından çalışmalar yaparken pankreası çıkarılmış köpeklerde benzer şekilde idrarın yüksek glukoz içerdiğini gözlemişler; bu gözlemlere dayanarak pankreasın, glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığını öne sürmüşlerdir. 1921 de Banting ve Best çalışmalarında, köpeklerin pankreatik kanallarını bağlayıp, pankreastan izole ettikleri ekstreyi depankretize bir köpeğe enjekte ettikten 2 saat sonra, köpeğin kan şekerinin belirgin düştüğünü saptamışlardır. Gelişmeler hızla devam etmiştir ve insülinin 14 yaşında diabetik bir hastada diabetin karakteristik belirtilerini önlediği gözlenmiştir. Banting ve Best'in çalışmaları sonucu, bu dramatik hastalığın tedavisi sağlanmış

ve insülin o günden bugüne kadar en etkin terapötik ajanlardan biri olmuştur ¹⁶.

2.2.1. Tanımı, Tipleri ve Etyopatogenez :

Diabetes mellitus; hiperglisemi, spesifik mikrovasküler komplikasyonlarla karakterli kompleks bir sendromdur. Farklı tipleri olmasına rağmen ortak noktaları beta hücrelerinden insülin salgılanmasının yetersiz olmasıyla insülinin kısmi yada tamamen eksikliğidir ⁵⁷.

Diabetin başlıca iki tipi vardır;

1) insüline bağımlı diabet (IDDM, Insulin dependent diabetes mellitus, jüvenil tip diabet, Tip 1 diabet),

2) insüline bağımlı olmayan diabet (NIDDM, Non-insulin dependent diabetes mellitus, erişkin tip diabet, Tip 2 diabet).

Etyoloji bilinmemekle birlikte, besinsel ve toksik etkiler ile bazı metabolik bozukluklar sonucu oluşan ancak daha seyrek gözlenen diabet tipleri de Tablo V' de görülmektedir ⁵⁷.

Diabetin kısmen kalıtsal, kısmen çevresel ve kısmen de hormonal etkenlerin birlikte oluşturduğu bir sonuç olduğu düşünülmektedir ⁹⁴.

Tip 1 diabette, beta hücreleri çeşitli etkenlerin aracılığıyla hasarlanmış ve insülin eksikliği oluşmuştur. β hücrelerini hasarlayan faktörün ne olduğu halen tam olarak bilinmemektedir. Bu konuda virusların, otoimmunitenin, çevresel toksik faktörlerin rolü üzerinde durulmaktadır ⁹⁴.

TABLO V : Diabetin tipleri 57

-
- I. Diabetes mellitus
 - A) Tip I Diabet
 - B) Tip II Diabet
 - II. Sekonder Diabet
 - A) Pankreas hastalıkları (Kronik pankreatit, hemokromatozis, pankreotektomi..)
 - B) Hormonal nedenli (Cushing's sendromu, akromegali, feokromasitoma)
 - C) ilaç ve kimyasal nedenli (Klorotiazid, fenitoin..)
 - D) insülin reseptör anormallikleri (Akantozis nigrigans, lipodistrofi..)
 - E) Genetik sendromlar (Ataksi telenjiektazi, progerya, Laurence-Moon-Biedel sendromu, miyotonik distrofi)
 - III. Yetersiz glukoz toleransı
 - IV. Gestasyonel diabet

Tip I diabette, insülinin primer hedef dokuları olan karaciğer, yağ ve kas dokusuna glukoz, amino asit ve yağasidi alınması bozulmuştur; aynı zamanda bu dokulardaki depolardan bu ürünlerin sürekli olarak salınması söz konusudur ¹⁶.

insüline bağımlı olmayan Tip II diabette ise, glukoz hemostazının korunmasından sorumlu feed-back döngüsünü kapsayan pankreas ada hücresi, karaciğer ve periferel dokulardaki defektin söz konusu olduğu açlık hiperglisemisi ile karakterize edilen bir hastalıktır ⁹⁰.

Etyolojisi bilinmemesine rağmen genetik ve çevresel faktörler, bu tip diabette önemli rol oynamaktadır. insulin yokluğu Tip I diabet için primer patogenetik faktör kabul edilirken, tip II için tartışmalıdır. Tip II diabette;

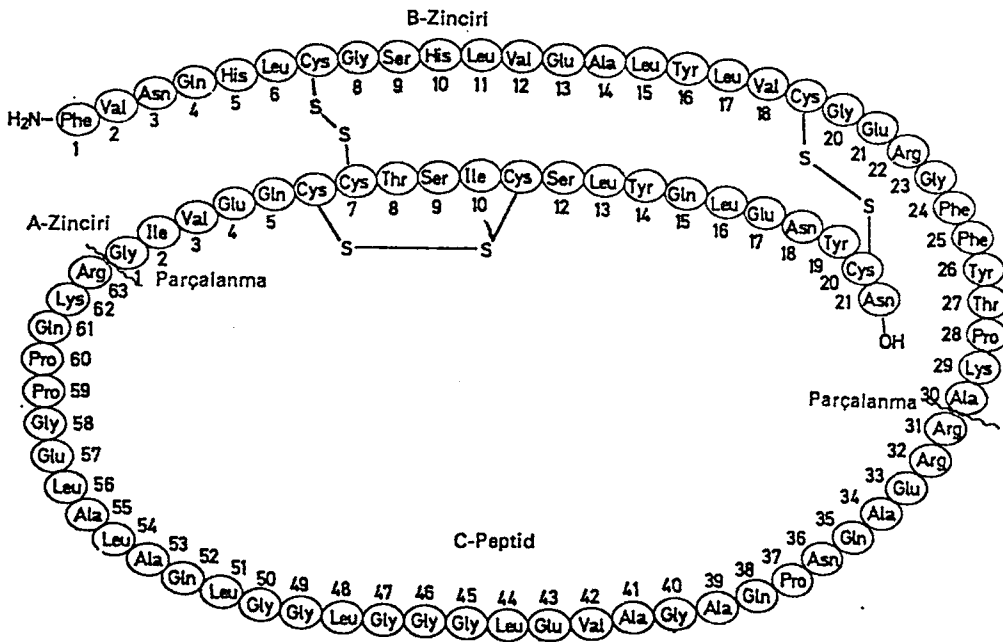
- a) insulin sekresyonu bozulmuştur,

b) insülin rezistansı ve,
c) Anormal hepatik glukoz metabolizması nedeniyle glukoz intoleransı gelişmiştir ²³.

Tip I' den farklı olarak Tip II' de adacık hücre anti-korları yoktur ancak obezite önemli bir patolojik faktördür ⁹⁶. Obezitede endojen ve eksojen insüline yanıt azalmaktadır ve azalma obez diabetiklerde, diabetik olmayan obezlerden daha fazladır ¹⁴. insülin rezistansı; hepatik glukoz oluşumu, glukozun karaciğer tarafından ve kas, yağ dokusu gibi periferel dokular tarafından glukoz alınmasının bozulmasından kaynaklanmaktadır ⁹¹.

2.3.2. insülin ve Etkileri:

insülin, disülfid köprüleriyle bağlı 51 amino asit içeren A ve B zincirlerinden oluşmuş bir protein yapıllı hormondur ⁴⁴ (Şekil 2).



ŞEKİL 2 : insan proinsülin, insülin ve C-peptid bağlantısı

insülin biyosentezi, pankreas Langerhans adacıkları β hücrelerinin granüler endoplazmik retikulumunda gerçekleşir. Genetik bilginin aktarılmasıyla, önce düz bir zincir şeklindeki preproinsülin sentezlenir, preproinsülinin N-terminal ucundaki 23 amino asitin ayrılmasıyla ve disülfit köprülerinin oluşmasıyla katlanmış helezon şeklindeki proinsülin oluşur. Veziküllerde bu şekilde depolanır, daha sonra golgi kompleksine gelir ve sonra granüllü endoplazmik retikulumda enzimatik olarak insülin ve bağlayıcı peptide (C-peptid) ayrılır ve "emiyositoz" ile hücre dışına atılır ⁴⁴. Yapılan çalışmalarda β hücre uyarılması ile insülin salınması arasındaki keneti, hücre içinde artan Ca^{+2} iyonlarının sağladığı ve cAMP'nin de bu olayda rolü olduğu bildirilmiştir. Ca^{+2} , hücre içinde kalmodulin ve ona bağımlı bir protein kinaz aracılığıyla insülin veziküllerinin hücre içinden membranın iç yüzüne taşınmalarını ve yapışmasını sağlar ²⁶.

TABLO VI : Pankreas β hücrelerinden insülin salınmasına neden olan faktörler

-
- A) insülin salınımını uyaranlar:
1. Glukoz, mannoz
 2. Lösin
 3. Vagal uyarım
 4. Sülfonilüreler
- B) Glukoza bağlı insülin salınımını uyaranlar:
1. Enterik hormonlar - Gastrik inhibiyör peptid
- Kolesistokinin
- Sekretin, gastrin
 2. Nöral uyaranlar - β adrenerjik uyarım
 3. Aminoasitler - Arginin
- C) insülin salınımını inhibe edenler:
1. Nöral ; Katekolaminlerin alfa-adrenerjik etkisi
 2. Humoral ; Somatostatin
 3. ilaçlar ; Diazoksit, fenitoin, kolşisin

Pankreas β hücrelerinden insülin salınımına neden olan glukoz dışında diğer faktörler; besinler, gastrointestinal ve diğer hormonlar ile sinirsel uyarılardır. Bu faktörler Tablo VI' da gösterilmiştir ⁸⁸.

insülinin, hedef hücrelerde kendine özgü spesifik reseptörlere bağlanarak etki yaptığı gösterildikten sonra, insülin reseptörü ilk kez 1971 yılında izole edilmiştir ⁸⁹. insülin reseptörü, iki alfa-alt birim (130 000 MA) ve iki beta-alt birim (95 000 MA) den oluşan bir integral membran glikoproteindir (350 000 MA). Alt birimler birbirlerine disülfid köprüleri ile bağlanmıştır. insülin reseptörü insüline bağlı tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir. β alt birimin tirozin fosforilasyonu insülin reseptörüyle ilgili kinaz aktivitesini artırmaktadır. Tirozin rezidüsü üzerindeki otofosforilasyon insülin reseptör kinazın regülasyonunda anahtar rol oynayabilir ⁵⁸.

insülinin karbohidrat, yağ ve protein metabolizmasına etkileri şu şekilde açıklanabilir ³⁵,

I. Karbohidrat metabolizmasına etkileri,

1. Kas ve yağ dokuda, hücre membranından glukozun transportunu artırır,
2. Kas, karaciğer ve yağ dokuda glikojen sentazı uyarır,
3. Glikolizisi artırmakta ve böylece diğer işlemlerin (Triaçilgliserol, glikojen, protein sentezi) gereksinimi olan ATP oluşumunu uyarır,

4. Karaciğerde glikojenolizis ve glukoneogenez'i inhibe eder,
5. Karaciğerde glukokinaz aktivitesini artırarak, beslenme sonrası karaciğere glukoz alınımını kolaylaştırır,
6. Karaciğer ve adipoz dokuda pentoz fosfat yolu ile glukoz oksidasyonunu artırır.

II. Lipid metabolizmasına etkileri,

1. Yağ dokuda lipolizisi inhibe eder,
2. Karaciğerde keton cisimleri sentezini inhibe eder,
3. Yağ doku ve karaciğerde yağ asitleri ve tri-
açilgliserol sentezlerini uyarır,

III. Protein metabolizmasına etkileri,

1. Kas, yağ doku ve karaciğere aminoasit trans-
portunu artırır,
2. Kas, yağ doku, karaciğer ve diğer dokularda
protein sentezini artırır,
3. Kas dokusunda protein yıkımını azaltır.

Bu şekilde insülin, normal kişilerde aminoasitlerin oksidasyondan çok protein sentezine girmesini sağlamaktadır.

insülinin organizmada oluşturduğu etkiler 3 gruba ayrılabilir ⁶⁴:

1. Heksozlar, iyonlar, aminoasitler, yağ asitleri ve nükleotidler gibi metabolitlerin taşınımının düzenlenmesini

sağlamak amacıyla, hücre membranında çok kısa süre içinde oluşturduğu olaylar.

2. Anabolik yolları hızlandırarak ve katabolik yolları yavaşlatarak metabolizmayı anabolik yönde uyarmak.

3. Çok daha uzun sürede hücre büyümesini uyarmak.

insülin eksikliği belirli hücre membranlarından glukoz transportunun azalmasına neden olup, hiperglisemiye yol açmaktadır. Diabette glukoz utilizasyonu azaldığından, glukozun hücre içi metabolik yolları da yavaşlamaktadır ³¹.

