

T.C.
İstanbul Üniversitesi
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Gülden Burçak

**TİP 2 DİYABETLİ HASTALARDA
PROTEİN GLİKASYONU VE
NEFROPATİLİ HASTALARDA B1
VİTAMİNİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi

Dr. Ebru ÇETİN

İSTANBUL 2008

İTHAF

Dr. Yalçın Ergezer ve Dr. Cem Ataklı'ya...

TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimim süresince her zaman yanımda olan, anlayışlı, sabırlı, titiz çalışma prensiplerini örnek aldığım, öğrencisi olmaktan onur duyduğum değerli Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam Prof. Dr. Gülden Burçak'a ,

Tez çalışmamın her aşamasında bana yardımcı olan, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen, deneyim ve tecrübelerinden çok yarlandığım Doç. Dr. Gülnur Andican'a,

Projemizde incelenen vakaların sağlanmasında ve klinik anlamda desteği ve yakınlığından dolayı Prof. Dr. Volkan Yumuk'a ,

Sevgili çalışma arkadaşım Candan Sohtorik'e

Merkez Laboratuvarındaki çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Murat Bolayırılı'ya ve tüm Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

İlgilerinden dolayı Anabilim Dalımızdaki tüm öğretim üyelerine ve arkadaşlarıma ,

Anabilim Dalı çalışanlarımıza ve

Dostum Ahmet Sukan 'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: T-811/27122005

İÇİNDEKİLER

İTHAF	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
TABLOLAR LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VII
GRAFİKLER LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XIII
ABSTRACT	XIV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. DIABETES MELLITUS	6
2.2. DIABETES MELLITUSUN KOMPLİKASYONLARI	7
2.3. DIABETES MELLITUS TANI KRİTERLERİ	8
2.4. İNSÜLİN VE C-PEPTİD	8
2.5. DİYABETTE KRONİK KOMPLİKASYONLARIN PATOGENEZİ	13
2.6. DİYABETİK NEFROPATİ	15
2.7. DİYABETİK NEFROPATİDE BÖBREĞİN HİSTOPATOLOJİSİ	20
2.8. AGE-DİYABETİK NEFROPATİ İLİŞKİSİ	22
2.9. AGE İNHİBİSYONU	28
2.9.1. B1 Vitamini (Tiyamin)	28
2.9.2. Benfotiyamin (BOM)	33
2.9.3. Vitamin B6	33
2.9.4. Aminoguanidin	35
2.9.5. Fenasil Tiyazol Bromür	37
2.9.6. OPB--9195 (Izopropiliden hidrazon-4-okso-tiyazolidin-5-asetanilidin)	37
2.9.7. Antioksidanlar	38
2.9.8. Antihipertansifler	38
2.9.9. Alagebrium	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. MATERYAL	40

3.2. KİMYASAL MADDELER	40
3.3. GEREÇLER	41
3.4. YÖNTEMLER	43
3.4.1. GLUKOZ ANALİZİ	43
3.4.2. TRİGLİSERİD ANALİZİ	44
3.4.3. TOTAL KOLESTEROL ANALİZİ	45
3.4.4. İNSÜLİN ANALİZİ	46
3.4.5. C-PEPTİD ANALİZİ	48
3.4.6. HEMOGLOBİN A1c ANALİZİ	50
3.4.7. TİYAMİN PİROFOSFAT (TPP) ANALİZİ	51
3.4.8. PİRİDOKSAL-5 -FOSFAT (PLP) VİTAMİNİ ANALİZİ	54
3.4.9. PLAZMA %AGE-PEPTİD ANALİZİ	57
3.4.10. HOMA-IR (Homeostasis model assessment: insulin resistance)	60
3.5. BULGULARIN İSTATİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ	61
4. BULGULAR	62
4.1. KORELASYON BULGULARI	79
5. TARTIŞMA	84
KAYNAKLAR	89
ETİK KURUL KARARI	106

TABLolar LISTESİ

Tablo _4-1: Nefropatili ve nefropatisiz diyabet gruplarının klinik özellikleri	65
Tablo _4-2: Nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri.....	66
Tablo _4-3: Nefropatisiz diyabet grubunda 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında çalışılan parametrelerin değerleri.....	67
Tablo _4-4: B1+B6 verilen nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri.....	68
Tablo _4-5: B6 verilen nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri	69
Tablo _4-6: Nefropatili ve nefropatisiz diyabet gruplarında 5 aylık sürenin başlangıcında ORT $\pm$SD değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları	70
Tablo _4-7: Nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplarda 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında saptanan değerlerin istatistiksel karşılaştırılması	71
Tablo _4-8: B1+B6 ve B6 verilen DN gruplarında ve nefropatisiz grupta 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında saptanan değerlerin ve farkların istatistiksel karşılaştırılması	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Tip 2 diyabet etyolojisi	10
Şekil 2-2: Hiperglisemi ve diyabetik mikroanjiyopati (83)	13
Şekil 2-3: Mezangiyal RAGE'ler	17
Şekil 2-4: Diyabetik nefropatinin doğal seyri (151)	19
Şekil 2-5: Tip 2 diyabette diyabetik nefropati ve kardiyovasküler mortalite (151)	20
Şekil 2-6: Diyabetik nefropati karakteristik lezyonları (31)	21
Şekil 2-7: AGE'lerin degradasyon ve eliminasyonu	23
Şekil 2-8: AGE reseptörleri	24
Şekil 2-9: AGE-RAGE etkileşimi	25
Şekil 2-10: Tiyaminin kofaktör olarak rol oynadığı enzim reaksiyonları (96)	29
Şekil 2-11: Hiperglisemide biyokimyasal disfonksiyonun tiyaminle geri döndürülmesi (11)	30
Şekil 2-12: Benfotiyamin	33
Şekil 2-13: Amadorinler	34
Şekil 2-14: Aminoguanidinin etki mekanizması (100)	37
Şekil 3-1: İnsülin standart grafiği	48
Şekil 3-2: C-peptid standart grafiği	50
Şekil 3-3 TPP kromatogram örneği	54
Şekil 3-4: PLP kromatogram örneği	56
Şekil 3-5: AGE kromatogram örneği	59
Şekil 3-6: AGE standart eğrisi	60

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik _4-1: Grupların plazma AGE (%) düzeyi histogramı	73
Grafik _4-2: Grupların plazma AGE(%) düzeyi histogramı	73
Grafik _4-3: Grupların AGE-peptid (%) düzeyi histogramı B1+ B6	74
Grafik _4-4: Grupların AGE-peptid (%) düzeyi histogramı B6	74
Grafik _4-5: Grupların C-peptid (pmol/mL) düzeyi histogramı	75
Grafik _4-6: Grupların C-peptid (pmol/mL) düzeyi histogramı	75
Grafik _4-7: Grupların PLP (µg/mL) düzeyi histogramı	76
Grafik _4-8: Grupların PLP (µg/mL) düzeyi histogramı	76
Grafik _4-9: Grupların TPP (µg/L) düzeyi histogramı	77
Grafik _4-10: Grupların HbA1c (%) düzeyi histogramı	77
Grafik _4-11: Grupların Triglisericid (mg/dL) histogramı	78
Grafik _4-12: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile C-peptid arasındaki ilişki	81
Grafik _4-13: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde HOMA-IR ile C-peptid arasındaki ilişki	81
Grafik _4-14: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile HOMA-IR arasındaki ilişki	81
Grafik _4-15: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile HOMA-IR arasındaki ilişki	81
Grafik _4-16: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde glukoz ile HOMA-IR arasındaki ilişki	82
Grafik _4-17: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde glukoz ile HOMA-IR arasındaki ilişki	82
Grafik _4-18: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde TPP ile PLP arasındaki ilişki	82
Grafik _4-19: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde TPP ile PLP arasındaki ilişki	82
Grafik _4-20: B1+B6 grubunun önce değerlerinde glukoz ile HbA1c arasındaki ilişki	83
Grafik _4-21: B1+B6 grubunun önce değerlerinde C-peptid ile kolesterol arasındaki ilişki	83
Grafik _4-22: B6 grubunun önce değerlerinde HbA1c ile PLP arasındaki ilişki	83

Grafik _4-23: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde trigliserid ile TPP arasındaki ilişki	83
---	----

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ACE	: anjiyotensin dönüştürücü enzim
ADA	: American Diabetes Association
AGE	: ileri glikasyon son ürünleri
AG	: aminoguanidin
ALE	: ileri lipoksidasyon son ürünleri
bFGF	: bazik fibroblast büyüme faktörü
BOM	: benzoil oksimetil tiyamin
CEL	: N--karboksietillizin
CHE	: kolesterol esteraz
CHOD	: kolesterol oksidaz
CML	: N--karboksimetillizin
DAD	: diode array detector
DAG	: diasil gliserol
DCCT	: The Diabetes Complications Control Trial
DKA	: diyabetik ketoasidoz
DM	: diabetes mellitus
DN	: diyabetik nefropati
ECM	: ekstrasellüler matriks
EDIC	: Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications
EGF	: bağ dokusu büyüme faktörü
EASD	: The European Association Studies of Diabetes
ESRF	: son dönem böbrek yetmezliği
GA3P	: gliseraldehid-3-fosfat
GDM	: gebelik diabetes mellitusu

GFR	: glomerüler filtrasyon hızı
GH	: büyüme hormonu
GK	: gliserol kinaz
GOD	: glukoz oksidaz
GOLD	: glioksal lizin dimer
GSH	: glutatyon
HbA _{1c}	: glike hemoglobin
HDL	: yüksek dansiteli lipoprotein
HOMA-IR	: homeostasis model assessment:insulin resistance
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HSPG	: heparansülfat proteoglikanı
HT	: hipertansiyon
ICAM-I	: hücrelerarası adhezyon molekülü-I
IGF	: insülin benzeri büyüme faktörü
IGT	: bozulmuş glukoz toleransı
IFG	: bozulmuş açlık glukozu
IL-1 _α	: interlökin-1 _α
IL-6	: interlökin-6
LDL	: düşük dansiteli lipoprotein
LPL	: lipoprotein lipaz
MAPK	: mitojen aktive edici protein kinaz
MG	: metilglioksal
MOLD	: metilglioksal lizin dimeri
NAD(P)H	: nikotinamid adenin dinükleotid fosfat redükte form
NF- _κ B	: nüklear faktör _κ B
NO	: nitrik oksit

NOS	: nitrik oksit sentaz
OGTT	: oral glukoz tolerans testi
OPB-9195	: izopropiliden hidrazon-4-okso-tiyazolidin-5-asetanilidin
PDGF	: trombosit türevli büyüme factor
PKC	: proteinkinaz C
PLP	: piridoksal-5'-fosfat
POD	: peroksidaz
PTB	: fenasil tiyazol bromür
RAGE	: AGE reseptörü
RCO	: reaktif karbonil bileşikleri
ROS	: reaktif oksijen türleri
STZ	: streptozotosin
TGF_	: transforming büyüme faktörü _
TNF _	: tümör nekroz faktörü _
TPP	: tiyamin pirofosfat
TRMA	: tiyamine duyarlı megaloblastik anemi
UAE	: üriner albumin ekskresyonu
UAER	: üriner albumin atılım hızı
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
VCAM-I	: vasküler hücre adhezyon molekülü-I
VEGF	: vasküler endotelyal büyüme faktörü
VKİ	: vücut kitle indeksi
vWF	: Von Willebrand faktör

ÖZET

İleri glikasyon sürecinin diabetes mellitusda, komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Bu tez çalışmasında öncelikle diyabetik nefropatide protein glikasyonunda artış olup olmadığı ve son yıllarda ileri glikasyonu önleyici etkileri öne çıkan vitamin B1 ve vitamin B6 türevlerinin glikasyon üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışmada tip 2 diyabetli hastalar (n=57) nefropatisi olan (n=27) ve nefropatisi olmayan (n=30) grup olarak iki gruba ayrıldı. Tüm gruplardan alınan tam kan örneklerinde HbA1c, TPP ve PLP vitamin düzeyleri, plazmada glukoz, trigliserid, kolesterol, C-peptid, insülin, AGE-peptid düzeyleri ölçüldü. HOMA-IR değeri hesaplandı. Nefropatili hastalar B1+B6 verilen (n=15) ve B6 verilen grup (n=12) olarak randomize edildi. Vitaminler 250 mg/gün dozunda, 5 ay süreyle verilerek süre sonunda analizler tekrarlandı. Nefropatili diyabet grubunda plazma AGE-peptid düzeylerinin nefropatisiz diyabet grubuna göre yüksek olduğu (p=0,005) saptandı. Nefropatisiz grupta 5 ay süre sonunda plazma AGE-peptid düzeylerinin arttığı (p=0,042) saptandı. Nefropatili hastalarda B1+B6 ve B6 vitamini kullanımının plazma AGE-peptid düzeylerini etkilemediği görüldü. Sadece B6 vitamini verilen grupta HbA1c düzeylerinin 5 ay süre sonunda düştüğü (p=0,033) görüldü. Her iki vitaminin kullanımının plazma C-peptid düzeylerini artırdığı saptandı.

Bu bulgular, diyabette nefropatili hastalarda nefropatisiz hastalara göre plazma AGE-peptid düzeylerinin daha yüksek olduğunu ve nefropatisiz hastalarda 5 aylık süre sonunda plazma AGE-peptid düzeylerinin arttığı fakat nefropatili olan ve B1+B6 veya B6 vitamin kullananan hastalarda bu düzeyin artmadığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Diyabetik nefropati, AGE-peptid, B1 vitamini, B6 vitamini, C-peptid

ABSTRACT

It is known that advanced glycation process plays an important role in development of chronic complications of diabetes mellitus. In this study, whether protein glycation increases in diabetes mellitus and whether vitamin B1 and vitamin B6 derivatives are effective in inhibition are questioned. Type 2 diabetic patients (n=57) are separated as the group with nephropathy (n=27), and the group without nephropathy (n=30). In each blood sample of two groups, HbA1c, TPP and PLP, glucose, triglyceride, cholesterol, C-peptide, insulin and AGE peptide levels in the plasma are measured. HOMA-IR value is calculated. Patients with nephropathy are randomized into groups given B1+B6 (n=15) or B6 (n=12). Vitamins were given for 5 months, at 250 mg/day and the analyses were repeated at the end of this period. The plasma level of AGE-peptides were higher in group with nephropathy when compared to group without nephropathy ($p=0,005$). In the group without nephropathy, AGE-peptide level displayed an increase in 5 months period. It was observed that the B1+B6 or B6 vitamin usage doesn't affect the AGE-peptide level in diabetic nephropathy patients. For the group given B6 vitamin, a decrease was observed in plasma HbA1c level at the end of 5 months ($p=0,033$). An increase in plasma C-peptide level was observed in diabetic nephropathy patients due to usage of B1+B6 or B6.

These findings show that, the plasma AGE-peptide level is higher for those with nephropathy than those without nephropathy. Despite an increase in plasma AGE-peptide levels in patients without nephropathy during the period of 5 months patients with nephropathy who received either B1+B6 or B6 did not display this increase.

Keywords: Diabetic nephropathy, AGE- peptide, vitamin B1, vitamin B6, C-peptide

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitusun mikrovasküler komplikasyonlarının patogeneğinde ve ilerlemesinde hipergliseminin önemi bilinmektedir. Bugüne kadar yapılan deneysel ve klinik çalışmalar hiperglisemiyle diyabetik komplikasyonlar arasındaki bağlantıyı ortaya koymasına rağmen patogenetik mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır (70,132,164).

