T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE AMİNOGUANİDİNİN SERUM NİTRİK OKSİT DEĞERLERİ VE DOKU NİTRİK OKSİT SENTAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. İLKER PARMAKSIZ

UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL 2009

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

STREPTOZOTOSİN İLE SIÇANLARDA OLUŞTURULAN DİYABET MODELİNDE AMİNOGUANİDİNİN SERUM NİTRİK OKSİT DEĞERLERİ VE DOKU NİTRİK OKSİT SENTAZ EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. İLKER PARMAKSIZ

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÖNDER ŞİRİKÇİ

İSTANBUL 2009

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca danışmanlığımı yapan, bilgisini ve yardımlarını esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Önder Şirikçi'ye teşekkürlerimi sunarım.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Kaya EMERK'e, Prof. Dr. Yavuz TAGA'ya, Prof. Dr. Süha YALÇIN'a, Prof. Dr. Nesrin KARTAL ÖZER'e, Prof. Dr. Serpil BİLSEL'e, Prof. Dr. Goncagül HAKLAR'a eğitimime katkılarından ve gösterdikleri yakınlık ile anlayıştan ötürü teşekkür ederim.

İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji ve Metabolizma Bilim Dalı'ndan Doç. Dr. Dilek Gogas'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof Dr. Ayşe Özer ile Öğretim Görevlisi Mustafa Akkiprik'e tez çalışmalarımdaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamda yardımlarından dolayı Dr. Palmet Akgün'e ve Yüksek Kimyager Hümeyra Turan'a teşekkür ederim.

Beraber geçirdiğimiz yıllar boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen tüm çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Eğitimim süresince hep yanımda olan aileme, her türlü zor anımda benimle olan, bana her açıdan destek olan sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Önsöz i
İçindekiler ii
Özet iii
Summary iv
Simge ve Kısaltmalar Dizini v
Şekiller ve tablolar listesi vi
1. Giriş ve Amaç 1
2. Genel Bilgiler 3
2.1. Diabetes Mellitus 3
2.1.1. Diabetes mellitus'un tanımı 3
2.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflanması 3
2.1.2.1. Tip 1 DM 4
2.1.2.1.1. Epidemiyoloji 5
2.1.2.1.2. Etiyoloji ve Patogenez 5
2.1.2.1.2.1. Genetik Faktörler 5
2.1.2.1.2.1. Otoimmunite ve Otoantikorlar 6
2.1.2.1.2.3. Çevresel Faktörlerin Rolü 7
2.1.2.1.3. Patofizyoloji 8
2.1.2.1.4. Klinik Bulgular 9
2.1.2.1.5. Tanı 9
2.1.2.1.6. Tedavi 9
2.1.2.2. Tip 2 DM 10
2.1.2.2.1. Epidemiyoloji 10
2.1.2.2.2. Etiyoloji ve patogenez 11
2.1.2.2.3. Klinik bulgular 14
2.1.2.2.4. Tanı 14
2.1.2.2.5. Tedavi 15
2.1.3. Diyabetin kronik komplikasyonlarının mekanizması 17
2.1.3.1. İleri glikasyon son ürün oluşumunun artması 17
2.1.4. Deneysel diyabet oluşturulma yöntemleri 21
2.2. Nitrik Oksit 22
2.2.1. Nitrik oksitin biyokimyası ve özellikleri 22
2.2.2. Nitrik oksitin sentezi 23
2.2.3. Nitrik oksitin yıkımı 23
2.2.4. Nitrik oksitin etkileri 24
2.2.5. Nitrik oksit sentaz enzimleri 25
2.2.6. Diyabetin eNOS üzerine etkileri (Uncoupling NOS) 29
3. Gereç ve Yöntem 31
3.1. Kullanılan gereçler 31
3.2. Kimyasal maddeler 31
3.3.Yöntemler 32
4. Bulgular 37
5. Tartışma ve Sonuçlar 44
6. Kaynaklar 48

ÖZET

Diabetes Mellitus (DM) ileri evrede mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla karşımıza çıkan metabolik bir hastalıktır. Yüksek glukoz konsantrasyonlarında dolaşımdaki veya dokulardaki proteinlerin non-enzimatik glikasyonu ile ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluştuğu bilinmektedir. AGE'ler, dolaşımdaki ve dokulardaki hücrelerin ve proteinlerin kalıcı kimyasal modifikasyonuyla endotel disfonksiyonuna katkıda bulunmaktadır. Dokularda AGE'nin zamanla birikiminin nitrik oksit (NO) miktarını azalttığı gösterilmiştir. NO, endotelin vasküler tonusu düzenlenmesinde en önemli mediyatördür ve vasküler tonusun düzenlenmesindeki bozukluk, endotelin diğer fonksiyonlarındaki bozulmayı da yansıtmaktadır. Çalışmamızda streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde AGE oluşumu inhibitörü olan aminoguanidin (AG) tedavisinin doku endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) ekspresyonu ve serum nitrik oksit (NO) düzeylerine etkisini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, 10 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçanlar 4 gruba ayrıldı ve iki gruba Streptozotosin verilerek diyabet oluşturuldu. Bir grup ilaçsız takip edildi (DM). Diğer gruba AG verildi (DM+AG). Üçüncü grup sağlıklı kontrol (SK) olarak izlendi. Dördüncü gruba yalnızca AG verildi (SK+AG). 12 hafta sonunda sıçanlardan kan, kalp ve böbrek dokularında glukoz, HbA_{1c}, NO düzeyleri ve eNOS ekspresyonları belirlendi.

Kan NO düzeyleri DM ve SK+AG grubunda SK'ya göre anlamlı olarak azalmıştı. DM ile DM+AG gruplarının NO düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark yoktu. Kalp dokusunda eNOS protein düzeyleri DM grubunda SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı. DM+AG grubu eNOS düzeyleri DM grubuna göre anlamlı bir şekilde artmıştı. Dört grubun böbrek dokusu eNOS düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

Kan NO düzeyleri DM grubunda literatür ile uyumlu olarak azalmıştı. Kalp dokusunda eNOS protein düzeyleri DM grubunda azalmış bulunurken AG tedavisiyle anlamlı bir artış görüldü. AG'in böbrek ve diğer dokulardaki etkilerinin ve bazı çalışmalarda görülen yan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: Diyabet, nitrik oksit, streptozotosin, aminoguanidin, AGE

SUMMARY

Diabetes Mellitus is a metabolic disease, which results in microvascular and macrovascular complications in later stages. It has been known that with elevated glucose concentrations, proteins both in circulation and tissues are non-enzymatically glycated and these result in advanced glycation end-product (AGE) production. AGEs contribute to endothelial dysfunction by permanent chemical modifications of proteins in circulation and in tissues. It was shown that AGE accumulation in tissues decrease NO concentration. NO is the most important mediator in the regulation of vascular tonicity and any derangement observed in the regulation of the vascular tonicity also reflects the derangements in the functions of the endothelium. In our study we aimed to investigate the effects of AGE inhibitor aminoguanidine (AG) treatment on tissue endothelial nitric oxide syntase (eNOS) expression and serum NO levels in streptozotocin induced diabetic rats .

In our study we enrolled 32 ten week-old male Sprague-Dawley rats into 4 groups. In two groups diabetes was induced with streptozotocin. While one group (DM) was followed without any treatment, the other group was given AG (DM+AG). The third group was followed as healthy control (HC). The fourth group was given only AG (HC+AG). After 12 weeks, glucose, HbA_{1c}, NO levels an eNOS expressions were measured in blood samples and heart and kidney tissues.

Blood NO levels were significantly lower in DM and SK+AG groups compared to SK group. There was no significant difference between the NO levels of DM and DM+AG groups. eNOS protein levels in heart tissues were significantly lower in DM group than the SK group. eNOS levels were significantly higher in DM+AG than DM group. There was no significant difference eNOS levels in kidney tissues between the four groups.

Blood NO levels were lower in DM group, which was consistent with the literature. While eNOS protein levels in heart tissues were lower in DM group, their concentration were increased with AG therapy. Further studies are needed to understand the effects of AG in kidney and other tissues and the side-effects that were seen in some studies.

Key words: Diabetes Mellitus, nitric oxide, streptozotocin, aminoguanidine, AGE

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADA : American Diabetes Association
AG : Aminoguanidine
AGE : Advanced Glycation End-Products
Akt : Protein Kinase B
APS : Amonium Persulphate
BH_4 : Tetrahidrobiopterin
4-CN : 4-Chloro-Napthol
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte-Associated-4
DCCT : Diabetes Control and Complications Trial
DPP-4 : Dipeptidylpeptidase-4
DTT : DL-Di-Thiothreitol
GAD65A : Glutamate Decarboxylase
GAPDH : Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
GIP : Gastric Inhibitor Peptide
GLP-1 : Glucagon Like Peptide-1
HSP-90 : Heat Shock Protein 90
IAA : Insulin Autoantibodies
ICAs : Islet Cell Antibodies
IRS : Insulin Receptor Substrate
MODY : Maturity Onset Diabetes Of The Young
NADPH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate
NF-κB : Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cells
PKC : Protein kinase C
PMSF : Phenyl-Methane-Sulfonyl-Fluoride
RAGE : Receptor For Advanced Glycation End-Products
SDS : Sodium Dodecyl Sulphate
SSAO : Semicarbazide-Sensitive Amine Oxidase
STZ : Streptozotosin
UKPDS : United Kingdom Prospective Diabetes Study

ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

1. Şekillerin Listesi

Şekil 1. İnsülin reseptörü ve sinyal iletimi
Şekil 2. Oral antidiyabetik ajanların etki bölgeleri
Şekil 3. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu
Şekil 4. AGE-RAGE etkileşimi ve NF-κB aktivasyonu sonucu oluşan değişiklikler
Şekil 5. Aminoguanidinin farmokolojik aktivitesinin şematik özeti
Şekil 6. NO sentezi
Şekil 7. Nitrik Oksitin nitrata dönüşümü
Şekil 8. NOS izoenzimlerinin yapısı
Şekil 9. Nitrik oksit sentazın dimerik yapısı
Şekil 10. Grupların NOx düzeylerinin (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.
Şekil 11. Grupların kalp dokusu eNOS ekspresyonunun Western-Blot analizi görüntüsü
Şekil 12. Gruplarının böbrek dokusu eNOS ekspresyonunun Western-Blot analizi görüntüsü
Şekil 13. Grupların kalp dokusunda μg protein başına düşen eNOS protein miktarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.
Şekil 14. Grupların böbrek dokusunda μg protein başına düşen eNOS protein miktarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.
Şekil 15. Grupların kalp dokusu ortalama eNOS/GAPDH oranlarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.
Şekil 16. Grupların böbrek dokusu ortalama eNOS/GAPDH oranlarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.

2.Tabloların Listesi

Tablo 1. Diyabet tanı kriterleri
Tablo 2. AGE tedavi yaklaşımları

Tablo 3. NO molekülünün çok yönlü etkileri
Tablo 4. NOS enzimlerinin temel özellikleri
Tablo 5: Grupların özellikleri
Tablo 6: Grupların glukoz ve HbA_{1c} düzeylerinin ortalama, standart sapmaları
Tablo 7. Grupların kalp ve böbrek dokusunda, µg protein başına düşen ortalama eNOS piksel yoğunlukları
Tablo 8. Grupların kalp ve böbrek dokularındaki ortalama eNOS/GAPDH oranı

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetin mikro ve makrovasküler komplikasyonları diyabetli hastaların en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Tip 1 diyabetli hastalarda 60 yaşından önce kalp damar hastalıkları nedeni ile ölüm riski 3-6 kat artmıştır (1).

Endotel hücreleri vasküler tonusu kontrol eden, trombosit aggregasyonu ve düz kas hücre çoğalmasını inhibe eden vazoaktif maddeler salgılayarak damar homeostazını korumada önemli bir rol üstlenirler. Endotel fonksiyon bozukluğu ise, diyabette erken evrede gözlenen bozukluklardan birisidir. Diyabet oluşturulan hayvanlarda endotel hücre proliferasyonunun arttığı, endotel hücrelerinin daha fazla LDL (low density lipoprotein) bağladığı ve endotel permeabilitesinin arttığı gösterilmiştir.

Diyabetin makro ve mikrovasküler komplikasyonları çerçevesinde bakıldığında, diyabette gözlenen endotel disfonksiyonunda da bozulmuş bir NO sentezinin rol oynayıp oynamadığı araştırılan bir konudur. Endotel hücrelerinde eNOS tarafından L-argininden sentezlenerek salgılanan NO, çok güçlü bir vazodilatör olmanın yanısıra, endotele trombosit ve lökosit adhezyonunu azaltmak ve damar düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmek gibi anti-aterojenik özelliklere sahiptir (2). İnsuline bağımlı diyabet modellerinde NO sentezi ve etkisini inceleyen çalışmalarda NO aracılığı ile gerçekleşen endotel kökenli vazodilatasyonun arttığı, azaldığı veya değişmediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır.

Diyabette, aldoz redüktaz yolağı, Diaçilgliserol/Protein Kinaz C (DAG/PKC) yolağı, hekzosamin yolağı ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu gibi değişik mekanizmaların endotel disfonksiyonuna katkıları ile ilgili deneysel bulgular bulunmaktadır (4). Yüksek glukoz konsantrasyonlarında dolaşımdaki veya dokulardaki proteinlerin non-enzimatik glikasyona uğradığı ve bunların birbirleri ile çapraz bağlar oluşturmaları ile de AGE oluştuğu bilinmektedir. AGE ise, dolaşımdaki ve dokulardaki hücrelerin ve proteinlerin kalıcı kimyasal modifikasyonları sonucunda endotel disfonksiyonuna katkıda bulunabilir. Dokularda AGE'nin zamanla birikimi sırasında ileri glikasyon ara ürünlerinin NO ile etkileşerek

yok ettiği gösterilmiştir. Bu da, o dokularda NO biyoyararlanımını azaltmakta ve dokuların vazodilatasyon gibi NO'ya olan yanıtını etkilemektedir.

AGE oluşumunu inhibe eden bir farmakolojik ajan olan AG'nin diyabetik hayvan ve insanlarda kullanımının ise, endotel kaynaklı vazodilatasyonu tekrar sağladığı, albuminüriyi azalttığı ve diyabetik nefropati gelişimini yavaşlattığı gösterilmiştir (5).

Bu projenin amacı sıçanlarda streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelinde doku NOS izoenzimlerinin ekspresyonu ve serum NO düzeylerindeki değişiklikleri incelemek, bir ileri glikasyon son ürünü inhibitörü olan aminoguanidin'in doku NOS izoenzimlerinin ekspresyonu ve serum NO düzeylerine olan etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Diabetes mellitus'un tanımı

Diabetes Mellitus; insülin sekresyonu ve/veya insülin etkisindeki defekt sonucu karbonhidrat, protein, yağ metabolizması bozuklukları ile karakterize, kronik hiperglisemi ile giden multipl etyolojili metabolik bir hastalıktır (7).

2.1.2. Diabetes Mellitus'un Sınıflanması

Diyabetin etiyolojik sınıflandırılması American Diabetes Association (ADA) tarafından aşağıdaki şekilde yapılmıştır (8)**;**

1) Tip1; β hücre tahribatı ile giden mutlak insülin yetmezliği.

- Otoimmunite
- İdiopatik

2) Tip2; Çoğunlukla insülin direnci ile giden insülin eksikliği.

3) Gestasyonel Diyabet

4) Diğer tipleri;

- β hücrelerinde genetik defekt

  Maturity Onset Diabetes of the Young 1 (MODY1)

  *Maturity Onset Diabetes of the Young 2 (*MODY2)

  Mitokondrial DNA mutasyonları
- İnsülin sekresyonunda genetik defekt

  Tip A insülin rezistansı

  Rabson-Mendenhall sendromu

  Lipoatrofik diyabet
- Diğer genetik sendromlar

  Down sendromu

  Frederik ataksisi

  Huntington hastalığı

  Turner sendromu

- Ekzokrin Pankreas hastalığı
  Pankreatit
  Travma
  Neoplazma
  Kistik fibroz
  Hemakromatoz
- Endokrinopatiler
  Cushing sendromu
  Akromegali
  Glukagonoma
  Hipertiroidizm
  Somatostatinoma
- İlaç ve kimyasallar
  Nikotinik asit
  Glukokortikoidler
  Tiroid hormonları
  Tiazidler
  Fenitoin
  Streptozotosin
  Alloksan
  Pentamidin
- İnfeksiyonlar
  Konjenital Rubella
  Sitomegalovirüs
  Coxsackie B4

2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 diabetes mellitus (DM) çocukluk yaş grubunda sık görülen, insülin üretiminde görev alan pankreasın beta hücrelerinin harabiyetine bağlı olarak gelişen insülinopeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik bir hastalıktır (9, 10). Tüm diyabetlilerin yaklaşık olarak % 10'unu oluşturmaktadır. Klinik bulgular,

immünolojik bozuklukların ortaya çıkışından aylar veya yıllar süren bir prodromal dönemi takiben ortaya çıkmaktadır (11). Herhangi bir yaş grubunda görülmekle beraber, en sık görüldüğü yaş grubu 7-15 yaşlarıdır (9). Otoimmunitenin varlığına göre Tip 1a ve Tip 1b olarak ikiye ayrılmaktadır. İmmün kökenli Tip 1a, diyabetli olguların %90'nını oluşturur iken yine çocukluk yaş grubunda görülen otoimmun belirleyicileri negatif olan Tip 1b ise %10'luk kısmını oluşturmaktadır (12).

2.1.2.1.1. Epidemiyoloji

Epidemiyolojik çalışmalar, tip 1 DM görülme insidans ve prevalansında belirgin değişikliklerin ve dünya ülkeleri arasında belirgin farklılıkların olduğunu göstermiştir (9, 11, 12). Tip 1 DM görülme sıklığı çocukluk döneminde 5-7 yaş civarında ve puberte döneminde olmak üzere belirgin 2 pik yapar (9, 13). Dünyada Tip 1 DM insidans ve prevalansı değişiklik göstermekte ve insidansta ülkeler arasında 400 kattan fazla varyasyon görülmektedir. Sardunya, Finlandiya'da insidansı 50/100000 iken Hindistan, Çin ve Venezuella'da ise insidansı 0,1/100000 civarındadır (14). Türkiye'de 1996'da yapılan bir çalışmada 0–15 yaş arası diyabet insidansı 2.52/100000 olarak bulunmuştur (13). Tip 1 DM insidansının 1997 yılına göre 2010 yılında % 40 daha yüksek olacağı tahmin edilmektedir (9, 15). İnsidansın bölgeler arasında bu kadar farklılık göstermesi genetik ve çevresel faktörlerin etkisine bağlanmıştır (9, 16).

2.1.2.1.2. Etiyoloji ve Patogenez

Etiyolojide, genetik, çevresel ve otoimmun faktörler önemli rol oynamaktadır (9, 12, 17, 18).