Karaciğer, beyin ve diğer sinir hücreleri, retina, eritrositler, böbrek tubulus ve barsak mukoza hücreleri gibi yapılara glukoz girişi insüline bağımlı değildir. insülinin karaciğer ve diğer hücrelere glukoz girişini artırması, hücre içinde glukoz utilizasyonunu artırmasına bağlı olarak indirek şekilde gelişir ⁶⁰. insülinin dağılımını, hücre içinden daha çok membranda bulunan glukoz taşıyıcılarının düzenlediği saptanmıştır ⁶³.

Glukoz hücreye girdikten sonra, bir heksokinaz enzimi ile 6. karbonundan fosforlanır ve glukoz-6 fosfat (G-6-P) oluşur; glukozun bu aktif formu hücre dışına çıkamaz ve hücrede çeşitli değişimlere uğrar ⁵⁵. Glukoz, G-6-P şeklinde;

a) Glikolizis ile pürüvata ve sonrasında TCA siklusu üzerinden H_2O ve CO_2 'e yıkılır.

b) Glukronik asit yolunda uridindifosfoglukoza (UDPG) döner.

c) UDPG'a dönüşen glukoz, glikojen sentaz enzimi ile glikojen sentezine katılır. insülin glikojen sentazı uyarır.

d) Pentoz fosfat yolu üzerinden gliseraldehit-3-fosfata dönüşür.

e) Glukoz-6-fosfataz enzimi ile serbest glukoz döner.

Son reaksiyon dışında bütün bu olaylar insülin tarafından artırılmaktadır ⁵⁵.

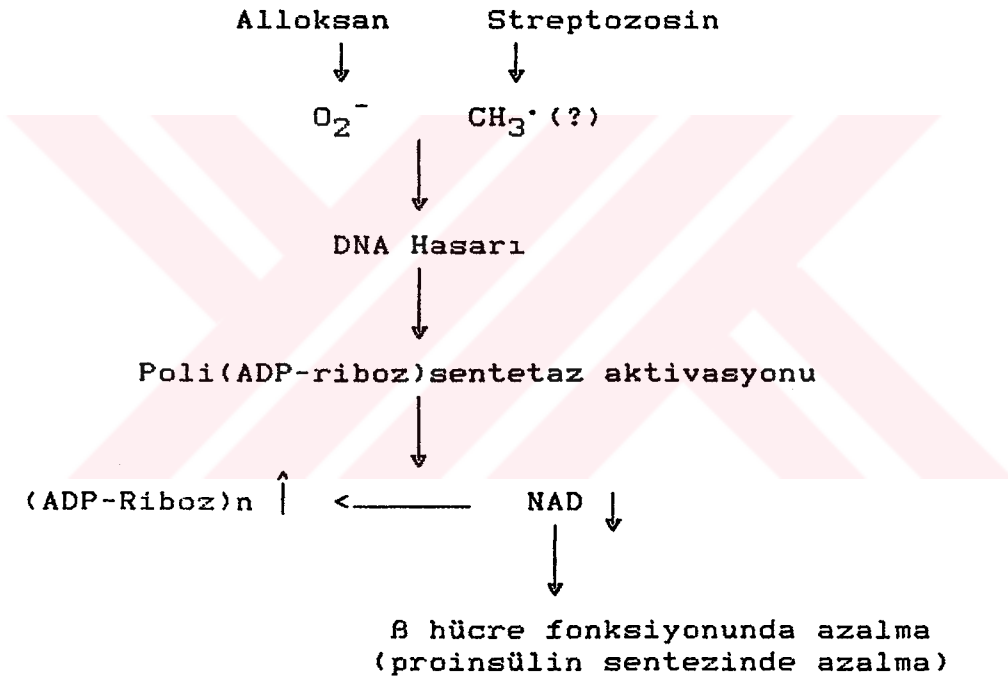
2.4. DiABET VE SERBEST OKSiJEN RADİKALLERİ

Son yıllarda diabetin etyopatogenezi, gidişi ve komplikasyonlarının gelişiminde serbest oksijen radikallerinin rolü üzerinde durulmaktadır ⁸⁴. Yapılan çalışmalar ile oksijen serbest radikallerinin diabetteki etkilerini iki kategoride inceleyebiliriz;

2.4.1. Aktif Oksijen Metabolitlerinin Diabete Etkisi :

Pankreatik β hücrelere immun veya kimyasal bir atak ile deneysel diabet oluşturulabilmektedir ⁸⁴. Deneysel hayvanlarında kimyasal diabet oluşturmak için alloksan, 50 yıldan bu yana yaygın olarak kullanılmaktadır ⁷⁰. Alloksanın diabetojenik etkisi pankreas beta hücrelerine karşı selektif toksik etkisindedir. Alloksan (2,4,5,6-tetraoksoheksahidropirimidin) kolaylıkla toksik bir bileşik olan dialurik asite indirgenir ⁹². Alloksan-dialurik asit reaksiyonu, redükta ajanların varlığında, oksijen tüketimine neden olur ve dialurik asitin oto-oksidasyonu hidrojen peroksit (H_2O_2), moleküler oksijen (O_2), süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali ($\cdot OH$) oluşumu ile sonuçlanır ²⁵. Kimyasal diabet oluşturmak için

kullanılan diğ̈er bir ajan olan streptozosin (STZ) de metil radikali (CH_3^\cdot) oluşturarak pankreas adacık hüc̈relerinde DNA kırılmasına ve nükleer poli(ADP-riboz)sentetazın uyarılmasına, böylece intrasellüler NAD nin tüketilmesine ve proinsülin sentezinin inhibisyonuna neden olurlar ¹⁰³. Alloksan ve streptozosinin pankreas β hüc̈resinde hasar oluşturma mekanizması Şekil:3'de gösterilmiştir ¹⁰⁷.



ŞEKİL 3 : Pankreatik β hüc̈relerde alloksan ve streptozosinin etki mekanizması

Pankreatik beta hüc̈relerde major anti-oksidan enzimlerin varlığı da gösterilmiştir. Bakır ve çinko içeren süperoksit dismutaz (Cu-ZnSOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPX)⁴², mangan içeren süperoksit dismutaz (MnSOD)⁶ ve glu-

tasyon redüktaz (GR)³ enzimlerinin hayvanlarda adacık β hücrelerinde kabul edilebilir miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Ancak pankreasta koruyucu enzimler diğer dokulardan daha düşük bulunmuştur ⁴².

BB ratlarda yapılan dinamik bir çalışmada pankreas adacık hücrelerinde SOD aktivitesi diabetin başlangıcı ve yaşına bağlı bir değişim göstermemiştir, ancak bu ratlarda diabetik olmayan ratlara göre belirgin olarak SOD aktivitesi düşük saptanmış, BB ratlarda gözlenebilen bu SOD düşüklüğünün her ne kadar diabetin tetik çekici mekanizması olmasa da, dolaylı olarak aşırı oksidatif strese karşı koymasının yetersizliğinde önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir ⁸⁹.

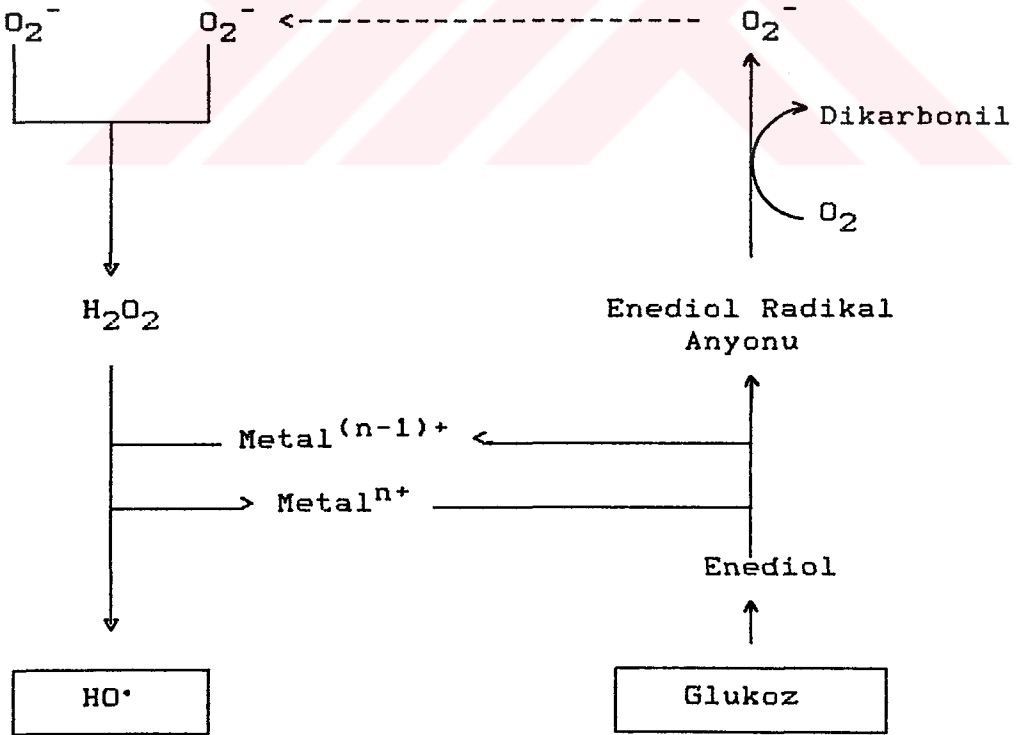
Başka bir çalışmada; Vit E eksikliği, selenyum eksikliği ve kombine eksiklik oluşturulan ratlarda, adacık fonksiyonları ve serbest radikal temizleyen sistemler incelenmiş, eksiklik oluşturulan bütün gruplarda, karaciğer, kalp ve iskelet kasında SOD seviyesi kontrol grubunun % 20'i kadar bulunmuştur ⁶.

2.4.2. Aktif Oksijen Metabolitleri Metabolizmasına Diabetin Etkisi:

Diabette, oksidatif stresi ve proteinlerdeki hasarı oluşturan serbest radikallerin olası kaynağı ;

1. Şekerlerin oto-oksidasyon reaksiyonları,
2. Proteinlere şeker bağlanması,
3. Plazma ve membran proteinlerindeki ansature yağ asitlerinin oto-oksidasyonudur ¹².

Hiperглиsemi, diabetin primer klinik görünüşüdür ve diabetik komplikasyonların gelişiminde öncelikle rol oynar ²⁰. Basit monosakkaritler direk nonenzimatik glikozilasyon yanında, fizyolojik şartlarda enolize olabilir ve moleküler oksijeni indirgeyerek oto-oksidasyona uğrayabilirler. Bu şekilde alfa keto aldehit, hidrojen peroksit ve serbest radikal ara ürünleri oluştururlar. Reaksiyonlar ve ürünleri şekil 4'de gösterilmiştir ¹⁰⁹. Proteinlerin glikozilasyonu, glukozun bu şekilde oto-oksidasyonuna ve ardından ketoaldehitlerin proteinlerin amino grubuna kovalent bağlanmalarına bağlıdır ⁵³. Proteinlerin bu şekilde glikozillenebildiği ¹⁰⁹ ve glikozile



ŞEKİL 4 : Glukoz oksidasyonu ve oksidant ürünler.

proteinlerden süperoksit açığa çıkarabildiği ⁴¹ in-vitro gösterilmiştir. Glikozile proteinlerden süperoksit oluşumu bazı faktörlerin (ağır metaller, askorbik asit..) varlığında artabilir veya azalabilir ⁴¹. Diabetik hastalarda protein glikozilasyonunun iki kat yada daha fazla gerçekleştiği, yine diabetik hastaların plazmalarında, nonenzimatik glikozilasyon reaksiyon ürünlerinin de yüksek miktarda bulunduğu; ve ayrıca diabetteki patolojik doku değişikliklerinin de protein glikozilasyonu ile korele olduğu ¹⁰⁹ bildirilmiştir. Diabetes mellitustaki oksidatif stres de nisbeten kısaca "oto-oksidatif glikozilasyon" kavramı ile açıklanmıştır ¹⁰⁹.

Yakın zamanda insan eritrositlerinin glikozillenmiş ve glikozillenmemiş Cu-ZnSOD içerdiği bildirilmiştir. Diabetli hastaların eritrositleri normal eritrositlerle karşılaştırıldığında, azalmış enzimatik aktivite varlığında glikozillenmiş enzim yüzdesi belirgin olarak artmıştır ⁵. In-vitro, Cu-ZnSOD ile D-glukoz inkübasyonu glikozilasyon ile sonuçlanmıştır, bu in-vivo olarak da diabet boyunca Cu-ZnSOD inaktivasyonu için olası bir mekanizma kabul edilebilir ⁸⁴.