Diyabette böbrekte ileri glikasyonu artıran majör etken hiperglisemidir (33,79). Diyabette glukoz dışında lipidler ve amino asitlerden de non-oksidatif ve oksidatif koşullarda oluşan reaktif karbonil bileşikleri proteinlerin serbest amino gruplarına bağlanmakta ve geri dönüşümlü erken glikasyon ürünleri (Amadori ürünü) oluşmaktadır. Aralarında oksidasyonun da yer aldığı bir seri geri dönüşümsüz reaksiyonla ileri glikasyon son ürünleri (AGE) oluşmaktadır. AGE'lerin oluşumları ve reseptörleri ile etkileşimleri sonucunda reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelmektedir. (33). Diabetes mellitusta glomerül bazal membranının ileri glikasyon ile giderek artan modifikasyonu membranın (+) yük yoğunluğunu azaltarak anyonik proteoglikanların bağlanmalarında azalmaya yol açmaktadır (2). Bu şekilde permeabilite özellikleri değişen bazal membrandan (-) yüklü plazma proteinlerinin glomerüler filtrata ve mezangiyuma geçişleri artmaktadır. Ayrıca AGE ile modifiye bazal membrana albümin, lipoproteinler ve IgG gibi serum proteinleri çapraz bağlanarak bazal membranın kalınlaşmasına katkıda bulunmaktadır. Bu durum proteüinürüye ve mezangiyumda protein birikimine yol açmaktadır (2).

AGE ile modifiye ekstrasellüler matriks (ECM) proteinleri özgün reseptörleri aracılığı ile katabolize edilmektedir (81,128). Özgün AGE reseptörleri arasında en iyi karakterize edilmişleri olan RAGE'lerin diyabetli hastaların kan damarlarında ve böbreklerinde diyabeti olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonda bulundukları gösterilmiştir (33).AGE-RAGE etkileşimi enflamasyon ve ROS artışına, sitokinlerin ve adhezyon moleküllerinin salınımına neden olmaktadır (79). Fizyolojik koşullarda dokunun yeniden şekillenmesine hizmet eden bu mekanizma aşırı AGE oluşumu nedeniyle doku hasarına yol açmaktadır. Ayrıca AGE'ler aracılığı ile oluşan aşırı çapraz bağlanma ECM'in enzimatik sindirime direncini artırmakta dokunun yeniden şekillenmesini engellemektedir (33). ECM sentezinin artmasından ve/veya yıkılımının

azalmasından dolayı DN'nin karakteristik bulguları olan bazal membran kalınlaşması, damar geçirgenliğinde artış ve glomerüloskleroz gelişmektedir. AGE'ler ECM'in sentezinin artmasına ve yıkılımının azalmasına katkıda bulunmaktadır (79). Glomerül bazal membran kalınlaşması ve mezangiyal matriksde genişleme görülen erken evrede pentozidin, karboksi metillizin (CML) ve diğer ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) kapiller duvarda ve proksimal tübüler hücrelerde yüksek miktarlarda bulunduğu gösterilmiştir. Nodüler lezyonların görüldüğü ilerlemiş evrede ise nodüllerde iskemik yarımam, arteriyel duvarda ve böbreğin tübüler hücrelerinde AGE'lerin yoğun olarak varlığı gösterilmiştir. Erken glikasyon ürünü olan glike albüminin de AGE'ler gibi bir prosklerotik sitokin olduğu bilinen TGF- β (transforming growth factor β) biyoaktivitesini ve ECM proteinlerinin sentezini artırdığı saptanmıştır (79). Deneysel tip 2 diyabet modelinde plazma glike albümin konsantrasyonunun azaltılması veya özgün antikor kullanımı ile ECM sentezinin, mezangiyal genişlemenin ve proteinürinin azaldığı ve böbrek yetmezliğine gidişin yavaşladığı gösterilmiştir (79). TGF- β , metabolik faktörler (glukoz ve AGE'ler) tarafından uyarıldığı gibi hemodinamik faktörler (AT-II ve ET-1) tarafından da uyarılmaktadır. DN gelişiminde metabolik mekanizmalar kadar hemodinamik mekanizmaların da rol oynaması diğer organlara göre böbreklerin daha ağır şekilde hasarlanmasına neden olmaktadır (70).

Doku makrofajları, karaciğerin sinüzoidal hücreleri ve endotel hücreleri tarafından reseptör aracılı endositoz ile alınan AGE'ler ile modifiye proteinler proteolitik enzimlere karşı dirençli olduklarından tam olarak katabolize edilememektedir (31). Kısmi proteoliz ile serbestleşen düşük molekül ağırlıklı AGE-peptidler (<10-15k Da) ve serbest AGE'ler böbrek glomerüllerinden süzöldükten sonra proksimal tübölüsler tarafından alınmakta ve lizozomal aktivite ile katabolize edilmektedir. Bu fonksiyonu ile böbrek, sistemik dolaşımdan AGE-peptidlerin temizlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Sistemik dolaşımda kalan AGE-peptidler güçlü çapraz bağlanma özellikleri ile LDL ve IgG gibi plazma proteinlerine ve damar duvarı proteinlerine bağlanarak ikinci jenerasyon AGE'leri oluşturmaktadırlar (131).

Dolaşımdan uzaklaştırılmaları kritik önem taşıyan AGE'lerin, böbrek yetersizliğinde klirenslerinin azalması ve protein katabolizmasındaki artış nedeni ile doku proteinlerinden serbestleşmeleri artarken oksidatif ve karbonil stres altında AGE oluşumu da artmaktadır. AGE'lerin özellikle plazma proteinleri, ECM proteinleri ile çapraz bağlanmaları ve reseptör aracılı biyolojik etkilerinden dolayı toksisitelerinden

bahsedilmektedir. AGE'lerin üremi toksinleri olarak tanımlandığı araştırmalar mevcuttur (22,131).

AGE-peptidler, DN'nin ve kardiyovasküler komplikasyonların ilerlemesine katkıda bulunur.

Diyabetik nefropatide temel tedavi yaklaşımları hiperglisemi ve hipertansiyonun kontrol altına alınması olduğu halde bazı olgularda, bu strateji ile nefropatinin ilerlemesi durdurulamamaktadır.

B1 vitamininin AGE oluşumunu inhibe ettiği ve diyabetik nefropatiyi önlediği deney hayvanlarında gösterilmiştir (3). İnsanlarda B1 vitamininin diyabetik nefropati tedavisindeki rolünü araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır. Deneysel diyabet modellerinde plazma tiyamin düzeylerinin azaldığı ve bunun kısmen hiperglisemide artan renal tiyamin klirensine bağlı olduğu açıklanmıştır. Tiyamin ve benfotiyamin verilmesi ile vitaminin plazma düzeylerinin yükseldiği gözlenmiştir (3).

Diyabette hücreye glukoz girişinin insüline bağımlı olmadığı dokularda glukoz konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak glikolizin hızlanması sonucunda gliseraldehid 3-fosfat (GA3P) ve dihidroksiaseton fosfat (DHAP) konsantrasyonları artmaktadır. Diyabet komplikasyonlarının patogenezinde rolü olan ileri glikasyon, protein kinaz C_α aktivasyonu, poliyol yolu ve heksozamin yollarının aktivasyonları, mitokondriyal disfonksiyon ve sonuçta gelişen oksidatif stresin trioz fosfat birikiminin engellenmesi ile önlenebileceği öne sürülmektedir (12).

Transketolaz (pentoz fosfat yolu), piruvat dehidrojenaz ve alfa keto-glutarat dehidrojenaz (trikarboksilli asit döngüsü) enzimlerinin koenzimi olan tiyamin hiperglisemide trioz fosfat birikimini engelleyici farmakolojik özelliklere sahiptir. Tiyamin transketolaz aktivasyonu ile GA3P'nin fruktoz 6-fosfat (F6P) ve riboz 5-fosfata dönüşümünü artırır. Tiyaminin bu etkisi hiperglisemik kültür ortamında eritrositlerde gösterilmiştir (21). Kapiller ve aorta endotel hücreleri hiperglisemik ortamda yüksek doz tiyamin ve S-benzoil tiyamin monofosfat (benfotiyamin) ile inkübe edildiğinde hücre replikasyonundaki gecikme ortadan kalkmış, protein kinaz C ve heksozamin yolu aktivasyonlarında, oksidatif stres ve AGE'lerde azalma gözlenmiştir (121).

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinde de tiyamin ve etkisi ile hücre proliferasyonunda artma ve fluoresans ölçümü ile izlenen AGE oluşumunda azalma

olduğu saptanmıştır (10). Streptozotosin (STZ) ile diyabet indüklenen sıçanlarda yüksek doz tiyamin (4mg/kg) ve benfotiyamin ile tedavinin 24 haftalık süre içinde nefropati gelişimini durdurduğu gösterilmiştir (12).

Diyabette glomerüllerde artan PKC aktivitesini tiyamin ve benfotiyaminin; metilglioksal ve karboksi metil lizin (CML) birikimini ise tiyaminin azalttığı gösterilmiştir. Diyabette böbrek glomerüllerinde %30 oranında azalan transketolaz aktivitesinin, vitamin kullanımı ile düzeltilebildiği belirlenmiştir (12). STZ ile indüklenen ve dislipideminin görüldüğü diyabet modelinde tiyaminin benfotiyamine göre daha yararlı olduğu saptanmıştır.

Avrupa Diyabet Çalışmaları Birliğinin (EASD) Mayıs 2005'te yaptığı toplantıda, diyabetik hastalarda orta derecede tiyamin eksikliği olduğu ve hastalarda diyabetik nefropatinin kontrol altına alınabilmesi için 250-300 mg/gün dozda tiyamin kullanımının yararlı olabileceği öne sürülmüştür (19). İnsanlarda B1 vitamininin diyabetik nefropati tedavisindeki rolünü araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

C-peptidin, fizyolojik konsantrasyonlarda, insülinin bazı etkilerini taklit ettiği öne sürülmektedir (76).

Miyoblastlarda glikojen sentezini PI 3-K aracılığı ile artırdığı gösterilen C-peptidin AGE'lerin eliminasyonu üzerine de insüline benzer şekilde etkili olabileceği düşünülebilir. İnsülinin fosfatidil inositol 3-kinaz (PI 3-K) aracılığı ile AGE ile modifiye proteinlerin reseptör aracılı endositoz ile alınımını artırdığı bilinmektedir (73).

Deneyssel diyabet modellerinde ve tip 1 diyabetik hastalarda nefropatinin erken evresinde C-peptid verilmesi ile glomerüler hiperfiltrasyon, albüminüri ve glomerüler hipertrofide azalma sağlandığı gösterilmiştir (73). Tip 2 diyabetli hastalarda oral glukoz yüklemesine C-peptid yanıt yetersizliğinin albüminüri ile ilişkili olduğu saptanmış fakat normoalbüminürik ve mikroalbüminürik hastaların C-peptid düzeyleri arasında farklılık saptanmamıştır (74).

Nefropatinin saptanması ve izlenmesi için en sık ve en yaygın olarak kullanılan tanı aracı kolay, hızlı ve klinik seyirle olumlu sonuç veren idrarda albümin tayinidir (90).

Mikroalbüminüri (30-300 mg/gün) DN'nin erken döneminde gözlenen bulgudur. DN'nin mikroalbüminüri evresinden ileri evrelere geçişinin uygun tedavi ile yavaşlatılabileceği ve erken evrede saptanan DN prognozunun daha iyi olduğu öne sürülmüştür (48).

Bu tez çalışmasının amacı, diyabetik nefropatide ileri glikasyonun rolünün ve B1 vitamininin ileri glikasyon üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve diyabetik nefropatideki olası etkinliğinin irdelenmesidir. Bu tez projesi yürürlüğe konulduktan sonra, sadece B1 vitamini içeren preparatın (Bevigen) imalattan kaldırılmış olduğu öğrenildi. Bu durumda B1 ve B6'yı birlikte içeren vitamin preparatı (Benol, 250mg tiyamin HCl ve 250mg piridoksin HCl) ve plasebo olarak da B6 vitamin preparatı (B6vigen, 250mg piridoksin HCl) verildi. B6 vitamininin de glikasyonda etkili olabileceği öngörüldüğünden B1 ve B6 vitaminlerinin birlikte kullanımı ile B6 vitamininin tek kullanımının etkileri karşılaştırıldı.

Bu tez çalışmasında ayrıca plazma C-peptid düzeyinde diyabette nefropati varlığına bağlı bir değişim olup olmadığı ve plazma C-peptid ve AGE-peptid düzeyleri arasında ilişki olup olmadığı araştırıldı.

Bu amaçla, çalışma İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Endokrinoloji, Metabolizma ve Diyabet Bilim Dalına müracaat eden insülin kullanmayan, oral antidiyabetik alan tip 2 diyabetli hastalarda (n=57) yürütüldü. Hastalar mikroalbüminüri düzeyinde nefropatisi olan grup (n=27) ve nefropatisi olmayan grup (n=30) olmak üzere iki gruba ayrıldı. Tüm gruplardan alınan heparinize tam kan örneklerinde HbA1c ve TPP / PLP (tiyamin pirofosfat / piridoksal 5-fosfat) vitamin düzeyleri, plazmada glukoz, trigliserid, kolesterol, C-peptid ve insülin düzeyleri ile plazma AGE-peptid düzeyleri ölçüldü. HOMA-IR (Homeostasis Model Assessment:Insulin Resistance) değeri hastaların plazma glukoz ve insülin düzeyleri kullanılarak hesaplandı. Nefropatili hastalar B1+B6 verilen grup (n=15) ve B6 verilen grup (n=12) olarak randomize edildi. Her iki vitamin de 250 mg/gün dozunda 5 ay süreyle verildi. Hastalara B1+B6 vitamini/B6 vitamini verilmesinden sonra aynı parametrelerin analizi tekrarlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus (DM) glukozun yetersiz kullanıldığı ve hipergliseminin olduğu karbonhidrat metabolizması bozukluklarının bir grubudur. İnsülin salgılanmasındaki eksiklik ya da insülin yokluğuna veya dokuların insüline duyarlılığında azalmaya bağlı olarak karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmaları bozulmuştur. Diabetes mellitusa eşlik eden metabolik bozukluk, multipl organ sistemlerinde sekonder patofizyolojik değişimlere neden olur (133).

Diyabetin prevalansı bilinmemektedir. ‘Third National Health and Nutrition Examination Survey’ 1994’de ABD’de 10.2 milyon kişiyi diyabetik olarak tanımlamıştır. ADA (American Diabetes Association) kriterleriyle tanı konmamış diyabetin prevalansı 5.4 milyondur (8,19).

ADA kriterlerine göre diabetes mellitusun sınıflandırılması

Tip 1 diabetes mellitus : Otoimmün, idiyopatik

Tip 2 diabetes mellitus

Diğer spesifik diyabet tipleri :

Gebelik diabetes mellitusu (GDM)

Bozulmuş glukoz toleransı (IGT)

Bozulmuş açlık glukozu (IFG)

Tip 1 Diabetes Mellitus : Diabetes mellitus’lu tüm bireylerin % 5-10’udur. Pankreas adacık _ hücre kaybından dolayı insülin eksikliği vardır ve insülin bağımlıdırlar. Büyük çoğunluğu otoimmündür, bazılarında ise antikorlara rastlanmadığından idiyopatik olarak adlandırılır; hastaların % 75’inde 30 yaşından önce başlar (8).

Tip 2 Diabetes Mellitus : Diabetes mellitus’lu bireylerin % 90’ını oluşturur. Daha önceleri insüline bağımlı olmayan diyabet ya da erişkin diyabeti olarak tanımlanırken, çocuklarda epidemik obezite ve inaktivite artışından dolayı tip 2 diabetes mellitus çok erken yaşlarda ortaya çıkmaya başlamıştır (8).

Tipik olarak 40 yaş üzerindeki bireyleri etkiler. Ketoza eğilimli değildir ve ketonüriyi önlemek için insüline bağımlı değildir. İnsülin konsantrasyonları normal, düşük ya da artmış olabilir ve birçoğunda azalmış insülin etkisi vardır. Tip 2 diabetes mellitus, periferik insülin direnci ile karakterizedir (8).

Diabetes mellitusun diğer spesifik tipleri : Spesifik bir bozukluk nedeniyle hiperglisemisi olan bireylerde görülür. _ hücre fonksiyonunda genetik defektler, insülin etkisinde görülen genetik defektler, endokrin hastalıklar (Cushing, Akromegali) bazı hormon ve ilaçlar (glukokortikoid, tiyazid, _ adrenerjikler), enfeksiyonlar, bazı genetik sendromlar (Down, Klinefelter, Porfiriya) bunlar arasındadır (8).