2.1.2.1.2.1. Genetik Faktörler

Tip 1 DM genetik faktörlerle güçlü bir şekilde etkilenmesine rağmen Mendel kalıtım patternine uymamaktadır ve bu yüzden kompleks ve multifaktöriyel bir hastalık olarak düşünülmektedir. Annesinde Tip 1 DM olan çocukların % 2'sinde diyabet gelişme riski varken, babası Tip 1 DM olan çocukların % 7'sinde diyabet gelişme riski mevcuttur (19). Tek yumurta ikizlerinde Tip 1 DM gelişim riskinin eşit olmaması genetik faktörlerin dışında çevresel faktörlerin rolü olduğunu

düşündürmüştür (20, 12). Tip 1 DM'de genetik yatkınlıktan ve koruyuculuktan sorumlu HLA (human leukocyte antigen) genleri, Tip 1 DM gelişimindeki yatkınlığın % 45-60'ından sorumlu tutulmaktadırlar (11, 21). HLA genlerinin tip 1 DM'da koruyucu rolleri de mevcuttur. Tip 1 DM'de yatkınlığı sağlayan ancak fonksiyonları tam olarak bilinmeyen çeşitli genler mevcuttur. Bunlar içerisinde diyabete yatkınlıktan sorumlu olan Insulin Dependent Diabetes Mellitus 2 (IDDM2) ile T hücre aktivasyonundan sorumlu olan Insulin Dependent Diabetes Mellitus 12 (IDDM12) genleri (9, 11, 22), T hücresi fonksiyonlarında ve immun cevabın regülasyonunda önemli molekülleri kodlayan CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated-4*) (22), PTPN22 (23) ve SUMO4 (24) sayılabilir.

2.1.2.1.2.2. Otoimmunite ve Otoantikorlar

Tip 1 DM pankreas β hücrelerinin harabiyeti (histolojik olarak insulinitis ve adacık hücre hasarı ile karakterize) ile giden otoimmun bir hastalıktır. Otoimmuniteden sorumlu spesifik mekanizma henüz net değildir (11). Genetik ve çevresel faktörler, pankreasın adacık hücrelerine karşın otoimmün sürecin başlamasında tetikleyicidirler (9, 11, 12) Otoimmun süreç ile birlikte pankreasın adacık hücrelerinde zamanla insülin sekresyonu azalmaktadır. Yaşamın ilk yılında geçirilen çoklu enfeksiyon sıklığının diyabet gelişme riskini azalttığı belirtilirken, perinatal enfeksiyonlara maruziyetin ise sıklığı artırdığı belirtilmektedir (9, 25, 26).

Tip 1 DM hastalarda otoimmun süreç dört fazda gerçekleşmektedir; 1- çevresel faktörlere maruziyet, 2- T hücrelerinin uyarılması, 3- T hücrelerinin farklılaşması, 4- beta hücrelerinin haraplanması (9).

Tip 1 DM ile ilişkili otoantikorlar yeni tanı alan hastaların %70-80'inde mevcuttur. Buna karşılık, genel populasyonun % 0,5'inde ve tip 1 DM'li hastaların birinci derece akrabalarının % 3-4'ünde bu otoantikorlar pozitiftir (27).

Tip 1 DM'da ilk tanımlanan antikor adacık hücre antikoru (*Islet Cell Antibodies,* ICAs) olup, daha sonra yapılan araştırmalarda insülin (*Insulin autoantibodies,* IAA), glutamik asit dekarboksilaz (*Glutamic acid decarboxylase*, GAD65A) ve transmembran protein tirozin fosfataz (ICA512A) antikorları da

tanımlanmıştır (9, 12, 28) Yeni tanı almış Tip 1 DM'lilerde ICA antikor pozitifliği % 70, IAA antikor pozitifliği % 35-60, GAD65A antikor pozitifliği % 60-80, ICA512A antikor pozitifliği % 40-60'dır. Bu antikorların diyabetin klinik bulguları başlamadan yıllar önce pozitifleştiği öne sürülmektedir (12, 18, 28). Adacık antikorunun diyabet tanısında altın standart olarak bildirilmektedir. Yeni tanı almış tip 1 DM'li hastalarda antikorlardan birinin pozitif olma olasılığı % 95 iken, iki antikorun pozitif olma olasılığı %80, üç antikorun da pozitif olma olasılığı ise %25'dir (12).

2.1.2.1.2.3. Çevresel Faktörlerin Rolü

Tip 1 DM genlerin, çevresel faktörlerin ve immun sistemin etkileşimi sonucu oluşur. Bilinen en önemli olası çevresel faktörler; diyet ve enfeksiyonlar gibi çevresel faktörlerdir. Bunun dışında mevsimsel dönemler de Tip 1 DM sıklığını etkilemektedir.

Tip 1 DM, yaz döneminde epidemiler artarken kış ve sonbahar aylarında viral enfeksiyon sıklığındaki artışla ilişkili olarak epidemi sıklığının daha fazla olabileceği ileri sürülmüştür (9, 13, 18). Ayrıca perinatal dönemde veya yaşamın erken döneminde enfeksiyonlara maruziyetin riski artırdığı öne sürülmüştür. Özellikle konjenital rubella enfeksiyonlarında tip 1 DM görülme sıklığının arttığı gözlenmiştir (11, 12, 18). Kabakulak, kızamık, suçiçeği ve rotavirus enfeksiyonlarından sonra adacık ilişkili otoantikorlar görülmüştür (29, 30). Viral etkenlerin yapısında bulunan antijenlerin pankreasın beta hücreleri ile çapraz reaksiyona girerek otoimmuniteyi tetikleyerek veya viral ajanların direkt olarak pankreasın beta hücrelerini harapladığı öne sürülmektedir (18).

Süt çocukluğunun erken dönemlerinde inek sütüne başlanılmasının tip 1 DM gelişim riskini artırdığı ileri sürülmektedir (31, 32). İnek sütünde bulunan sığır albuminin (*Bovine serum albumin*, BSA) yapısında bulunan 17 aminoasitlik peptid ile adacık hücre 69 (ICA69) antijeni arasındaki moleküler benzerlikten kaynaklandığı öne sürülmüştür (33). İnek sütü ile erken tanışma barsak maturasyonu olmadan bu proteinin emilimine izin verir ve infanti immunize ederek ICA69 benzerliği yüzünden pankreas adacıklarında immun cevap oluşmasına sebep olur (33). Ancak ICA69 antijenin pankreas dışında birçok organda bulunmasına rağmen o organlarda

bir çapraz reaktivite göstermemektedir. Birkaç çalışmada da inek sütü proteini ile otoimmunite arasında güçlü bir ilişki olduğuna dair herhangi bir kanıt saptanmamıştır (34, 35).

Tip 1 DM gelişiminin D vitamini düzeyi ile de ilişkisinin olduğu öne sürülmüştür (36, 37, 38). Dünyada diyabet insidansının en sık görüldüğü ülke olan Finlandiya'da yapılan çalışmada süt çocuklarında D vitamini idamesinin etkisi ile ilgili yapılan çalışmada, D vitamini idamesi yapılmayanlarda göreceli riskin daha yüksek olduğu ve yeterli D vitamini takviyesi yapılması durumunda Tip 1 DM insidansının azalabileceği ileri sürülmüştür (36). Yapılan 2 çalışmada ise Tip 1 DM sıklığının tahıl ve glutene erken dönemde maruziyetle ilişkili olduğu ispat edilmiştir (39, 40).

Nitrozamin bileşiklerinin toksik dozda alımının da serbest radikal yapımını artırarak diyabete sebep olabileceği ileri sürülmektedir (41).

Kimyasal ajanların ve ilaçların da pankreasın beta hücrelerinde haraplanma yaparak tip 1 DM gelişimini kolaylaştırdığı saptanmıştır (42, 43). Alloxan, streptozotosin, pentamidin ve vacor gibi ilaçların diyabetojenik ilaçlar olduğu öne sürülmüştür. Bunlarda en önemlisi olan diyabetik hayvan modeli oluşturmak için kullanılan streptozotosindir. Streptozotosin, otoimmuniteye neden olarak pankreasın beta hücrelerini direkt olarak haraplamaktadır.

2.1.2.1.3. Patofizyoloji

Pankreas adacıklarında β-hücre kütlesinin kaybı hastalarda hiperglisemiye sebep olur. Bu hiperglisemi glukozun glikojenoliz ve glukoneogenez yoluyla aşırı üretimine ve yağ ile kas gibi dokularda hücresel alımın azalmasına bağlıdır (44). Glukozun hücreler tarafından yeterli kullanılamaması lipid sentezinin azalmasına ve lipolizin hızlanmasına neden olarak serum total lipid, kolesterol, trigliserid ve serbest yağ asitlerin de artmasına neden olmaktadırlar. Sonuçta artan serbest yağ asitleri periferik glukozun kullanılmamasına ve keton üretiminin artmasına neden olmaktadır. Artan keton ürünleri periferik kullanım kapasitesinin ve renal atılım kapasitesinin üzerine çıkarsa ketoasidoza neden olmaktadır.

2.1.2.1.4. Klinik Bulgular

Çocukluk dönemi diyabetinin klinik gidişi prediyabet, diyabetin ortaya çıkışı, kısmi remisyon (balayı) ve total diyabet evresi olarak 4 evrede sınıflandırılmaktadır (11, 45). Çocukluk yaş grubunda diyabet tanısı, semptomların akut başlaması nedeniyle kolaylıkla konabilmektedir. Çocuk ve adölesan yaşlarında diyabetin en sık klasik başvuru semptomları poliüri, polidipsi, kilo kaybı, halsizlik ve yorgunluktur (9, 11, 18). Yeni tanı almış tip 1 DM olgularının % 15-40'ı diyabetik ketoasidoz bulguları ile başvurmaktadır. Yeni tanılı tip 1 DM olguların %30-60'ı ortalama 1–6 ay içinde insülin ihtiyacının azaldığı kısmi remisyon evresine girmektedir ve balayı dönemi olarak adlandırılmaktadır. Balayı evresi ortalama 1-2 yıl sürmektedir (46). Diyabet semptomlarının çıkışından sonraki birkaç yıl içerisinde klinik ve biyokimyasal bulguların daha hakim olduğu total diyabet evresi başlar.

2.1.2.1.5. Tanı

Klinik bulguların yanı sıra rasgele alınan kan şekerinin 200 mg/dL'nin üzerinde olması ve buna eşlik eden idrarda glukozüri ve/veya ketonürinin varlığı diyabet tanısı koydurur (9, 18, 44). Tip 1 DM olguların çoğuna tanı için oral glukoz tolerans testinin yapılması şart değildir (18). Diyabet ön tanısı ile araştırılan olgularda hipergliseminin süresi konusunda, tedaviye başlama kararında ve izleminde HbA_{1c} de önemli bir parametredir.

2.1.2.1.6. Tedavi

Yeni tanılı tip 1 DM'li olguların eğitimi karmaşık ve zaman alıcıdır (20). Tedavideki genel amaç metabolik dengeyi sağlayarak kısa dönem (hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz) ve uzun dönemde görülen komplikasyonları (retinopati, nefropati, nöropati vs.) minimuma indirmektir. İnsülin tedavisinin tipi ve uygulama saatlerinin seçimi hastanın psikososyal gelişimini bozmayacak ve en uygun metabolik kontrol sağlayacak şekilde bireyselleştirilmelidir. Bunun için diyabet ekibi tarafından çocuğun yaşı uygun ise çocuk da dahil olmak üzere aileye diyabet eğitimi verilmelidir . Tip 1 diyabetli hastalarda tedavi stratejileri şöyledir (11, 45, 47, 48);

1.İnsülinin yerine konması

2. Beslenmesinin düzenlenmesi

3. Günlük olarak belirli miktarda egzersiz yaptırılması

4. Glisemik kontrolün düzenlenmesi

5. Hastalık durumlarında uygun tedavi yaklaşımlarnın sağlanması

6. Diyabet konusunda ailenin eğitimi

7. Hastalara psikososyal açıdan yaklaşım ve değerlendirme

8. Diyabet ile ilişkili komplikasyonların takibi ve taranması

9. Diyabet ile ilişkili hastalıkların takibi (Hashimoto tiroiditi, Gluten enteropatisi vs.)

10. Diyabet ile ilgili komplikasyonların önlenmesi ve tedavisi.

2.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Toplumda en sık (% 90) görülen diyabet tipidir. Tip 2 DM genellikle erişkin yaşlarda görülmesine rağmen çocuklar ve adölesanlarda da ortaya çıkabilir (49). Etiyolojileri bilinmese de, burada beta hücrelerinin otoimmun yıkımı söz konusu değildir ve bu bireyler çoğunlukla yaşamak için insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar. Tip 2 DM'li olgularda, Tip1 DM'li olgularda görülen ozmotik diüreze bağlı semptomlar başlangıçta görülmediğinden tanı gözden kaçmakta ve geç tanı konulmaktadır. Tip 2 DM'nin görülme riski yaş, obezite ve fiziksel inaktivite ile artar.

2.1.2.2.1. Epidemiyoloji

Dünyada 1995 yılında 20 yaş ve üzeri populasyonda prevalansı % 4 iken 2030 yılında % 5,4 olması beklenmektedir. Sıklığı gelişmiş ülkelerde gelişmekte olan ülkelere göre biraz daha yüksektir. 1990 yılında gerçekleştirilen çalışmada toplumumuzda diyabet prevalansı erkeklerde % 8,1, kadınlarda % 8,9 bulunmuştur.

Çalışmanın 2001'deki güncelleştirmesinde ise DM prevalansının geçen 10 içinde her yıl ortalama % 6,7 oranında arttığı anlaşılmıştır (50).

2.1.2.2.2. Etiyoloji ve patogenez

Sağlıklı bireylerde normal glukoz toleransından sorumlu faktörler (51):

- İnsülin sekresyonu
- Doku glukoz alımı
  1. Periferik (Primer olarak kas doku, % 80-85)
  2. Splanknik (Karaciğer ve bağırsak)
- Karaciğer glukoz yapımının baskılanması
  1. Azalmış yağ asitleri
  2. Azalmış glukagon
- Glukozun vücuda uygulanma şekli

Tip 2 DM glukoz homeostazında birçok bozukluğun ortaya çıkmasına bağlıdır. Bunlar:

- İnsülin sekresyonunun bozulması
- Kas, karaciğer ve yağ dokuda insülin direnci
- Splanknik glukoz alımında anormallikler

Tip 2 DM'li bireylerde insülin sekresyonundan sorumlu olabilecek faktörler ise şöyle sıralanabilir (51):

1. Glukotoksisite
2. Lipotoksisite
3. İnsülin direnci
4. Yaş
5. Genetik
6. Azalmış inkretinler (*Glucagon-like peptide-1,* GLP-1 ve *Gastric inhibitory peptide*, GIP).
7. Amilin (*Islet amyloid polypeptide*, IAPP) (60,61)
8. Heksozaminler
9. TNF-α

Glukotoksisite ve lipotoksisite edinilen defektler içerisindedir ve bozulmuş insülin sekresyonuna yol açabilir. Glukotoksisite hipotezi gliseminin diyet, insülin

tedavisi, sülfanilüre, metformin tedavisi ile artan insülin sekresyonu konusundaki gözlemler ile desteklenmiştir (52, 53, 54).

Kısa süreli olarak β hücrelerinin artmış serbest yağ asitlerine maruziyeti hücrede fosfatidik asit ve DAG artışına yol açar ve spesifik protein kinazları aktive ederek insülin eksositozuna sebep olur. Kronik maruziyet ise Randle siklusu yoluyla seramidleri artırır ve artan seramid iNOS'u artırarak çeşitli inflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu artırarak β hücrelerinin apoptozuna katkı sağlar (55, 56, 57).

Glukozun oral olarak alınması ile oluşan insülin sekresyonunun intravenöz uygulamaya göre daha fazla olmasının tesbiti inkretinlerin araştırılmasına yol açmıştır ve iki gastrointestinal hormon olan GIP ve GLP-1 glukoz ve yemekle oluşan inkretin etkilerinin % 90'ından fazlasını açıklamıştır (58, 59). GLP-1'in salınan miktarı GIP'den çok daha az olsa da GLP-1'in insülin sekresyonunu stimüle eden major inkretin olduğu düşünülmektedir. Her iki inkretin dipeptidil peptidaz-4 enzimi ile dakikalar içerisinde yıkılmaktadır. GIP ve GLP-1 glukoza bağımlı akut insülinotropik etkilerini pankreasın β-hücrelerinin yüzey reseptörlerine bağlanıp cAMP'yi artırarak gösterirken, uzun dönem etkilerini ise β hücrelerinin gen ekspresyonlarını artırıp insülin sentezini artırarak yapar, Tip 2 DM'li bireylerde oral glukoz alımına GIP cevabı normal iken GLP-1'in oral glukoz alımına cevabı azalmıştır. Ayrıca GLP-1'in intravenöz uygulanması tip 2 DM'lilerde postprandial insülin sekretuvar cevabını artırır ve kronik kullanımı normal glisemiye yakın düzeylere getirir (58).

Hepatik glukoz yapımı glikojenoliz ve glukoneogenez ile sağlanır. Diyabetiklerde hepatik glukoz yapımındaki artışın % 90'ının hızlanmış glukoneogenez ile olduğu gösterilmiş. Hepatik glukoneogeneze katkı yapan çeşitli mekanizmalar ise hiperglukagonemi, glukagona duyarlılığın artması, glukoneogenetik prekürsörlerin (laktat, alanin, gliserol) dolaşımdaki seviyesinin artışı, artan yağ asidi oksidasyonu, insülin duyarlılığında azalmadır.