Kimyasal olarak deneysel diabet oluşturulan hayvanlarda SOD aktivitesi ölçülmüştür. Matkovics ve ark. tarafından, alloksan veya STZ-diabetik ratlarda 2 ay boyunca, total SOD aktivitesinin karaciğer, böbrek, dalak, kalb, testis, pankreas, iskelet kası ve eritrositlerde azaldığı ⁷³, beyin ve akciğerde ise değişmediği gösterilmiştir ⁷².

Crouch ve ark.'nın çalışmasında STZ-diabetik ratlarda 5

gün boyunca akciğer, karaciğer, beyin, aorta, böbrek, bütün göz ve lensde SOD aktivitesinin değişmediği; eritrosit ve retinada Cu-ZnSOD aktivitesinin azaldığı, 3 günlük insülin tedavisi ile enzim aktivitesinin restore olduğu gösterilmiştir ³⁰.

Loven ve ark. tarafından, STZ-diabetik ratlarda 9-10 gün boyunca Cu-ZnSOD aktivitesinin renal korteks, ince ve kalın barsak mukozasında azaldığı, MnSOD aktivitesinin intestinal mukozada değişmeyip renal kortekste azaldığı ve 5-6 gün insülin ile tedavi sonucunda düşük barsak ve renal korteks Cu-ZnSOD ile renal korteks MnSOD seviyesinin normale döndüğü bildirilmiştir ⁶⁵.

Nishida ve ark.'nın çalışmasında ise, STZ-diabetik ratlarda SOD aktivitesinin retinada azaldığı ancak kornea, lens, kan, karaciğer veya böbrekte değişmediği bildirilmiştir ⁸².

Diabetik rat aortasında, glutatyon peroksidaz (GPx) belirgin düşerken, katalazın diabetle ilgisiz olduğu, SOD'ın saptanabilir konsantrasyonda bulunmadığı; böbrekte ise GPx'in yükseldiği, katalaz ve SOD aktivitesinin değişmediği, ayrıca plazmada lipid peroksidlerin de arttığı gösterilmiştir ³⁴.

Nonobez diabetik farelerde böbrekte MDA seviyesi ve SOD aktivitesi belirgin yüksek olarak bulunmuş; böylece böbrekteki glomerüler hasardan serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür ¹¹⁰.

Low ve ark.'nın çalışmasında STZ-diabetik ratlarda, siyatik sinir Cu-ZnSOD aktivitesinin kontrole göre azaldığı

ve insülin tedavisiyle enzim aktivitesinin restore olduğu bildirilmiş, deneysel oluşturulan diabette oksijen serbest radikallerinin arttığı gösterilmiştir ⁶⁷.

Diabetik şahıslardaki SOD aktivitesi hakkında da çalışmalar yapılmıştır. En az iki yıldır insülin ile tedavi olan tip I diabetli hastalarda eritrosit Cu-ZnSOD ile lenfosit Cu-ZnSOD ve MnSOD aktivitesinde değişiklik saptanmazken ⁴⁸, tip II diabetli hastalarda eritrosit Cu-ZnSOD aktivitesi azalmış olarak bulunmuştur ⁷³.

Diabetik hastaların beyaz hücrelerinde, SOD'ın substratı olan süperoksit radikali (O_2^-) de birçok çalışmada ele alınmıştır. Normal şahıslar ile karşılaştırıldığında, diabetik hastaların polimorfonükleer (PMN) hücrelerinde süperoksit radikali belirgin yüksek bulunmuş, bu yüksekliğin sitoplazmik ve mitokondrial SOD aktivitelerinin azalmasını açıkladığı; diabetik hastaların insülin tedavisi sonucunda PMN hücrelerde kabul edilebilir bir SOD yükselmesi olduğu belirtilmiştir ⁷⁸.

Bir başka çalışmada tip II diabetli hastaların eritrositlerinde SOD, GPx, CAT, GSH, ve membran protein sülfidril grupları (P-SH) çalışılmış; SOD, GPx ve CAT diabet ve kontrol grupları arasında farklılık göstermezken, GSH içeriği ve P-SH diabetin alt tipleri ve kontrolde farklı bulunmuştur ¹⁸.

Yine tip 2 hastaların eritrosit ve plazmalarında lipid

peroksidasyonun arttığı, eritrosit GSH içeriğinin ve GPx aktivitesinin kontrole göre azaldığı bildirilmiştir ¹⁰⁴.

Böbrek tutulumuyla ilgili olarak tip I diabette oksijen radikallerinin, kontrol grubuna göre arttığı ve diabetik grup içinde de mikroalbüminürisi yani böbrek tutulumu olan hastalarda, olmayanlara göre belirgin yükseldiği bildirilmiştir ²⁷.

Plazma ekstrasellüler SOD(EC-SOD) aktivitesi yönünden de diabetik hastalar incelendiğinde, bir araştırma grubu tarafından diabetik ve kontrol grupları arasında fark bulunmadığı ⁷¹, bir başka grup tarafından ise son yıllarda EC-SOD'ın da Cu-ZnSOD gibi glikozillenebildiği bildirilmiştir ¹.

2.5. DİABETİN ORAL TEDAVİSİ VE SÜLFONİLÜRELER

ideal NIDDM tedavisi, insülin sekresyonunun arttırılması ve insülin rezistansının kaldırılarak metabolik bozuklukların düzeltilmesidir. Uzun süreli glisemik kontrolde asıl hedef ise diabetin en önemli komplikasyonları olan aterosklerozis, diabetik mikroanjiopati, diabetik retinopati ve enfeksiyonun ortaya çıkışını önleyebilmektir ⁹⁶.

1939 da Laubatières tarafından sülfonilürelerin bulunuşundan kısa bir süre sonra sülfonilürelerin bütün deney hayvanlarında hipoglisemiye neden olduğu, pankreotektomi yapılmış hayvanlarda ise etki göstermediği, Tip I diabette de etkisiz olduğu bulunmuştur. 1952 yılında Almanya'da sülfonilüre türevi bir madde olan karbutamidin diabet tedavisinde kullanılabileceği öne sürülmüş, ancak kullanımda önemli yan etkilerinin

ortaya çıkmasıyla 1956 yılında karbutamide benzeyen ama daha az toksik tolbutamid bulunmuş, bunu klorpropamid ve diğerleri izlemiştir. 1960 ortalarında ise kütlelerine göre daha güçlü etkinlik gösteren, bu şekilde daha düşük dozlarda etkili olabilen 2. kuşak sülfonilüreler bulunmuştur ⁵². Sülfonilüre türevi antidiabetik ilaçlar Tablo VII de gösterilmiştir.

TABLO VII : Sülfonilüre türevi oral antidiabetik ilaçlar

	Doz Aralığı	Yarılanma ömrü
A) 1. Kuşak		
Tolbutamid (1956)	1.0-3.0 g	3-8 saat
Klorpropamid (1957)	100-500 mg	35 saat
Asetohekzamid (1962)	0.25-1.5 g	6-8 saat
Tolazamid (1962)	100-750 mg	7 saat
B) 2. Kuşak		
Glimidin (1964)	0.5-2.0 g	4 saat
Glibenklamid (1969)	2.5-20 mg	5 saat
Glibornurid (1970)	12.5-75 mg	8 saat
Glipizid (1971)	2.5-20 mg	4 saat
Gliquidon (1975)	60-180 mg	4 saat
Gliklazid (1979)	80-320 mg	12 saat

Tip II Diabetik hastalarda hipergliseminin başlıca nedenleri ⁸⁶;

1. Reseptör ve postreseptör insülin rezistansı
2. Hepatik glukoz üretiminde artma
3. insülin salımında anomali olarak belirlenmiştir.

Sülfonilürelerin kan şekerini düzenlemedeki başlıca

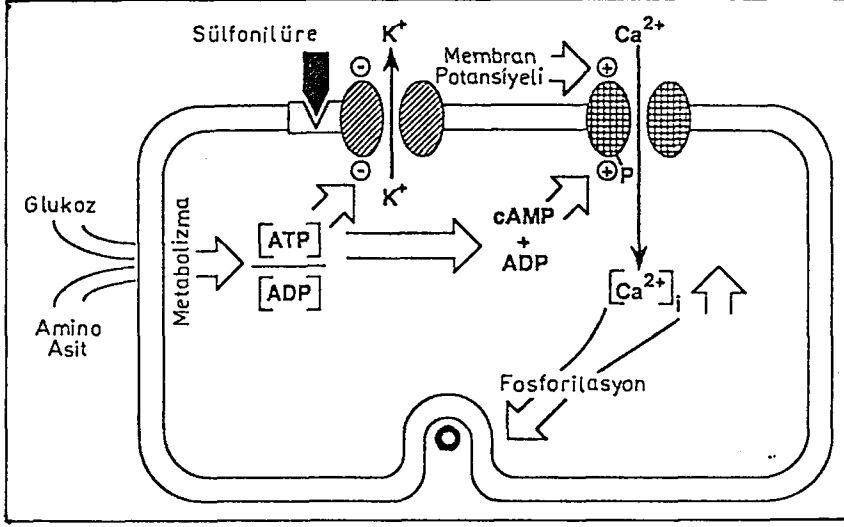
mekanizmalarının en son belirtilen insülin salınımındaki anomalileri düzelterek olduğuna inanılmaktadır. Ancak, sülfonilürelerin tedavi başlangıcında akut insülin cevabını artırarak oluşturduğu hipoglisemik etki yanında , uzun süreli tedavide oluşturduğu ekstrapankreatik etkiler ile de diğer ilk iki anomaliyi dengelediklerine inanılmaktadır ⁸⁶.

Sülfonilürelerin başlangıçta pankreastan insülin salınımına neden olan mekanizmalarına ilişkin çok sayıda kuram ortaya atılmıştır. β hücrelerinin sülfonilüreler tarafından uyarılması ve insülin salınım mekanizması günümüzde şu şeklini almıştır ¹⁹;

Pankreas beta hücresi membranında;

1. ATP duyarlı K^+ kanalları
2. Voltaja bağımlı Ca^{+2} kanalları mevcuttur.

Aynı zamanda bu hücrelerde yüksek afiniteli sülfonilüre reseptörlerinin de bulunduğu gösterilmiştir. Hücre membranında sülfonilüre reseptörleri, ATP duyarlı K^+ kanalları ile birlikte bulunmaktadır. Bu sülfonilüre reseptörleri ile glibenklamid çok düşük konsantrasyonda bile bağlanabilmektedir. Bu bağlanma gerçekleşince, ATP duyarlı K^+ kanalları bloke olur ve hücre dışına K^+ çıkışı durur. Aynı zamanda, glukoz ve aminoasit metabolizması sonucunda oluşan ATP, hücreiçi ATP/ADP oranını artırır, bu da ATP duyarlı K^+ kanallarının sitoplazmik yüzeyindeki özel bölgesine etki ederek kanalların inhibe olmasını sağlar. Bu şekilde K^+ 'un hücre dışına çıkışının engellenmesi beta hücresini depolarize hale getirir ve voltaja bağımlı Ca^{+2} kanalları açılır, ekstrasellüler kalsiyum içeri girer. Sitoplaz-



ŞEKİL 5 : β hücrelerinde voltaj-bağımlı Ca^{+2} kanalları ve ATP-bağımlı K^+ kanallarının sülfolilüre reseptörü ile ilişkisi.

mik serbest kalsiyum seviyesinin artması ⁸⁰, insülin salınımı için tetik mekanizmadır (Şekil 5).

Sülfolilürelerin çok sayıda ekstrapankreatik etkileri vardır, ancak Tip 2 diabette sülfolilürelerin ekstrapankreatik etkilerinin klinik açıdan değer taşıması için şu kriterleri karşılaması gerekir: Etki; sülfolilürelerin kronik tedavi dozlarında, sülfolilürelerin ulaşabildiği hücre bölgelerinde ve insülin varlığında oluşabilmelidir ³⁶. Buna göre, sülfolilürelerin ekstrapankreatik etkileri ise;

A. Karaciğerde, insülin etkisini potansiye etmeleri ⁷⁶

B. Kasda, insülinin glukoz uptake'i üzerine olan etkisini potansiye etmeleri ⁹⁸.

C. Yağ dokuda, insüline benzer etki göstermeleri ve insülin etkisini potansiye etmeleridir ².

D. insülin davranışının hedef periferik organları olan iskelet kası ve yağ dokusunda insüline rezistansı azaltmalarıdır ¹⁷.