Gebelik Diabetes Mellitusu (GDM) : Gebelik sırasında başlayan ya da ilk kez gebelikte belirlenen glukoz tolerans bozukluğudur. Daha önce diyabetli olduğu bilinenler bu sınıfa girmez (8).

2.2. DIABETES MELLITUSUN KOMPLİKASYONLARI

- **Akut Komplikasyonlar**

Diyabetik Ketoasidoz (DKA)

Hiperglisemik hiperosmolar nonketotik koma

Hipoglisemi

- **Kronik Komplikasyonlar**

Mikrovasküler : Retinopati, nefropati, nöropati

Makrovasküler : Hipertansiyon, koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar

- **Diğer komplikasyonlar**

Gastrointestinal (gastroparezi, diyare), genitoüriner (seksüel disfonksiyon), dermatolojik komplikasyonlar, enfeksiyonlar, katarakt, glokom (8,149).

2.3. DIABETES MELLITUS TANI KRİTERLERİ

Diabetes Mellitus

- Klasik diyabet semptomları (poliüri, polidipsi, kilo kaybı) varlığı ve rastgele bakılan plazma glukoz konsantrasyonu ≥ 200 mg/dl olması veya
- Açlık plazma glukoz düzeyi ≥ 126 mg/dl olması veya
- Oral glukoz tolerans testinde (OGTT) 2. saatte plazma glukoz konsantrasyonu ≥ 200 mg/dl olması.

Bozulmuş Açlık Glukozu (IFG)

- Açlık plazma glukozu 110-125 mg/dl arasındadır.

Glukoz toleransı azalmıştır, açlık glukoz konsantrasyonu normale diyabetik arasındadır. Diyabet ve kardiyovasküler hastalık riskini artıran bir durumdur.

Bozulmuş glukoz toleransı (IGT)

- 2 saat OGTT plazma glukozu 140-199 mg/dl arasındadır.

Diabetes mellitus tanısı için açlık glukozu gerekenden daha düşük ancak oral glukoz tolerans testi (OGTT) plazma glukoz değerleri normal ile diyabetik arasında gözlenir. Bozulmuş glukoz tolerans testi olan bireylerde belirgin diyabet gelişimi % 1-5 oranında ortaya çıkar fakat olguların büyük kısmı kendiliğinden normale döner. Komplikasyonların gelişmesi nadirdir (49,81).

2.4. İNSÜLİN VE C-PEPTİD

İnsülin pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücreleri tarafından üretilen bir proteindir. Molekül ağırlığı 6000 dalton, iki disülfid köprüsü ile birbirine bağlanmış 51 amino asitten oluşur. Glukozun yağ ve kas dokularına alımını uyarır ve depolanmak üzere glikojen ve yağa çevrilmesini sağlar. Karaciğerde glukoneogenezi inhibe eder, protein sentezini uyarır ve protein parçalanmasını inhibe eder (135,161).

C-peptid 35 amino asit kalıntısından oluşan, proinsülinin insüline enzimatik ayrılması sırasında ortaya çıkan protein fragmanıdır. Genellikle biyolojik aktiviteden yoksun kabul edilir. Bununla birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalarda tip 1 diyabetli hastalarda biyolojik etkileri olduğu bildirilmektedir (73).

C peptidin kısa dönem infüzyonunun, tip 1 diyabetin ortaya çıkışından sonra erken dönemde glomerüler hiperfiltrasyonu azalttığı gösterilmiştir (41,73,76,144). Ayrıca hayvan çalışmalarında C peptid verilmesiyle üriner albümin ekskresyonunda (UAE) azalma görülmüştür (142). Yine C-peptid infüzyonunun mikrosirkülatuvar etkileri olduğu, iskelet kası ve deride kan akışını artırdığı, kapillerleri güçlendirdiği gözlenmiştir (68,73,75). Bu etkilerin C-peptidin endotelial nitrik oksit sentaz üzerine olan uyarıcı etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir (41,73).

Diyabetik nöropatili hastalara kısa dönem C-peptid infüzyonu ile otonom sinir fonksiyonlarında düzelme gözlenmiştir (72,73). C-peptid başta sinir ve böbrek dokusu olmak üzere bazı dokularda $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaz}$ aktivitesini uyarır (68,73). Johansson ve arkadaşlarının tip 1 diyabetli hastalarda yaptıkları bir çalışmada üç ay boyunca C-peptid ve insülin kombine tedavisiyle renal fonksiyonun düzeldiği, UAE'nin azaldığı ve otonom ve sensoryel sinir fonksiyon bozukluğunun iyileştiği saptanmıştır (73).

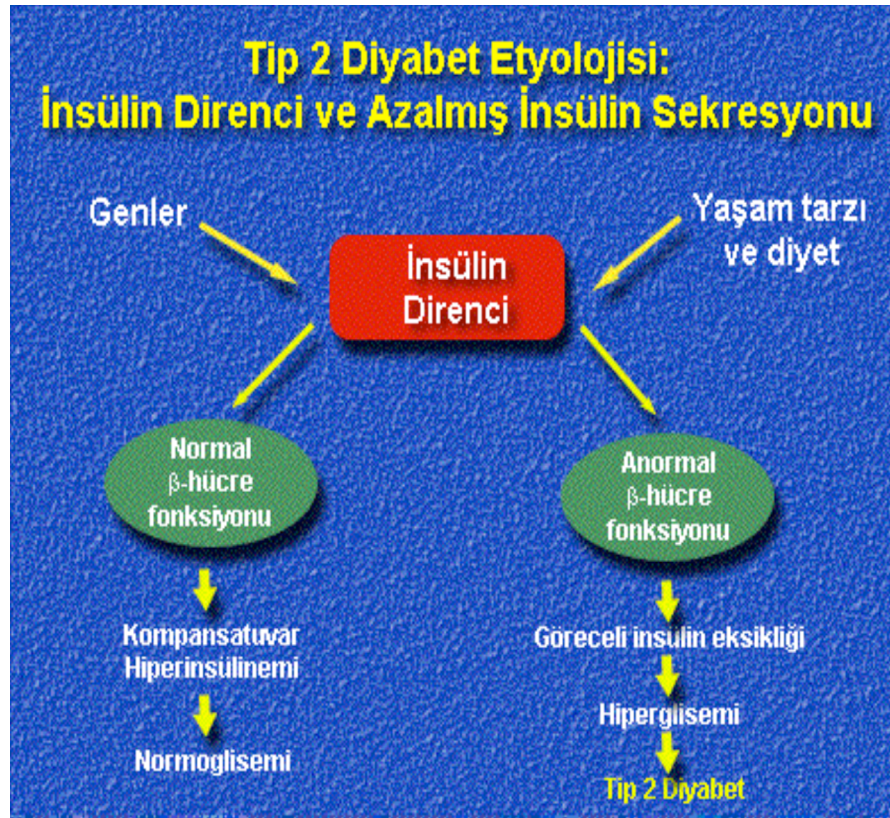
C- peptid pankreasdan insülin salınımı sırasında kan dolaşımına salınır. Böbrekler tarafından dolaşımdan temizlenir ve parçalanarak idrarla atılır (144).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalar insülin konsantrasyonunun ölçümünün diyabetin gelişimini önceden belirlediği ve diyabete yatkınlığın saptanmasında kullanılabileceğini göstermiştir (73). Tip 1 diyabetli bireylerde, plazma insülin konsantrasyonları _ hücre aktivitesinin ölçüsü olarak rezidüel endojen insülinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Bununla birlikte açlık ya da uyarılmış C-peptid ölçümleri bu belirlemeleri yapmak için insülin ölçümünün yerini almıştır. C-peptid ölçümü insüline göre daha avantajlıdır. Hepatik metabolizması olmadığından _ hücre fonksiyonunun insüline göre daha iyi bir göstergesidir. Klinik araştırmalarda bazal ya da uyarılmış C-peptid konsantrasyonları bir bireyin insülin salgılama kapasitesinin göstergesi olarak kullanılabilir (74).

Tip 2 diyabet insülin direnci ile karakterizedir ve adacık hücrelerinin fonksiyonel anormallikleriyle birliktedir. Normal kilolu diyabetik bireylerde, normoglisemik kontrollerle karşılaştırıldığında daha az insülin salgılandığı görülmüştür. Normoglisemik popülasyonda açlık plazma insülin düzeylerinin değişkenliği azalır ve _ hücrelerinin fonksiyonel kapasitesinden çok insülin direnci için daha iyi bir göstergedir. Düşük açlık plazma insülin düzeyleri hiçbir şekilde _ hücre yetersizliğini göstermez tersine yüksek insülin düzeyleri insülin direncinin göstergesidir (161).

İnsülin direnci insüline normalde cevap veren yağ, karaciğer, iskelet kası ve kalp kası gibi hedef dokularda insülin sinyal yolunda yetersizlik olarak tanımlanabilir (42). Hastalarda görülen ortak özellik obezitedir. Obezlerde insülin direnci orta derecededir ve glukoz hassasiyet azalmıştır. Vücut ağırlığından bağımsız olarak abdominal obezite ve insülin direncinin derecesi arasında güçlü ilişki vardır (42).

İnsülin direnci hastalarda doğal olarak gelişebildiği gibi ,insülin tedavisi sırasında anti- insülin antikorlarının artması sonucu da gelişebilir. İnsülin reseptör sayısı azalmıştır ve plazma insülin düzeyi normal veya yüksektir. Günlük insülin gereksinimi 100Ü üzerine çıkmış ise kullanılan insüline karşı direnç söz konusu olabilir (42).



Şekil 2-1: Tip 2 diyabet etyolojisi

Tip 2 diyabette glukoz toleransı bozulmuştur, insülin direnci ve hiperinsülinemi vardır. İnsülin direnci tip 2 diyabet patogenezinde anahtar faktördür ve dislipidemi, hipertansiyon, ateroskleroz gelişimi de bu hastalarda kofaktördür. Tip 2 diyabette obezitedeki artışla birlikte kardiyovasküler risk ve hipertansiyon riski artmıştır.

Tip 2 DM gelişme sürecinde öncelikle ortaya çıkan, dokuların insüline karşı direnç geliştirmesidir. Hiperglisemi daha sonra belirir. Dokuların insüline karşı duyarlılıkları birbirinden farklı olduğundan, insülin direnci başladığında öncelikle kasta glukoz yıkımı azalır ve bu postprandiyal hiperglisemiye yol açar. Bunun arkasından karaciğerden glukoz çıkışı artar. Böylece açlık hiperglisemisi ve tüm gün hiperglisemisi saptanır hale gelir (35).

İnsülin direnci ve yağ dokusunda artış Tip 2 diyabet patogenezinde işbirliği halinde görülmektedir. İnsülin direncinde bir yandan plazma lipoprotein lipaz (LPL) aktivitesi azalır plazma trigliseridleri artarken bir yandan da karaciğerde LPL aktivitesinin artması nedeniyle HDL yıkımı hızlanır. Diğer yandan plazma serbest yağ asidi konsantrasyonu artar. Serbest yağ asitleri hem kas dokusunda glukoz alımını azaltmak hem de karaciğerden glukoz çıkışını artırmak yönünde insülin karşıtı etkiler göstermektedir (141).

Adipöz dokudan salgılanan TNF- α ile yağ kütlesi ve insülin direnci arasında yakın ilişki vardır. Ancak TNF- α 'nın insülin direncini hangi mekanizmalarla uyardığı anlaşılamamıştır (69).

Adiponektin yağ dokusunun salgıladığı bir plazma proteindir. Plazmadan glukoz, trigliseridler ve serbest yağ asitlerinin temizlenmesini kolaylaştırır ve karaciğerde glukoz üretimini baskılar. Ayrıca hasarlı damarların duvarında birikerek aterogenez sürecinde önemli olan inflamatuvar medyatörlerin olumsuz etkilerini engeller. Adiponektin düzeyi obez bireylerde azalmıştır. Adiponektin düzeyinin regülasyonu omental yağ dokusundan yapılmaktadır. Bu da visceral adipozitenin metabolik sendrom ve insülin direnci ile olan bağlantısı ile uyumlu bir mekanizmadır (104).

Resistin son yıllarda keşfedilen, yağ hücrelerinden salgılanan polipeptid yapıda bir hormondur. İn-vivo ve in-vitro uygulanmasıyla insülin direnci oluşur (5,42). Resistin obezite ve tip 2 diyabetle bağlantılıdır. Periferik sinyal molekülü olarak glukoz toleransını ve insülinin hücrelere etkisini bozar, hücrelerin glukoz alımını ve insüline duyarlılığını azaltır, insülin direnci gelişimine neden olur (42).

İnsülin direncini göstermek için pek çok metod geliştirilmiştir. Hiperinsülinemik-öglisemik klemp tekniği altın standart olarak kabul edilir. Ancak bu

teknikğin pahalı ve güç olması nedeniyle HOMA (Homeostasis Model Assessment) metodu geliştirilmiştir (Matthews) (95). Bu testte bazal plazma glukoz ve insülin konsantrasyonları kullanılır. β -hücre yetersizliği ve insülin direncinden ileri gelen homeostatik konsantrasyonları öngörür (95).

Diyabetin patogeneğinde genetik ve çevresel faktörlerin yanı sıra hiperglisemi ve hiperlipidemi de önemlidir; β hücreleri üzerinde toksik etki gösterirler. Glukotoksisite, lipotoksisite ve glukolipotoksisite tip 2 diyabet patogeneğinde rol oynayan sekonder fenomenlerdir (120).

β hücreleri diğer dokularla karşılaştırıldığında çok düşük miktarda antioksidan enzim içerirler. Bu nedenle oksidatif strese karşı daha duyarlıdırlar (58,120).

Glukoz hücreye girdikten sonra trioz fosfatlara dönüşür ve pirüvata metabolize olur. Pirüvat trikarboksilik asit siklusuna girer ve oksidatif fosforilasyona uğrar. Bu süreçte ATP oluşur ve ROS (reaktif oksijen türleri) açığa çıkar (47).

İnsan pankreas adacık hücrelerinde ROS yüksek glukoz konsantrasyonlarında oluşur. ROS oluşumunun insülin miktarını düşürdüğü ve glukoz tarafından uyarılan insülin salınımını inhibe ettiği görülmüştür (120,147). Tip 2 diyabet patogeneğinde proapoptotik mekanizmaların da rol oynadığı bildirilmiştir. Tip 2 diyabetli hastaların pankreatik dokuları kontrol grubu ile karşılaştırılmış, β hücrelerinin replikasyon düzeyleri arasında fark bulunamazken, apoptozun düşük kilolu hastalarda 10 kat, obez vakalarda 3 kat daha fazla artmış olduğu bulunmuştur (117).

Yüksek glukoz konsantrasyonlarında proapoptotik olan Bad, Bid ve Bik genlerinin adacık hücrelerinde aşırı eksprese oldukları saptanmıştır. Antiapoptotik gen Bcl-2 etkilenmezken Bcl-xl azalmış olarak bulunmuştur (117,120). Apoptozla hücre ölümünün artışı diyabetin gelişiminden sorumludur.

Adacık hücreleri üzerinde glukolipotoksisitenin etkisi araştırılmış, yapılan in vitro çalışmalarda adacık hücrelerinin uzun süre yüksek düzeyde yağ asidine maruz kalmalarının, glukoz tarafından insülin salgılanmasının indüklenmesini inhibe ettiği, insülin gen ekspresyonunun azaldığı ve apoptozla hücre ölümünün indüklendiği görülmüştür.

In vitro ve in vivo çalışmalarda lipotoksisitenin yalnızca yüksek glukoz düzeyleri varlığında bu etkileri gösterdiği sonucuna varılmıştır (117,120,140).

Normoglisemik bireylerde kilo alma sürecinde insülin direncine karşı _ hücre kütlesi, insülin biyosentezi ve insülin sekresyonu artar. _ hücrelerinin bu fonksiyonel adaptasyon mekanizması bilinmemekle birlikte yağ asidi artışına bağlı olabileceği düşünülmektedir (46,112,120).