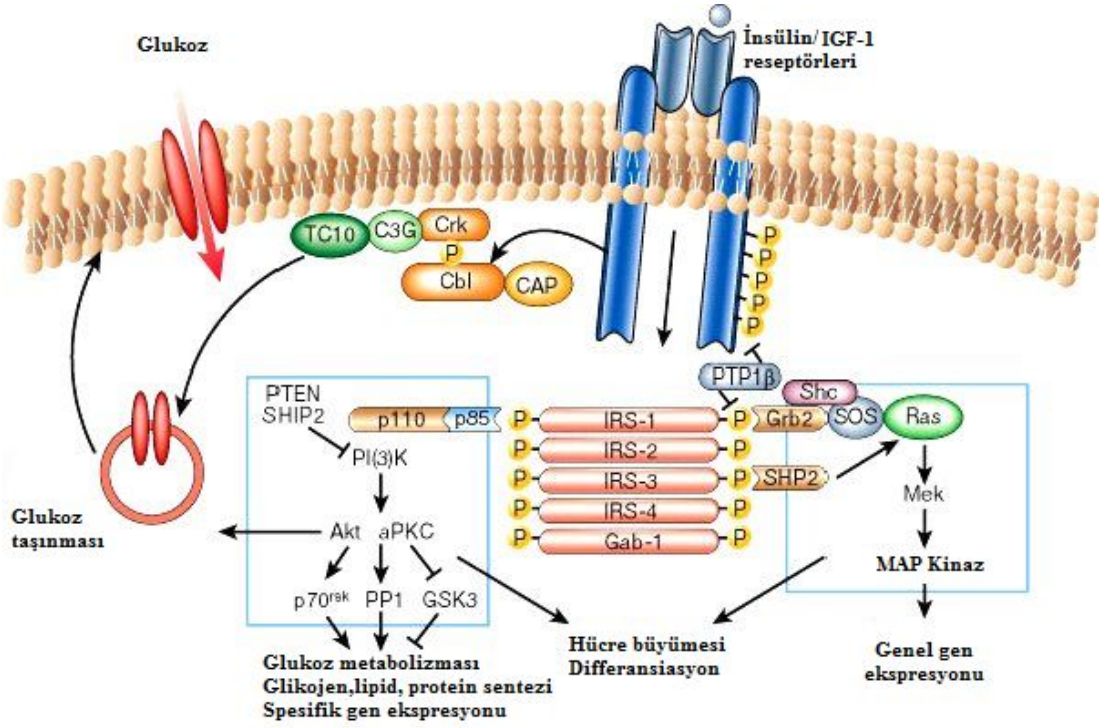
Yapılan kombine öglisemik insülin *klamp* ve femoral ven kateteterizasyon çalışmalarında dolaşımdaki glukozun alımının % 80 kadarının kas doku tarafından alındığı gösterilmiştir. Bu çalışmalarda Tip 2 DM'lilerde periferik dokulara glukoz alımı % 50 azalmış olarak bulunmuştur (51). Bu çalışmalarda herhangi bir zamanda

splanknik doku glukoz alımında diyabetikler ile sağlıklı bireyler arasında herhangi bir fark görülmemiştir.

Glukoz kullanımında ilk basamak glukoz transport sisteminin aktivasyonunu gerektirir ve bunun neticesinde insülinin hedef dokularında, özellikle kasta glukozun hücre içine akışı olur ve hücreye giren serbest glukoz metabolize edilir.

İnsülin reseptörü 2 α ve 2 β-subunitten oluşan glikoprotein yapıda, disülfid bağları ile birleşmiş bir reseptördür (62). İki α alt birimi tamamen ekstrasellülerdir ve insülin bağlayıcı bölgeyi içerir. β alt birimi ise ekstrasellüler, transmembran ve intrasellüler bölgelerden oluşur ve insülin ile uyarılan kinaz aktivitesi β alt biriminde bulunmaktadır. β alt biriminin fosforilasyonu ve sonrasında insülin-reseptör-tirozin kinazın aktivasyonu glukoz metabolizması üzerinde insülinin etkilerinin ilk basamağını oluşturur (Şekil 1)(63).

Tip 2 DM'de insülin reseptörünün tirozin kinaz aktivitesinde (64, 65), insülinle stimüle IRS-1 fosforilasyonunda ve PI-3-kinaz aktivitesinde azalma (% 80-90) gösterilmiştir (66). IRS-1 ve PI-3-kinaz ilişkisinin bozulması ve sonrasındaki aktivasyonda bozulma Tip 2 DM için karakteristik anormalliklerdir ve eğer metabolik yolak bozulursa (PI-3-kinaz) plazma glukoz seviyesi artar ve sonuç olarak insülin sekresyonunda artış ve hiperinsülinemi oluşur. Bu şekilde MAPK yolu aşırı uyarılır (vasküler dokularda) ve böylece artmış kollajen, büyüme faktörleri ve inflamatuvar sitokinlerin yapımında artış olur (67, 68).



Şekil 1. İnsülin reseptörü ve sinyal iletimi *(Saltiel ve ark. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:2078-2084'den değiştirilerek alınmıştır)(73).*

2.1.2.2.3. Klinik bulgular

Semptomların başlangıcı yavaştır. Genelde 45 yaş üzeri ilk belirtiler başlar. Polidipsi, poliüri, polifaji gibi yakınmalardan başka retinopati, nefropati, nöropati ve aterosklerotik kalp hastalığı gibi kronik komplikasyonlara bağlı bulgular vardır. İlk tanı konuldugunda çoğunlukla kronik komplikasyonlar vardır. Hiperglisemiye rağmen kan ve idrarda keton cisimleri azdır veya yoktur. Sadece aşırı hiperglisemi ve hiperozmolarite durumlarında nadiren ketoasidoz koması gelişebilir (69).

2.1.2.2.4. Tanı

2003 ADA' nın önerdiği tanı kriterleri, tablo 1'de gösterilmektedir (70).

Tablo 1. Diyabet tanı kriterleri

Açlık plazma glukozu	
<100 mg/dL (5,6 mmol/L)	Normal glisemi
100-125 mg/dL (5,6- 6,9 mmol/L)	Bozulmuş açlık glukozu (IFG)
≥ 126 mg/dL (7,0 mmol/L)	Diabetes mellitus
75 gr anhidroz glukoz ile yapılan OGTT'de 2. saat plazma glukozu	
<140 mg/dL (7,8 mmol/L)	Normal glisemi
140-199 mg/dL (7,8- 11,1 mmol/L)	Bozulmuş glukoz toleransı (IGT)
≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L)	Diabetes mellitus

2.1.2.2.5. Tedavi

Tip 2 DM tedavisinin hedefleri;

- Diyabetik semptomların ortadan kaldırılması (Hipergliseminin kontrolü)
- Akut komplikasyonların riskini azaltmak (hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperozmolar koma)
- Kronik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların önlenmesi
- Diyabete eşlik eden obezite, hipertansiyon, dislipidemi gibi diğer sorunların tedavisidir.

Hem 'Diabetes Control and Complications Trial' (DCCT), hem de 'United Kingdom Prospective Diabetes Study' (UKPDS) çalışmaları göstermiştir ki, mikrovasküler komplikasyonların gelişmesini önlemek ya da azaltmak için HbA1c düzeylerinin % 7 ve altına indirilmesi gereklidir. Bu olgularda, mutlaka ek risk faktörü olan, hipertansiyon ve dislipideminin tedavisi de gerekmektedir. Bu nedenle bu olgularda tek başına kan şekeri ayarının sağlanması yeterli olmamaktadır. Tip 2 DM'li olguların önemli bir bölümü obez oldugundan tedavinin başında diyet ve egzersiz gibi yaşam stili değişikliklerinin yapılması gerekmektedir. Özellikle, insülin direncinin, önemli olduğu bu olgularda, kiloda azalmanın sağlanmasının çok önemli olduğu açıktır. Tedavide;

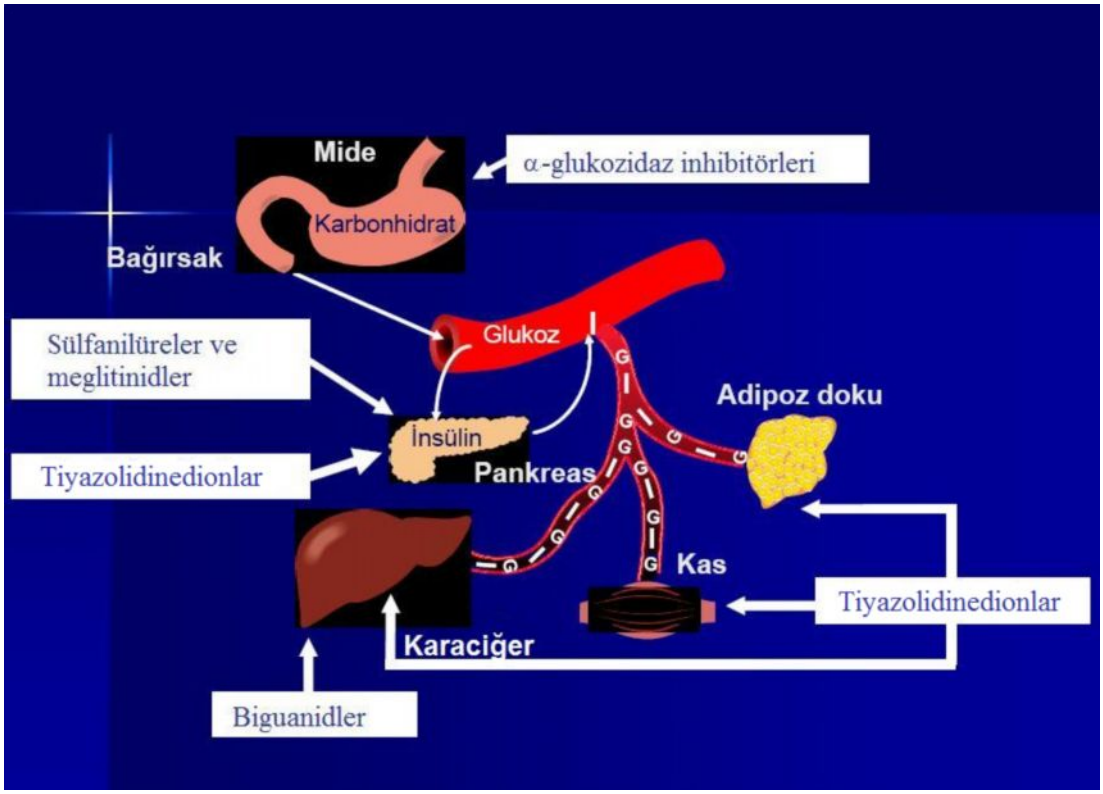
1) Yaşam tarzında değişiklik,

- Diyet
- Egzersiz

2) Oral antidiyabetikler (71),

- insülin salgılatıcıları (sülfonilüreler, tolbutamid, klorpropamid, glipizid, gliklazid, gliburid, glimeperid, glinidler pankreastan insülin salgılanmasını sağlarlar).
- Biguanidler (Biguanidler kilo kaybı yanında hepatik glukoz çıkısını engeller, periferik glukoz alımını artırır ve insülin direncini azaltır).
- R-glukozidaz inhibitörleri (Akarboz ve miglitol bağırsaktan glukoz emilimini azaltır).
- Tiyazolidinedionlar (PPAR agonisti olan rosiglitazon, piaglitazon insülin direncini azaltarak ve glukoz kullanımını artırarak etki göstermektedir).

3) İnsülin tedavisi (Obez olmayan ve on yıldan daha uzun süredir tip 2 DM olan hastalar ise çoğunlukla insülinopeniktirler ve dışarıdan insülin tedavisine gereksinim duyarlar).



Şekil 2. Oral antidiyabetik ajanların etki bölgeleri *(Kobayashi ve ark. Diabetes Obes Metab 1999; 1 (Suppl1):32-40'den değiştirilerek alınmıştır) (71).*

Bunların dışında geliştirilen ve geliştirilmekte olan GLP-1 analog ve mimetikleri (Exenatide, liraglutide, CJC-I131, CJC-I134-PC, BIM51077) ve dipeptidilpeptidaz-4 (DPP-4) inhibitörleri (Sitagliptin, Vildagliptin, Alogliptin, Saxagliptin, PSN-9301, RI438, TA-6666, PHXII49, GRC8200, SYR-619) deneme aşamasında olan veya kullanıma yeni yeni giren ilaçlar arasında sayılabilir (72, 73).

2.1.3. Diyabetin kronik komplikasyonlarının mekanizması

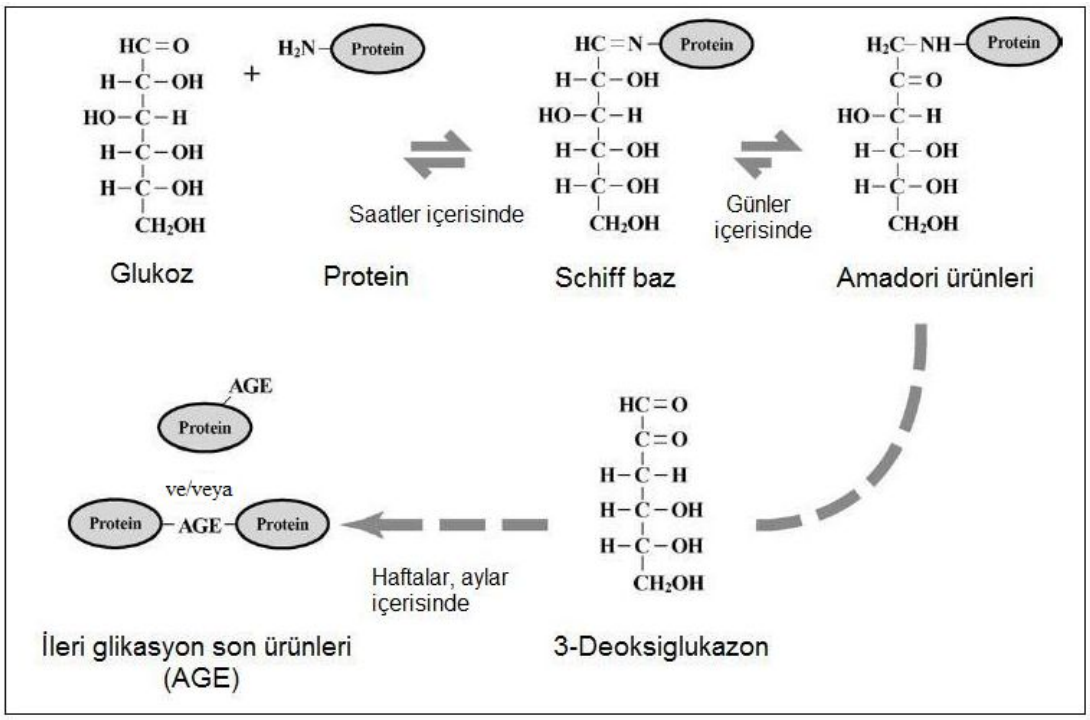
Uzun vadede diyabetin morbiditesi, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlardan kaynaklanmaktadır. Deneysel ve klinik bulgular, diyabet komplikasyonlarının metabolik dengesizlikler, özellikle de hipergliseminin sonucunda oluştuğunu göstermektedir. Hiperglisemiye sekonder olarak bazı biyokimyasal yollar da aktive edilir. Bu aktive edilmiş yollar izole çalışmazlar ve aralarında yaygın etkileşimler olusur. Hiperglisemi dört ana mekanizma ile diyabetik komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu mekanizmalar; poliol yolunun aktivasyonu, hücre içinde AGE'nin artması, protein kinaz C aktivasyonu (PKC) ve heksozamin yolunun aktivasyonudur.

2.1.3.1. İleri glikasyon son ürün oluşumunun artması

AGE'ler, indirgeyici şekerler, lipidler, nükleik asidlerden ve/veya proteinlerdeki mevcut aminoasitlerden non-enzimatik olarak oluşan heterojen bileşiklerdir. Bu non-enzimatik reaksiyona *Maillard Reaksiyonu* da denir. İlk kez 1912 yılında *Louis Camille Maillard* tarafından gösterilmiştir. AGE'ler ilk kez gıda kimyasında kullanılmış, daha sonraları ise 1968 yılında HbA_{1c}'nin diyabetik hastalarda keşfi ile AGE'ler araştırılmaya başlanmıştır (74).

AGE oluşumunda etkili faktörler; proteinlerin turnover oranı, hiperglisemi derecesi, çevresel oksidan stresin genişliğidir (75). Amadori ürünlerinin oluşumuna kadar olan bölüm geri dönüşümlü iken daha sonraki evreler ise geri dönüşümsüzdür. AGE oluşumu geçiş metalleriyle katalize edilir ve askorbat gibi indirgeyici bileşiklerle inhibe olur. İleri glikasyon haftalar süren bir süreç olduğu için genellikle uzun ömürlü proteinleri etkiler (Şekil 3)(76). AGE ile modifikasyona aminoasit zincirindeki lizin, histidin, arginin daha hassastır. Proteinlerin glikasyonu non-

enzimatik bir süreç olduğu için ve glikasyon miktarı hiperglisemi derecesine bağlı olduğundan hem hücre içinde hem de hücre dışında oluşabilir (77).



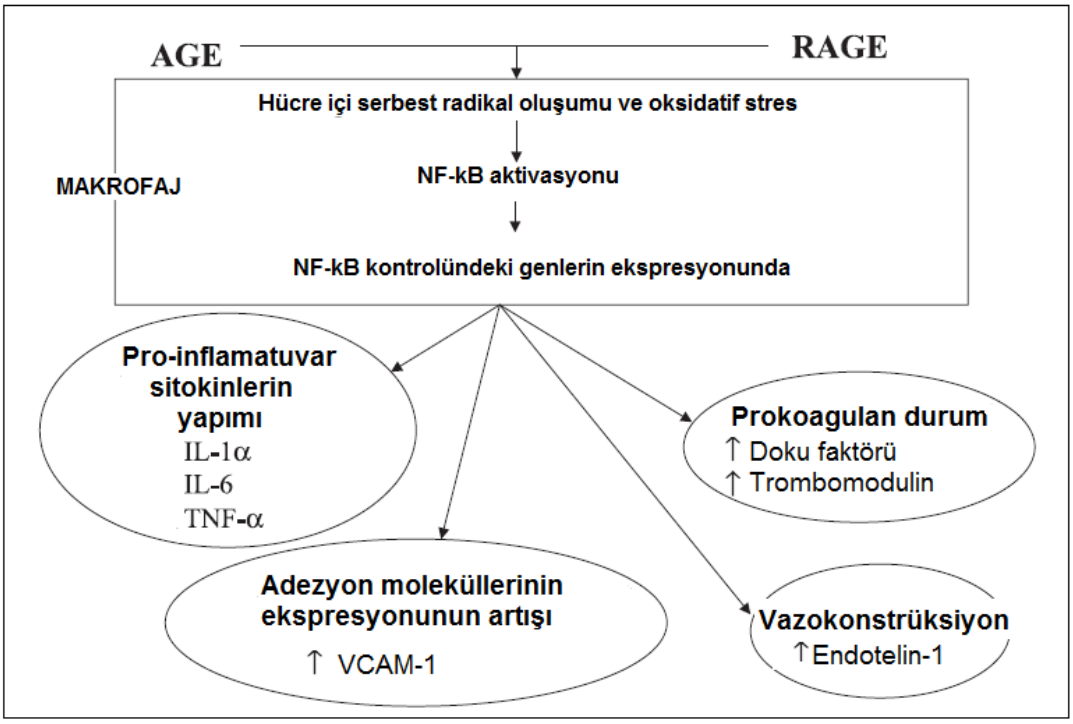
Şekil 3. Proteinlerin glikasyonu ve AGE oluşumu *(Ahmed ve ark. Diabetes Res Clin Pr 2005; 67:3-21'den değiştirilerek alınmıştır)(76).*

AGE'ler kimyasal yapılarına göre 3'e ayrılır;

1. Floresans çapraz bağlı AGE'ler; '*pentosidine'* ve '*crossline'*
2. Non-floresans çapraz bağlı AGE'ler; '*glucosepane*' ve '*MOLD*'
3. Çapraz bağ yapmayan AGE'ler; '*CML*' ve '*Pyrraline*'

AGE'nin bağlandığı başlıca reseptörler şunlardır; RAGE, çöpçü reseptörler (Class A, CD36, class B tip1, LOX-1, FEEL-1, FEEL-2), AGE-R1 (Oligosakkaril transferaz-48), AGE-R2, AGE-R3 (Galektin-3). Bu reseptörlerden en çok çalışılmış olanı RAGE'dir ve IgG süperailesinin bir üyesidir. AGE'ler dışında inflamatuvar sitokinler, amfoterin, amiloid-β ve diğer fibriler proteinler ile uyarılabilir. RAGE ekspresyonu diyabet ve inflamasyonda artar (74). RAGE'nin uyarılması NF-κB'yi aktive eder ve çeşitli inflamatuvar sitokinlerin, adezyon moleküllerinin ve çeşitli mediatörlerin ekspresyonuna sağlar (şekil 4)(78). Çöpçü reseptörler, AGE-R1,

AGE-R2, AGE-R3 reseptörleri de AGE bağlar ancak RAGE gibi sinyal iletisi başlatmaz ve AGE'lerin detoksifikasyon ve klirensini sağlar.