2.5.1. Karaciğerde, insülin davranışına etkisi:

Glibenklamidin karaciğerde glukoz üretimini azaltıp, insülin etkinliğini artırması aşağıdaki şekilde açıklanmaktadır, (Şekil 6) ²³;

1. Glibenklamid karaciğerde glikojen sentazı indükleyerek glikojen sentezini artırır.

2. Fosforilaz a aktivitesini azaltarak glikojenolizi inhibe ederek glukoz çıkışını azaltır.

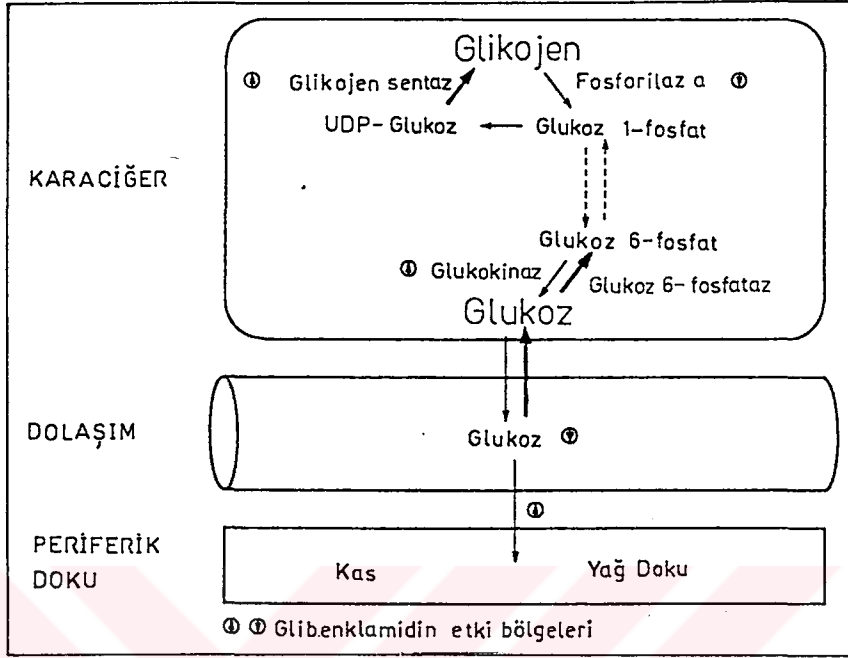
3. Olasılıkla glukokinazın indüklenmesi ile hepatik glukoz ütilizasyonunu sağlar.

4. A-kinaz aktivitesini (cAMP bağımlı protein kinaz) inhibe ederek glikolizin artışına ve glukoneogenezin azalmasına neden olur. Doza bağımlı olarak bu enzimin inhibe olmasıyla Fruktoz 2-6 difosfat(Fru 2,6-P₂) artar, bu maddenin varlığı;

a) 6 fosfofrukto 1-kinazı uyarır.

b) Fruktoz 1-6 difosfatazı inhibe eder.

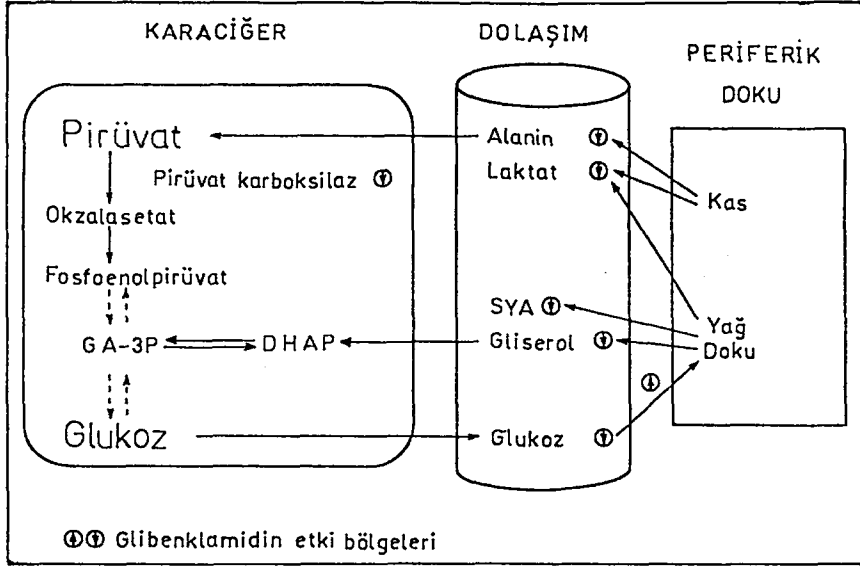
Bu iki enzim de bilindiği gibi glikoliz ve glukoneogenezin hız sınırlayıcı enzimleridir. Diabetik hayvanlarda karaciğerde fruktoz 2-6 difosfatazın azaldığı ve glibenklamid tedavisi sonucu doza bağlı olarak arttığı gösterilmiştir ⁸⁵. Fruktoz 2-6 difosfataz miktarı Fru 6-P 2-kinaz Fru 2-6 fosfataz enzimi ile düzenlenir ⁵⁰. Enzimin aktifleşmesi Fru 2,6-P₂



ŞEKİL 6 : Glibenklamidin karaciğerde glikojenez ve glukoneoje-neze etkileri, glibenklamidin hepatik glukoz üretimini azaltma mekanizması.

miktarını artırmaktadır; (diabetik hastalarda Fru 2,6-P2 miktarının azaldığı bildirilmiştir⁷⁹). Bu enzimin fosfataz aktivitesi cAMP bağımlı protein kinaz (A-kinaz) tarafından katalizlenen fosforilasyonla kontrol edilmektedir. Glibenklamid doza bağlı A-kinaz aktivitesini inhibe eder, A-kinaz inhibe olunca düzenleyici enzimin kinaz aktivitesi sağlanır(enzim fosforiledir) ve enzim de Fru 2,6-P2 miktarını artırır, glukoneogenez azalır ve glikoliz artar⁸⁵, (Şekil 7).

5. Pürivat karboksilaz üzerine yaptığı etki ile, glukoneogenezini inhibe eder. Bu etki indirek gelişmektedir. Glibenklamid hücre içi ATP/ADP oranını azaltır, azalmış ATP/ADP oranı

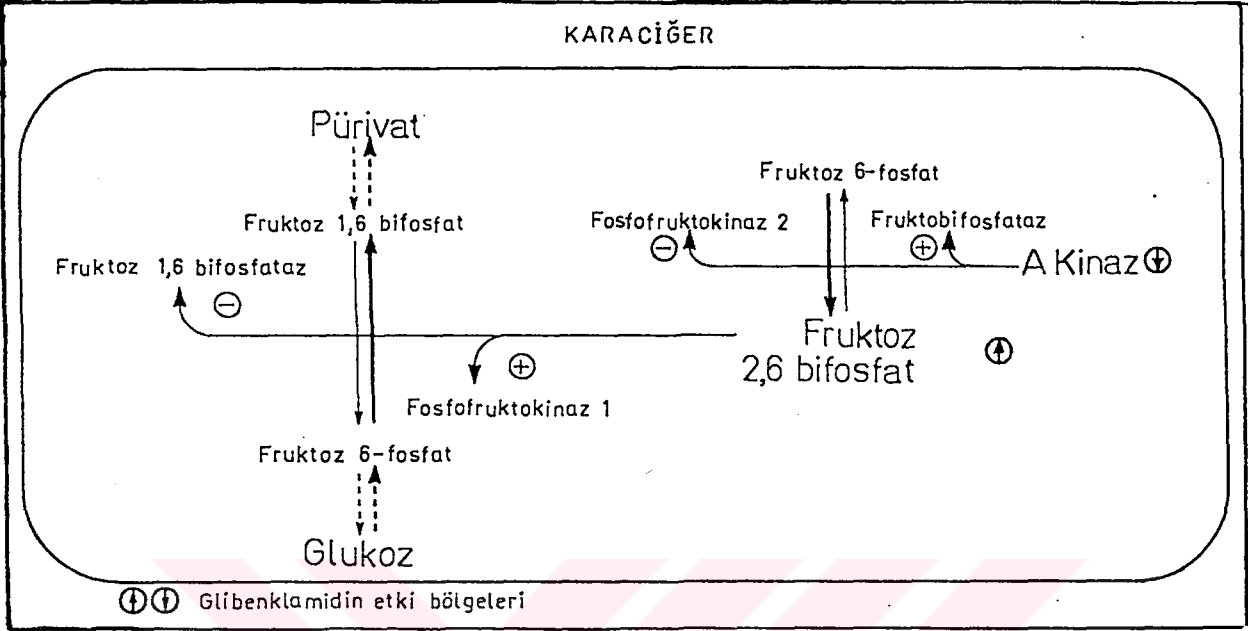


ŞEKİL 7 : Glibenklamidin karaciğerde glikojenez ve glukoneoje-
neze etkileri. SYA ; Serbest yağ asidi.

pürivat karboksilazı inhibe ederek glukoneogenezin anahtar basamağında, pürivattan fosfoenolpürivata olan metabolik akışı azaltır ¹⁰⁶ (Şekil 8).

6. Glibenklamid mitokondride oksidasyon için yağ asitlerinin transportunu sağlayan karnitin palmitoil transferaz I enzimini inhibe ederek , rat karaciğerinde yağasiti oksidasyonunu ve ketogenezi azaltmaktadır ⁸⁷, yine glukoneogenez için major glukojenik maddeler olan gliserol, laktat ve alanin seviyelerini azaltmakta; böylece hepatik glukoz üretimini düşürmektedir ²³ (Şekil 8)

Altan ve ark.'nın sıçan adipositlerinde yaptıkları bir çalışmada, sülfonilürelerin karbohidrat metabolizması



ŞEKİL 8 : Glibenklamidin karaciğerde glukoneojenezde olası etki basamakları

üzerine insülin benzeri etki gösterdiği ve insülin etkisini potansiye ettikleri saptanmış; glibenklamidin glikojen sentazi aktive ettiği ve bu etkinin doza, glukoz konsantrasyonuna ve zamana bağlı değiştiği gösterilmiştir ².

Neufeld ve ark. 'nın çalışmasında, Tip 2 diabetli hastalarda monositlerin biyofiziksel davranışı ve membran yapılarında glibenklamidin insülin etkisini artırdığı ve bu etkisini insülin reseptörlerinden bağımsız yaptığı ileri sürülmüştür ⁸¹.

Tip 2 hastalarda 3 ay süreyle yapılan glibenklamid tedavisinden sonra periferik insülin seviyesinin ve periferik glukoz kullanımının arttığı, hepatik glukoz çıkışının azaldığı

gözlenmiş; yine bu hastalarda glibenklamid kan glukozunu düzenleme açısından, periferik glukoz yıkımını artırması ve glukozun hepatik üretimini azaltması ile korele bulunmamış serum insülin konsantrasyonunu artırmasıyla korele bulunmuştur ⁶².

Glibenklamid sülfonilüre reseptörlerine karşı tolbutamid, glipizid ve klorpropamidden daha fazla afinite göstermektedir ⁹⁵.

Glibenklamidin hem reseptör hemde postreseptör etkili oldukları ⁴⁰, postreseptör etkilerini glukoz metabolizmasındaki intrasellüler basamakları etkilediği gibi glukoz transport akışını da etkileyerek gerçekleştirdiği bildirilmiştir ⁵⁴.

Sülfonilürelerin, bazı glukoz taşıyıcı proteinlerin sentezini artırabileceklerini gösteren araştırmalar bulunmaktadır ³³.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi deney hayvanları yetiştirme bölümünden sağlanan 150-200 gr ağırlığındaki dişi sıçanlar kullanılmıştır.

3.1.2. Kullanılan Aletler

Çalkalayıcı su banyosu (Meka-Lab)

pH metre (Nel-Elektronik)

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

Homojenizatör (Virtishear)

Hassas terazi (Bosch 2000)

Spektrofotometre (Milton Roy Spectronic 3000 Array)

Glucometer II (Ames)

Glucostix (Ames)

Sıvı azot tankı

Mikropipetler

Deep freeze (GLF)

Çeşitli tüpler, dispoziibl kaplar ve diğer rutin labaratuvar malzemeleri.

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Alloksan, Superoxide dismutase (SOD, Bovine Liver, 3000 ü), 6-hydroxydopamine hidrobromid (6-OHDA), EDTA, Bovine serum albumin, Folin Ciocalteu's Fenol (SIGMA).

Glibenklamid (NOBEL).

Sodyum hidrojen fosfat dibazik, potasyum hidrojen fosfat monobazik (MERCK).

3.2. Uygulanan Yöntemler

3.2.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması ⁸

Diabet oluşturmak amacıyla serum fizyolojik içinde hazırlanmış alloksan, eter ile hafif düzeyde anestezi edilmiş sıçanların kuyruk veninden 60 mg/kg dozda iv olarak verildi. Alloksan injeksiyonundan 1 hafta sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kanda glukostikler kullanılarak kan glukoz tayini yapıldı. Glukostik üzerine damlatılan kanın oluşturduğu renk şiddeti glukometer II aletinde değerlendirilerek tesbit edildi. Kan glukozu 250 mg/dl ve üzerinde bulunan sıçanlar diabetik olarak kabul edildi.