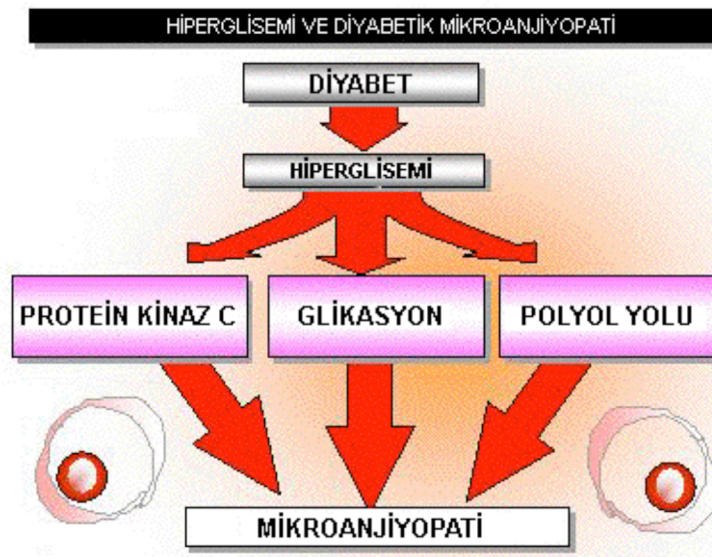
2.5. DİYABETTE KRONİK KOMPLİKASYONLARIN PATOGENEZİ

Diabetes mellitus hiperglisemiyle karakterize metabolik bir hastalıktır ve yağ protein metabolizmasındaki değişikliklerle ve uzun dönem makro ve mikrovasküler komplikasyonlarla birlikte.

Gliseminin düzeyi ve uzun dönem komplikasyonların gelişimi arasındaki bağlantı uzun yıllar önce öne sürülmüş ve epidemiyolojik çalışmalarda gösterilmiştir (119).

Glukoz hipotezine göre hiperglisemi doğrudan ya da dolaylı olarak diyabetin spesifik komplikasyonları nefropati, retinopati ve nöropatinin gelişimi ve ilerlemesi ile bağlantılıdır (34,83,110,111).

Glisemik düzeylerle nonspesifik makrovasküler komplikasyonlar arasında ilişki kurmaksa güçtür. Makrovasküler komplikasyonlar multifaktöryel olarak kabul edilmektedir (34).



Şekil 2-2: Hiperglisemi ve diyabetik mikroanjiyopati (83)

Glisemik düzeyleri düşümeye yönelik yoğun tedavinin mikrovasküler komplikasyonlar üzerindeki benzer yararlı etkileri, hipergliseminin üç majör diyabetik

komplikasyon patogeneğinde benzer rol oynadığını göstermektedir. DCCT (Diabetes Complications Control Trial) çalışmasında yoğun tedavinin bütün komplikasyonların gelişimi ve ilerlemesini % 50 azalttığı gösterilmiştir (34). Komplikasyonların ortak özelliği diyabetin süresi ile bağlantılı olmalarıdır. Nefropati ve retinopati gelişim ve ilerlemesinde kan basıncı gibi diğer bazı değişkenler de etkili olmaktadır (64,84,116).

Komplikasyonların farklı aşamalarında ise değişik patolojik mekanizmalar etkili olabilir. Örneğin yeni damarların gelişimi ile karakterize ileri evre retinopatide (proliferatif retinopati) anjiyogenik faktörler etkilidir, glisemiyle doğrudan ilişkisi yoktur (4).

Değişmiş yağ asidi ve protein metabolizması veya göreceli veya mutlak insülin eksikliğinin komplikasyonların nedeni olabileceği düşünülmektedir (34).

Yüksek glukoz düzeyi, non-enzimatik glikasyon ürünleri, hekzozaminler ve vazoaktif hormonlar matriks komponentlerinin kompozisyonunun değişimi ve birikiminden sorumlu faktörlerdir. Growth faktörler ve sitokinlerin sentez ve salınımını uyarır, hücre proliferasyonu ve hipertrofisi ortaya çıkar.

Bu profibrotik sitokinler arasında TGF- β , diyabetik nefropatideki yapısal anormalliklerin gelişiminde anahtar rol oynar. İn-vitro çalışmalarda yüksek glukoz varlığında glomerüller, mezangiyal hücreler, epitelyal hücreler ve interstisyel fibroblastlarda TGF- β ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (114,139).Yine in-vivo olarak renal TGF- β ekspresyonunun diyabette arttığı görülmüştür (22,23).

Glomerüler bazal membran ve ECM'de heparan sülfat proteoglikanın (HSPG) heparan sülfat zincirindeki değişiklikler diyabetik renal hastalıkta rol oynar. HSPG'nin

anyonik yan zinciri heparan sülfatta azalma proteinüriye neden olur. HSPG ekspresyonu ve mezangiyal genişleme arasında ters ilişki vardır (123).

ECM akümüasyonu tübülointerstisyel fibrozisin ve renal yetmezliğin derecesi ile proteinüri arasında güçlü bir birliktelik vardır. Tübülointerstisyel hasar hastalığın ilerlemesinin başlıca göstergesidir.Kronik interstisyel hasar glomerüler proteinürinin başlangıcını izler (26,162).

Çalışmalar intrasellüler hiperglisemide AGE öncüllerinin hücre içinde şekillendiğini göstermiştir. Bu öncül maddeler intra ve ekstrasellüler proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girer ve AGE'ler oluşur. AGE'ler damar geçirgenliğini artırır,

protein ve lipoprotein birikimlerine neden olur ayrıca nitrik oksidi inaktive etme ve matriks protein sentezini artırma yeteneğindedir (24).

Proteinkinaz C (PKC) hormonlara, growth faktörlere, nörotransmitterlere, prostoglandinlere cevapta fonksiyon görür. Büyüme hızı, DNA sentezi, Na^+/H^+ antiport aktivitesinin artırılması, düz kas kasılması ve hormonlara cAMP cevabını düzenler. Hücrel PKC aktivitesi diacilgliserol (DAG) ve inozitol fosfat düzeyleriyle düzenlenir. Diyabetik hayvanlarda DAG düzeyleri artmıştır (157). İntrasellüler glukoz artışı PKC'yi uyaran DAG düzeyini artırır (26). PKC pekçok hücrel proteini fosforile eder. Artmış PKC aktivitesi mezangiyal hücrelerde gen ekspresyonunu değiştirir, özellikle tipIV kollajen ve fibronektin olmak üzere ECM protein sentezi artar. Ayrıca vazodilatör prostonoidleri artırır, hiperfiltrasyonla sonuçlanır (162).

Diğer yanda PKC, mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) ile bağlantılıdır. MAPK intrasellüler sinyal ileti yollarında önemlidir ve hücre proliferasyonu ve hipertrofiyle sonuçlanır (60,61).

Hipergliseminin diğer bir etkisi polyol yolunun aktiflenmesidir. Aldoz redüktaz aracılığıyla sorbitolün intrasellüler birikimi sonucu intrasellüler osmolalite artar. Sorbitol birikimi doku hasarına neden olur. Redükte glutatyon düzeyleri düşer intrasellüler oksidatif stres artar (89).

Diyabetik hayvanlarda aldoz redüktaz inhibisyonunun bazı yararlı etkileri gösterilmiştir. STZ ile indüklenen sıçanlarda artmış GFR ve proteinürinin azaldığı gözlenmiştir (157). Tip 1 diyabetli glomerüler hiperfiltrasyonu olan normoalbuminürik hastalarda yapılan bir çalışmada aldoz redüktaz inhibitörleri ile tedavinin GFR'yi ve albumin ekskresyon hızını azalttığı görülmüştür (157).

Hiperglisemide hekzozamin yolunun aktiflenmesiyle N-asetil glukozamin düzeyleri artar. N-asetil glukozamin intrasellüler proteinleri modifiye eder. Modifiye proteinler renal diyabetik komplikasyonların patogeneze katkıda bulunurlar (162).

2.6. DİYABETİK NEFROPATİ

Diyabetik nefropati gelişmiş ülkelerde ileri evre böbrek yetmezliğinin en sık nedenidir. ESRF (end stage renal failure-son dönem böbrek yetmezliği) hastaları içinde nedeni diyabetik nefropati olanların oranı Amerika'da % 46, Japonya'da % 41, Yeni

Zelanda'da % 40, Almanya'da % 34, Avustralya'da % 30, İngiltere'de % 18, Norveç'de % 15 olarak saptanmıştır. Tip 2 diyabetiklerde ESRF hastalarının sayısı tip 1 diyabetiklerden sayıca fazladır. Bazı ülkelerde bu 10:1 oranında bulunmuştur (44,92,105).

Hiperglisemi, artmış kan basıncı düzeyleri ve genetik predispozisyon DN gelişiminde esas risk faktörleridir. Artmış serum lipidleri, sigara kullanımı, diyetle alınan protein miktarı da risk faktörleridir (77).

UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) çalışmasında tip 2 diyabetli hastalarda mikroalbuminüri görülme sıklığı % 2 iken tanıdan 10 yıl sonra yılda % 25 e çıkmıştır (65).

Mikroalbuminüri erken tespit edilip, tedavi edildiğinde nefropati ile birlikte kardiyovasküler mortalite de azalmaktadır. Diyabetik nefropatiye karşı korunmada erken aşamada dört yaklaşım önemlidir:

- Normoglisemi
- Düşük kan basıncı
- RAS (renin-anjiyotensin sistem) blokajı
- Sigara kullanmama

EDIC (Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications) çalışması erken aşamada glisemik kontrolün kardiyovasküler riski azalttığını göstermiştir (129).

ABCD çalışması (Appropriate Blood Pressure Control in Diabetes) kan basıncının düşürülmesinin mikroalbuminüri riskini azalttığını göstermiştir (137).

Mikroalbuminürinin tip 2 diyabette RAS blokajı ile önlenilebileceği görülmüştür. Hayvan çalışmalarında prediyabetik evrede RAS blokajı ile bunun mümkün olduğu gösterilmiştir (44,106,133).

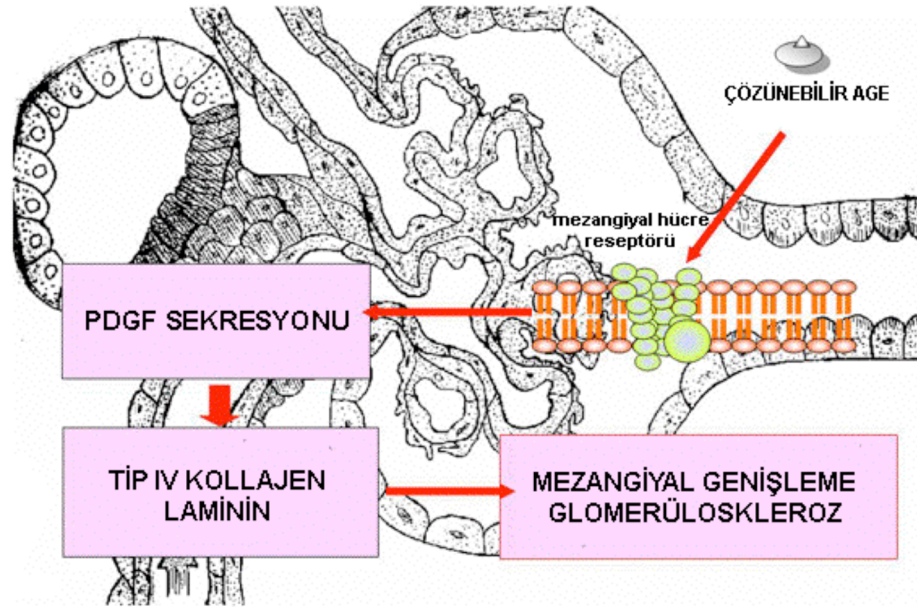
Diyabetik nefropati, diyabetli hastaların % 40'ında ortaya çıkar. Diyabet böbrekte spesifik değişikliklere neden olur. Klasik glomerüloskleroz artmış bazal membran kalınlığı, diffüz mezangial skleroz, hyalinoz, mikroanevrizma ve hyalin ateroskleroz ile karakterizedir. Ayrıca tübüler ve interstisyel değişiklikler olur (77,118).

Klinik çalışmalarda DM'lu hastalarda AGE (advanced glycation end products-ileri glikasyon son ürünleri) birikimiyle mikrovasküler komplikasyonlar arasında güçlü

korelasyon bulunmuştur. Özellikle serum AGE'leri mikroalbüminüri sürecinde ve ardından gelen overt nefropatide ileri derecede artmaktadır (77,150).

AGE'lerin DN gelişiminde ve ilerleme sürecinde, kimyasal, hücrel ve dokular üzerinde geniş etkileri vardır. Böbrek, diyabette AGE'lerin patofizyolojik etkilerine en açık dokudur. Ayrıca AGE'ler filtre olduktan sonra proksimal tübülüslerden reabsorbe olur. Bu endolizozomal aparatı da içeren proksimal tübüllerin aktif bir prosesidir. Glukoz reabsorbsiyonu proksimal tübüllerde insülin kontrolü altında değildir. Bu da tübülüs hücrelerinde glukoz konsantrasyonunun artmasına, yüksek intrasellüler glukoz seviyelerine, AGE üretimi ve oksidatif stres oluşumuna neden olur (9,150).

Pek çok çalışma göstermiştir ki AGE düzeylerinde ve AGE reseptörlerinde (RAGE) diyabetik böbrekte önemli değişiklikler olmaktadır (77).



Şekil 2-3: Mezangiyal RAGE'ler

Park ve arkadaşları (115) yaptıkları çalışmada diyabetin gelişiminden 6 hafta sonra plazmada AGE birikiminin arttığını, aorta ve böbrekte lizatlar oluştuğunu bildirilmiştir. Bu bulgular aorta ve böbrekteki lizatlarda RAGE konsantrasyonunun artışıyla birliktedir.

Karin A. Jandeleith-Dahm ve arkadaşlarının (70) yaptıkları bir diğer çalışmada 20 haftalık tedavisiz diyabette AGE birikiminin böbrekte glomerüllerde ve tübülointerstisyumda önemli derecede arttığı, bu artışın albüminürideki artışla birlikte olduğu gözlenmiş, glomerüloskleroz ve tübülointerstisyel hasar saptanmıştır.

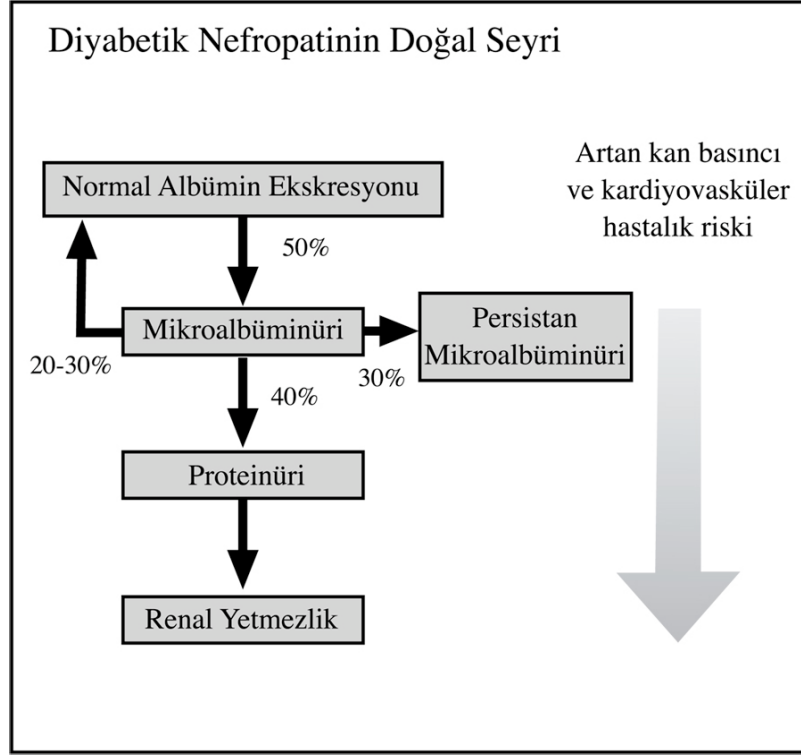
Lassila ve arkadaşları (88) aminoguanidin ve alagebrium klorürle yaptıkları çalışmada benzer sonuçlar almıştır.