Şekil 4. AGE-RAGE etkileşimi ve NF-κB aktivasyonu sonucu oluşan değişiklikler *(Lapolla ve ark. Clin Biochem 2005; 38:103-115'den değiştirilerek alınmıştır) (78).*

AGE'lerin yıkılmasında primer yıkım mekanizması AGE-reseptör sistemidir. Yıkımdan sonra küçük solubl AGE peptidleri salınır ve daha sonra böbrekle atılırlar.

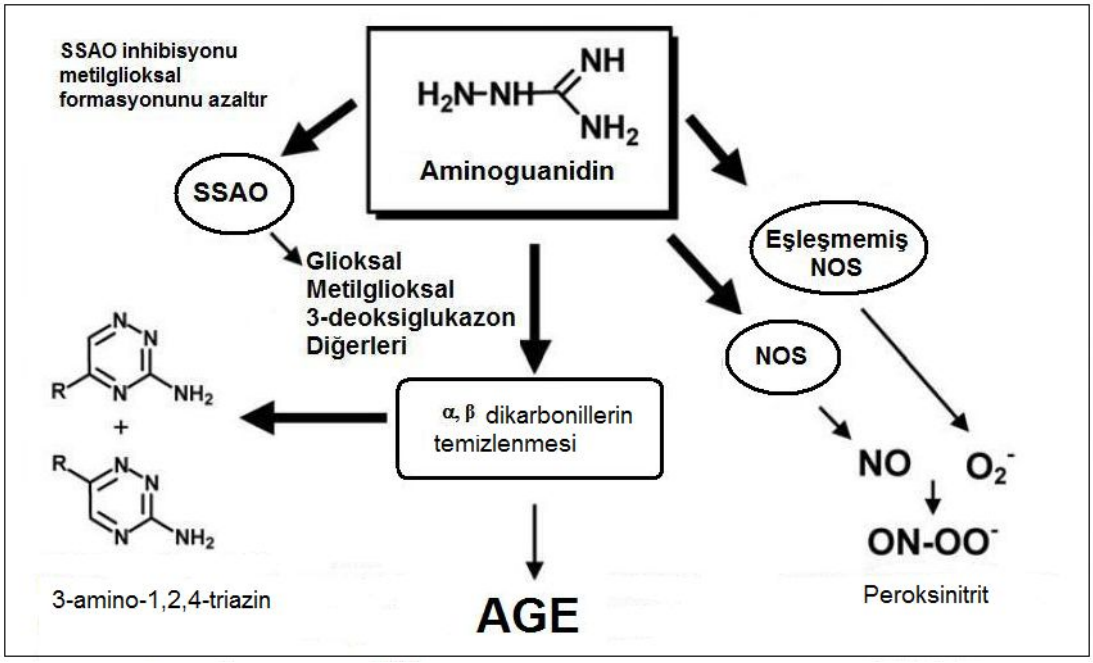
İleri glikasyon inhibisyonunun diyabetik nefropati, retinopati ve nöropati komplikasyonlarını azaltıcı etkileri saptanmıştır (79). AGE tedavi yaklaşımları tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. AGE tedavi yaklaşımları *(Bohlender ve ark. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 289: F645-F659 değiştirilerek alınmıştır)(80).*

SINIF	BİLEŞİK	ETKİ MEKANİZMASI
AGE formasyonunu inhibe edenler	Aminoguanidin (Pimagedin)	α, β dikarbonil bileşikleri gibi glukozdan türeyen ara ürünlerle reaksiyona girerek
	Pridoksamin (Pridorin)	Post-amadori reaksiyon inhibisyonu, metal iyonlarının şelasyonu, süperoksit radikallerinin inhibe edilmesi ve karbonil tuzaklama yaparak
	OPB-9195	Karbonil tuzaklama yaparak
	ALT-946	Protein çapraz bağlanmasını inhibe ederek
Çapraz bağ kıranlar	*Alegebrium (ALT-711)*	Glikasyona bağlı oluşan protein çapraz bağlarını yıkarak
	N-Fenasiltiazolyum bromid (PTB)	Glikasyona bağlı protein çapraz bağlarını yıkarak
AGE nötralizasyonu yapanlar	*'Soluble receptor for AGE' (sRAGE)*	Biyolojik etkilerin inhibe ederek
	Lizozim	Biyolojik etkilerin inhibe ederek
Diğerleri	ACE inhibitörleri	İndirekt etkili, oksidatif stresi azaltarak
	Tiyazolidinedionlar	RAGE ekspresyonunu azaltarak
	HMG-CoA redüktaz inhibitörleri	AGE aracılı anjiogenezi azaltarak

Anti-glikasyon ilaçları içerisinde ilk denemeye başlanan bir nükleofilik hidrazin bileşiği olan aminoguanidindir (AG). AGE formasyonunu önlemede ilk kez Brownlee ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (81).

AG, bir hidrazin (-$NHNH_2$) ve bir guanidin grubundan [-NH-C(=NH)] oluşur. AG α, β dikarbonil bileşikleri gibi glukozdan türeyen ara ürünlerle reaksiyona girip 3-amino-1,2,4-triazin oluşturur ve AGE oluşumunu önler (82). Ayrıca yüksek konsantrasyonlarda diğer karbonil bileşiklerle de anlamlı reaksiyonlar oluşturabilir. AG fizyolojik şartlarda piruvat ve glukoz ile de reaksiyona girebilir. AG bunun dışında '*inducible NOS* (iNOS)'un güçlü bir inhibitörüdür. Ayrıca aminoasetonun metilglioksala dönüşümünü katalizleyen '*semicarbazide-sensitive amine oxidase*' (SSAO) enziminin güçlü ve geri-dönüşümsüz inhibitörüdür. AG bunların dışında RAGE yoluyla olan vasküler NADPH oksidaz aktivasyonunu baskılayarak ve eşleşmemiş eNOS'u inhibe ederek süperoksid yapımını azaltır. Böylece ortamda olan NO ile süperoksitin oluşturduğu peroksinitrit miktarı azalır (Şekil 5).



Şekil 5. Aminoguanidinin farmokolojik aktivitesinin şematik özeti *(Thornalley ve ark. Arch Biochem Biophys 2003; 419:31-40'den değiştirilerek alınmıştır) (82).*

2.1.4. Deneysel diyabet oluşturulma yöntemleri

Diyabetin mekanizmasının, etkilerinin, yeni tedavilerin incelenebilmesi için çeşitli diyabet oluşturma yöntemleri bulunmaktadır;

1. Kendiliğinden veya genetik olarak

2. Beslenmeye bağlı,
3. Kimyasal ajanlarla,
4. Cerrahi olarak,
5. Transgenik ve knock-out hayvanlarla diyabet modellenebilmektedir (83).

Tip 1 DM oluşumunda ise en geçerli 3 yöntem ise cerrahi, kimyasal ajanlar ve kendiliğinden Tip 1 DM olan BBDP (BioBreeding rat) ve NOD (Non-Obese Diabetic) farelerdir. Alloksan ve streptozotosin (STZ) kimyasal olarak diyabet oluşturulmasında kullanılan ajanlardır. Diyabet ile ilgili en sık kullanılan modellerden birisi, pankreasın beta hücreleri için toksik bir nitrozamin olan streptozotosin (STZ) ile sıçanlarda oluşturulan diyabettir (6). STZ, pankreas β hücrelerini hasarlayarak hem insüline bağımlı, hem de insülinden bağımsız diyabete neden olmaktadır. Yetişkin sıçanlarda tek doz (40-60 mg/kg) damar içi yolla STZ uygulamasının insüline bağımlı diyabete, yeni doğmuş sıçanlara tek doz periton içi veya damar içi yolla 100 mg/kg STZ uygulamasının ise insülinden bağımsız diyabete neden olduğu bildirilmiştir (84). STZ ile oluşturulan diyabet modelinin STZ'nin pankreas alfa ve delta hücrelerini etkilememesi, rezidüel insülin sekresyonunun hayvanın yaşamını idame ettirmesini sağlaması, ketozis ve mortalitenin daha az olması, uygulamanın kolay ve yöntemin ucuz olması gibi avantajları vardır. Bunun yanında insandaki diyabetden farklı olarak diyabete bağlı ateroskleroz gelişimi, hipertansiyon gelişimi olmamakta ve retinal vasküler proliferasyon gelişimi nadiren olmaktadır (85).

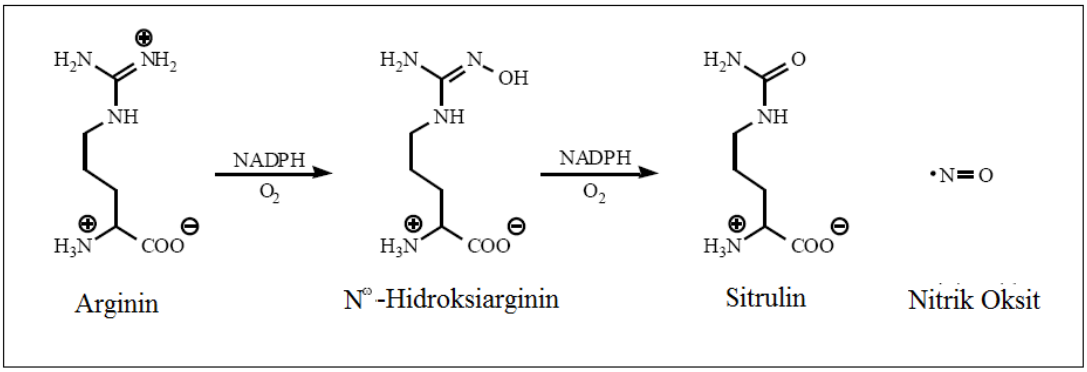
2.2. NİTRİK OKSİT

2.2.1. Nitrik oksitin biyokimyası ve özellikleri

NO, son yörüngesinde eşleşmemiş bir elektronunun olması nedeniyle, diğer moleküller ile kovalan olarak bağlanabilen serbest bir radikaldir (2). Son derece toksik bir gaz olan NO serbest radikal yapısında olmasından dolayı yarı ömrü çok kısadır. Diğer serbest radikallerden farklı olarak, NO düşük konsantrasyonlarda önemli fizyolojik fonksiyonlar yerine getirir. NO, fizyolojik koşullarda stabil anyonik ürünleri olan nitrit ve nitrata okside olmaktadır.

2.2.2. Nitrik oksitin sentezi

Serbest bir radikal olan NO, nitrik oksit sentaz (NOS) denilen enzim ailesi tarafından, bir aminoasit olan L-arginin'in terminal guanidin grubunun NO'e çevrilmesiyle üretilir. Bu dönüşüm sırasında moleküler oksijen ile kofaktör olarak, redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotid (FAD), flavin mononükleotid (FMN) ve tetrahidrobiyopterin (BH4), kalmodulin ve hem'e ihtiyaç vardır (Şekil 6)(86). Sentezlenen NO difüzyonla vasküler düz kas hücresine geçip guanilat siklazı aktive eder ve cGMP oluşumuna yol açar. cGMP artışı kalsiyumun hücreye girişini azaltır ve kalsiyumun hücreden çıkışını artırır, böylece hücre içi kalsiyum konsantrasyonu azalır ve relaksasyon ile vazodilatasyon oluşur (87).



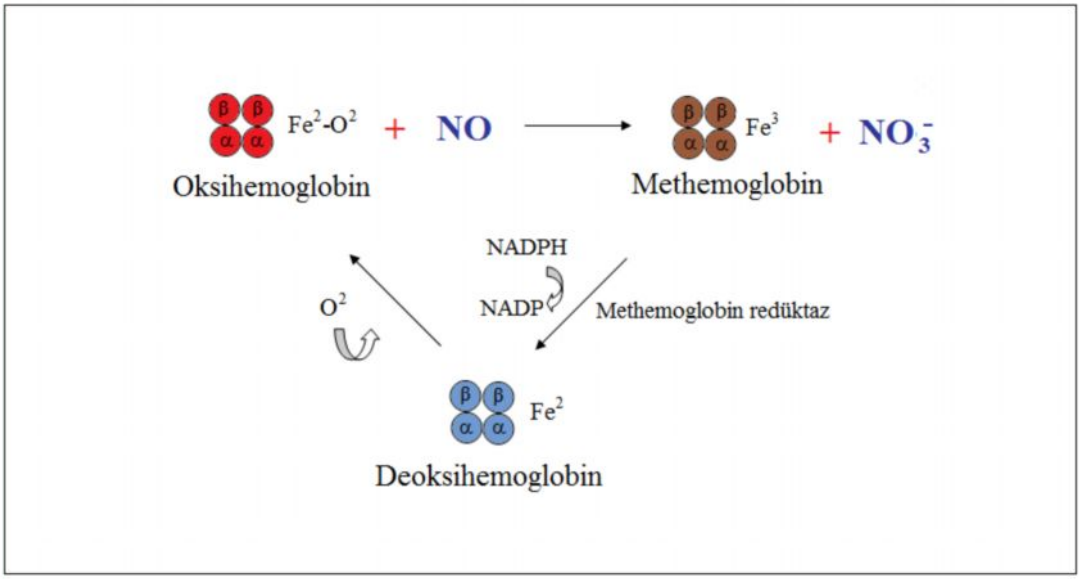
Şekil 6. NO sentezi *(Paige ve ark. Curr Top Med Chem, 2007; 7:97-114'den değiştirilerek alınmıştır) (87).*

2.2.3. Nitrik Oksitin Yıkımı

NOS, aracılığıyla enzimatik olarak sentezlenen NO'in metabolize edilmesi için özel bir enzim yoktur (2). Buna rağmen, NO çok kısa sürede 2 ana mekanizma ile ortamdan uzaklaştırılır.

1. Biyolojik sıvılarda NO hızla okside olur ve nitrit oluşturur. Nitrit ise 1-2 saat içerisinde nitrata dönüşür (88).
2. Normal koşullarda NO düzeylerinin kontrolünde en önemli faktör NO ile oksihemoglobin tepkimesi sonucunda NO'nun nitrata oksidasyonudur. Oksihemoglobin ve NO arasındaki reaksiyonun sonucunda açığa çıkan

methemoglobin ise methemoglobin redüktaz enzimi tarafından NADPH kullanılarak tekrar hemoglobine indirgenir (Şekil 7).



Şekil 7. Nitrik oksitin nitrata dönüşümü

2.2.4. Nitrik oksitin etkileri

NO, çok sayıda düzenleyici fonksiyonlarının yanında, yaşamı tehdit edebilecek ciddi toksik etkilere de sahiptir. NO'nun etkileri tablo 3'de özetlenmiştir (2).

NO'nun yararlı etkilerinin yanında önemli zararlı etkileri de mevcuttur (2). Bunlar kısaca antioksidanların tüketilmesi, bazı enzimlerin inhibisyonu (Akonitaz, katalaz, sitokrom-p450 vb), DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve diğer toksik etkenlere duyarlılığın artırması şeklinde sıralanabilir.

Tablo 3. NO molekülünün etkileri *(Kılınç ve ark. Nitrik Oksit. Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri'nden değiştirilerek alınmıştır)(2).*

Düzenleyici etkiler	Düz kasların gevşemesini sağlamak
	Trombosit agregasyonunun inhibe etmek
	Böbrekte üretilen NO, glomerular filtrasyon hızında (GFR), Na^+ ve H_2O atılmasında rol oynamak
	Endotelyal hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu arttırmak
	Süperoksit radikali ile reaksiyona girip peroksinitrit oluşturarak mikroorganizmaların yok edilmesine yardımcı olmak
Koruyucu etkiler	Oksijen radikalleri olmak üzere radikallerle etkileşerek antioksidan etkiler göstermek
	Monosit kemotaksisinin inhibisyonu, lökositlerin endotelyuma adhezyonunun inhibisyonu gibi anti-inflamatuvar etkiler göstermek
	TNF toksisitesininin azaltmak

2.2.5. Nitrik Oksit Sentaz Enzimleri

Nitrik oksit vertebralılarda NOS yardımıyla L-argininden sentezlenir. Başlıca 3 NOS izoformu bulunmaktadır. Bunlar;

1. NOS I; Nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS)
2. NOS II; İndüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS)
3. NOS III; Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)

NOS enzimlerinin temel özellikleri tablo 4' de özetlenmiştir.