Deneyler 4 grup sıçan üzerinde uygulandı, gruplar şu şekilde düzenlendi;

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

1. grup deneylerde kullanılan sıçanlar kan glukoz ölçümleri yapılarak normal bulunan ve ağırlıkları tesbit edilen sıçanlar 28 gün boyunca ayrı kafeslerde bekletildi. Bu süre sonunda yine ağırlık ve kan glukoz tesbiti yapılarak deneylere

geçildi.

2. grup deneylerde kullanılan sıçanların kan glukoz ve ağırlıkları tesbit edildikten sonra 28 gün boyunca hergün oral yolla (sonda yardımı ile intra gastrik yoldan) 5 mg/kg glibenklamid verildi. Bu süre sonunda yine ağırlık ve kan glukoz tesbiti yapılarak deneylere geçildi.

3. grupta alloksan enjeksiyonundan 7 gün sonra kan glukoz ve ağırlık ölçümleri yapılarak 28 gün boyunca sıçanlar su ve yemleri devamlı takviye edilerek, temizliklerine dikkat edilerek kafeslerinde bekletildi. 28 gün sonunda yine ağırlık ve kan glukoz tesbiti yapılarak deneylere geçildi.

4. grupta alloksan enjeksiyonundan 7 gün sonra kan glukoz ve ağırlık tesbiti yapıldı. Daha sonra 28 gün boyunca sıçanlara her gün 5 mg/kg glibenklamid oral yolla verildi. Bu süre sonunda yine ağırlık ve kan glukoz tesbiti yapıldı.

Deneylerde kullanılan sıçanlar Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Araştırma Laboratuvarında ayrılan bölümde bakıma alındı. Hayvanların temizlik, beslenme ve su ihtiyaçları, günlük ilaç dozlarının verilmesi sırasında azami dikkat gösterildi.

Deneyler için toplam 75 deney hayvanı kullanıldı ancak ilaç verilimi yada diabet nedeni ile bir kısmı kaybedildi.

Kesim günü geldiğinde son ölçümleri yapılan deney hayvanları taşıma kafesleri içinde birimize getirildi, gerek-

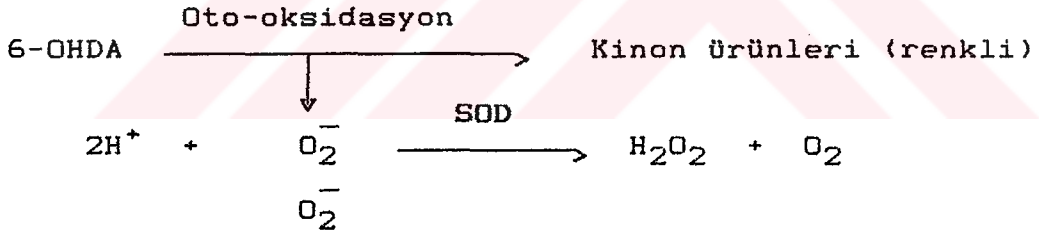
li hazırlıklar tamamlandıktan sonra eterle zayıf anestezi yapılarak kesildi. Hayvanlardan alınan karaciğer ve böbrekler derhal soğuk serum fizyolojik içinde yıkandı ve alüminyum folyo ile sarılarak sıvı azot tankı içinde donduruldu, deney gününe kadar -70°C 'de saklandı.

3.2.2. Yöntemlerin Uygulanması

1. Doku SOD Aktivitesi

Doku SOD aktivitesi Heikkila ve Cabbat tarafından geliştirilen; SOD'ın, 6-OHDA'nın spontan oto-oksidasyonunu inhibe etmesine dayanan metodu ile çalışıldı ⁴⁹.

6-OHDA spontan oto-oksidasyon ile kinon ürünlerine dönerken süperoksit anyonu açığa çıkarır.



Açığa çıkan süperoksit, 6-OHDA'nın oto-oksidasyonunu uyarır ancak ortamda SOD varlığında süperoksit, H_2O_2 ve O_2 'e çevrilir ve 6-OHDA'nın oto-oksidasyonu inhibe olur. 6-OHDA oto-oksidasyonu ve SOD enzimi tarafından inhibisyonu 490 nm'de absorbans değişimini verir.

a) Reaktifler

- Tampon : 10^{-4}M EDTA içeren 0,05 M fosfat tamponu, pH:7.4
- 6-OHDA : 10^{-4}M
- Standart : Bovine Liver SOD 3000 ü.

b) Deneyin Yapılışı

Deney günü dokular tartıldı ve 1:9 oranında (ağırlık: volüm) $10^{-4}M$ EDTA içeren 0,05 M fosfat tamponunda (pH 7,4), buzlu su banyosu içinde teflon uçlu homojenizatör ile homojenize edildi. Elde edilen homojenat $4^{\circ}C$ 'de 700 g'de 10 dakika santrifüjlendi ve temiz süpernatant ayrıldı. Süpernatanda SOD aktivitesi çalışıldı.

Deney ortamı 3.0 ml'lik quartz spektrofotometre tüplerinde gerçekleştirildi, $10^{-4}M$ EDTA içeren 0,05 M fosfat tamponundaki (pH:7.4) 0,1 ml homojenatın, $10^{-4}M$ 6-OHDA otooksidasyonunu inhibe etmesi, 6-OHDA kontrolü ile gerçekleştirildi. 490 nm'de absorbans değişimi 15 sn aralarla izlendi. Yüzde inhibisyon değeri absorbans değişiminin başlangıç hızları temel alınarak hesaplandı. Başlangıç hızları ise 0 ile 15 saniyeler arasında hesaplandı.

0.sn absorbans A1

15.sn absorbans A2

$$\text{Başlangıç Hızı} = \frac{A2-A1}{t2-t1}$$

$$\text{Kontrol yüzdesi} = \frac{\text{Numune başlangıç hızı}}{\text{Kontrol başlangıç hızı}} \times 100$$

(% K)

% inhibisyon = 100 - (% K), hesaplandı.

Numune enzim aktivasyonu, standart karaciğer SOD'ı kullanılarak ve mg protein başına hesaplandı (Bovine Liver SOD, 3000 U; 1 ü/ml %50 inhibisyona neden oldu).

2. Protein Tayini Lowry Yöntemi ⁶⁸

a) Reaktifler

- Alkalın reaktif : 32 kısım 0,1 N NaOH içinde %2 Na₂CO₃
1 kısım %2 Na-K tartarat
1 kısım %1 CuSO₄

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

- Standart : 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA).

b) Deneyin Yapılışı

- Numuneler belirli oranda distile su ile dilüe edildi.
- 2 ml alkalın reaktifi konularak iyice karıştırıldı.
- 0,2 ml folin ciocalteu eklenip 1 saat oda ısısında bekletildi.

- Standart olarak 1 mg/ml'lik BSA, kör olarak ise distile su numune gibi aynı şekilde çalışıldı.

- 750 nm dalga boyunda spektrofotometrik ölçüm yapıldı.

3.3. Sonuçların Analizi

Deneyler sonucunda elde edilen veriler bilgisayarda istatistik paket programı (Microstat, 1984, Ecosoft, Inc) kullanılarak analiz edildi.

Çalışmalarda uygun şekilde gruplar arasındaki farklılık student t testi ile değerlendirildi.



4. BULGULAR

4.1. Sıçanların Genel Özellikleri

Çalışmamızda 150-200 g ağırlığında dişi sıçanlara 60 mg/kg iv alloksan injeksiyonundan 1 hafta sonra yapılan ölçümlerde kan şekeri düzeyleri 250 mg/dl ve üzerinde olan sıçanlar diabetik olarak değerlendirildi. Ayrıca diabetin karakteristik semptomları olan poliüri, polidipsi ve polifaji de bu sıçanlarda gözlemlendi.

Alloksan enjeksiyonundan 1 hafta sonra sıçanlar tedavi edilmemiş kontrol(K), tedavi edilen kontrol(K+G), tedavi edilmeyen diabetik(D) ve tedavi edilen diabetik(D+G) olarak 4 gruba ayrıldı.

Tedavi verilen gruplara 28 gün süre ile hergün 5 mg/kg dozda glibenklamid sonda yardımı ile direk mide içine verildi.

4.2. Araştırmanın Sonucunda Elde Edilen Bulgular

Gruplara ait bütün veriler Tablo VIII'de görülmektedir.

Dört grupta da sıçanların ağırlıkları 28 günün sonunda anlamlı değişimler gösterdi, bu değişimler K, K+G, D+G gruplarında artma (sırasıyla $p < 0,001$, $t = -14.8943$; $p < 0,001$, $t = -7.3569$; $p < 0,001$, $t = -5.0589$), D grubunda ise azalma ($p < 0,02$, $t = 2.5817$) şeklinde oldu, Tablo IX ve Şekil 9.

Sıçanların beden ağırlıklarında gram farklılıklar istatistiksel incelendiğinde ise, K ve K+G grubu arasında anlamlı fark olmadığı, ancak K ve D, D ve D+G grupları arasında anlamlı fark olduğu (sırasıyla $p < 0,001$, $t = 3,5211$;

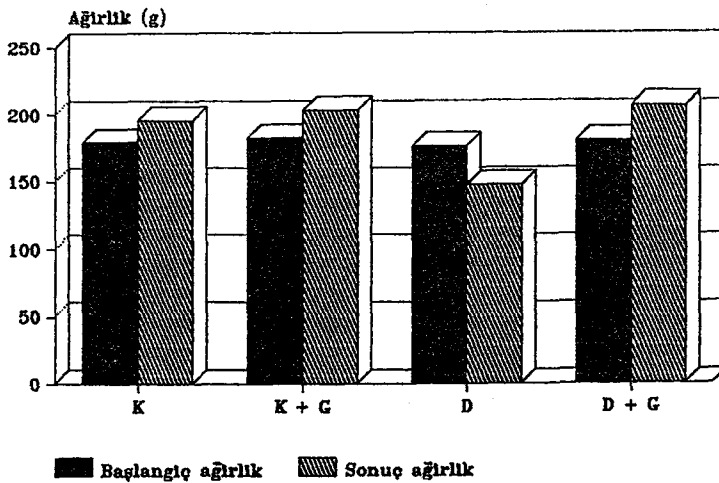
TABLO VIII : Gruplara ait veriler. (KŞ1 başlangıç, KŞ2 sonuç kan şekeri; Ağı1 başlangıç, Ağı2 sonuç ağırlık değerleri.)

Gruplar	Kan Şekeri (mg/dl)		Ağırlık (g)		Karaciğer SOD (ü/mg protein)	Böbrek SOD
	KŞ1	KŞ2	Ağı1	Ağı2		
K	1	108 / 104	160 / 175	169,75	94,09	
	2	117 / 115	175 / 190	119,68	64,81	
	3	120 / 125	170 / 180	103,61	46,78	
	4	109 / 112	200 / 215	158,46	72,70	
	5	120 / 125	160 / 180	135,68	53,05	
	6	102 / 108	150 / 175	74,01	57,45	
	7	105 / 100	200 / 215	75,00	67,54	
	8	110 / 99	210 / 225	71,47	78,46	
	9	112 / 109	180 / 200	60,00	81,37	
	10	118 / 116	175 / 190	93,35	97,05	
	11	115 / 105	200 / 210	80,73	34,67	
	12	112 / 103	200 / 220	125,13	56,91	
	13	108 / 106	160 / 175	110,71	22,40	
	14	114 / 118	170 / 190	85,64	83,34	
K+G	1	108 / 110	160 / 175	98,76	40,45	
	2	125 / 120	170 / 180	118,50	50,36	
	3	115 / 114	230 / 250	126,74	94,85	
	4	112 / 108	180 / 225	138,07	56,84	
	5	128 / 122	165 / 180	89,72	63,88	
	6	120 / 115	230 / 240	95,57	44,49	
	7	117 / 112	165 / 185	92,51	39,85	
	8	125 / 120	230 / 255	103,25	38,25	
	9	122 / 115	165 / 175	94,57	28,30	
	10	115 / 117	150 / 170	68,71	45,37	
	11	120 / 119	175 / 200	83,09	57,65	
	12	109 / 115	170 / 180	101,35	67,18	
	13	117 / 120	190 / 225	98,04	-	
	14	110 / 118	175 / 205	77,84	-	
D	1	288 / 315	170 / 175	47,18	-	
	2	365 / 343	220 / 120	95,25	74,47	
	3	251 / 295	185 / 90	87,46	-	
	4	308 / 281	175 / 110	33,33	-	
	5	367 / 325	180 / 110	95,21	108,37	
	6	257 / 284	180 / 120	15,78	63,75	
	7	337 / 385	180 / 115	5,79	65,42	
	8	288 / 260	150 / 160	12,56	84,04	
	9	287 / 294	210 / 215	54,83	37,92	
	10	322 / 286	175 / 200	132,13	33,87	
	11	400 / 310	120 / 125	76,98	49,27	
	12	350 / 300	185 / 205	56,23	69,65	
	13	320 / 310	160 / 165	64,66	81,16	

Gruplar	Kan Şekeri (mg/dl)		Ağırlık (g)		Karaciğer SOD (ü/mg protein)	Böbrek SOD
	KŞ1	KŞ2	Ağ1	Ağ2		
D+G 1	320 / 198		170 / 175		129,19	55,73
2	295 / 217		220 / 230		130,77	-
3	258 / 166		120 / 130		107,95	-
4	321 / 241		205 / 220		92,06	60,84
5	388 / 250		250 / 280		113,86	55,20
6	377 / 226		210 / 245		102,53	77,67
7	310 / 175		210 / 270		88,13	59,28
8	395 / 225		125 / 160		59,53	30,67
9	387 / 238		100 / 150		100,46	47,36
10	380 / 140		165 / 210		92,85	77,97
11	353 / 175		210 / 225		115,85	-

TABLO IX : Sıçanların ağırlık değişimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi. Veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.