Ancak büyüme faktörlerinin diyabetik böbrek hastalıklarındaki esas rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Büyüme hormonu (GH), insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF'ler), TGF β , trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) ve diğer büyüme faktörleri böbrekteki uzun dönem değişikliklerde önemli olabilir (118).

Epidemiyolojik çalışmalarda tip 1 ve tip 2 diyabette nefropatinin gidişinin aynı olduğu öne sürülmüştür. Tip 2 diyabette hastaların % 30-50'sinde mikroalbüminüri diyabetin başlangıcından 20 yıl sonra gelişmektedir. Popülasyon bazlı çalışmalarda tip 2 diyabette tanı anında nefropati prevalansının % 5 -10 olduğu ileri sürülmüştür (48).

Geleneksel olarak nefropati üriner albümin atılım hızına (UAER) göre gizli ve overt olmak üzere iki tipe ayrılır. Gizli nefropati UAER (30-300mg/24 saat) ve genellikle 6-15 yıllık diyabet geçmişi vardır. Mikroalbüminüriye rağmen bu hastaların hepsi overt nefropatiye dönmez. % 25'i normoalbüminüriye dönerken, % 40 hasta mikroalbüminürik kalır (48,150) .

Proteinürinin gelişmesiyle (UAER > 300mg/24saat) hipertansiyonun ortaya çıkması bağlantılıdır. Sonuç olarak renal fonksiyondaki azalma kan basıncı düzeylerindeki artışla doğru orantılı olur. Overt nefropatinin başlangıcından sonra yedi yıl içinde son dönem böbrek yetmezliği ortaya çıkar (48,157).



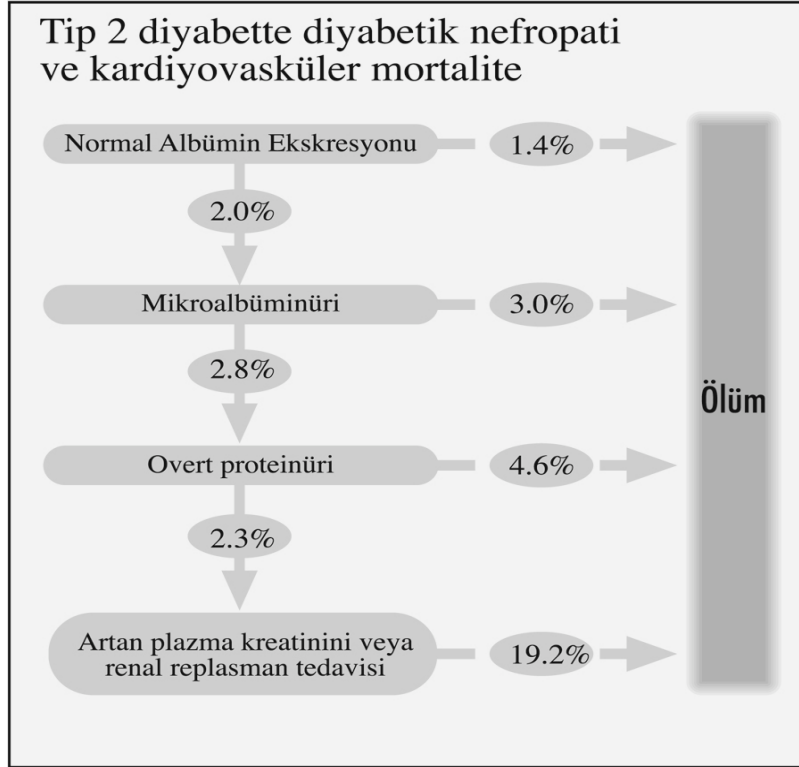
Şekil 2-4: Diyabetik nefropatinin doğal seyri (151)

Mikroalbüminüri DN'nin ilk göstergesidir. UAER 20-200 $\mu\text{g/ml}$ (30-300 mg/gün). Günden güne değişiklik gösterdiğinden üç ölçümden ikisinde pozitif olmalıdır (129).

Mikroalbüminüri gizli nefropati olarak da adlandırılır. Bununla birlikte erken fazda dahi önemli glomerüler patolojiler olabilir ve GFR hızı düşmeye başlamış olabilir. Ancak bazen UAER 200 $\mu\text{g/dak}$ düzeyine çıkana kadar GFR normal sınırlarda kalabilir (151).

Mikroalbüminüri özellikle tip 1 diyabetli hastalarda retinopati, periferik vasküler hastalıklar ve nöropati ile yakından ilişkilidir. Bu fazda kan basıncı artar ve lipid anormallikleri gelişir. LDL, trigliserid, apolipoprotein B artar ve HDL kolesterol azalır (151).

Bu ilerleyici anormallikler tip 1 ve 2 diyabette görülür, bununla birlikte tip 2 diyabette hipertansiyon ve dislipidemi daha önceden bulunabilir. Mikroalbüminüri generalize endotelial disfonksiyonla da birliktedir (151).



Şekil 2-5: Tip 2 diyabette diyabetik nefropati ve kardiyovasküler mortalite (151)

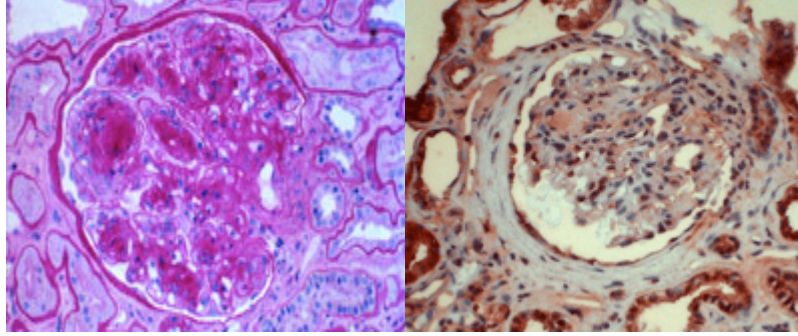
Persistan Albüminüride ise UAER deki artış 200 µg/dak üstündedir ve klinik olarak overt DN safhasındadır. Arteriyel hipertansiyon (HT) genellikle vardır, protein kaybı artabilir ve nefrotik sendrom, hipoalbuminemi ve periferik ödem ortaya çıkabilir. Lipid bozuklukları ve aterosklerotik komplikasyonlar görülebilir (151).

2.7. DİYABETİK NEFROPATİDE BÖBREĞİN HİSTOPATOLOJİSİ

Diyabetik böbrekte esas patolojik değişiklik glomerüllerde ortaya çıkar. Tanı konulduğunda böbreğin ve özellikle glomerüllerin hacmi artmıştır ve glomerüllerin genişlemesi geç dönemde de devam eder. Erken dönemde bu genişleme filtrasyon artışıyla sonuçlanan bazal membran kalınlaşması şeklinde iken daha sonra mezangiyal genişlemeye neden olabilir. Total renal hacimdeki artış tübüler dokunun genişlemesine de neden olabilir (157).

Bazal membran kalınlaşması uzun süre diyabetin ayırıcı özelliği olarak tanımlanmıştır. Kalınlaşma tanıdan iki yıl sonra gözlenebilir (157).

AGE'lerin ekstrasellüler matriksde birikimi glomerüler bazal membran kalınlaşması ve mezangial genişleme ile sonuçlanır. Ayrıca tübülointerstisyel fibrozis diyabetik nefropatide hakim olan morfolojik değişikliklerdir (77,150) .



Şekil 2-6: Diyabetik nefropati karakteristik lezyonları (31)

Glomerüler hastalık tek başına kısa dönem diyabetli hastalarda sıklıkla mikroalbüminüri ile birlikte gözlenir. Daha az spesifik değişiklikler, vasküler ve tübülointerstisyel anomaliler uzun dönem diyabetli hastalarda dikkati çeken patolojilerdir (makroalbüminüri, renal yetmezlik, hipertansiyon) (16,33,55,56,134).

Hemodinamik anormallikler glomerüllerdeki hipertrofik değişikliklerle birlikte. Büyüme hormonu (GH) ve GH serbestleştirici faktörün transgenik farelerde aşırı ekspresyonu, glomerüloskleroz ve glomerüler hipertrofiye neden olduğu gösterilmiştir (157).

10 yıldan daha uzun süreli diyabette hastaların büyük çoğunluğunda ve mezangial hücrelerde proliferasyon ve mezangial matriksde diffüz artışla karakterize glomerüloskleroz bulunmaktadır. Bazı vakalarda afferent ve efferent arterioldeki hyalin aterosklerozla devam eder. Ancak bazal membran kalınlaşmasının aksine, mezangial hacim bazı hastalarda 25 yıl sonra normal olabilir (157).

Mezangiumda madde birikimi nodüller şeklinde de olabilir. Bu lezyonlar Periodik asid-Schiff pozitif materyallerdir. Kimmelstiel-Wilson adı verilen bu nodüller diyabet için patognomoniktir (157).

Hyalin birikimleri eozinofilik aselüler materyallerdir. Ancak nonspesifiktir ve diğer bazı böbrek hastalıklarında da görülebilir. Endotelyal hücrelerle bazal membran arasında ve afferent ve efferent arteriollerde bulunabilir. Afferent arteriol blokajına bağlı GFR’de azalma ortaya çıkabilir (157).

Tübüller ve interstisyumda diğer kronik böbrek hastalıklarında ortaya çıkan non-spesifik değişiklikler görülebilir (54,157).

Bütün bu değişiklikler RAGE’lerdeki artışla birliktedir.

Ayrıca artmış makrofaj infiltrasyonu, hücresel proliferasyon, aktin pozitif hücrelerle artmış infiltrasyon, artmış kollajen tip 1 ve tip 4 birikimi bunların dışında TGF α -1, CTGF ve PDGF gibi çeşitli sitokinlerin ekspresyonunda artma görülür (70,88).

Tip 1 diyabette erken fazda morfometrik çalışmalarda lümenal hacim ve filtrasyon yüzeyindeki artış gösterilmiş ve bu GFR’deki artışla ilişkilendirilmiştir. İlerleyici renal hastalıkta fonksiyonel değişiklikler ve mezangial genişleme arasında bir ilişki vardır. Aynı zamanda bu GFR ile de ilişkilidir. Bu ilişki değişkendir. Kapiller yüzey alanı ile ters ilişkisinden kaynaklanır (157).

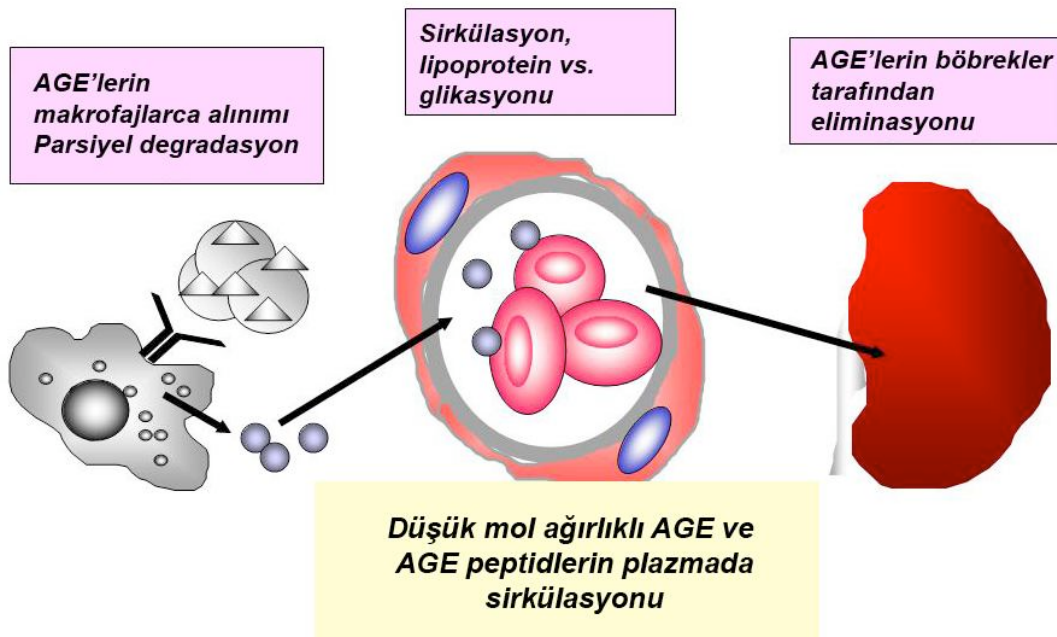
Düşük düzeyde mikroalbuminüri (20-30 μ g/ dk) tip 1 diyabetli hastalarda glomerüler anomalilere rastlanmamıştır. Bu değerlerin üzerinde üriner albümin atılımı olanlarda mezangiumun hacmi önemli derecede artmış, kreatinin klirensinde minör düzeyde azalma, kan basıncında artış saptanmıştır. Benzer bulgular mikroalbuminüri ve proteinüri tip 2 diyabetli hastalarda da bildirilmiştir (157).

2.8. AGE-DİYABETİK NEFROPATİ İLİŞKİSİ

İleri glikasyon son ürünleri ilk kez 1912 yılında Fransız kimyacı Louis Maillard (94) tarafından tanımlanmıştır. Fransız kimyacı şeker ve amino asit karışımlarının ısıtıldığında kahverengi bir bileşik oluşturduklarını gözlemleyerek glukozun oksidasyonunu ortaya koymuştur. Günümüzde ‘Maillard reaksiyonu’ adı verilen bu reaksiyon sonucu oluşan bileşikler ileri glikasyon son ürünleri (advanced glycation end products-AGE) olarak tanımlanmaktadır (2,79). AGE’ler hem plazma hem de dokularda proteinleri modifiye edebilen kompleks heterojen moleküllerdir. Günümüzde bütün AGE’ler tespit edilememiş ve oluşum mekanizmaları aydınlatılamamıştır.

Bununla birlikte birçoğu model AGE'ler olarak tanımlanmış ve diğerlerinin de yapıları karakterize edilmektedir. Ancak, sadece bazıları organizmada patofizyolojik etkilere sahiptir (2,79,131).

En iyi bilinen AGE'ler; pentozidin, N-karboksimetillizin (CML), N-karboksietillizin (CEL), glioksal lizin dimeri (GOLD), metilglioksal lizin dimeri (MOLD), imidazolon (3-deoksiglukozon-arjinin-imidazolon) ve pirlalin'dir (31,79,125,152).