Tablo 4. NOS enzimlerinin temel özellikleri *(Kılınç ve ark. Nitrik Oksit. Biyolojik Fonksiyonları ve Toksik Etkileri'nden değiştirilerek alınmıştır)(2).*

	Kalsiyum bağımlılığı	**Hücrede lokalizasyonu**	**Bulunduğu hücreler**	**NOS aktivasyonu yapanlar**
nNOS	Bağımlı	Sitoplazma>Hücre zarı	Beyin, MSS, PSS, bağırsak, idrar yolları, pankreas β hücreleri, adrenal medulla, üreme organları, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlar	Asetil kolin, bradikinin, Ca-iyonoforları, histamin, lökotrienler, PAF
iNOS	Bağımsız	Sitoplazma>Hücre zarı	Makrofaj, nötrofil, solunum yolu epitel hücresi, fibroblast, mast hücresi, hepatosit, miyokard, endokard, damar endoteli	LPS, γ-IFN, TNF-α, TNF-β, IL-1, IL-2, lipoteikoik asit, pikolinik asit
eNOS	Bağımlı	Sitoplazma<Hücre zarı	Endotel hücresi, miyokard, endokard, mast hücresi, trombosit, vasküler düz kas hücresi, nötrofil	Sıyırıcı stres, serotonin, trombin

Bu enzimlerden eNOS, endotel hücresi, miyokard, endokard, mast hücresi, trombosit, vasküler düz kas hücresi ve nötrofillerde bulunur. eNOS esas olarak yapısal bir enzim olmasına rağmen egzersiz ve stres gibi çeşitli mekanizmaların eNOS genini up-regüle ettiği gösterilmiştir Asetil kolin, sıyırıcı stres, bradikinin, P maddesi, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve β adrenerjik reseptörler gibi bir haberci aracılığıyla Ca^{++} kanalları açılarak hücre içi Ca^{++} düzeyleri yükselir. Ardından Ca^{++}'un kalmoduline bağlanmasıyla oluşan kompleks endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS)'u uyarır ve L-argininden NO sentezi gerçekleşir.

eNOS'un aktivitesini regüle eden diğer bir mekanizma ise protein fosforilasyonudur ve eNOS primer olarak serin rezidüsünden (insanda 1177), daha az olarak ise treonin ve tirozin rezidülerinden fosforile olmaktadır. Bu fosforilasyon, PI3K'ın protein kinaz B (Akt)'yi aktive etmesi ile olur. Akt ile fosforillenen eNOS'un aktivitesi fosforillenmemişe göre 15-20 kat fazladır. Ancak Akt dışında

başka kinazlarında rolünün olabileceği düşünülmektedir (protein kinaz A, AMP ile aktive edilmiş protein kinaz A ve kalmodulin kinaz II gibi)(96).

eNOS, plazma membranında kaveol içinde yerleşmiştir. eNOS'un kaveolar lokalizasyonu enzimin intraluminar hormonlar tarafından akut regülasyonu için büyük önem taşımaktadır. Bu izoformun sitoplazmik veya zarsal lokalizasyonu proteinin yağ asitleri ile kimyasal modifikasyonu tarafından belirlenir. N-miristoilasyon ve palmitoilasyon eNOS'un kaveola'ya hedeflendirilmesi için gerekli modifikasyonlardır. N-miristoilasyon, N-terminal glisine 14 karbonlu yağ asidi olan miristik asidin N-miristoil transferaz enzimi ile geri dönüşümsüz olarak transfer edilmesidir (94). Palmitoilasyon, eNOS'un sistein 15/26 aminoasid noktalarından gerçekleşen geri dönüşümlü posttranslasyonel bir modifikasyon olup, yağ açil tiyoester bağlarının oluşumu ile gerçekleşmektedir (95). Tüm NOS'lar benzer primer aminoasit dizilimine sahip iken yalnızca eNOS miristoilasyon ve palmitoilasyon özelliği gösterir.

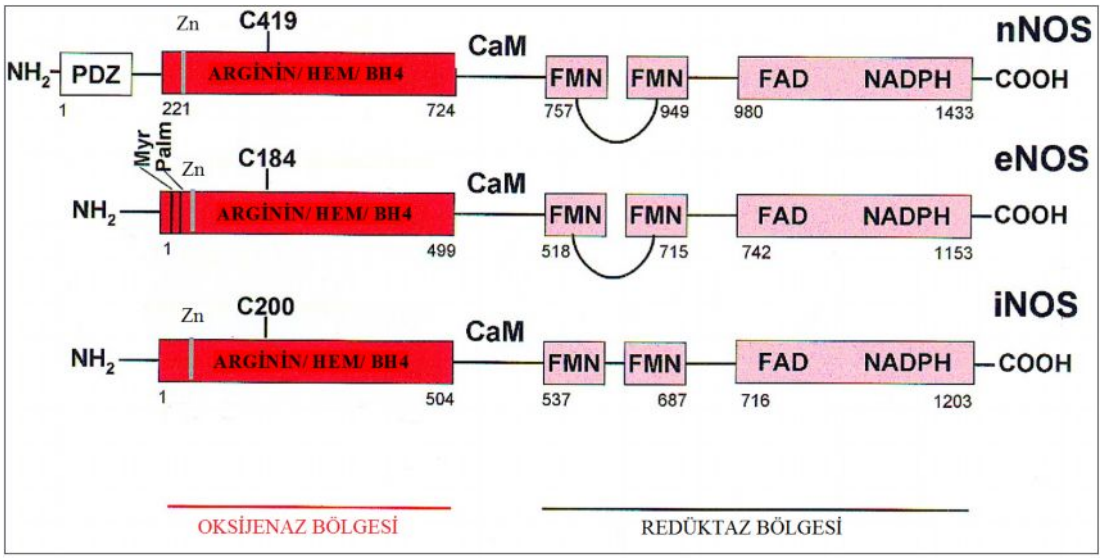
Bu regülasyon mekanizmalarının dışında eNOS enziminin regülasyonu, proteinlerle etkileşimle de kontrol edilmektedir. Örneğin kaveolin-1, eNOS-kalmodulin etkileşmesini bozarak eNOS aktivitesini azaltır. HSP-90 ise istirahat halindeki hücrelerde eNOS ile ilişkili durumdadır ve NO salınımını stimüle eden sıyırıcı stres, VEGF, östrojen gibi uyaranlar ile HSP-90 ile eNOS etkileşiminin ve buna bağlı olarak ise NO sentezinin arttığı gözlenmiştir (97).

nNOS beyin, MSS, PSS, adrenal medülla, pankreas β hücreleri, makula densa hücreleri, iskelet kası, bağırsak, idrar yolları, üreme organları, nonadrenerjik-nonkolinerjik nöronlarda bulunur (2). Asetil kolin, bradikinin, Ca-iyonoforları, histamin, lökotrienler, PAF, gibi faktörler enzimi aktive eder. Glutamat reseptörlerinin inhibisyonu, steroid hormonlar ve östradiol nNOS sentezini artırır. nNOS enzimi aktivitesi de eNOS'a benzer şekilde hücre içi kalsiyum düzeyleri, enzimin hücre zarı veya stoplazmadaki lokalizasyonu ve fosforilasyon düzeyi ile kontrol edilir. nNOS enziminin regulasyonu akut olarak hücre içi kalsiyum düzeyleri kontrol eder.

iNOS enzimi ise makrofaj, nötrofil, solunum yolu epitel hücresi, fibroblast, mast hücresi, hepatosit, miyokard ve endokardda mevcuttur. Diğer yapısal 2 enzimin aksine iNOS enziminin regülasyonu DNA düzeyindedir. İndüklenmemiş hücrelerin

iNOS aktivitesi çok azdır (2). Bu yolda ise bakteriyel ürünler (lipopolisakkaritler gibi) ve sitokinler Ca^{++}'ya bağımlı olmadan iNOS'u indüklerler. Uyarıcılar tarafından transkripsiyonel olarak (mRNA artışıyla) enzim indüklenir ve sonuçta oluşan NO artar. (93).

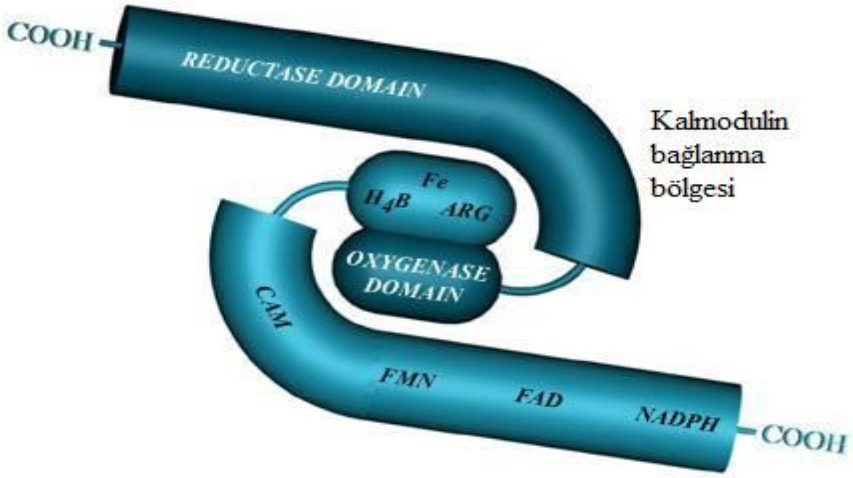
NOS enzimleri 2 farklı bölge içerirler (2). Enzimin N-terminal bölgesi sitokrom P-450 oksidaza yapı ve fonksiyon olarak benzer ve oksijenaz bölgesi olarak adlandırılır. Bu bölge hem-grubu ve substrat (arginin) bağlama bölgelerini içerir. Tetrahidrobiopterin (BH_4) ve oksijen bağlama bölgeleri de bu bölge üzerindedir. Oksijenaz bölgesi altbirimler arası etkileşimi sağladığından, dimerizasyondan da sorumludur. NOS C-terminal bölgesi ise yapı ve fonksiyon olarak sitokrom P-450 redüktaz enzimine benzer ve redüktaz bölgesi olarak adlandırılmıştır. Koenzimlerden NADPH, FAD, FMN bağlama bölgeleri redüktaz bölgesi üzerindedir ve elektron akışından sorumludur. Kalmodulin NOS enzimlerine bu iki bölge arasından bağlanır (Şekil 8) (90).



Şekil 8. NOS izoenzimlerinin yapısı *(Alderton ve ark. Biochem J 2003; 357:593-615'den değiştirilerek alınmıştır((90).*

Kalmodulin bağlanması ile redüktaz ve oksijenaz bölgeleri uygun konformasyonları alarak enzimi aktive eder. Kalmodulinin eNOS ve nNOS'a bağlanması kalsiyum bağımlıdır. iNOS'da ise kalmodulin enzimin bir alt birimi gibi enzime bağlıdır ve bağlanma için kalsiyuma gereksinim yoktur. Her 3 NOS enziminin

aktif formları homodimerdir ve dimer oluşumu (şekil 9) için sadece oksijenaz bölgesi gereklidir (92).



Şekil 9. Nitrik oksit sentazın dimerik yapısı *(Dash ve ark. http://.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash'dan değiştirilerek alınmıştır) (91).*

Nitrik oksit sentezi için ana elektron taşıyıcısı NADPH olup, redüktaz bölgesinin prostetik grubu olan FAD ve FMN'ye elektronları verir. NO sentezi için elektronların redüktaz bölgesinden oksijenaz bölgesi üzerindeki hem grubuna aktarılması gerekmektedir. Bu iki bölge arasındaki elektron akışı ise kalmodulin kenetlenmesi ile kontrol edilir. Enzime kalmodulin bağlı değilse iki bilge arasında elektron akımı oluşmaz. Bu durumda elektronlar hem grubuna değil ortamdaki bir elektron alıcıya (örneğin oksijen, ferrisiyanid, NBT, sitokrom c gibi) aktarılır. Elektron akımını oksijenaz bölgesine iletildiğinde NO sentezlenirken, iletilmediğinde süperoksit yapımı olur. Süperoksitin ne kadar oluşabileceği arginin derişimi tarafından belirlenir.

2.2.6. Diyabetin eNOS üzerine etkileri (Uncoupling NOS)

Diyabette çeşitli mekanizmalarla, başta süperoksit radikali olmak üzere reaktif oksijen türlerinin artışına bağlı belirgin bir oksidatif stres durumu mevcuttur (98). Bu mekanizmalardan biri artan glukoz miktarına bağlı olarak glikolizin yetersiz kalması ile artan Aldoz Redüktaz yolağı NADPH yardımıyla glukozun sorbitole dönüşümünü sağlar. Sonrasında ise sorbitolden fruktoza dönüşüm sırasında da NADH/NAD oranı artar. Bunun dışında hiperglisemiye bağlı olarak elektron transport zincirinde proton gradyanı arttığından elektronların indirgenmiş koenzim

Q'dan kompleks III'e transferi inhibe olur. Arginin yerine elektronlar moleküler oksijene transfer olur ve süperoksit radikali oluşur. Bu mekanizmalar sebebiyle, ortamda oluşmuş olan NO süperoksit radikali ile reaksiyona girer ve peroksinitrit ($OONO^-$) oluşturur. Böylece NO miktarları azalır. Ayrıca oluşan peroksinitrit ise BH_4'ü 7,8-dihidrobiopterine (BH2) çevirir. Böylece ortamdaki BH4 azalmış olur. Bu şekilde ortamdaki NADPH ve BH_4 azaldığından dolayı eNOS arginini substrat olarak kullanamaz NOS enzimi NO yerine süperoksit radikali oluşturur. Bu olaya 'Uncoupling eNOS' denir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Gereçler

Accu-check hasta başı şeker ölçüm cihazı, *Roche Diagnostic* (Almanya)
pH metre (*WTW inoLab,* Almanya)
NO Analizörü *Sievers* 280i, (USA)
Otoanalizör (*Roche Diagnostic Hitachi Modüler P800,* Almanya)
HPLC cihazı (*Thermo Electron Corporation Spectra Model,* USA)
Homojenizatör (*IKA ULTRA TURRAX T25*, Almanya)
Mikroplak okuyucu (*Tecan Infinite M200,* İsviçre)
Su banyosu (*Störk Tronic Assistent 3180* Almanya)
Elektroforez tankı (*Bio-Rad Protean II xi,* USA)
Transfer cihazı (*BioRad Transblot cell,* USA)
Güç kaynağı (*BioRAD PAC 300,* USA)
Karıştırıcı (*IKA Schütter MTS4,* Almanya)
Diğer malzemeler
Steril filtre, Whatman FP 30 0,45 μm (Almanya)
Whatman kağıdı, Whatman 3MM CHR (Almanya)
Nitrosellüloz membran

3.2. Kimyasal Maddeler

Aminoguanidin Bikarbonat (AG) (ICN Biomedicals Ohio, USA)
Streptozotosin (STZ) (Sigma, St. Louis MO, USA)
Çinko sülfat ($ZnSO_4.7H_20$) (MERCK, Almanya)
NaOH (Riedel-de Haen, Almanya)
Tris baz (Applichem, Almanya)
% 37 HCl (MERCK, Almanya)
Leupeptin (Applichem, Almanya)
Aprotinin (Applichem, Almanya)
PMSF (Applichem, Almanya)

Etylenediaminetetraaceticacid disodium salt: Dihydrate (EDTA) (Sigma, USA)
Pepstatin (Applichem, Almanya)
DL-Dithiothreitol (DTT) (Sigma, USA)
Sodyum ortovanadat (Na_3VO_4) (Applichem, Almanya)
Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (MERCK, Almanya)
Bakır sülfat ($CuSO_4.5H_2O$)
Sodyum potasyum tartarat ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) (MERCK, Almanya)
Folin Ciacolteu (Sigma, USA)
Sığır serum albumin FRAKSİYON V, ph 7,0 (BSA) (Applichem, Almanya)
Gliserol (MERCK, Almanya)
Sodum dodesil sülfat (SDS) (Applichem, Almanya)
2-Merkaptoetanol (MERCK, Almanya)
Bromfenol mavisi (MERCK, Almanya)
Amonyum persülfat (APS) (Applichem, Almanya)
Tetrametilendiamid (TEMED) (Applichem, Almanya)
% 40 Akrilamid solusyonu (Applichem, Almanya)
Glisin (Applichem, Almanya)
1-butanol (MERCK, Almanya)
Metanol ultra saf (MERCK, Almanya)
Coomassie Brillant Blue R-250 (MERCK, Almanya)
% 100 Asetik asit (Applichem, Almanya)
Ponceau S (Applichem, Almanya)
Tween 20 (Applichem, Almanya)

3.3. Yöntemler

Çalışmaya 32 adet, 10 haftalık erkek Sprague-Dawley sıçan alındı. Sıçanlar her grupta 8 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve % 20 protein içeren standart sıçan yemi ile beslendi. Tüm grupların içme suyu şişeleri günlük olarak değiştirildi. İki gruba 65 mg/kg pH 4.5 sodyum sitrat tamponu içinde çözünmüş STZ (Sigma, St. Louis MO, USA) tek doz, intraperitoneal olarak enjekte edilerek diyabet oluşturuldu (99) Bir hafta sonra kuyruk veninden alınan kan örneğinde kan glukoz düzeyi 200 mg/dL veya üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi.

On diyabetik sıçan tedavi olmayan diyabet grubu olarak ilaçsız takip edildi (DM grubu). Diyabet oluşturulmuş sıçanların 9 tanesine içme suyuyla 1 g/L/gün AG (ICN Biomedicals Ohio, USA) verildi (DM+AG grubu)(5). Sağlıklı 13 sıçana ise yalnızca içme suyu ile 1g/L/gün AG verildi (SK+AG). Dokuz sağlıklı sıçan ise sağlıklı kontrol olarak ilaçsız takip edildi (SK)(Tablo 5).

Tablo 5. Grupların özellikleri

GRUP	ÖZELLİK
GRUP SK (n= 8)	SAĞLIKLI KONTROL
GRUP SK+AG (n=8)	SAĞLIKLI + AMİNOGUANİDİN
GRUP DM (n=8)	DİABETES MELLİTUS
GRUP DM+AG (n=8)	DİABETES MELLİTUS + AMİNOGUANİDİN

Çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi hayvan laboratuvarında gerçekleştirildi. Deneyler uluslararası laboratuvar hayvanları kurallarına uygun olarak yapıldı. Çalışma Marmara Üniversitesi hayvan etik kurulu tarafından onaylandı (07.05.2007- 25.2006.mar).

Diyabet oluşmasından 12 hafta sonra sıçanlar eter anestezisi altında kanatılıp feda edilerek kan, kalp, böbrek doku örnekleri alındı. Kan örnekleri 4 dk 4000 x g'de santrifüj edildi. Serum örneklerinden glukoz, NO düzeyleri, EDTA'lı kan örneklerinden ise HbA_{1c} düzeyleri çalışıldı. Doku örnekleri ise alındıktan hemen sonra bozulmamaları için sıvı nitrojene kondu ve -80^{o}C'da saklandı.

3.3.1. Glukoz ölçümü

Kan glukoz düzeyleri, glukozun glukoz oksidaz ve peroksidaz enzimleri ile tepkimeye girmesiyle ortaya çıkan kırmızı renk yoğunluğunun spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tesbit edildi (Roche Diagnostic, Modüler P800, Almanya)(100).

3.3.2. HbA_{1c} ölçümü

HbA_{1c} düzeyleri ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemiyle çalışıldı. Analizler Spectra model HPLC cihazı (Thermo Electron Corporation, ABD) ve UV 1000 Dedektörü ile yapıldı. Mobil faz olarak ClinRep

Complete Kit (RECIPE, Almanya) kullanıldı ve ölçümler 20 µL numune ile 23°C kolon sıcaklığında, 415 nm'de yapıldı (101).

3.3.3. NO ölçümü

Nitrik oksit ölçümündeki zorluklardan dolayı miktarını belirlemek için metabolitleri olan nitrit ve nitratın beraber ölçümünden yararlanılır (NOx)(102). Biyolojik sıvılarda NO moleküler oksijenle reaksiyona girererek nitrite dönüşür. NO, oksihemoglobin ile reaksiyona girdiği zaman ise nitrat oluşturur.