Gruplar	n	Başlangıç ağırlık (g)	28 gün sonraki ağırlık (g)	p	t
K	14	179,3 \pm 19,3	195,7 \pm 18,1	p<0,001	t=-14,8943
K+G	14	182,5 \pm 27,3	203,2 \pm 30,1	p<0,001	t=-7,3569
D	13	176,1 \pm 24,8	146,9 \pm 41,8	p<0,02	t= 2,5817
D+G	11	180,4 \pm 48,1	208,6 \pm 49,1	p<0,001	t=-4,8486



ŞEKİL 9 : Sıçanların gruplara göre ağırlık değişimi.

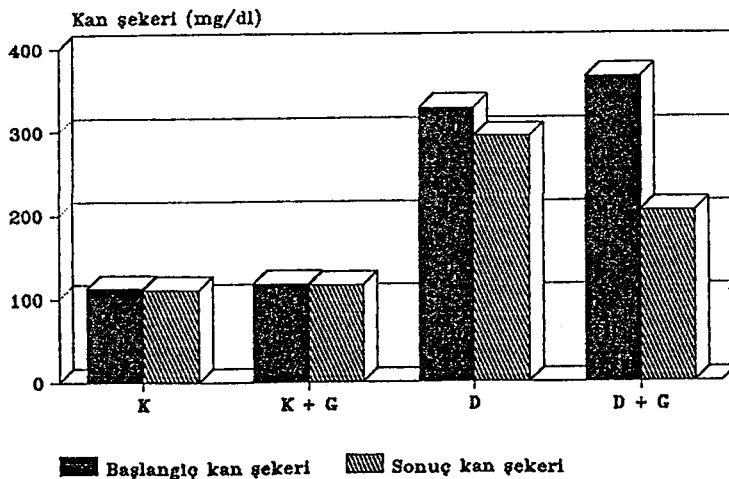
$p < 0,001$, $t = -3,6166$) gözlemlendi. K+G ve D+G grupları arasında da anlamlı fark bulunamadı.

Aynı şekilde dört grup sıçanda tedavinin başlangıcında ve bitiminde kan şekerleri glukostiklerle ölçüldü. Kan şekerleri açısından 28 gün boyunca D+G grubunda istatistiksel anlamlı azalma gözlemlendi ($p < 0,001$, $t = 7,8969$). Tablo X ve Şekil 10.

Sıçanların gruplar arası, 28 günlük kan şekeri farklılıklarının istatistiksel değerlendirilmesinde ise; K ve K+G,

TABLO X : *Sıçanların kan şekeri değişimlerinin istatistiksel değerlendirilmesi. Veriler ortalama \pm SD olarak verilmiştir.*

Gruplar	n	Başlangıç kan şekeri (mg/dl)	28 gün sonraki kan şekeri (mg/dl)	p	t
K	14	112,1 \pm 5,5	110,4 \pm 8,5	$p > 0,05$	$t = 1,1613$
K+G	14	117,4 \pm 6,3	116,1 \pm 4,1	$p > 0,05$	$t = 1,0067$
D	13	318,4 \pm 44,5	306,8 \pm 31,6	$p > 0,05$	$t = 0,7717$
D+G	11	344,0 \pm 45,7	204,9 \pm 36,3	$p < 0,001$	$t = 7,8969$



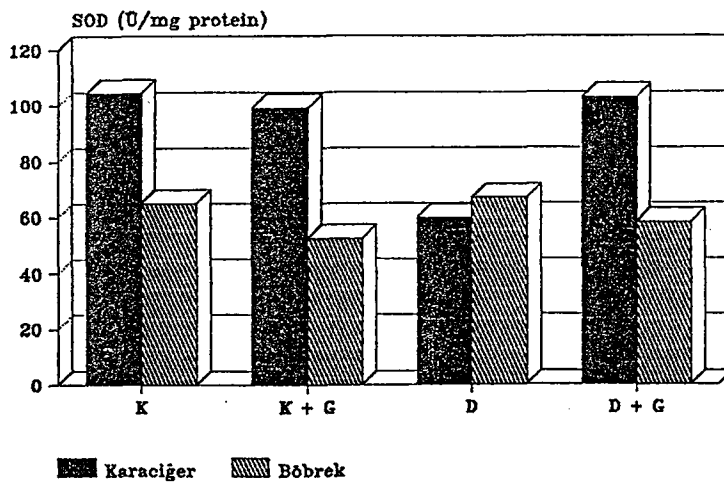
ŞEKİL 10 : *Sıçanların gruplara göre kan şekeri değişimi.*

K ve D grupları arasında anlamlı fark olmadığı, ancak, D ve D+G , K+G ve D+G grupları arasında anlamlı fark olduğu gözlemlendi (sırasıyla $p < 0,001$, $t = 7,0559$; $p < 0,001$, $t = 10,7450$). Diabetik olan gruplarda (D ve D+G), kan şekeri değerleri belirli bir şekilde yükselirken 28 günlük tedavi sonucunda, tedavi verilen grupta (D+G) kan şekerinin anlamlı olarak düştüğü gözlemlendi.

SOD aktivitesinin karaciğer ve böbrek dokularında, gruplara göre dağılımı Tablo XI ve Şekil 11'de görülmektedir.

TABLO XI : Karaciğer ve böbrek dokularında SOD aktivitelerinin gruplara göre dağılımı.

	SOD Aktivitesi (Ü/mg protein)	
	Karaciğer	Böbrek
K	104,52 ± 33,69	65,04 ± 21,58
K+G	99,12 ± 18,54	52,29 ± 17,57
D	59,80 ± 37,43	66,79 ± 22,44
D+G	102,97 ± 20,23	58,09 ± 15,44



ŞEKİL 11 : Gruplarda dokulara göre SOD aktivitesi.

TABLO XII : Grupların SOD aktivitelerinin (ü/mg protein), istatistiksel olarak Student t testi ile karşılaştırılması. Değerler, ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir.

	Kontrol	Diabet	
Karaciğer SOD	104,52 ± 33,69	59,80 ± 37,43	p<0,002 t= 3,2674
Böbrek SOD	65,04 ± 21,58	66,79 ± 22,44	p>0,05 t= -0,1920
	Diabet	Diabet+Gli	
Karaciğer SOD	59,80 ± 37,43	102,97 ± 20,23	p<0,002 t=-3,4190
Böbrek SOD	66,79 ± 22,44	58,09 ± 15,44	p>0,05 t= 0,9315
	Kontrol	Kontrol+Gli	
Karaciğer SOD	104,52 ± 33,69	99,12 ± 18,54	p>0,05 t= 0,5247
Böbrek SOD	65,04 ± 21,58	52,29 ± 17,57	p>0,05 t= 1,6337

Grupların istatistiksel değerlendirilmesi ise Tablo XII'de gösterilmiştir.

Kontrol grubuna göre, diabetik grupta karaciğer SOD aktivitesi belirgin azaldı ($p < 0,002$, $t = 3,2674$); bu düşüş glibenklamid uygulaması ile anlamlı şekilde restore edilirken ($p < 0,002$, $t = -3,4190$), glibenklamid sağlıklı kontrol grubunda istatistiksel bir değişiklik yapmadı.

Böbrek dokusunda ise, aynı grupların SOD aktivitesinde istatistiksel bir farklılık gözlenmedi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada 28 gün glibenklamid ile tedavi edilen normal ve alloksan diabetik sıçanlarda karaciğer ve böbrek doku SOD aktivitesi incelendi. Glibenklamid tedavisinin karaciğer dokusunda SOD aktivitesini restore ettiği gösterildi.

Alloksan uygulaması sonunda kan şekerinin 250 mg/dl üzerine çıkması ve poliüri, polidipsi, polifaji semptomlarının gözlenmesi diabetin geliştiğini kanıtlamaktadır ⁵⁷.

Annamala ve Augusti alloksan diabetik tavşanlarda 2 ay boyunca glibenklamid tedavisi ile bu hayvanlarda ağırlık artışı olduğunu göstermişlerdir ⁴. Çalışmamızda diabetik ratlarda ağırlık azalmasının glibenklamid ile restore olduğu, bunun yanında diabetik olmayan ratlarda glibenklamidin kilo artışına etkili olmadığı gözlemlendi.

Glibenklamid tedavisinin başlangıcında gözlenen kan şekerini düşürücü etkiler insülin sekresyonunun akut uyarılması sonucudur. Uzun süreli tedavide ekstrapankreatik etkileri daha önemli olmaktadır ⁸⁶. Bu ekstrapankreatik etkilerin glibenklamidin hepatik glukoz üretimini baskılaması ¹⁵ ve glukoz kullanımının artışına bağlı olduğu gösterilmiştir ⁴⁵.

Glibenklamid tedavisinin bazal glukoz seviyesini 128 mg/dl (%48) düşürdüğü ve iyi cevap veren sülfonilüreler grubuna dahil olduğu, sadece 48 mg/dl (%26) azalma yapan ilaçların ise zayıf cevap veren sülfonilüreler olduğu bildirilmiştir ⁷⁶.

Çalışmamızda, 28 gün süre ile glibenklamid tedavisi uygulanmış alloksan diabetik sıçanlarda kan glukoz düzeylerinde anlamlı bir düşme olduğu gözlemlendi ve bu düşme ortalama 139 mg/dl (%59) oldu.

Birçok araştırmacı tarafından diabette serbest oksijen radikallerinin arttığı gösterilmiştir.

Dohi ve ark. STZ-diabetik rat plazmasında ³⁵; Low ve ark. siyatik sinirde ⁶⁷; Collier ve ark. tip 2 diabetik hastaların eritrositlerinde ²⁸; Nath ve ark. polimorfonükleer lökositlerde ⁷⁸ oksijen serbest radikal düzeyinin yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Yaguchi ve ark. da nonobez diabetik farelerde yaptıkları çalışmada, böbrek dokusunda oksidatif stresin arttığını göstermişler ve böbrekteki glomerüler hasardan serbest oksijen radikallerinin sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir ¹¹⁰.

Böbrek tutulumuyla ilgili olarak ayrıca insanlarda tip I diabette oksijen radikallerinin, kontrol grubuna göre arttığı ve diabetik grupta mikroalbüminürisi yani böbrek tutulumu olan hastalarda, olmayanlara göre belirgin yüksek olduğu bildirilmiştir ²⁷.

Diabette serbest oksijen radikallerinin neden arttığına ilişkin açıklamalar henüz çok yetersiz kalmaktadır. Diabette yüksek serbest oksijen radikallerinin olası kaynağının şekerlerin oto-oksidasyon reaksiyonları ¹² ve proteinlerin glikolizasyon reaksiyonlarının ⁵³ olduğu görüşleri yanında; polyol

yolunda aldoz redüktaz ve glutatyon redüktazın NADPH için yarışması sonucunda artmış aldoz redüktaz aktivitesinin sekonder olarak redoks potansiyelini değiştirmesinin de bir sonucu olabileceği görüşü de son yıllarda ileri sürülen teoriler arasındadır ^{10,100}.

Çalışmamızda, oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizmalarının en önemlilerinden biri olan SOD enzim aktivitesi incelendi. Alloksan-diabetik sıçan karaciğerinde SOD aktivitesinin, kontrol grubuna oranla anlamlı ölçüde düştüğü; buna karşın böbrek dokusunda bir değişiklik saptanmadığı gözlemlendi. Elde ettiğimiz bu sonuçlar bir çok araştırmacının sonuçları ile paralellik göstermektedir.