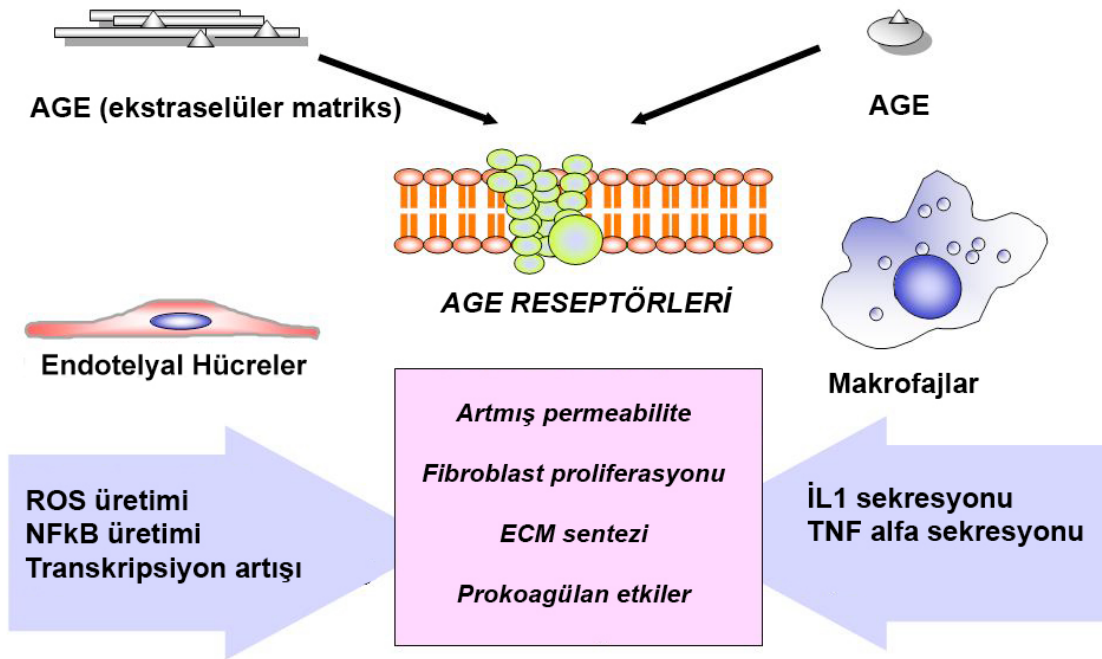


Şekil 2-7: AGE'lerin degradasyon ve eliminasyonu

AGE'lerin başlıca karakteristik özellikleri; sarı-kahverengi pigmentasyon, fluoresans ve çapraz bağlama yetenekleridir. Ancak, bazı AGE'ler nonfluoresan olmakla birlikte çapraz bağlama yeteneğinden de yoksundurlar (2,79). Organizmada AGE birikiminin birçok toksik etkisi bulunmaktadır. Bu etkilerin bazıları Amadori ürünlerine atfedilebilir. AGE'ler ekstrasellüler matriksin yapısını ya doğrudan hasarlayarak onun fiziksel, kimyasal özellikleri ile metabolizmasını değiştirirler, çapraz bağlanmalara neden olurlar, nitrik oksidin etkisini baskırlar ve lipoperoksidasyonu artırır ya da AGE spesifik reseptörler üzerinden etkilerini gösterirler (79,132,164). Reseptör farklı AGE bileşenlerine nonspesifik olarak bağlanır. Bunlar arasında CML ve pentozidin yüksek afiniteye sahip ligandlardır (77,82).

Ekstrasellüler AGE varlığında duyarlı hücreler hemen RAGE anlatımını *up regüle* ederler. Diyabetik nefropati hastalarında bu etki böbrekte glomerüler podositlerde gösterilmiştir. Ancak diğer glomerüler hücrelerdeki RAGE anlatımı daha düşük düzeylerde (77,163).

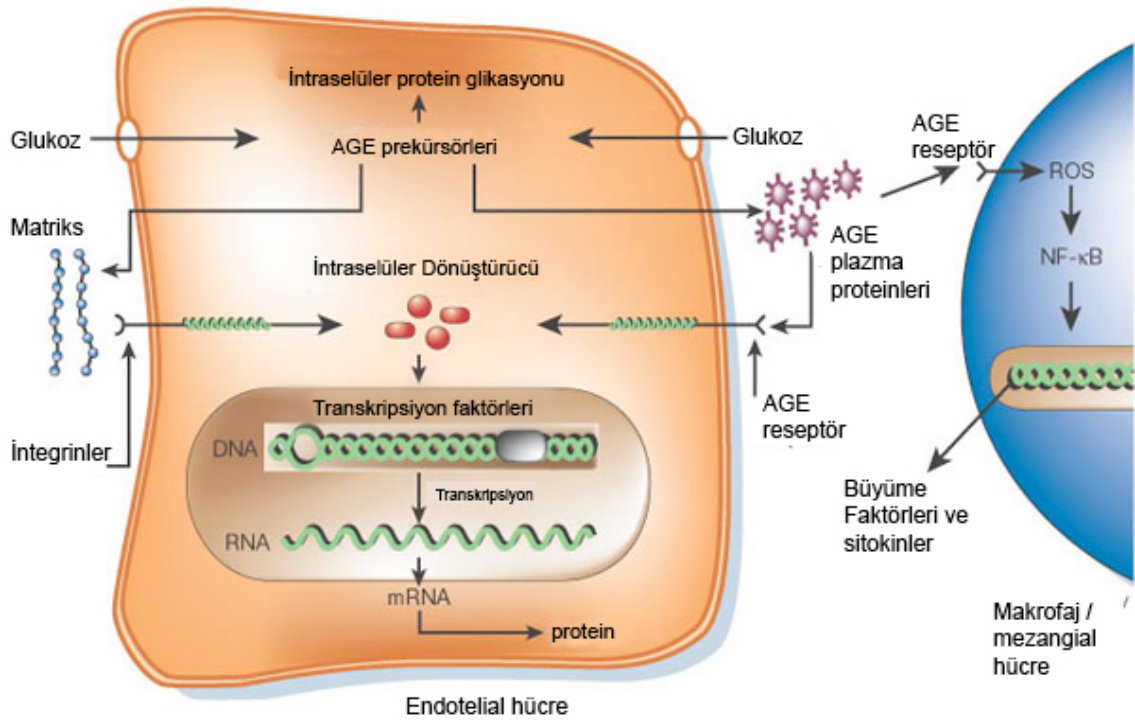
RAGE'lerin DN gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada RAGE geni aşırı ekspresyon yapan farelerde diyabet indüklenmesinin ardından hızlanmış renal hasar olduğu gözlenmiştir. Yine RAGE knock out farelerde diyabette mezangiyal genişlemeye karşı korunma sağlandığı tespit edilmiştir (150). RAGE aktivasyonu, hücre tipine bağlı olarak çok çeşitli intraselüler transdüksiyon kaskadlarını tetikler (77). ERK kinaz, $p38^{MAPK}$, JNK kinazlar ve NF- κ B (nükleer faktör κ B) örnek olarak gösterilebilir (66,150).



Şekil 2-8: AGE reseptörleri

AGE-RAGE etkileşimi, sitokinler, büyüme faktörleri (TNF- α , IL-1, PDGF, IGF1, interferon γ) ve adhezyon molekülleri (ICAM-1, VCAM-1) genlerinin transkripsiyonunu stimüle eder, hücre proliferasyonunu stimüle eder, vasküler permeabiliteyi artırır, makrofaj geçişini indükler, endotelin-1 oluşumunu stimüle eder, trombomodülini *down regüle* eder, kollajen IV, fibronektin ve proteoglikanların ve prokoagulant doku faktörlerinin sentezlerini artırır (79,148).

AGE'ler vücutta fizyolojik koşullar altında da oluşur ve yaşlanmayla birlikte oluşumları da artış gösterir (79). Plazma düzeylerinin üremik hastalarda anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmış ve 'yeni üremik toksinler' olarak tanımlanmışlardır. Daha sonrasında nörodejeneratif hastalıklarda sinir dokularında biriktikleri saptanarak, romatoid artrit ya da kronik pulmoner hastalıklar gibi diğer hastalıklardaki önemi tartışılmaya başlanmıştır (31,39,79,81).



Şekil 2-9: AGE-RAGE etkileşimi

Renal yetmezliği olan diyabetik hastalarda glikoksidasyon, hiperglisemi karbonil stres ve oksidatif stres ile artar. Artmış AGE'ye hem dokuda hem de serum da rastlanır ve serum AGE düzeyleri organ hasarının şiddetiyle orantılıdır. Azalmış renal fonksiyona sahip hastalarda, serum AGE düzeyleri normal fonksiyonlu diyabetik hastalarinkinden birkaç kat daha fazladır. Sağlıklı örneklerle kıyaslandığında AGE flouresansı 3- 4- kat, CML 3 kat ve pentozidin 10 kat daha fazladır. Serum AGE düzeyleri organlarda biriken AGE ile korelasyon göstermektedir (37).

Renal yetmezlikte AGE artışı sadece klasik glikasyon yolu ile oluşum ya da azalmış renal atılım ile açıklanamaz. AGE oluşumunda hem oksidatif hem de karbonil stresin önemli rol oynadığı bilinmektedir (136). Pek çok çalışmada, renal yetmezlikte oksidatif stresteeki artışın serum lipoperoksidasyon ürünlerinin ve ayrıca proteinlerin ileri oksidasyon ürünlerinin seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (93). Bunun yanı sıra ileri derece renal yetmezliği olan hastalarda antioksidan savunmanın, enzimlerin ve onların kofaktörleri olan Zn, Se ve vitaminlerin azaldığı saptanmıştır.

Bazal membran, mezangiyal ve endotelial hücreler, podositler ve tübüller de dahil olmak üzere, neredeyse bütün renal yapılar AGE birikimine karşı duyarlıdır (77).

Böbrekte AGE birikimi ya AGE peptidlerin tübüler reabsorbsiyonu sırasında dolaşımdaki AGE'lerin mezangiyal tutulması ile ya da diyabetik böbrekte yeni AGE oluşumuyla gerçekleşir (164).

İleri diyabetik nefropatili hastaların, glomerüler lezyonlarında ve damar sistemlerindeki glikoksidasyon ürünlerinin immünohistokimyasal yerleşimleri araştırıldığında, genişlemiş mezangiyal matrikste, nodüler lezyonlarda, kalınlaşmış kapiller duvarlarında ve arteriyal duvarda artmış CML birikimine rastlanmıştır. Buna karşın aynı sonuçlar normal böbreklerden elde edilememiştir. Benzer sonuçları imidazolon ile elde edilmiştir (63,77).

Diyabetik nefropatide mezangiyal genişleme ve bazal membranda kalınlaşma, mezangiyal matriksin kompozisyonundaki değişikliklerden kaynaklanır.

ECM proteinlerinin glomerüler mezangiyumda birikmeleri DN için karakteristiktir. Normal kollajen ve matriks-hücre etkileşimlerine AGE'ler zarar verebilir. Bazal membran proteinlerindeki çapraz bağlanmalar permeability ve proteinlerin glomerüler geçişlerini artırabilir (164).

Diyabetli hastalarda yapılan alışmalar AGE birikimi ile mikrovasküler komplikasyonların şiddeti arasında doğrudan ilişki olduğunu göstermektedir (13). Özellikle overt nefropati ve mikroalbuminürinin gelişiminde serum AGE seviyeleri de doğru orantılı olarak artmaktadır. Benzer çalışmalarda tip 1 diyabetli hastalarda renal komplikasyonların şiddetiyle derideki AGE düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (102). Diyabetik nefropatinin oluşum ve gelişimi üzerinde AGE’lerin geniş bir kimyasal, hücresel ve dokusal etkileri olduğu bilinmektedir.

Diyabette AGE’lerin patofizyolojik etkilerine en hassas olan bölge böbrekler olarak kabul edilmiştir. Szlmş AGE’lerin reabsorbsiyonu için asıl bölge proksimal tübüldür. Bu proksimal tübülün endolizozomal aparatının katıldığı aktif bir süreçtir (150).

Proksimal tübülde glukoz alınımlı insülinin kontrolü altında değildir. Bu da hiperglisemide yüksek intraselüler glukoz seviyeleri oluşturarak AGE ve oksidatif stresin oluşumuna neden olmaktadır. Tersine insülin eksikliği diğer renal hücreleri ekstrasellüler hipergliseminin etkilerine karşı koruyor olabilir (90,150).

AGE’ler diyabetik nefropatinin gelişiminde rol alan pek çok patojenik medyatörün ekspresyonu ve aktivasyonuna neden olur. Bu etkisi reseptörler aracılığıyla direkt olarak veya serbest oksijen radikallerinin oluşumu ve ekstrasellüler matriks bütünlüğündeki, sitokinler, adhezyon molekülleri ve kemokinlerin oluşumu ile sonuçlanan değişiklikler aracılığıyla indirekt olabilir. Bu olay, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), bağ dokusu büyüme faktörü (EGF), transforming büyüme faktörü _1 (TGF-_1), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), tümör nekroz faktörü- _ (TNF-_) ve interlökinler (IL-1_ ve IL-6) gibi anahtar mediyatörleri kapsar (48).

Özellikle TGF-_1’in indüksiyonu, hücre büyümesi ve matriks homeostazı üzerinde AGE-RAGE kaynaklı etkilerde anahtar ara basamak olarak göze çarpar. TGF-_1 anlatımı böbrekte AGE birikimiyle yakından ilişkilendirilmektedir (48).

Reaktif oksijen türlerinin oluşumuna yol açan oksidatif stres de diyabetik nefropati gelişimindeki önemli bileşenlerden biridir. Bugün oksidatif stresle ileri glikasyon arasında sinerjik bir ilişkinin varlığı bilinmektedir. Deneysel diyabet modellerinde oksidatif stresin AGE birikiminin olduğu bölgelerde arttığı ortaya konmuştur (67,150).

2.9. AGE İNHİBİSYONU

DCCT ve UKPDS çalışmaları tip 1 ve tip 2 diyabette mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde hipergliseminin kontrol edilmemesinin risk faktörü olduğunu göstermiştir. Makrovasküler komplikasyonların hiperglisemi ile birlikteliği açık değildir. Fakat birkaç çalışmada hipergliseminin makrovasküler hastalık riskini artırdığı gösterilmiştir (98,154).

AGE inhibitörlerinin diyabetik komplikasyonlara karşı yararlı oldukları gösterilmiştir. Araştırmalar, anti-AGE stratejilerinin diyabetik hastaların tedavisinde önemli rol oynadıklarını açıkça göstermektedir (109).

Nonenzimatik glikasyon sürecinin önlenmesi veya yavaşlatılması konusunda yoğun çalışmalar yapılmıştır. Burada iki esas farmakolojik yaklaşım vardır. Biri erken glikasyon ürünlerinin geri dönüşümlü aşamada yeniden düzenlenmesi, diğeri AGE'lerin çapraz bağlarını kırmaktır (57,71).

Reaktif dikarbonil bileşikleri glioksal, metilglioksal (MG), 3-deoksiglukozon (3-DG) AGE lerin komplikasyon gelişiminde öncü maddelerdir. AGE oluşumunun birçok ajanla direkt kimyasal inhibisyonu gösterilmiştir. Bu süreç, AGE prekürsörleri olan reaktif karbonil ve dikarbonil bileşiklerinin ortadan kaldırılmasını gerektirir. Aminoguanidin, piridoksamin ve OPB-9195 gibi bileşikler karbonil gruplarını ortadan kaldırır (79).

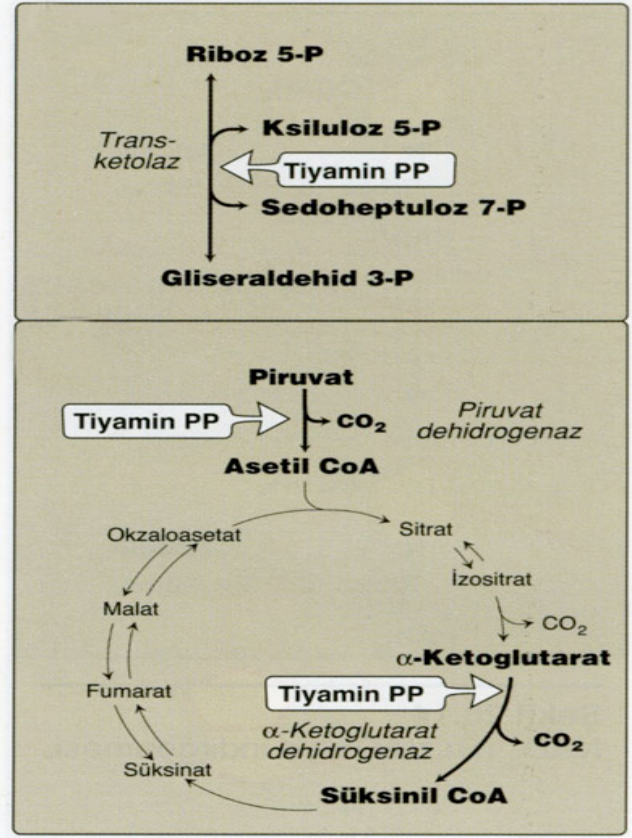
AGE düzeylerinin düşürülmesi değişik terapilerin birarada kullanılmasıyla (AGE formasyon inhibitörleri, AGE çapraz bağ kırıcıları, serbest radikal temizleyicileri, antihipertansif ajanlar) kullanılmasıyla mümkündür (71,154).