Nitratın ölçümünde HCl içindeki vanadium (III) kloridin, nitrat ve nitriti nitrik oksite çevirmesinden yararlanılır. Nitrit ölçümlerinde; glasiyel asetik asit içindeki KI (% 1 wt/vol)' nın nitriti NO'e çevirmesinden yararlanılır.

$2NO^-_3 + 3\ V^{+3} + 2H_2O_2 \rightarrow \quad NO + 3VO_3^- + 4H^+$

$I^- + NO^-_2 + 2H^+ \rightarrow NO + ½\ I_2 + H_2O$

$NO + O_3 \rightarrow NO_2^- + O_2$

$NO_2^- \rightarrow NO_2 +$ ışık (>600 nm)

Serum örneklerinden proteinlerin uzaklaştırılması için 200 µL seruma 400 µL 0.5 N NaOH ve 400 µL % 10'luk $ZnSO_4$ eklendi. 15 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 15,000 x g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatandan 5 µL alınıp cihaza enjekte edildi. Cihaz içinde kapalı ortamda vanadium (III) kloridin, nitratı nitrik oksite çevirmesiyle oluşan NO, Ozon ile tepkimeye girerek uyarılmış durumdaki nitrojen dioksit (NO_2)'e dönüşdü. Uyarılmış NO_2'nin normal formuna dönerken yaydığı foton ise, kemilüminesans yöntemiyle ölçüldü (NO Analizörü *Sievers* 280i, USA) (103).

3.3.4. NOS ölçümü

Dokular, % 50 w/v oranında, 5 µg/mL leupeptin, 5 µg/mL aprotinin, 0.1 mM/L PMSF, 1 mM/L EDTA, 1 µM/L pepstatin, 1 mM/L DTT, 1 mM/L Na_3VO_4 içeren 20 mM Tris-HCl pH 7.4 içerisinde 20500 rpm'de homojenize edildi (IKA, Ultra Turrax T25, Almanya)(104). Homojenatlar, 4ºC'da 20 dakika süre ile 10000 x g santrifüj edildi ve supernatan NOS izoformlarının ayrıştırılması için kullanıldı.

Doku homojenatlarının protein içerikleri Lowry yöntemi ile belirlendi (105). 15 µL homojenat, 300 µL Lowry solusyonu (0.1 N NaOH içerisindeki % 2 Na_2CO_3 ile % 2 Na-K Tartarat ve % 1 $CuSO_4.5H_2O$ sırasıyla 50:0.5:0.5 oranında karıştırılır) ile oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve üzerine 30 µL 1:1 oranında sulandırılmış Folin Ciacolteu reaktifi eklendi. Oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra karışımların absorbansları 750 nm. de ölçüldü ve protein konsantrasyonları µg/mL olarak belirlendi.

Kalp dokuları için 70 µg, böbrek dokuları için ise 100 µg protein içeren homojenatlar 62.5 mM Tris-HCl, % 10 gliserol, % 2 SDS, % 5 2-β-merkaptoetanol, % 0.1 bromfenol mavisi içeren jel yükleme tamponu ile 40 µL'ye tamamlandı ve 95ºC'de 4 dakika ısıtılarak denatüre edildi (106).

Sonrasında ise % 4 yükleme (0.125 M Tris-HCl, % 4 (w/v) Akrilamid, % 0,1 (w/v) SDS, % 0,05 (w/v) APS ve % 0,1 (w/v) TEMED eklenerek pH 6.8'de hazırlandı) ve % 7,5 ayırma (0.375 M Tris-HCl, % 7,5 (w/v) Akrilamid, % 0.1 (w/v) SDS, % 0.05 (w/v) APS, % 0.05 (w/v) TEMED eklenerek pH 8.8'de hazırlandı) jeline yüklendi. 2 L, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin, 3.5 mM SDS içeren elektroforez yürütme tamponu içinde yükleme jelinde 16 mA akım altında 2 saat, ayırma jelinde 24 mA akım altında 2 saat sürede proteinler ayrıştırıldı (Bio-Rad Protean II elektroforez tankı).

Pozitif kontrol olarak Rat Brain Extract (Santa Cruz Biotechnology, katalog no: sc-2392), protein molekül ağırlığı belirleyicisi olarak Protein Marker III(6,5-200) (Applichem, katalog no: A4402) kullanıldı.

Ayrıştırılan proteinler, immunoblotting ile 4ºC'da 40 volt sabit akımda, 25 mM Tris-baz, 192 mM glisin ve % 20 v/v metanol içeren, pH 8.3'lük transfer tamponunda gece boyu 0.2 µm kalınlıktaki nitroselluloz membrana aktarıldı (BioRad Transblot cell, katalog no: 162-0112)(107). Transferin etkin olup olmadığı membranın Ponceau S (1 g/L Ponceau S, % 1 asetik asit solusyonu içinde), elektroforezin görüntülemesi ise jelin Coomassie-R250 (1 g/L Coomassie Brillant Blue R-250, % 45 v/v metanol ile % 10 v/v asetik asit içeren solusyonda) ile boyanması ile kontrol edildi.

Transfer sonrası membran 2 kez 5'er dakika PBST (% 0.1 v/v Tween-20, 10 mM NaH_2PO_4, 10 mM Na_2HPO_4, 150 mM NaCl içeren PBS solusyonunu, pH 7.4)

solusyonu ile yıkandı (108). Membrandaki bağlanmamış yerler % 5 BSA-PBST ile 1 saat bloke edildikten sonra membran % 3 BSA-PBST ile 1/1000 sulandırılmış, eNOS izoenzimine karşı tavşanlardan elde edilen spesifik primer antikor (Santa Cruz Biotechnology, katalog no: sc-654) ve housekeeping protein olarak da 'Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase' (GAPDH)'a karşı tavşanlardan elde edilen spesifik primer antikor (Santa Cruz Biotechnology, katalog no: sc-25778) ile 4ºC'da bütün gece inkübe edildi. Bağlanmamış antikorların PBST ile yıkanmasından sonra membran, 1/3000 oranında sulandırılmış tavşanlara karşı geliştirilmiş amplifiye horseradish peroksidaz (HRP) işaretli keçi sekonder antikoru (BioRad, katalog no: 170-8239) ile 1 saat inkübe edildi ve yıkandıktan sonra ortama 4-Kloro-1-naftol (Opti-4CN) substratı eklenerek bantlar görünür hale getirildi ve bant yoğunlukları Vilber Lourmat Görüntüleme cihazı (Almanya) kullanılarak TIFF formatında saklandı. Tüm görüntülerdeki bantların piksel yoğunluğu 'Image Programı' ile eşit büyüklükte alanlarda sayıldı (109).

3.3.5. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için Windows uyumlu GraphPad InStat Version 3.05 programı kullanıldı. Çalışma grupların verilerinin istatistiksel karşılaştırılmasında non-parametrik bir test olan Mann Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arası farklar % 95 güven aralığında, $p<0.05$ düzeyinde anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

Bütün grupların kan örneklerinden glukoz, HbA_{1c} ve NOx düzeyleri çalışıldı, kas ve böbrek dokusu homojentalarındaki eNOS ekspresyonu belirlendi.

SK, SK+AG, DM, DM+AG gruplarında kan glukoz düzeyleri sırası ile 175±8, 158±15, 471±127, 517±227 mg/dL (ortalama ± standart sapma) bulundu. DM grubu glukoz düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştı ($p<0.0001$). DM+AG grubu glukoz düzeylerinde de SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış vardı ($p<0.005$). DM+AG grubu glukoz düzeyleri ise SK+AG grubuna göre anlamlı olarak artmıştı ($p<0.02$). DM ile DM+AG grupları glukoz düzeyleri kıyaslandığında ise anlamlı bir fark yoktu.

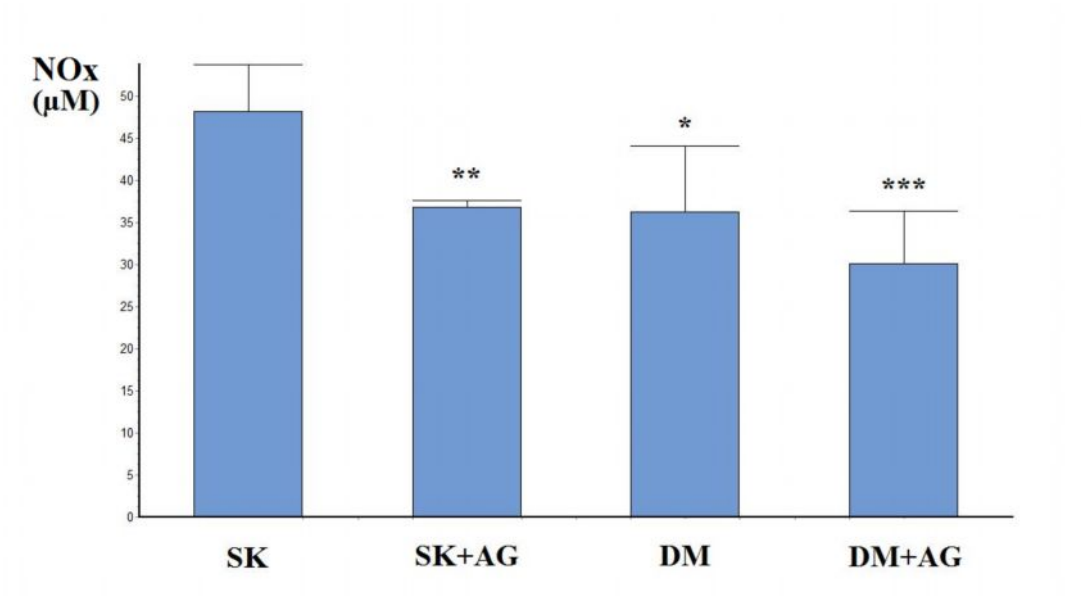
HbA_{1c} düzeyleri SK, SK+AG, DM, DM+AG gruplarında sırası ile % 1.1±0.2, 1.0±0.3, 2.8±0.9, 2.0±0.6 (ortalama±standart sapma) bulundu. DM grubu HbA_{1c} düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmıştı ($p<0.0001$). DM+AG ile DM grubu kıyaslandığında ise HbA_{1c} düzeyleri anlamlı olarak düşüktü ($p<0.04$). DM+AG ile SK+AG grupları kıyaslandığında HbA_{1c} düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($p<0.0001$). SK ile SK+AG grupları arasında ise anlamlı fark yoktu.

Tablo 6: Grupların glukoz ve HbA_{1c} düzeylerinin ortalama, standart sapmaları

	SK	**SK+AG**	**DM**	**DM+AG**
Ortalama glukoz düzeyleri (mg/dL) (ortalama±standart sapma)	175±8	158±15$^{\square}$	471±127*	517±227**
Ortalama HbA_{1c} düzeyleri (%) (ortalama±standart sapma)	1.1±0.2	1.0±0.3$^{\#}$	2.8±0.9*	2.0±0.6***

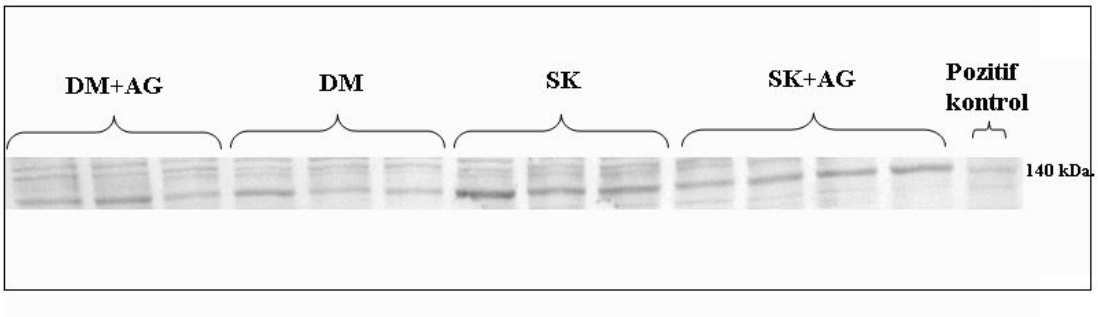
SK ile karşılaştırıldığında * $p<0.0001$, SK ile karşılaştırıldığında ** $p<0.005$, DM+AG ile karşılaştırıldığında $^{\square}$ $p<0.02$, DM+AG ile karşılaştırıldığında *** $p<0.04$, DM+AG ile karşılaştırıldığında $^{\#}$ $p<0.0001$

NOx düzeyleri SK, SK+AG, DM, DM+AG gruplarında sırası ile 48±6, 37±1, 36±8, 30±6 µM (ortalama±standart sapma) bulundu. DM grubu NOx düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.001$). SK ile SK+AG grupları karşılaştırıldığında, SK+AG grubunda NOx düzeyleri anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.0005$). DM ile DM+AG grupları NOx düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark yoktu (Şekil 10).

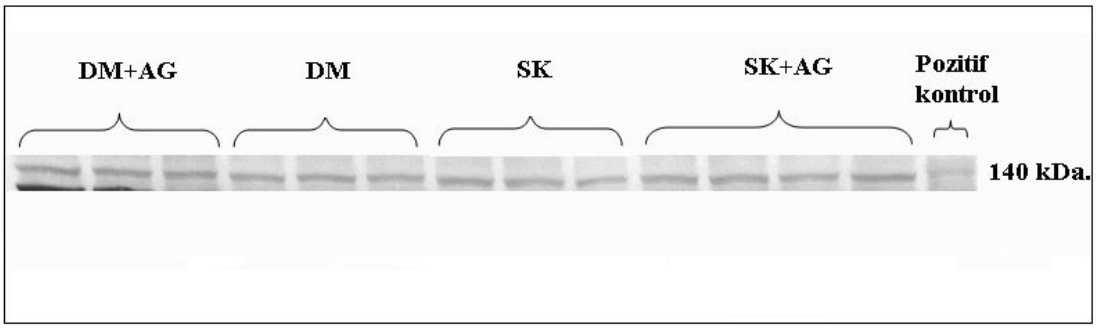


Şekil 10. Grupların NOx düzeylerinin (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.
SK ile karşılaştırıldığında *$p<0.001$, SK ile karşılaştırıldığında ** $p<0.0005$, SK+AG ile karşılaştırıldığında *** $p<0.02$

Her gruptan 8 hayvanın kalp ve böbrek dokularının Western-Blot yöntemiyle eNOS protein ekspresyonları incelendi (Şekil 11 ve şekil 12).



Şekil 11. Grupların kalp dokusu eNOS ekspresyonunun Western-Blot analizi görüntüsü



Şekil 12. Gruplarının böbrek dokusu eNOS ekspresyonunun Western-Blot analizi görüntüsü

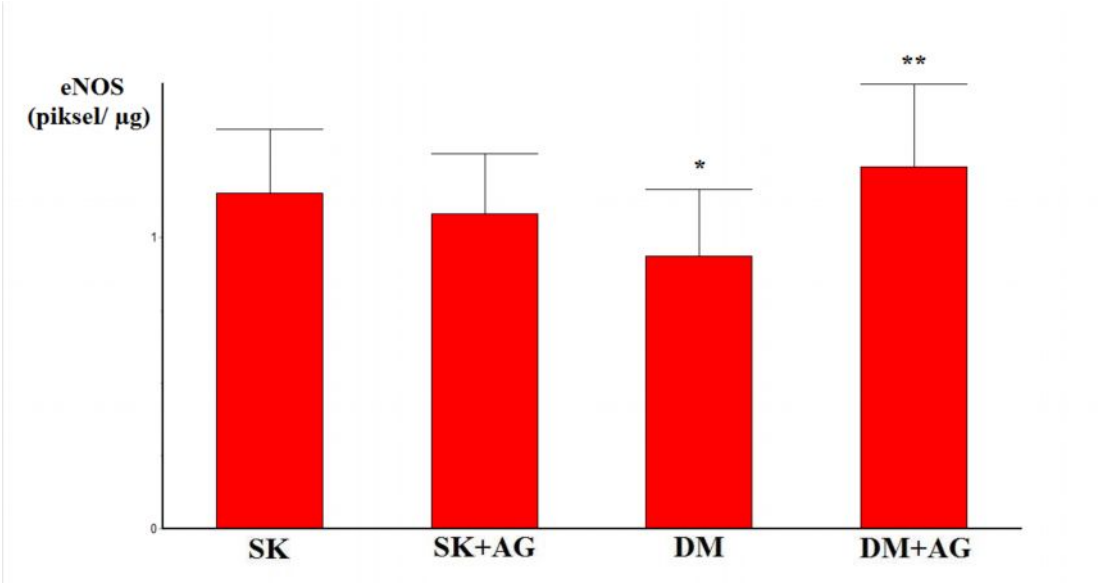
Gruplarda µg protein başına düşen ortalama eNOS piksel yoğunlukları ortalama eNOS piksel yoğunluğunun yüklenen her kuyuya yüklenen protein miktarına bölünmesiyle hesaplandı (Tablo 7). Bu şekilde yapılan kalp dokusu eNOS analizinde ise SK, SK+AG, DM, DM+AG gruplarının eNOS protein bantları piksel yoğunlukları 1.16±0.22, 1.08±0.21, 0.94±0.23, 1.24±0.28 piksel/µg protein olarak (ortalama±standart sapma) bulundu. DM grubu eNOS düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.05$). DM+AG grubu eNOS düzeyleri DM ile kıyaslandığında ise anlamlı olarak yüksekti ($p<0.01$). SK ile SK+AG grupları eNOS düzeyleri kıyaslandığında ise anlamlı bir fark yoktu. SK ile DM+AG grupları eNOS düzeyleri kıyaslandığında da anlamlı bir fark yoktu.

Böbrek dokusunun µg protein başına düşen ortalama eNOS piksel yoğunlukları SK, SK+AG, DM, DM+AG gruplarında sırasıyla 0.82±0.17, 0.73±0.15, 0.81±0,01 0.88±0.14 piksel/ µg protein olarak (ortalama±standart sapma) hesaplandı. Grupların eNOS düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (Şekil 14).