STZ-diabetik ratlarda, Matkovich ve ark. total SOD aktivitesinin karaciğer, pankreas, iskelet kası ve eritrositlerde azaldığını ⁷³ beyin ve akciğerde değişmediğini ⁷²; Crouch ve ark. akciğer, karaciğer, beyin, aorta, böbrek, bütün göz ve lensde değişmediğini, eritrosit ve retinada sadece Cu-ZnSOD aktivitesinin azaldığını ³⁰; Loven ve ark. renal kortekste total SOD aktivitesinin, barsak mukozasında ise sadece Cu-ZnSOD aktivitesinin azaldığını ⁶⁶; Nishida ve ark. retinada SOD aktivitesinin azaldığını ancak kornea, lens, kan, karaciğer, ve böbrekte değişmediğini ⁸²; Dohi ve ark. böbrek dokusunda SOD aktivitesinin değişmediğini ³⁵; Low ve Nickander ise siyatik sinirde SOD aktivitesinin azaldığını ⁶⁷ bildirmişlerdir.

Hägglöf ve ark. tip I diabetik çocukların eritrosit CuZn-SOD aktivitesinin azaldığını, lenfosit CuZn-SOD ve Mn-SOD aktivitesinin değişmediğini ⁴⁸; Nath ve ark. diabetik hastaların polimorfonükleer lökositlerinde SOD aktivitesinin azaldığını ⁷⁸; Bono ve ark. tip II diabetli hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin değişmediğini ¹⁸, ancak Collier ve ark. ise tersine tip II diabetik hastalarda eritrosit SOD aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir ²⁸.

Çalışmamızda, karaciğer dokusunda azalmış SOD aktivitesi oral glibenklamid tedavisi ile restore edilirken, böbrek dokusunda SOD aktivitesine ait herhangi bir değişiklik saptanamamasının nedeni belki de, bu dokunun karaciğere oranla hücrel hasara daha geç izin vermesi olabilir.

Nath ve ark. diabetik hastalarda yaptıkları çalışmada PMN lökositlerde azalmış SOD aktivitesinin insülin tedavisi ile % 75 üzerinde bir oranda restore olduğunu ⁷⁸; Low ve Nickander STZ-diabetik ratlarda siyatik sinirde azalmış SOD aktivitesini yine insülin ile düzeltebildiklerini ⁶⁷ bildirmişlerdir.

Lowen ve ark. STZ-diabetik ratlarda 5-6 gün insülin ile tedavi sonucunda düşük barsak ve renal korteks Cu-ZnSOD ile renal korteks MnSOD seviyesinin normale döndüğü ⁶⁶, karaciğer ve böbrekte düşük CuZn-SOD aktivitesinin hem insülin hem de oral glutatyon tedavisi ile restore olduğu ⁶⁵ bildirilmiştir.

Bu restorasyonun hangi mekanizma ile gerçekleştiği henüz tam açık değildir. Glukozun oto-oksidasyonu ve ardından ketoaldehitlerin proteinlerin amino grubuna kovalent bağlanmaları ile proteinlerin glikozillenebildiği bilinmektedir ¹⁰⁹. Diabetik hastalarda bu protein glikozilasyonunun iki kat yada daha fazla olduğu ⁴¹, diabetteki patolojik doku değişikliklerinin de protein glikozilasyonu ile korele olduğu ⁵³ bildirilmiştir. Ayrıca in-vitro yapılan bir çalışmada CuZn-SOD ile D-glukoz inkubasyonunun, enzimin glikozilasyonu ile sonuçlandığı ⁸⁴ ve diabetik hastaların eritrositleri sağlıklı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında düşük CuZn-SOD aktivitesinin, yüksek glikozillenmiş enzim yüzdesi ile birlikte olduğu ⁵ bildirilmiştir.

Tip II diabette mevcut hipergliseminin başlıca nedenleri; a) Reseptör ve postreseptör insülin rezistansı, b) Hepatik glukoz üretiminde artma, c) insülin salınımında anomali olarak belirlenmiştir; sülfonilürelerin tedavi başlangıcında akut insülin cevabını artırarak oluşturduğu hipoglisemik etki yanında , uzun süreli tedavide oluşturduğu ekstrapankreatik etkiler ile de diğer ilk iki anomaliyi dengelediğine inanılmaktadır ⁸⁶.

Glibenklamidin ekstrapankreatik etkileri arasında, karaciğerde ³⁴ ve adipoz dokuda ² glikojen sentaz enzimini indüklemeleri de yer almaktadır. Loven ve ark. yaptıkları çalışmada, insülin ve glutatyonun dokularda SOD aktivitesini restore ettiği, eritrositlerde ise böyle bir restorasyona

rastlanmadığı ⁶⁵, bunun da dokularda özellikle karaciğerde protein sentezinin yapılmasına bağlı olabileceği görüşündeyiz. Ayrıca son zamanlarda glibenklamidin bazı glukoz taşıyıcı proteinlerin sentezini artırabileceklerini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır ³².

Çalışmamızda sülfonilüre grubu oral antidiabetik ilaçların en potentlerinden biri olan glibenklamidin, diabette düşük SOD aktivitesini restore ettiği ilk kez bizim tarafımızdan gösterildi, ancak restorasyonun nedeni bu çalışmamızda araştırılmadı. Araştırmamızın insüline bağımlı olmayan diabetin (NIDDM) patogenezinde ve bu ilaçların etki mekanizmalarının değerlendirilmesinde de önem taşıyabileceği görüşündeyiz.

6. ÖZET

Bu çalışmada, tip 2 diabetik (NIDDM) ratlara glibenklamid tedavisi uygulandı ve karaciğer süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinde düzenleyici etkisi gözlemlendi. Diabetik hayvanlarda hepatik SOD aktivitesi belirgin azaldı. 4 haftalık glibenklamid tedavisi ile diabetik karaciğerde gelişen değişiklikler düzeldi. Ayrıca tedavi uygulanmayan diabetik ratlardaki yüksek kan glukoz düzeyi glibenklamid tedavisi sonucunda düşme gösterdi. Ancak böbrek dokusunda belirgin bir değişiklik saptanmadı. Diabetik ratlarda glibenklamid tedavisinin, diabete bağlı gelişen değişiklikleri geri döndürmesi glibenklamidin karaciğerde SOD aktivitesini direk olarak artırabileceğini düşündürmektedir.

7. SUMMARY

In the present study we administrated glyburide (glibenclamide) to type II (NIDDM) diabetic rats and determined the effect of such treatment on liver superoxide dismutase (SOD) activity. Hepatic SOD activity was significantly reduced in diabetic animals. Glyburide treatment of diabetic rats for 4 weeks corrected the changes observed in diabetic liver. In addition high blood glucose levels of untreated diabetic rats were decreased following glyburide treatment as well. However, not changes observed in diabetic kidney. Administration of glyburide to diabetic rats reversed the diabetes-induced changes suggesting that glyburide may directly increase liver SOD enzyme activity.

8. KAYNAKLAR

1. Adachi T, Ohta H, Hirano K, Hayashi K, Marklund SL : Non-enzymic glycation of human extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* 279 : 263-267, 1991.
2. Altan N, Altan M, Mikolay L, Larner J, Schwartz CFW : Insulin-like and insulin enhancing effects of the sulfonylurea glyburide on rat adipose glycogen synthase. *Diabetes* 34 : 281-286, 1985.
3. Anjaneyulu K, Anjaneyulu R, Sener A, Malaisse WJ : The stimulus-secretion coupling of insulin release. Thiol:disulfide balance in pancreatic islets. *Biochimie* 64 : 29-36, 1982.
4. Annamala PT, Augusti KT : Studies on the biochemical effects of glibenclamide on alloxan diabetic rabbits. *Experientia* 36 : 383-384, 1980.
5. Arai K, Iizuka S, Tada Y, Oikawa K, Taniguchi N : Increase in the glucosylated form of erythrocyte CuZn-superoxide dismutase in diabetes and close association of the nonenzymatic glucosylation with the enzyme activity. *Biochim Biophys Acta* 924 : 292-296, 1987.
6. Asayama K, Kooy NW, Burr IM : Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: Decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med* 107 : 459-464, 1986.

7. Autor AP : Biosynthesis of mitochondrial manganese superoxide dismutase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 257(5) : 2713-2718, 1982.
8. Bailey CJ, Flatt PR : Animal model of NIDDM: Textbook of Diabetes. Birinci baskı. Pickup J, Williams G (ed), Cilt 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991, S : 228-239.
9. Bannister JV, Bannister WH : Isolation and characterisation of superoxide dismutase. *Methods in Enzymology* 105 : 88-104, 1984.
10. Barnett PA, Gonzalez RG, Chylack LT Jr, Cheng H : The effect of oxidation on sorbitol pathway kinetics. *Diabetes* 35 : 426-432, 1986.
11. Basaga HS : Biochemical aspects of Free radicals. *Biochem Cell Biol* 68 : 989-998, 1990.
12. Baynes JW : Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes* 40 : 405-412, 1991.
13. Beckman G, Lundgren E, Tarnvik A : Superoxide dismutase isoenzymes in different human tissues, their genetic control and intracellular localization. *Hum Hered* 23 : 338-345, 1973.
14. Berson SA, Yallow RS : Some current controversies in diabetes research. *Diabetes* 14 : 519, 1985.

15. Best JD, Judzewitsch RG, Pfeifer MA : The effect of chronic sulfonylureas therapy on hepatic glucose production in NIDDM. *Diabetes* 31 : 333-338, 1982.
16. Bliss M : The discovery of insulin. *Textbook of Diabetes*. Birinci baskı. Pickup J, Williams G (ed) Cilt 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991, S : 10-14.
17. Boden G, Ray TK, Smith RH, Owen OE : Carbohydrate oxidation and storage in obese non-insulin dependent diabetic patients: effect of improving glycemic control. *Diabetes* 32 : 932-987, 1983.
18. Bono A, Caimi G, Catania A, Sarno A, Pandolfo L : Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 19 : 264-266, 1987.
19. Boyd AE, Aguilar-Bryan L, Nelson DA : Molecular mechanism of action of glyburide on the beta cell. *Am J Med* 89 (Suppl2A): 3-10, 1990.
20. Brownlee M, Cerami A : The biochemistry of the complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Biochem* 50 : 385-432, 1981.
21. Brunori M, Rotilio G : Biochemistry of oxygen radical species. *Methods in Enzymology* 105 : 22-35, 1984.
22. Cadenas E : Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58 : 79-110, 1989.

23. Caro JF : Effects of glyburide on carbohydrate metabolism and insulin action in the liver. Am J Med 89 (suppl2A): 17-25, 1990.
24. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D : Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycemia through oxidative stress. Diabetologia 36 : 265-266, 1993.
25. Cohen G, Heikkila RE : The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. J Biol Chem 249 (8): 2447-2452, 1974.
26. Colca JR, Brooks CL, Landt M, McDaniel ML : Correlation Ca^{++} and calmodulin dependent protein kinase activity with secretion of insulin from islets of Langerhans. Biochem J 212 : 819-827, 1983.
27. Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GDO, Small M : Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. Diabetes 41 : 909-913, 1992.
28. Collier A, Wilson R, Bradley H, Thomson JA, Small M : Free radical activity in type 2 diabetes. Diabetic Med 7 : 27-30, 1990.
29. Cross CE : Davis Conference : Oxygen radicals and human disease. Ann Intern Med 107 : 526-545, 1987.

30. Crouch R, Kimsey G, Priest DG, Sarda A, Buse MG : Effects of streptozoci on erythrocyte and retinal superoxide dismutase. *Diabetologia* 15 : 53-57, 1978.
31. Czech MP : Molecular basis of insulin action. *Ann Rev Biochem* 46 : 359-384, 1977.
32. Davidson MB, Molnar G, Furman A, Yamaguchi D : Glyburide-stimulated glucose transport in cultured muscle cells via protein kinase C. mediated pathway requiring new protein synthesis. *Diabetes* 40 : 1531-1538, 1991.
33. Davidson MB, Sladen G : Effect of glyburide on glycogen metabolism in cultured rat hepatocytes. *Metabolism* 36 : 925-930, 1987.
34. Dohi T, Kawamura K, Morita K, Okamoto H, Tsujimoto A : Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetic rats. *Horm Metabol Res* 20 : 671-675, 1988.
35. Espinal J : Understanding Insulin Action : Principles and molecular mechanism. Wiseman A (ed) Ellis Horwood Limited, Southampton 1989, S : 39-54.
36. Feldman JM, Lebowitz HE : Appraised of the extrapancreatic action of sulfonylureas. *Arch Int Med* 123 : 314-322, 1969.
37. Fridovich I : Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 44 : 147-159, 1975.