2.9.1. B1 Vitamini (Tiyamin)

Anti beriberi faktörü olan tiyamin aneurin olarak da adlandırılır . Eksikliğinde beriberi hastalığı ortaya çıkar. Karbonhidrat metabolizmasında anahtar rol oynar. Tiyamin difosfat oksidatif dekarboksilasyon reaksiyonlarını katalizleyen üç multienzim kompleksinin koenzimidir. Piruvat dehidrojenaz karbonhidrat metabolizmasında, _-ketoglutarat dehidrojenaz sitrik asit siklusunda ve transketolaz pentoz fosfat yolunda görev alır (96).

Tiyamin, gliseraldehid 3-fosfatı (GA3P) glikolizden pentoz fosfat şantına kaydırır. Sadece intrasellüler proteinleri ve laktik asidi glikozilleyen birikimini

önlemez, aynı zamanda pentoz fosfat yolunu kullanarak antioksidan oluşumunu ve NADPH düzeylerini artırır. Tiyaminin fonksiyonel aktivitesi eritrosit transketolaz aktivitesi ile ölçülür (38,87,124).



Şekil 2-10: Tiyaminin kofaktör olarak rol oynadığı enzim reaksiyonları (96)

Diyabetik hastalarda hiperglisemi ile vasküler hastalık arasında güçlü birliktelik vardır. Yüksek glukoz düzeyleri endotel hücre disfonksiyonuna neden olur ve replikasyonu geciktirir. Bu sürecin gelişimindeki patolojik mekanizmalar AGE'ler ve toksik metabolitlerin aşırı miktarda birikimidir. Endotel tarafından sentezlenen von Willebrand faktör (vWF) diyabetik hastalarda artmıştır (10,14,145).

Tiyamin vWF düzeylerini azaltır. vWF vasküler endotel hücrelerde üretilen ve primer hemostazda rol alan bir maddedir. Artmış vWF düzeyleri miyokard infarktüsü ve tromboembolik komplikasyonlarla birliktedir (10,53,148). Retinopatide de yüksek vWF düzeyleri saptanmıştır (10).

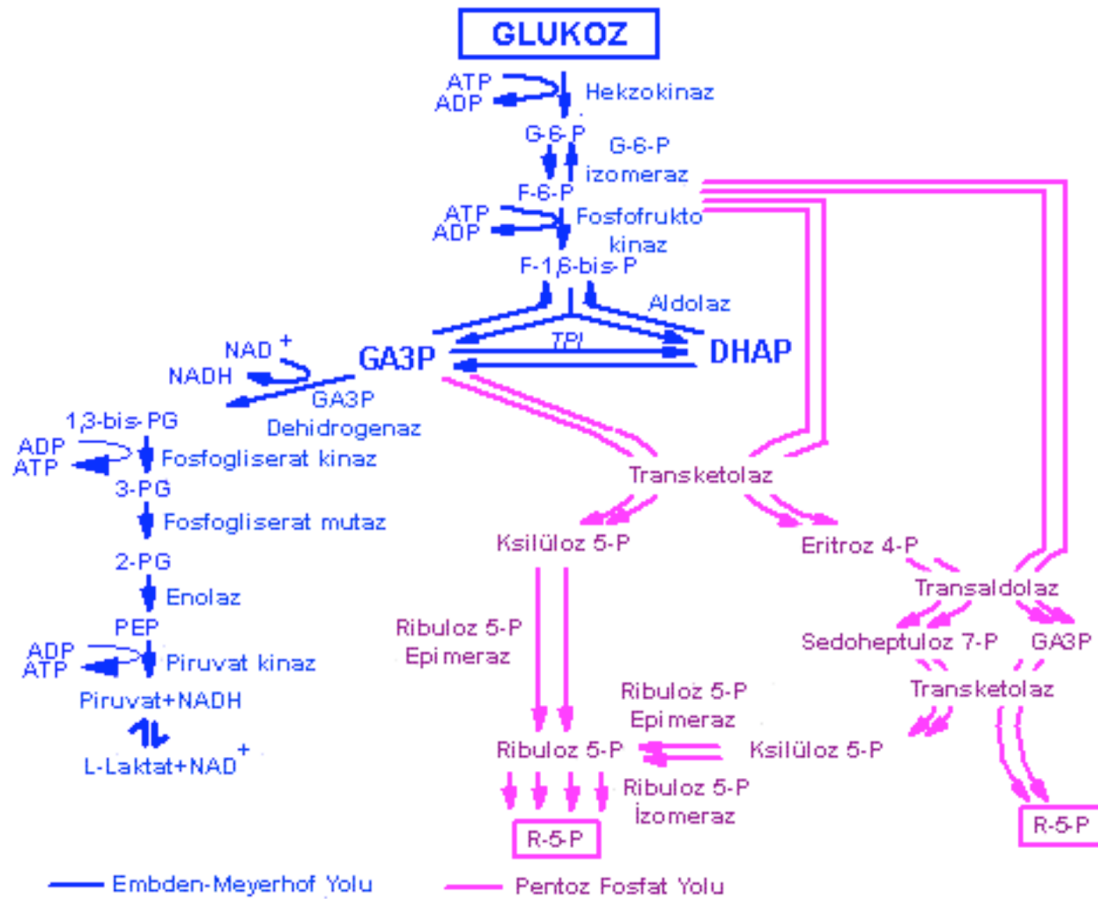
vWF yüksek düzeylerinin kardiyovasküler patoloji riskini artırdığını ve vWF ün diyabetik komplikasyonlar için yararlı bir marker olabileceği bildirilmiştir (78).

Normoglisemide tiyamin tedavisinin endotelial hücrelerde vWF sekresyonu üzerine etkisi yoktur (103).

Tiyamin tedavisinin endotelial hücre proliferasyonunu iyileştirdiği, artmış olan laktik asit oluşumunu normal düzeylere çektiği ve hiperglisemik koşullarda inkübe edilmiş endotelial hücrelerde floresans AGE oluşumunu önlediği gösterilmiştir (10).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda diyabette doku tiyamin alımının azaldığı ince barsakta membran transportunun bozulduğu gösterilmiştir (10,86).

Tiyamin intrasellüler NADPH düzeylerini artırır böylece hiperglisemide oluşan serbest oksijen radikallerinden hücreyi korur. Plazmada ng/ml düzeyindedir. Sirküle eden tiyamin organizmadaki hücreler tarafından alınır ve depolanır. İntrasellüler konsantrasyonu her hücrede değişiktir (124).



Şekil 2-11: Hiperglisemide biyokimyasal disfonksiyonun tiyaminle geri döndürülmesi (11)

Ascher ve arkadaşları (10) tarafından yapılan bir çalışmada tiyaminin endotelial hasardan sonra endotel hücre migrasyonunu artırdığı görülmüştür. Yüksek glukoz

düzeylerine sekonder olarak azalmış migrasyon ve artmış vWF sekresyonu tiyaminle geri döndürülmüştür. Bu in vitro çalışmanın sonucunda tiyaminin hiperglisemik koşullar altında endotelyal hücre disfonksiyonunu azalttığı, diyabetik ve nondiyabetik koşullarda reendotelizasyonu sağladığı ileri sürülmektedir.

Tiyamin pirofosfat pankreatik _ hücre fonksiyonu ve glukoz metabolizması üzerine önemli rol oynar. Tiyamin eksikliği olan sıçanlarda glukoz oksidasyonu ve insülin sekresyonunun azaldığı görülmüştür (126,127).

Seyrek görülen bir hastalık olan tiyamine duyarlı megaloblastik anemi (TRMA) dejeneratif bir sendromdur. Megaloblastik anemiyle birlikte DM ve sensorinöral sağırılık ile karakterizedir. Yüksek doz tiyamin ve eksojen insülin tedavisine ihtiyaç duyulur. Özellikle biyolojik membranları kolay geçen tiyaminin lipofilik formu (benzoil oksimetil tiyamin) olan BOM ile başarılı sonuçlar alınmaktadır (130).

TRMA sendromlu hastalarda tiyamin kan glukoz düzeylerini ve glukoz tolerans eğrisini normale döndürür (130).

Pek çok çalışmada DM'lu hastalarda vitamin eksikliği bulunduğu görülmüştür. Özellikle B grubu vitaminler ve tiyamin eksikliği karbonhidrat intoleransı ile birlikte (154).

TRMA sendromlu hastalarda BOM (vitaminin lipofilik formu), diyabet metabolizmasının kontrolünü sağlayarak, endojen insülin sekresyonu artırır ve insülin tedavisine gereksinimi ortadan kaldırır (158).

Tip 1 diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada plazma tiyamin düzeyi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük bulunmuştur. Uzun süreli tip1 diyabetli hastalarda BOM ile metabolik kontrolün düzenlenemediği gözlenmiştir. Ancak bu hastaların bir kısmı puberte döneminde olduğundan insülin direnci gelişiminin durumdan sorumlu olabileceği düşünülebilir (80).

Bir çalışmada tiyaminin AGE oluşumunu azalttığını ve replikasyon defektlerini düzelttiğini göstermiştir (86). Yüksek glukozdan dolayı artan laktat düzeyi normale dönmüştür.

F. Pomero ve arkadaşları (121) endotelyal hücrelerde yaptıkları bir çalışmada tiyamin ve benfotiyamini karşılaştırmışlar ve benfotiyaminin AGE oluşumunu diyabetli Wistar sıçanlarda azalttığını buna karşılık tiyaminin böyle bir etkisi olmadığını

göstermiştir. Bununla birlikte HUVEC çalışmasında tiyaminle de benzer sonuçlar elde edilmiştir (97).

Deneysel çalışmalar diyabette doku spesifik tiyamin eksikliği olduğunu göstermektedir. Plazma tiyamin düzeyleri ve transketolaz aktivitesi önemli derecede azalmıştır. Ayrıca renal glomerüllerdeki patolojiye bağlı olarak tiyaminin renal klirensi artmıştır (80,154).

Thornalley ve arkadaşlarının (154) düşük plazma tiyamin düzeyi olan diyabetik hastalarda yaptıkları çalışmada, tiyaminin artan renal klirensinin diyabette renal disfonksiyonun erken göstergesi olabileceği ve bu disfonksiyonun proksimal tübüllerle ilişkili olduğu öne sürülmüştür.

Tiyaminin proksimal tübüllerden geri Emilimi tiyamin taşıyıcıları THTR-1 ve THTR-2 ile sodyum bağımlı proton antiport mekanizması yoluyla olur ve Ca^{+} /kalmodulinle regüle edilir (11,154). THTR-1 ve THTR-2 taşıyıcıları gen ekspresyonu SP1 promoter elementleri ile düzenlenir. Hiperglisemide SP1 sinyal mekanizması tübüler epitelde azalmıştır. Bu azalma heksozamin yolu aktivitesinin artışı ile SP1 O-glikozilasyonunun artmasına bağlanmaktadır. Tiyaminin tübüler epitel tarafından geri alınımı deneysel diyabet ve klinik diyabette THTR-1 ve THTR-2 taşıyıcı gen ekspresyonunun heksozamin yolu bağımlı olarak azalmasından; bu tiyamin taşıyıcılarının dikarbonil glikasyonu ile inhibisyonundan ve tübüler lümen asidifikasyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir (11,12,38,108,154,160).

Vasküler hücrelerde tiyamin eksikliği hiperglisemide metabolik disfonksiyonu şiddetlendirir. Endotelial disfonksiyon göstergesi olarak S VCAM-1 düzeyleri ile birlikte ateroskleroz gelişimi de artar (143).

S VCAM-1 diyabet hastalarında artmıştır. Normal renal fonksiyonla ve mikro-ve makrovasküler komplikasyonlarla ilişkilidir (43,91,143,154). Düşük tiyamin düzeyleri artmış VCAM ile ilişkili olabilir.

Yüksek doz tiyamin ve benfotiyamin terapisi deneysel diyabette metilglioksal türevi AGE formasyonunu azaltır (1,3,12,59).

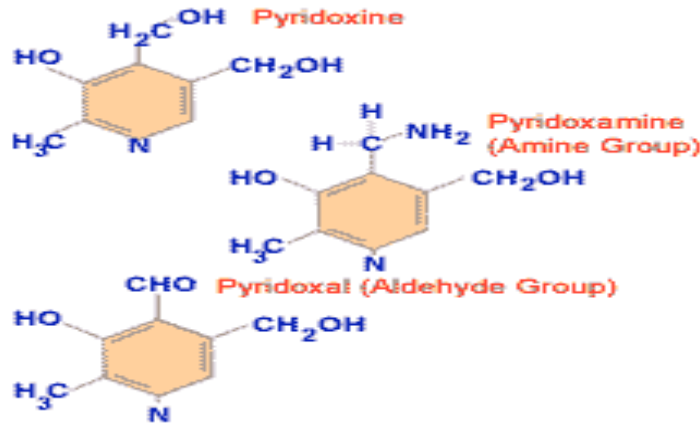
Tiyamin (20 mg/gün) ile piridoksinin (50 mg/gün) karşılaştırıldığı bir çalışmada polinöropatili diyabetik hastalara tiyamin verilmesi 5 kat daha etkili olmuştur (3). Başka çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır (21).

Piridoksal fosfat amino asit metabolizmasında özellikle transaminasyon ve dekarboksilasyon reaksiyonlarında pek çok enzimin koenzimi olarak rol oynar.

Steroid hormon aktivitesinde, hormon reseptör kompleksinin DNA'ya bağlanmasını ortadan kaldırmakta ve hormon aktivitesinin sonlandırılmasında önemlidir. B6 vitamini eksikliğinde östrojen, androjen, kortizol ve vitamin D düşük konsantrasyonlarda artmış aktivite gösterirler (97).

B6 vitamini eksikliğinde nörolojik semptomlar ortaya çıkar. Bu etkisi _ aminobutirik asit (GABA) sentezinin azalmasına bağlanmaktadır . Glutamik asitten GABA sentezini katalizleyen glutamat dekarboksilaz kofaktör olarak piridoksal fosfata gereksinim duyar. B6 vitamini eksikliği romatoid artrit, karaciğer hastalığı, alkolizm, diabetes mellitus , ateroskleroz ve bazı malignansilerde bildirilmiştir (97).

Amadorinler Amadori ürününün AGE'lere dönüşümünü inhibe eden bileşiklerdir. Piridoksamin (Piridorin) bu sınıfın ilk üyesi olarak denenmiştir. Terapötik potansiyeli halen araştırılmaktadır. Hayvan modellerinde umut verici sonuçlar alınmaktadır (146).



Şekil 2-13: Amadorinler

AGE ve ileri lipoksidasyon son ürünü (ALE) formasyonunu in vitro, hiperglisemik ve hipoglisemik hayvan modellerinde proteinlerin kimyasal modifikasyonunu inhibe eder (99,113).

Piridoksaminin başlıca iki mekanizma ile AGE oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür. Bunlardan birincisi karbonil gruplarının yakalanması, ikincisi ise metal

iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılmasıdır. Glukoz ve lipid degradasyonu sonucu ortaya çıkan düşük molekül ağırlıklı 1-4 dikarbonil bileşiklerini uzaklaştırır (6,7).

Piridoksamin in vitro efektif ALE inhibitörüdür. AGE inhibisyonundaki mekanizmaların ALE inhibisyonu için de geçerli olduğu öne sürülmektedir (7,20).

Tip 1 (streptozosin modeli deneysel diyabet) ve tip 2 diyabette yapılan birkaç klinik çalışmada oral piridoksaminin diyabetik nefropatiye karşı koruyucu etkileri olduğu görülmüştür. Hiperlipidemide ALE inhibitörü olarak, plazma kolesterol ve trigliserid düzeylerini düşürmüş, renal ve vasküler kollajeni kimyasal modifikasyona ve çapraz bağlara karşı korumuştur (6,164).