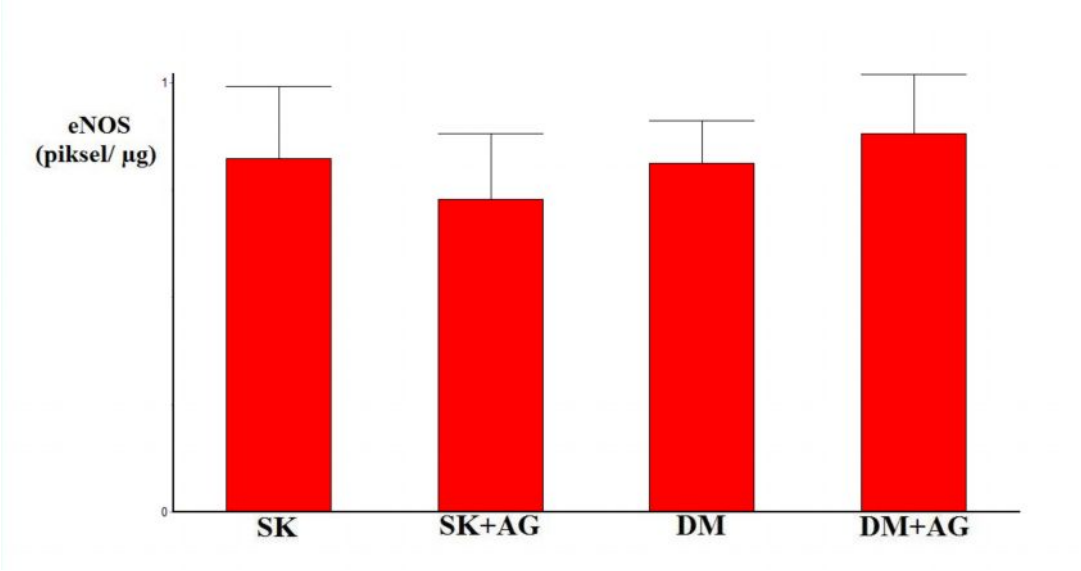
Tablo 7. Grupların kalp ve böbrek dokusunda, µg protein başına düşen ortalama eNOS piksel yoğunlukları

eNOS protein bandı ortalama piksel yoğunluğu (piksel/µg protein)	**SK**	**SK+AG**	**DM**	**DM+AG**
Kalp dokusu	1.16±0.22	1.08±0.21	0.94±0.23*	1.24±0.28**
Böbrek dokusu	0.82±0.17	0.73±0.15	0.81±0,01	0.88±0.14

SK ile karşılaştırıldığında *p<0.05, DM+AG ile karşılaştırıldığında ** p<0.01



Şekil 13. Grupların kalp dokusunda µg protein başına düşen eNOS protein miktarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması. SK ile karşılaştırıldığında *p<0,005, DM ile karşılaştırıldığında ** p<0,01



Şekil 14. Grupların böbrek dokusunda µg protein başına düşen eNOS protein miktarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.

eNOS protein düzeyleri, eNOS değerlerini 'housekeeping protein' olan GAPDH düzeylerine oranlanması ile de hesaplandı. SK grubunun oranı eNOS/GAPDH oranı 1 olarak kabul edildi ve diğer gruplarda görülen NOS ekspresyonu değerleri, SK grubunun katı olarak hesaplandı (Tablo 7).

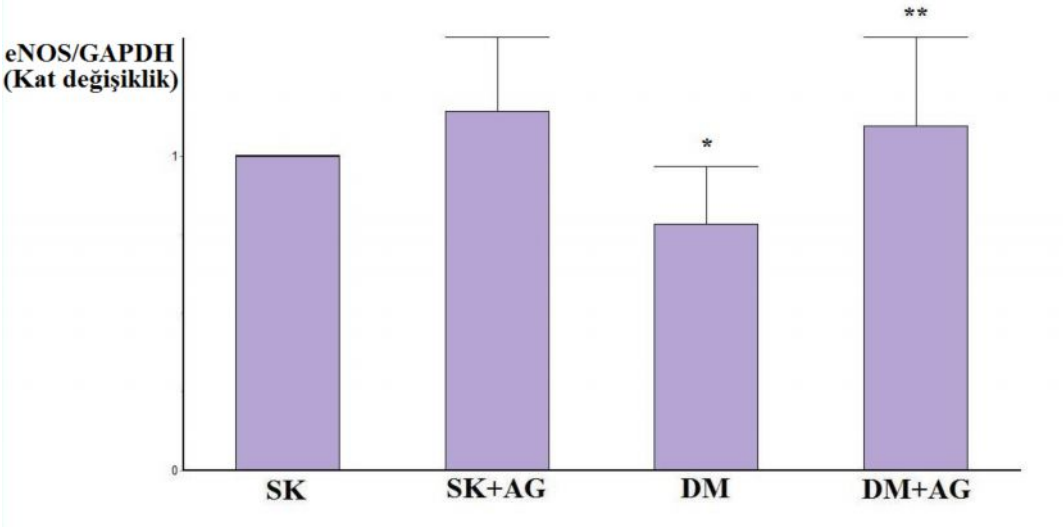
SK grubu kalp dokusunda eNOS/GAPDH oranı 1 kabul edildiği zaman SK+AG, DM, DM+AG gruplarında eNOS/GAPDDH oranları sırası ile; 1.15±0.24, 0.79±0.18, 1.10±0.28 kat değişiklik (ortalama±standart sapma) bulundu. DM grubu eNOS düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.005$). DM+AG grubu eNOS düzeyleri DM grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.01$). SK ile SK+AG grupları ve DM+AG ile SK+AG grupları eNOS düzeyleri kıyaslandığında ise anlamlı bir fark yoktu (Şekil 15).

SK grubu böbrek dokusunda eNOS/GAPDH oranı 1 kabul edildiği zaman SK+AG, DM, DM+AG gruplarında eNOS/GAPDDH oranları sırası ile; 1.26±0.59, 1.04±0.30, 1.04±0.13 kat değişiklik (ortalama±standart sapma) bulundu. Gruplar karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 16).

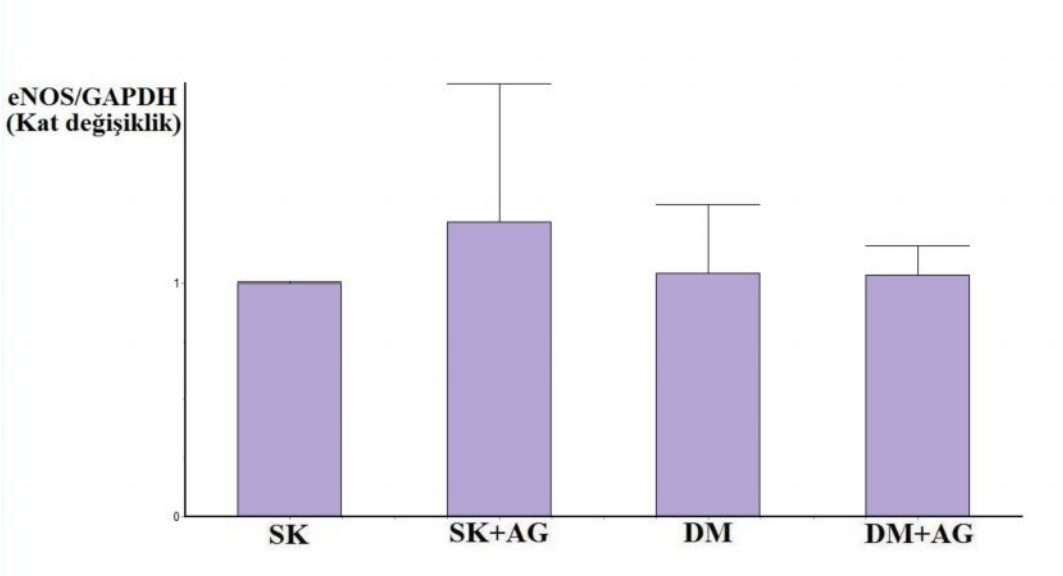
Tablo 8. Grupların kalp ve böbrek dokularındaki ortalama eNOS/GAPDH oranı

ortalama eNOS/GAPDH oranı	SK	SK+AG	DM	DM+AG
Kalp dokusu	1±0	1.15±0.24	0.79±0.18*	1.10±0.28**
Böbrek dokusu	1±0	1.26±0.59	1.04±0.30	1.04±0.13

SK ile karşılaştırıldığında * p<0.005, DM ile karşılaştırıldığında ** p<0.01



Şekil 15. Grupların kalp dokusu ortalama eNOS/GAPDH oranlarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması. SK ile karşılaştırıldığında *p<0.005, DM ile karşılaştırıldığında ** p<0.01



Şekil 16. Grupların böbrek dokusu ortalama eNOS/GAPDH oranlarının (ortalama ± standart sapma) kıyaslanması.

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

İnsanda yapılan çalışmalar diyabette oluşan retinopati, nefropati ve diyabette görülen ateroskleroz gibi vasküler komplikasyonların gelişiminde endotel disfonksiyonunun yakın ilişkili olduğunu ispat etmiştir (110). Diyabette, aldoz redüktaz yolağı, DAG/PKC yolağı, hekzosamin yolağı ve ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşumu gibi değişik mekanizmaların endotel disfonksiyonuna katkıları ile ilgili deneysel bulgular bulunmaktadır (4).

Diyabet tedavisinde kullanılan çeşitli ajanlara rağmen diyabet insidansı yıllarla beraber artmaya devam etmiştir ve yeni tedavilerin bulunması ihtiyacı doğurmuştur. Bu tedavi çalışmalarından birini de bir nükleofilik hidrazin bileşiği olan aminoguanidin oluşturmaktadır.

Bizde çalışmamızda streptozosin ile oluşturulan diyabet modelinde serum nitrik oksit (NO) düzeylerindeki değişiklikleri ve doku nitrik oksit sentaz (NOS) ekspresyonunu incelemeyi ve bir ileri glikasyon son ürünü inhibitörü olan aminoguanidin'in doku NOS izoenzimlerinin ekspresyonu ve serum NO düzeylerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda diyabet modelimizin değerlendirilmesi için kan glukoz, ve HbA_{1c} düzeylerini, AG'nin AGE tedavisindeki etkinliğini görmek için ise kan NO, ve doku eNOS düzeylerini kullandık.

Diyabetik hastaların takibinde kanda açlık ve tokluk kan şekeri, HbA_{1c}, fruktozamin düzeyleri ile 24 saatlik idrarda mikroalbumin düzeylerinden faydalanılmaktadır. HbA_{1c} hemoglobinin β zincirinin N-terminal valin aminoasidinden glikozillenmiş formudur ve AGE oluşumunun erken evresinin bir örneğidir. HbA_{1c}'nin % 50'sinin son bir ayda, % 25'inin iki ay önce, kalan % 25'inin ise son 2-4 ayda oluştuğu gösterilmiştir (110). Kan HbA_{1c} düzeyleri, bize kan şekerinin ortalama eritrosit ömrüne denk gelen son 120 günlük dönemi hakkında bilgi verir. Kan fruktozamin düzeyi ise kanda glikozillenmiş plazma proteinlerinden albumini göstermektedir ve albumin yarı ömrü olan son 20 günlük kan şekeri düzeylerini hakkında bilgi verir. Biz çalışmamızda dokularda AGE oluşmasına yetecek kadar bir süre geçmesini beklediğimizden daha uzun bir dönemi yansıtan kan HbA_{1c} düzeylerini kullanmayı uygun bulduk.

Çalışılan örneklerde DM ve DM+AG gruplarında glukoz düzeyleri anlamlı olarak artmıştı (sırasıyla $p<0.0001$ ve $p<0.005$). DM grubu HbA_{1c} düzeyleri SK grubu ile karşılaştırıldığında, glukoz düzeyleri ile uyumlu olarak anlamlı bir artış göstermekte idi ($p<0,0001$). Bu da bize diyabet modelimizin başarılı olduğunu gösterdi. DM+AG grubu HbA_{1c} düzeyleri DM grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.04$). AG'nin AGE tedavisindeki etki mekanizması glukozdan türeyen dikarbonil bileşikleri ile reaksiyona girerek 3-amino-1,2,4-triazin oluşturması ve AGE oluşumunu önlemesidir. HbA_{1c} gibi erken dönem oluşan Amadori ürünlerine direkt bir etkisi olmasa da, bu düşüş, Thornalley'inde (82) bildirdiği gibi hücre içi AG konsantrasyonunun hemoglobin glikasyonunu yarışmalı olarak inhibisyonu sonucunda oluşmuş olabilir.

SK ile SK+AG grupları HbA_{1c} düzeyleri arasında ise anlamlı fark yoktu. Diyabetik grupta AG tedavisi ile görülen HbA_{1c} düzeylerindeki anlamlı azalmanın SK+AG grubunda gözlenmemesi, bu grupta AGE oluşumunun artmamış olması veya HbA_{1c} düzeylerinin bu farkı oluşturacak kadar yüksek olmaması ile açıklanabilir.

NO, endotel hücrelerinden salınıp, düz kas gevşemesi, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, renal etkiler, immun sistem etkileri, anti-inflamatuvar etkiler, antioksidan etkiler gibi pekçok fonksiyonu olan bir bileşiktir. İnsulin bağımlı diyabet modellerinde NO sentezi ve etkisini inceleyen çalışmalarda NO aracılığı ile gerçekleşen endotel kökenli vazodilatasyonun arttığı, azaldığı veya değişmediğini bildiren çalışmalar bulunmaktadır. Tip 1 DM, Tip 2 DM ve Tip 1 DM'nin hayvan modellerinde NO biyoyararlılığı ve endotel bağımlı relaksasyonun azaldığını Durante (111), Johnstone (112), Williams (113) rapor etmişlerdir. Stalker (114), hiperglisemik şartlar altında, *in vivo* olarak sıçan mezenterik arterlerinde azalmış NO yapıldığını ve azalmış hsp90-eNOS compleks formasyonu gösterdiğini rapor etmiştir. Bizde çalışmamızda NOx düzeylerini DM grubunda SK grubuna göre anlamlı olarak azalmış bulduk ($p<0.001$). DM ile DM+AG grupları NOx düzeyleri arasında ise anlamlı bir fark yoktu. SK+AG grubu NOx düzeyleri SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.0005$). DM+AG grubu NOx düzeyleri de SK+AG grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.02$).

DM grubunda NO düzeylerinde görülen azalma eNOS'daki düşüşün yanısıra, diyabette artan süperoksit radikali ve eNOS'un *uncoupling*'e uğramasına bağlı

olabilir. SK+AG grubunda SK grubuna göre NO miktarlarında görülen azalma ise AG'nin aynı zamanda NOS inhibitörü olmasıyla açıklanabilir. DM+AG grubunda eNOS düzeyleri artmasına rağmen, DM grubuna göre NO düzeylerinin düşük olması ise diyabetik sürecin devamına bağlı süperoksit radikali yüksekliğinin ve eNOS *uncoupling*'inin sürmesiyle açıklanabilir.

Aterosklerozde olduğu gibi diyabetik hayvan modellerinde de eNOS ekspresyonu ve aktivitesi konusunda çelişkili sonuçlar ortaya atılmıştır. Hiperglisemik şartlarda insan aortik endotel hücrelerinin eNOS ekspresyonunun azalmış (115) veya artmış (116) olduğu çalışmalarda gösterilmiştir. Diğer taraftan insan glomerüler endotel hücreleri hiperglisemik şartlarda artmış eNOS ekspresyonu ve azalmış NO formasyonu göstermiştir (117). İlginç olarak, eNOS knockout sıçanlarda yapılan çalışmalar diabetik nefropati patogenezindeki yetersiz eNOS kaynaklı NO yapımını destekler tarzda hızlanmış bir diabetik nefropatiyi göstermiştir (118). Pieper (119) diabetik hayvanların artmış eNOS mRNA ve protein düzeyleri sergilediğini söylerken bazı çalışmalar ise buna zıt olarak azalmış cGMP formasyonunu rapor etmişlerdir (120). Araştırmalarda elde edilen sonuçlardaki bu farklılıklar, diyabetin süresi ve ağırlığı, incelenen doku, damar ve seçilen vazodilatör ajanların farklılığı ile açıklanabilir. Ancak çalışmaların çoğunda, yerleşmiş bir diyabetin oluşması ile dokularda NO'ya bağımlı yanıtlarda bir değişiklik oluştuğu kabul edilmektedir (3).

Biz çalışmamızda kalp dokusunda eNOS protein düzeylerini karşılaştırdığımızda DM grubu eNOS düzeyleri SK grubuna göre anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.005$) ve NO düzeylerinde görülen azalma ile uyumluydu. DM+AG grubu eNOS düzeyleri DM grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak yüksekti ($p<0.01$). SK ile SK+AG grupları eNOS düzeyleri kıyaslandığında ise anlamlı bir fark yoktu. Diyabetik grupta görülen eNOS ekspresyonundaki azalmaya çeşitli mekanizmaların yol açabileceği ileri sürülmektedir. Bunlardan birisi uzun dönem hiperglisemiye bağlı artan ROS ve bunların sebep olduğu AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerindeki artıştır (115). Diğer bir teori ise artan AGE'lere bağlı olarak NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerinin artışının eNOS ekspresyonunu azaltmasıdır (121). Sonuçlarımız, eNOS ekspresyonunun azaldığını gösteren, Srnivasan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ile uyumluydu. Srnivasan ve arkadaşları yaptıkları

çalışmada endotel hücrelerinin kısa dönem (4 saat) glukoza (25 mmol/L) maruziyetin eNOS ekspresyonunun arttırdığını, uzun dönemde (7 gün) maruziyetin ise eNOS ekspresyonunu azalttığını göstermiştir(115). DM grubunda görülen düşüşün DM+AG grubunda AG tedavisi ile artması aynı zamanda aynı artışın SK ile SK+AG grupları kıyaslandığında görülmemesi zaten sağlıklı kontrollerde AGE ile ilgili bir patalojik sürecin olmaması ile açıklanabilir ve bu durum bize AG tedavisinin AGE oluşumunu önlediği sonucunu düşündürdü.

Böbrek dokusunda ise eNOS protein düzeylerinde SK, SK+AG, DM, DM+AG grupları kıyaslandığında anlamlı bir değişiklik görülmedi. Kalp dokusunda gözlemlediğimiz değişikliklerin böbrek dokusunda gözlenmemesi AGE oluşumunun ve yaptığı değişikliklerin doku dağılımlarına göre farklılıklar gösterebileceği sonucunu düşündürdü.

Aminoguanidin ile ilgili yapılan klinik çalışmalar, gastrointestinal semptomlar, karaciğer fonksiyon testlerinde bozukluk, grip benzeri semptomlar, glomerülonefrit insidansında artma ve nadiren vaskülit görülmesi dolayısıyla azaldı. AG ile tedavi edilen diyabetik sıçan modellerinde böbrek tümörlerinin görülmesiyle ise kullanımı tamamen sorgulanmaya başlandı.