38. Fridovich I : Overview: Biological sources of O_2^- . Methods in Enzymology 105 : 59-61, 1984.
39. Gandy SE, Buse MG, Crouch RK : Protective role of superoxide dismutase against diabetogenic drugs. J Clin Invest 70 : 650-658, 1982.
40. Gavin JR : Dual actions of sulfonylureas and glyburide. Am J Med 79 (Suppl 3B): 34-42, 1985.
41. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP : Glycation of proteins as a source of superoxide. Diabete & Metabolisme 14 : 25-30, 1988.
42. Grankvist K, Marklund SL, Täljedal IB : CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. Biochem J 199 : 393-398, 1981.
43. Grankvist K, Marklund S, Täljedal IB : Superoxide dismutase is a prophylactic against alloxan diabetes. Nature 294 : 158-160, 1981.
44. Granner DK : Hormones of pancreas and GI tract. Harper's Biochemistry. 22. baskı. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (ed) Appleton and Lange, California 1991, S : 530-574.
45. Green A, Olefsky JM : Evidence for insulin included internalization and degradation of insulin receptors in rat adipocytes. Proc Natl Acad Sci USA 79 : 427-431, 1982.

46. Gregory EM, Yost FJ Jr, Fridovich I : Superoxide dismutases of *Escherichia coli*: intracellular localization and functions. *J Bacteriol* 115 : 987-991, 1973.
47. Halliwell B, Gutteridge JMC : Role of free radicals and catalytic metal ions in human diseases: An overview. *Methods in enzymology* 186 : 1-85, 1990.
48. Hägglöf B, Marklund SL, Holmgren G : CuZn-superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinol* 102 : 235-239, 1983.
49. Herkkilä RE, Calbot F : A sensitive assay for SOD based on the auto-oxidation of 6-hydroxydopamine. *Anal Biochem* 75 : 356-362; 1975.
50. Hers H-G, Van Schaftingen E : Fructose 2,6-bisphosphate two years after its discovery. *Biochem J* 206 : 1-12, 1982.
51. Hruszkewycz AM, Bergtold DS : Oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA damage in mitochondria. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Birinci baskı. Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C (ed) Plenum Press, New York 1988, S : 449-456.
52. Holman RR, Turner RC : Oral agent and insulin in the treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus. *Textbook of Diabetes*. Birinci baskı. Pickup J, Williams G (ed) Cilt 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford

1991, S : 462-476.

53. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP : Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. *Biochem J* 256 : 205-212, 1988.
54. Jacop DB, Hayes GR, Lockwood DH : In vitro effects of sulfonylurea on glucose transport and translocation of glucose transporters in adipocytes from streptozotocin induced diabetic rats. *Diabetes* 38 : 205-211, 1989.
55. Jefferson LS, Neely JR : Intermediary metabolism. *Diabetes mellitus and obesity*. Brodoff BN, Bleicher SJ (ed) Williams & Wilkins, London 1982, S : 3-26.
56. Johnston RB, Keele BB, Misra HP, Lehmeyer JE, Webb LS, Baehner RL, Rajagopalan KV : The role of superoxide anion generation in phagocytic bactericidal activity. *J Clin Invest* 55 : 1357-1372, 1975.
57. Kahn CR : Pathophysiology of diabetes mellitus : A overview. *Joslin Diabetes Mellitus*. 20. baski. Marble A, Krall LB, Bradley RF, Christlieb AR, Soeldner JS (ed) Lea & Febiger, Philadelphia 1985, S : 43-50.
58. Kahn CR, White MF : The insulin receptor and the molecular mechanism of insulin action. *J Clin Invest* 82 : 1151-1156, 1988.
59. Karlsson K, Marklund SL : Extracellular-superoxide dismutase association with cell surface-bound sulfated glucosa-

- minoglycans. Oxygen Radicals in Biology and Medicine. Birinci baskı. Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C (ed) Plenum Press, New York 1988, S : 647-650.
60. Kayaalp SO : insulin, oral antidiabetik ilaçlar, glukagon. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Üçüncü baskı. Ulucan Matbaası, Ankara 1986, S : 2195-2248.
61. Klug D, Rabani J, Fridovich I : A direct demonstration of the catalytic action of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. J Biol Chem 247 : 4839-4842, 1972.
62. Kolterman OG, Gray RS, Shapiro G, Scarlett JA, Griffin J, Olefsky JM : The acute and chronic effects of sulfonylurea therapy in type II diabetic subjects. Diabetes 33 : 346-354, 1984.
63. Kono T, Robinson FW, Blewins TL, Ezaki O : Evidence that translocation of glucose transport activity in the major mechanism of insulin action in glucose transport in fat cell. J Biol Chem 257 : 10942-10947, 1987.
64. Larner J, Cheng K, Kikuchi K, Tamura S, Katz M : Insulin mediators and their control of metabolism through protein phosphorylation. Recent Prog Horm Res 38 : 511-556, 1982.
65. Loven D, Schedl H, Wilson H, Daabees TT, Stegink LD, Diekus M, Oberley L : Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase

- activities in organs of rats with streptozocin-induced diabetes. *Diabetes* 35 : 503-507, 1986.
66. Loven DP, Schedl HP, Oberley LW, Wilson HD, Bruch L, Niehaus CN : Superoxide dismutase activity in the intestine of the streptozotocin-diabetic rat. *Endocrinology* 111 : 737-742, 1982.
67. Low PA, Nickander KK : Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 40 : 873-877, 1991.
68. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951.
69. Macfarlane IA : The millenia before insulin. *Textbook of Diabetes*. Birinci baskı. Pickup J, Williams G (ed) Cilt 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford 1991, S : 3-9.
70. Malaisse WJ : Alloxan toxicity to the pancreatic β -cell. *Biochem Pharmacol* 31 : 3527-3534, 1982.
71. Marklund SL, Hägglöf B : Plasma EC-superoxide dismutase activity in insulin-dependent diabetic children. *Clin Chim Acta* 142 : 299-305, 1984.
72. Matkovics B : Effect of plant and animal tissue lesions on superoxide dismutase activities. *Superoxide and superoxide dismutase*. Michelson AM, McCord JM, Fridovich I (ed) Academic Press, London 1977, S : 501-515.

73. Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H : The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolizing enzymes. *Horm Het Res* 14 : 77-79, 1982.
74. McCord JM, Fridovich I : The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243 : 5753-5760, 1968.
75. McCord JM, Fridovich I : Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 244 (22) : 6049-6055, 1969.
76. McGuinness OP, Cherrington AD : Effect of glyburide on hepatic glucose metabolism. *Am J Med* 89 (Suppl 2A) : 26-37, 1990.
77. Naqui A, Chance B, Cadenas E : Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 55 : 137-166, 1986.
78. Nath N, Chari SN, Rathi AB : Superoxide dismutase in diabetic polymorphonuclear leukocytes. *Diabetes* 33 : 586-589, 1984.
79. Neely P, El-Maghrabi R, Pilkis S, Claus T : Effects of diabetes, insulin, starvation and refeeding on the level of rat hepatic fructose 2,6-bisphosphate. *Diabetes* 30 : 1062-1064, 1981.
80. Nelson TY, Gaines KL, Rajan AS, Berg M, Boyd AE : Increased cytosolic calcium. A signal for sulfonylurea-stimulated insulin release from beta cells. *J Biol Chem* 262 (6) : 2608-2612, 1987.

81. Neufeld ND, Harris M, Corbo LM, Koduri A : Effect of glyburide in Type II Diabetes Mellitus. Diabetes 36 : 1351-1355, 1987.
82. Nishida T, Nakagawa S, Manabe R : Superoxide dismutase activity in diabetic rat retina. Jpn J Ophthalmol 28 : 377-382, 1986.
83. Obberghen VE, Gammeltoft S : Insulin receptors: Structure and function. Experienta 42 : 727-734, 1986.
84. Oberley LW : Free radicals and diabetes. Free Radical Biol Med 5 : 113-124, 1988.
85. Okuno S, Inaba M, Nishizawa Y, Inoue A, Morii H : Effect of tolbutamide and glyburide on cAMP-dependent protein kinase activity in rat liver cytosol. Diabetes 37 : 857-861, 1988.
86. O'Meara NM, Shapiro ET, Cauter EV, Polonsky KS : Effects of glyburide on beta cell responsiveness to glucose in non-insulin dependent diabetes mellitus. Am J Med 89 (Suppl 2A) : 11-16, 1990.
87. Patel T : Effect of sulfonylureas on hepatic fatty acid oxidation. Am J Physiol 251(b) : E241-E246, 1986.
88. Peter FH, Karam JH, Salber PR : Pancreatic hormones and diabetes mellitus. Basic and Clinical Endocrinology. Üçüncü baskı. Greenspon FS (ed) Prentice-Hall International Inc, Toronto 1992, S : 592-560.

89. Pisanti FA, Frascatore S, Papaccio G : Superoxide dismutase activity in the BB rat: A dynamic time-course study. *Life Sciences* 43(20) : 1625-1632, 1988.
90. Portha B, Serradas P : Improvement in glucose induced insulin secretion in diabetic rats after long-term gliclazide treatment. *Am J Med* 90(Suppl 6A) : 15-21, 1991.
91. Reaven G, Chen Y, Donner C : How insulin resistance are patients with non-insulin dependent diabetes mellitus? *J Clin Endocrinol Metab* 61 : 32-36, 1985.
92. Rerup CC : Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol Rev* 22 : 485-518, 1970.
93. Rest RF, Spitznagel JK : Subcellular distribution of superoxide dismutase in human neutrophils. *Biochem J* 166 : 145-153, 1977.
94. Rossini AA, Mordes JP, Handler ES : Speculations on etiology of diabetes mellitus. Tumbler hypothesis. *Diabetes* 37 : 257-261, 1988.
95. Schmid-Antomarchi H, De Weille J, Fosset M, Lazdunski M : The receptor for antidiabetic sulfonylureas controls the activity of the ATP-modulated K⁺ channel in insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 262 : 15840-15844, 1987.
96. Sharon E, Washington EL, Mazzeferri MD : Type II diabetes. Role of first and second generation drugs. *Geriatrics* 41 : 51-64, 1986.

97. Simic MG : Pulse radiolysis in study of oxygen radicals. *Methods in Enzymology* 186 : 89-100, 1990.
98. Smith RJ : Effects of the sulfonylureas on muscle glucose homeostasis. *Am J Med* 89 (Suppl 2A) : 38-43, 1990.
99. Steinman HM, Naik VR, Abernathy JL, Hill RL : Bovine erythrocyte superoxide dismutase. Complete amino acid sequence. *J Biol Chem* 249 : 7326-7338, 1974.
100. Sukalski KA, Pinto KA, Berntson JL : Decreased susceptibility of liver mitochondria from diabetic rats to oxidative damage and associated increase in α -tocopherol. *Free Rad Biol Med* 14 : 57-65, 1993.
101. Tainer JA, Hallewell RA, Roberts VA, Parge HE, Getzoff ED: Probing enzyme-substrate recognition and catalytic mechanism in CuZn superoxide dismutase. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Birinci baskı. Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C (ed) Plenum Press, New York 1988, S : 635-640.
102. Thaete LG, Crouch RK, Buse MG, Spicer SS : The protective role of copper-zinc superoxide dismutase against alloxan-induced diabetes: morphological aspects. *Diabetologia* 28 : 677-682, 1985.
103. Uchigata Y, Yamamoto H, Kawamura A, Okamoto H : Protection by superoxide dismutase, catalase, and poly(ADP-ribose) synthetase inhibitors against alloxan and streptozotocin-induced islet DNA strand breaks and against the inhibition

- of proinsulin synthesis. *J Biol Chem* 257 : 6084-6088, 1982.
104. Uzel N, Sivas A, Uysal M, Öz H : Erythrocyte lipid peroxidation and glutathione peroxidase activities in patients with diabetes mellitus. *Horm Metabol Res* 19 : 89-90, 1987.
105. Weisiger RA, Fridovich I : Superoxide dismutase. *J Biol Chem* 248 : 3582-3592, 1973.
106. White C, Rashed H, Patel T : Sulfonylureas inhibit metabolic flux through rat liver pyruvate carboxylase reaction. *J Pharmacol Exp Ther* 246 : 971-974, 1988.
107. Wilson GL, Patton NJ, McCord JM, Mullins DW, Mossman BT : Mechanism of streptozotocin- and alloxan-induced damage in rat β cells. *Diabetologia* 27 : 587-591, 1984.
108. Wolf SP, Crabbe MJC, Thornalley PJ : The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Experientia* 40 : 244-246, 1984.
109. Wolf SP, Dean RT : Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 245 : 243-250, 1987.
110. Yaguchi Y, Tomino Y, Watanabe S, Koide H : Detection of malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in renal tissues of nonobese diabetic mice (letter). *Nephron* 54 : 368, 1990.