Sonuç olarak STZ diyabet modelimizde NOx düzeylerimiz literatür ile uyumlu olarak azalmış tesbit edildi. eNOS düzeyleri konusunda ise değişik çalışmalarda değişik modellerden elde edilen farklı veriler vardı. Biz yaptığımız çalışmada eNOS protein düzeylerimizi kalp dokusunda DM ile azalmış bulurken uygulanan AG tedavisi ile anlamlı bir artış tesbit ettik, ancak aynı değişiklik paternini böbrek dokusu eNOS protein düzeylerinde göremedik. AG'in böbrek ve diğer dokulardaki etkilerinin ve birtakım çalışmalarda görülen yan etkilerinin daha iyi gözlenebilmesi için daha fazla sayıda çalışma yapmak gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Krolewski AS, Kosinski EJ, Warram JH. Magnitude and determinants of coronary artery disease in juvenile-onset, Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. Am J Cardiol 1987; 59:750-755.
2. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit. Palme Yayıncılık 2003.
3. Chatterjee A, Catravas J.D. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. Vasc Pharmacol 2008; 49:134-140
4. Schalwijk CG, Stehouwer CDA. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. Clin Sci 2005; 109:143-159.
5. Yavuz DG, Ersöz HÖ, Tuncel M, Sargon MF, Küçükkaya B, Ahıskalı R, Akalın S. Effects of Aminoguanidine on Glomerular Basement Membrane Thickness and Anionic Charge in a Diabetic Rat Model. Int. Jnl. Experimental Diab Res 2001; 2: 225-232.
6. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg 2007;17(4):231-236.
7. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabet Med 1998 Jul;15(7):535-553.
8. American Diabetes Association; Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus; Diabetes care 2004; 27(1):5-10
9. Alemzadeh R, Wyatt D.T. Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. 17 edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 2004:1947-1972.
10. Morales A.E, She J.X, Schatz D.A. Genetics of Type 1 Diabetes. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (eds). Pedaitric Endocrinology. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins; 2004:403- 410
11. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. Pediatr Clin North Am 2005; 52:1553-1578.

12. Fiallo-Scharer R, Eisenbarth G.S. Patophysiology of İnsulin-Dependent Diabetes. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (eds). PediatricEndocrinology. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins; 2004:411-426.
13. Saka HN, Günöz H, Öcal G, Yordam N, Kurtoğlu S. Pediatrik Endokrinoloji. 1. Baskı. Pediatrik Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları, Ankara: Kalkan Matbaacılık; 2003:415-455.
14. LaPorte RE, Chang Y-F, Matsushima M. Prevalence and incidence of insulin-dependent diabetes. 7 National Institutes of Health; 1995:37-46.
15. EURODIAB ACE Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. Lancet 2000; 11:873-876.
16. Norris A.W, Wolfsdorf J.I. Diabetes Mellitus. In: Brook G.D. C, Clayton P.E, Brown RS, Savage M.O (eds). Clinical Pediatric Endocrinology. 5 edition. Massachussetts (USA): Blackwell Publishing Ltd; 2005:436-491.
17. Morales A.E, She J.X, Schatz D.A. Genetics of Type 1 Diabetes. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A (eds). Pedaitric Endocrinology. 1 edition. Philadelphia (USA): Lippincott Williams and Wilkins; 2004:403-410.
18. Rosenbloom A.l, Silverstein J.H. Diabetes in the Child and Adolescent. In: Lifshitz F (eds). Pediatric Endocrinology. 4 edition. New York (USA): Marcel Decker, 2003:611-651.
19. Hamalainen AM, Knip M. Autoimmunity and familial risk of type 1 diabetes. Curr Diab Rep 2002; 2(4): 347-353.
20. Norris A.W, Wolfsdorf J.I. Diabetes Mellitus. In: Brook GDC, Clayton P.E, Brown RS, Savage M.O (eds). Clinical Pediatric Endocrinology. 5 edition. Massachussetts (USA): Blackwell Publishing Ltd; 2005:436-491.
21. Buzzetti R, Quattrocchi CC, Nistico L. Dissecting the genetics of type 1 diabetes: relevance for familial clustering and differences in incidence. Diabetes Metab Rev 1998; 14:111-128.
22. Anjos SM, Tessier MC, Polychronakos C. Association of the cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 gene with type 1 diabetes: evidence for independent effects of two polymorphisms on the same haplotype block. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:6257-6265.

23. Zheng W, She JX. Genetic association between a lymphoid tyrosine phosphatase (PTPN22) and type 1 diabetes. Diabetes 2005; 54(3):906-908.
24. Guo D, Li M, Zhang Y, et al. A functional variant of SUMO4, a new I kappa B alpha modifier, is associated with type 1 diabetes. Nat Genet 2004; 36(8):837-841
25. Larsson K, Elding-Larsson H, Cederwall E, et al. Genetic and perinatal factors as risk for childhood type 1 diabetes. Diabetes-Metab Res 2004; 20:429-437.
26. Blom L, Nystrom L, Dahlquist G. The Swedish childhood diabetes study. Vaccinations and infections as risk determinants for diabetes in childhood. Diabetologia 1991; 34:176-181.
27. Schatz D, Krischer J, Horne G, et al. Islet cell antibodies predict insulin-dependent diabetes in United States school age children as powerfully as in unaffected relatives. J Clin Invest 1994; 93(6):2403-2407.
28. Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. Pediatr Clin North Am 2005; 52:1553-1578.
29. Helmke K, Otten A, Willems WR, et al. Islet cell antibodies and the development of diabetes mellitus in relation to mumps infection and mumps vaccination. Diabetologia 1986; 29(1):30-33.
30. Honeyman MC, Coulson BS, Stone NL, et al. Association between rotavirus infection and pancreatic islet autoimmunity in children at risk of developing type 1 diabetes. Diabetes 2000; 49(8):1319-1324.
31. Kostraba JN, Cruickshanks KJ, Lawler-Heavner J, et al. Early exposure to cow's milk and solid foods in infancy, genetic predisposition, and risk of IDDM. Diabetes 1993; 42:288-295.
32. Johnston CS, Monte WC. Infant formula ingestion is associated with the development of diabetes in the BB/Wor rat. Life Sci 2000; 66:1501-1507.
33. Pietropaolo M, Castano L, Babu S, et al. Islet cell autoantigen 69 kD (ICA69). Molecular cloning and characterization of a novel diabetes-associated autoantigen. J Clin Invest 1993; 92:359-371.
34. Norris JM, Beaty B, Klingensmith G, et al. Lack of association between early exposure to cow's milk protein and beta-cell autoimmunity. Diabetes

Autoimmunity Study in the Young (DAISY). J Am Med Assoc 1996; 28:609-614.

35. Couper JJ, Steele C, Beresford S, et al. Lack of association between duration of breast-feeding or introduction of cow's milk and development of islet autoimmunity. Diabetes 1999; 48:2145-2149.
36. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. Lancet 2001; 358:1500-1503.
37. Zella JB, McCary LC, DeLuca HF. Oral administration of 1,25-dihydroxyvitamin D3 completely protects NOD mice from insulin-dependent diabetes mellitus. Arch Biochem Biophys 2003; 417:477-480.
38. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. Diabetologia 1999; 42:51-54.
39. Norris JM, Barriga K, Klingensmith G, et al. Timing of initial cereal exposure in infancy and risk of islet autoimmunity. J Am Med Assoc 2003; 290(13):1713-1720.
40. Ziegler AG, Schmid S, Huber D, et al. Early infant feeding and risk of developing type 1 diabetes-associated autoantibodies. J Am Med Assoc 2003; 290(13):1721-1728
41. Pont A, Rubino JM, Bishop D, et al. Diabetes mellitus and neuropathy following Vacor ingestion in man. Arch Intern Med 1979;139(2):185-187.
42. Collins J, Pien FD, Houk JH. Insulin-dependent diabetes mellitus associated with pentamidine. Am J Med Sci 1989; 297:174-175.
43. Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. Diabet Med 2005; 22:359-370.
44. Sperling M.A. Diabetes Mellitus. In: Sperling M.A (eds). Pediatric Endocrinology. 2nd edition. Pennsylvania (USA): Saunders Elseiver Science; 2002:323-66.
45. Abacı A.,Böber E., Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabet. Güncel Pediatri 2007; 5:1-10.
46. Lombardo F, Valenzise M, Wasniewska M, et al. Two-year prospective evaluation of the factors affecting honeymoon frequency and duration in children

with insulin dependent diabetes mellitus: the key-role of age at diagnosis. Diabetes Nutr Metab 2002; 15:246-251.

47. Cooke D.W, Plotnick L.P. Manangment of Type 1 Diabetes Mellitus. In: Pescovitz O.H, Eugster E.A, editors. Pediatric Endocrinology. 1 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004:427-449.
48. Havas S, Donner T. Tight control of type 1 diabetes: recommendations for patients 1. Am Fam Physician 2006; 74:971-978.
49. Beers M.H. Berkow R.: The Merck Manualof Diagnosis and Therapy, 17. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2002.
50. Onat A, Yıldırım B, Ceyhan K, et al. Halkımızda diyabet ve glukoz intoleransı: koroner mortalite ve morbiditeye prospektif etkisi, prevalansında artma Türk Kardiyol Dern Arş V. 2001; 29, Sayı: 5.
51. DeFronzo RA, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, Med Clin N Am 2004; 88:787-835.
52. Vague P, Moulin J-P. The defective glucose sensitivity of the B cell in insulin dependent diabetes. Improvement after twenty hours of normoglycaemia. Metabolism 1982; 31:139-142.
53. Kosaka K, Kuzuya T, Akanuma Y, Hagura R. Increase in insulin response after treatment of overt maturity onset diabetes mellitus is independent of the mode of treatment. Diabetologia 1980; 18:23-28.
54. Rossetti L, Giaccari A, DeFronzo RA. Glucose toxicity. Diabetes Care 1990;13:610-630.
55. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications. Diabetes 1995; 44:863-870.
56. McGarry JD. Banting lecture 2001: Dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Diabetes 2002; 51:7-18,
57. Shimabukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH. Fatty acid induced β cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:2498–2502.
58. Drucker DJ. The glucagon-like peptides. Endocrinology 2001; 142:521-527.

59. Vilsboll T, Krarup T, Deacon CF, Madsbad S, Holst JJ. Reduced postprandial concentrations of intact biologically active glucagon-like peptide 1 in type 2 diabetic patients. Diabetes 2001; 50:609-613.
60. Johnson KH, O'Brien TD, Betysholtz C, Westermark P. Islet amyloid, islet-amyloid polypeptide, and diabetes mellitus. N Engl J Med 1989; 321:513-518
61. Bretherton-Watt D, Gilbey SG, Ghatei MA, Beacham J, Bloom SR. Failure to establish islet amyloid polypeptide (amylin) as a circulating beta cell inhibiting hormone in man. Diabetologia 1990; 33:115-117.
62. Whitehead JP, Clark SF, Urso B, James DE. Signaling through the insulin receptor. Cur Opin Cell Biol 2000; 12:222-228.
63. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 2001; 414:799-806
64. Nolan JJ, Friedenberg G, Henry R, Reichart D, Olefsky JM. Role of human skeletal muscle insulin receptor kinase in the in vivo insulin resistance of noninsulin-dependent diabetes and obesity. J Clin Endocrinol Metab 1994; 78:471-477
65. Freidenberg GR, Reichart D, Olefsky JM, Henry RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. J Clin Invest 1988;82:1398-1406.
66. Folli F, Saad JA, Backer JM, Kahn CR. Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase activity in liver and muscle of animal models of insulin-resistant and insulin-deficient diabetes mellitus. J Clin Invest 1993;92:1787-1794.
67. Hsueh WA, Law RE. Insulin signaling in the arterial wall. Am J Cardiol 1999; 84:21-24.
68. Jiang ZY, Lin YW, Clemont A, Feener EP, Hein KD, Igarashi M, Yamauchi T, White MF, King GL. Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. J Clin Invest 1999; 104:447-457.
69. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus, 2. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2001.
70. Bennett HP, Knowler CW, Definition Diagnosis and Classificationn of Diabetes Mellitus and Glucose Homeostasis. Ed. Kahn C. Ronald, Weir C. Gordon, King

L.George et al; Joslin's Diabetes Mellitus, fourteenth edition, (19):331-339. Lippincott Williams and Wilkins, Boston, USA, 2005.

71. Kobayashi M. Effects of current therapeutic interventions on insulin resistance Diabetes Obes Metab 1999; 1 (Suppl1):32-40
72. Green BD, Flatt PR. Incretin hormone mimetics and analogues in diabetes therapeutics. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2007; 21:497-516.
73. Ahren B, Landin-Olsson M, Jansson PA, Svensson M, Holmes D, Schweizer A. Inhibition of dipeptidyl peptidase-4 reduces glycemia, sustains insulin levels, and reduces glucagon levels in type 2 diabetes. J Clin Endocrinol Metab 2004; 89:2078-2084.
74. Peyroux J, Sternbeg M; Advanced glycation endproducts (AGEs): pharmacological inhibition in diabetes. Pathol Biol 2006; 54:405-419.
75. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA; Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. Circulation 2006;114:597-605
76. Ahmed N; Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. Diabetes Res Clin Pr 2005; 67:3-21.
77. Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth P; AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. Cardiovasc Res 1998; 37:586-600.
78. Lapolla A, Traldi P, Fedele D; Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. Clin Biochem 2005; 38:103-115.
79. Wautier JL, Guillausseau PJ; Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. Diabetes metab 2001; 27:535-542.
80. Bohlender JM, Franke S, Stein G, Wolf G; Advanced glycation end products and the kidney. Am J Physiol Renal Physiol 2005; 289: F645-F659.
81. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. Science 1986; 232:1629-1632.
82. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys 2003; 419:31-40.

83. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview. Indian J Med Res 2007; 125: 451-472
84. Öntürk H, Özbek H. Deneysel diyabet oluşturulması ve kan şeker seviyesinin ölçülmesi. Genel Tıp Derg 2007;17(4):231-236
85. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, Burstow D, Brown L. The Streptozotocın-Diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. Heart, Lung & Circulation 2003; 12:44-50.
86. Aladağ MA, Türköz Y, Özerol İH. Nitrik Oksit ve Nörofizyopatolojik Etkileri. T Klin Tıp Bilimleri 2000; 20:107-111.
87. Paige SJ, Jaffrey SR. Pharmacologic Manipulation of Nitric Oxide Signaling: Targeting NOS Dimerization and Protein-Protein Interactions. Curr Top Med Chem, 2007; 7:97-114.
88. Bryan NS. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? Free Radıcal Bio Med 2006; 41:691–701
89. Raij L, Baylis C. Glomerular actions of nitric oxide. Kidney Int. 1995; 48(1):20-32.
90. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J 2003; 357:593-615.
91. Dash P. Nitric Oxide (http://.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash).
92. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. BBA-Bioenergetics 1999; 1411:217-230.
93. Çekmen MB, Turgut M, Türkoz Y, Aygün AD, Gözükara EM. Nitrik Oksit (NO) ve Nitrik Oksit Sentaz (NOS)'ın Fizyolojik ve Patolojik Özellikleri. T Klin J Pediatr. 2001; 10:226-236.
94. Gordon JI, Duronio RJ, Rudnick DA, Adams SP, Gokel GW. Protein Nmyristoylation. J Biol Chem 1991; 266 (14):8647-8650.
95. Liu J, Garcia-Cardena G, Sessa WC. Biosynthesis and palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase: mutagenesis of palmitoylation sites, cysteines-15 and/or -26, argues against depalmitoylation-induced translocation of the enzyme. Biochemistry. 1995; 34:(38):12333-12340.

96. Fulton D, Gratton JP, McCabe TJ, Fontana J, Fujio Y, Walsh K, Franke TF, Papapetropoulos A, Sessa WC. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. Nature. 1999; 10;399(6736):597-601.
97. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. Nature 1998; 392: (6678):821-824.
98. Bayraktutan U. Free radicals, diabetes and endothelial dysfunction. Diabetes Obes Metab 2002; 4:224-238
99. Perreault M, Dombrowski L, Marette A. Mechanism of impaired nitric oxide synthase activity in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetologia (2000) 43:27-437.
100. Trinder P, Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann clin Biochem. 1969; 6:24-27
101. ClinRep Complete Kit "Hb A1c in Whole Blood. (http://www.recipe.de/index_e.htm)
102. McMurtry MS, Kim DH, Dinh-Xuan T, Archer SL. Measurement of nitric oxide, nitrite and nitrate using a chemiluminescence assay: an update for the year 2000 (http://analusis.edpsciences.org/index.php?option=article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/analusis/abs/2000/06/mcmurtry/mcmurtry.html)
103. Kielbasa W, Fung HL. Nitrite Inhalation in Rats Elevates Tissue NOS III Expression and Alters Tyrosine Nitration and Phosphorylation. Biochem Bioph Res Co 2000; 275:335–342.
104. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R.J. J. Biol. Chem 1951; 193:265-275.
105. Laemmli. UK. Nature, 1970; 227:680
106. Tojo A, Kımoto M, Wılcox CS. Renal expression of constitutive NOS and DDAH: Separate effects of salt intake and angiotensin. Kidney Int 2000; 58:2075–2083
107. Amplified Opti-4CN Detection Kit, Goat-anti-Rabbit 170-8239 Instruction Manual (http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9620.pdf)
108. http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html

109. Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, Van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. Cardiovasc. Res. 1997; 34:55-68

110. Tahara Y, Shima K. Kinetics of HbA_{1c}, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. Diabetes Care 1995; 18:440-447

111. Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. Br. J. Pharmacol. 1988; 94:463-468.

112. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. Circulation. 1993; 88:2510-2516

113. Williams, SB, Cusco, JA, Roddy M.A, Johnstone MT., Creager MA. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J. Am. Coll. Cardiol. 1996; 27:567-574

114. Stalker TJ, Skvarka CB, Scalia R. A novel role for calpains in the endothelial dysfunction of hyperglycemia. Faseb J. 2003; 17:1511-1513.

115. Srinivasan S, Hatley ME, Bolick DT, Palmer LA, Edelstein D, Brownlee M, Hedrick CC. Hyperglycaemia-induced superoxide production decreases eNOS expression via AP-1 activation in aortic endothelial cells. Diabetologia. 2004; 47:1727-1734

116. Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Luscher T.F. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. Circulation 1997;96:25-28.

117. Hoshiyama M, Li B, Yao J, Harada T, Morioka T, Oite T. Effect of high glucose on nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase protein expression in human glomerular endothelial cells. Nephron. Exp. Nephrol 2003; 95: 62-68.

118. Zhao HJ, Wang S, Cheng H, Zhang MZ, Takahashi T, Fogo AB, Breyer M.D, Harris R.C, Endothelial nitric oxide synthase deficiency produces accelerated nephropathy in diabetic mice. J. Am. Soc. Nephrol 2006;17:2664-2669.

119. Pieper GM, Siebeneich W, Moore-Hilton G, Roza AM. Reversal by L-arginine of a dysfunctional arginine/nitric oxide pathway in the endothelium of the genetic diabetic BB rat. Diabetologia 1997; 40:910-915.

120. Lin KY, Ito A, Asagami T, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Tsuji H, Reaven GM, Cooke JP. Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 2002; 106:987-992.

121. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA; Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. Circulation 2006;114:597-605