Piridoksamin fruktozaminin AGE'lere dönüşümünü inhibe eder ve lipid peroksidasyonu sonucu oluşan aldehid türevlerinden AGE oluşumunu önler. STZ-indüklenmiş diyabetik sıçanlarda dislipidemiye düzeltmiştir ve mikrovasküler komplikasyonlara karşı koruduğu gözlenmiştir (3,22,36,62,146).

Halen piridoksaminle diyabetik nefropatinin tedavisi için araştırmalar yapılmaktadır ve umut verici sonuçlar alınmaktadır. Degenhardt ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada piridorin adlı ilacın iyi tolere edildiği ve ciddi yan etkisinin olmadığı bildirilmiştir (36). Hastalarda UAER'nin % 32 azaldığı bildirilmiştir. 15 hastanın 12'sinde piridorin 300 mg verilmesiyle 45 günde makroalbuminüri mikroalbuminüriye dönmüştür (71).

Diyabetik hastalarda PLP eksikliği saptanmıştır. 120 mg/gün piridoksin verilen hastalarda PLP düzeyi yükselmiş ve total kolesterol ve LDL konsantrasyonları azalmış bulunmuştur (3,30).

2.9.4. Aminoguanidin

Inhibisyonundaki ilk yaklaşım, erken glikasyon ürünlerinden ileri ürünlere geçiş esnasında inhibisyon yapmaktır. Bu amaçla kullanılan aminoguanidin (AG) Schiff baza bağlanarak Amadori ürününe dönüşümünü engeller (40). Ne yazık ki AG ile yapılan klinik çalışmalar diyabetik hastalarda yan etkiler nedeni ile geçici olarak

durdurulmuştur. Uzun dönem AG verilen hayvan çalışmaları B6 eksikliği ve nörotoksisite ile sonuçlanmıştır (71).

Mikrovasküler komplikasyonlara karşı terapötik ajan olarak kullanılmış olan aminoguanidin (Pimagedin) MG'e karşı scavenger etkisi vardır. Ancak, kısa farmakokinetik yarı ömrü etkinliğini kısıtlamaktadır; ayrıca önemli toksik etkileri vardır. Çalışmalarda başarısız bulunmuştur (3,153).

Aminoguanidin uzun yıllardır çok tartışılan bir ilaçtır. Nükleofil hidrazin grubu karbonil grubuna bağlanır ve çapraz bağlanmaları önler. Proteinlerin terminal amino grubundan daha yüksek kimyasal reaktivite gösterir. Bu nedenle glukozun proteinlere bağlanmasını inhibe edici olarak seçilmiştir (100).

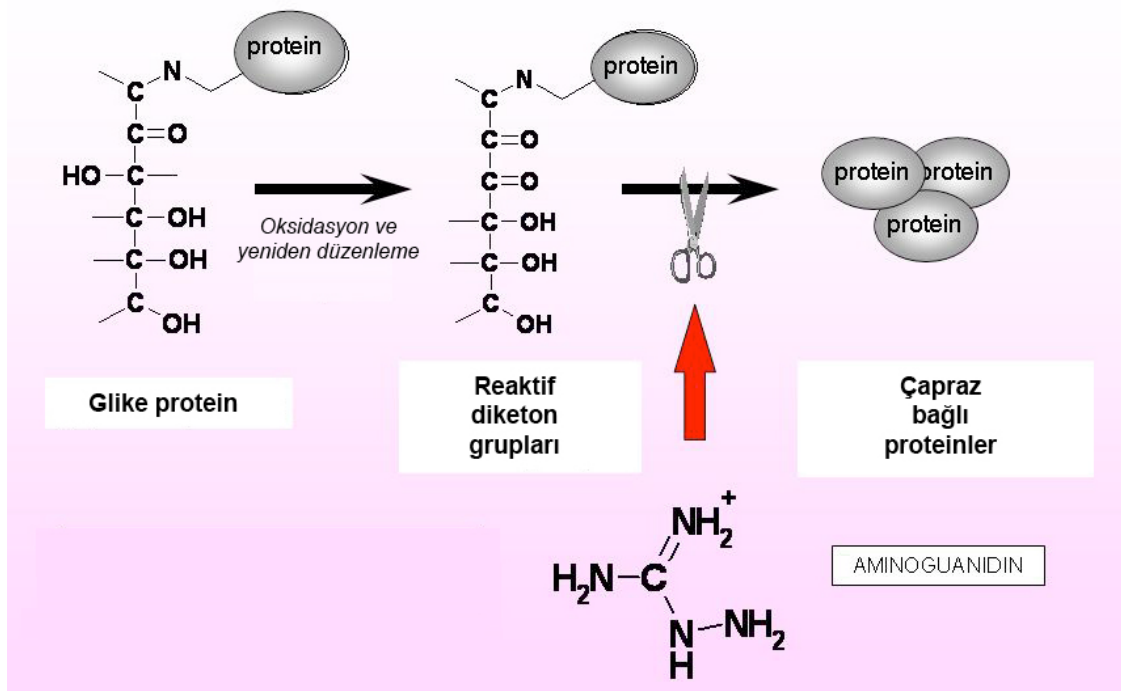
Albüminüriyi azaltır ve glomerüloskleroz gelişimini önler. Glomerül bazal membranında kalınlaşmayı ve mezangiyal genişlemeyi azaltır. Etkileri böbrekle sınırlı değildir. Lens proteininin çapraz bağlanmasını, periferik sinirlerde fonksiyonel anomalileri ve dokularda AGE birikimini önler. Retinadaki oluşan vasküler değişiklikleri yavaşlatır (79).

Primer olarak Amadori ürünü ile reaksiyona girer, karbonil gruplarının ketoaminlere ve türevlerine dönüşümünü bloke eder (100). Ayrıca AGE peptidlerle ve diğer reaktif araçlarla reaksiyona girer, böylece serbest amino grubuna bağlanmayı inhibe eder.

Pek çok hayvan çalışması göstermiştir ki AG diyabetin geç dönem komplikasyonlarını önler veya ilerlemesini geciktirir (100).

Son dönem yapılan çalışmalara göre AG nitrik oksit sentaz (NOS) aktivitesini azaltır. In vitro çalışmalarda AG'nin hidroksil radikalini uzaklaştırdığı görülmüştür. Bazı araştırmacılara göreyse in vivo lipid peroksidasyonunu önler (100).

Ancak otoantikor gelişimi, ilerleyici glomerülo nefrit ve anemi gibi ciddi yan etkileri aminoguanidinin kullanımını sınırlandırır (79).



Şekil 2-14: Aminoguanidinin etki mekanizması (100)

Bir çalışmada n-metilguanido asetik asit (kreatin) ve dimetilbiguanid (metformin) kullanılmıştır. Kreatin spesifik kas dokusu metaboliti, non-toksik biyolojik bir bileşiktir. Metformin tip 2 diyabetli hastalarda kullanılır. Dimetilbiguanid glikasyonun ilerlemesini önler ve Maillard reaksiyonu sırasında oluşan reaktif karbonil bileşiklerini ortadan kaldırır (100).

2.9.5. Fenasil Tiyazol Bromür

AGE'lerin çapraz ve kovalent bağlarını kıran bilinen en iyi madde fenasil tiyazol bromür (PTB) dür (32,100,159).

AGE inhibitörü olarak kabul edilen fenasil tiyazolyum bromür MG'yi temizleyici ve endojen tiyamini potansiyalize edici etkilere sahiptir; ancak stabil değildir ve inaktif ürünlere parçalanır (3,5,45,155,156).

2.9.6. OPB--9195 (İzopropiliden hidrazon-4-okso-tiyazolidin-5-asetanilidin)

Hipoglisemik ajan olarak kullanılan tiyazolidin türevidir. Hidrazon oluşumu sırasında karbonil gruplarıyla reaksiyona girer. Etki mekanizması aminoguanidine benzer ancak daha potent olması beklenmektedir. In vitro çalışmalarda pentozidin

oluşumunu azalttığı in vivo çalışmalarda ise sıçan karotid arterinde neointima oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir (79).

Olmesartan ve OPB-9195 Cu iyonlarıyla şelasyon yapar AG'den daha büyük miktarda, askorbik asidin otooksidasyonunu inhibe eder (33).

Hammes ve arkadaşları AGE'lerle birlikte diyabetik komplikasyon patogenezinde biyokimyasal yollar üzerinde engelleyici olduğunu göstermiştir (59).

2.9.7. Antioksidanlar

GSH, lipoik asid, vitamin E gibi antioksidanların AGE inhibisyonu üzerindeki etkileri halen yoğun bir şekilde tartışılmaktadır. Oksidatif stresi de içine alan, AGE formasyonundaki rolleri ve AGE-RAGE etkileşimindeki etkileri araştırılmaktadır (79).

2.9.8. Antihipertansifler

Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin ve anjiyotensin reseptör-1 antagonistlerinin AGE formasyonunu azalttığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (79,101). Transizyon metallerini şelasyona uğratarak reaktif karbonil prekürsörlerinin üretimini ve hem pre- ve hem de post-Amadori aşamalarında oksidatif basamakları inhibe eder.

Diğer bir AGE inhibisyon yolu reaktif oksijen türlerinin (ROS) blokajıdır. Oksidatif metabolizma RCO'ların jenerasyonu için önemlidir. Olmesartan ve temocaprilat serbest radikaller üzerine etkilidir. Hidroksil radikali oluşumunu ve karbon merkezli radikalleri azaltır (33).

Bu sonuçlar diyabetik ve subtotal nefrektomize ramipril ve losartan tedavisi yapılan sıçanlarda alınmıştır. Benzer sonuçlar nondiyabetik nefropatili ramipril tedavisindeki hastalarda da alınmıştır (48,79,138).

Diğer bir antihipertansif hidralazin ile de şüpheli sonuçlar alınmıştır. Reaktif karbonil bileşiklerini ortadan kaldırmakta ve oksidatif metabolizmayı modifiye etmektedir (79,107).

Ca kanal blokeri nifedipin AGE düzeylerini düşürücü etki göstermediği saptanmıştır (79).

2.9.9. Alagebrium

Fenasiltiyazolyum bromür türevi AGE çapraz bağ kırıcısıdır. Kimyasal olarak B1 vitamini ile ilgilidir. Sıçan diyabet modellerinde alagebriumun çapraz bağ kırıcı aktivitesi ölçülmüştür (164).

Diyabetiklerde artan IgG'nin eritrositlere bağlanmasında azalma görülmüştür. Bilinen klinik hedef diyabette matriks protein kollajenine bağlanan AGE'lerdir. Ayrıca damarları genişlettiği saptanmıştır. Kardiyovasküler sisteme yararlı olduğu hayvan çalışmalarıyla doğrulanmıştır ve diyabetik nefrosklerozda denenmesi önerilmektedir. Renoprotektif potansiyeli ile ilgili henüz çok az bilgi vardır (164).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Araştırmada, İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokronoloji, Metabolizma ve Diyabet Bilim Dalı tarafından izlenen 40 yaş üzeri, insülin kullanmayan, oral antidiyabetik kullanan, Tip 2 diyabetli 57 hastaya ait kan örneklerinde çalışıldı. Hastalara araştırma süresince özel bir diyet uygulanmadı. Deney süresi 5 ay (Ekim 2006-Aralık 2007) olarak planlandı (12,80). Hastalar, poliklinik dosyalarındaki mikroalbüminüri düzeylerine göre iki gruba ayrıldı.

Nefropatisiz Diyabet Grubu (n=30)

Nefropatili Diyabet Grubu (n=27)

Nefropatili diyabet grubuna randomize olarak B1+B6 veya B6 vitamini 5 ay süreyle 250 mg/gün dozunda verildi. Nefropatisiz gruba herhangi bir vitamin uygulaması yapılmadı.

B1+ B6 vitamini verilen nefropatili diyabet grubu (n=15)

B6 vitamini verilen nefropatili diyabet grubu (n=12)

Hasta gruplarından, 5 ay arayla iki kez kan örnekleri alındı ve parametreler analiz edildi.

Plazmada ; glukoz, trigliserid, kolesterol, C-peptid, insülin,AGE peptid

Tam kanda ;glike hemoglobin, TPP ve PLP vitamin düzeyleri çalışıldı.

Plazma kreatinin düzeyleri hasta dosyalarından elde edildi.

HOMA-IR (Homeostasis model assessment:insulin resistance), plazma glukoz ve insülin düzeylerine göre hesaplandı.

Bu süre içerisinde örnekler -80 °C de saklandı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Albumin (Sigma A-2153)

Tris (Sigma: T 9159)

Proteinaz K (Sigma: P 4032)

Glukoz (Sigma: G 7528)

Trikloroasetik asit (TCA) (Riedel-de Haen 33731)

Disodyum hidrojen fosfat (Carlo Erba 480141)

Potasyum dihidrojen fosfat (Merck 4871)

Hidroklorik asit (Carlo Erba : 302626)

Sodyum azid (Riedel-de Haen 13412)

Glukoz kiti (Futura system S.R.l.Liqui glucose enzymatic colorimetric method)

Kolesterol kiti (Futura system S.R.l.Liqui total cholesterol enzymatic colorimetric method)

Trigliserid kiti (Futura system S.R.l.Liqui triglycerids enzymatic colorimetric method)

TPP analiz kiti (CHROMSYSTEMS: 35000)

PLP analiz kiti (CHROMSYSTEMS: 31000)

İnsülin ELİSA kiti (BIOSOURCE: KAP 1251)

C-peptid ELİSA kiti (BIOSOURCE: KAP 0401)

HbA1c kiti (Pronto FAR S.r.l. Enrico Fermi 37026)

3.3. GEREÇLER

Kuru ve EDTA' lı kan alma tüpleri

Terazi

Elektronik tartı (Shimadzu-Libror AEu-210)

- 80° C derin dondurucu (RUA Instrument)

- 20° C derin dondurucu (Indesit)

Buzdolabı

Santrifüj (Christ II KS)

Santrifüj (Heraus)

Eppendorf santrifüj (Sigma)

Vorteks (Elektromag)

Etüv (Heraus)

pH metre (SCHOOT, CG 840)

Spektrofotometre (Shimadzu UV-1201)

Milli-Q HPLC Grade su sistemi

0.22 µm Ultrafree-MC Millipore ependorf filtre

Millipore filtre (Millipore Millex. ,22 µm 13 mm Katalog No : SLGV013NL)

HPLC sistemi Hewlett-Packard

Dörtlü pompa (Quaternary pump)

Vacuum degasser

Autosampler

Diode Array Dedektör (DAD)1100

Fluoresans Dedektör

Laser Jet 6L yazıcı

Bilgisayar Toshiba Satellite U400

Mikropipetler

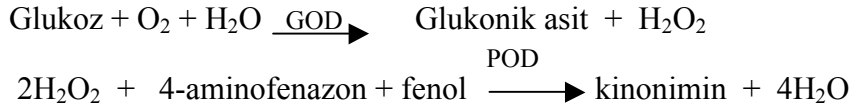
Pasteur pipeti

Eppendorf tüpü

3.4. YÖNTEMLER

3.4.1. GLUKOZ ANALİZİ

Prensip: Glukoz, glukoz oksidaz (GOD) varlığında glukonik asit ve H_2O_2 'e okside edilir. H_2O_2 peroksidaz (POD) varlığında 4-aminofenazon ve fenol ile kırmızı menekşe renkli kinonimin bileşimini oluşturur. Oluşan bu renkli bileşik, belirli dalga boylu ışığı, konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak absorblar.



Glukoz analizi kit kullanılarak yapıldı (50).

Çözeltiler :

Glukoz Ayırıcı :	Fosfat Tamponu	0,1 mol / L, pH 7
	Fenol	10mmol/L
	4-aminofenazon	0.3 mmol / L
	Glukoz oksidaz	≥ 10000 U / L
	Peroksidaz	≥ 1000 U / L
	Sodyum azid	< % 0,1

Glukoz standart çözeltisi: 100 mg / dL

Uygulama :

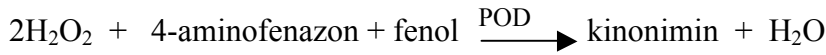
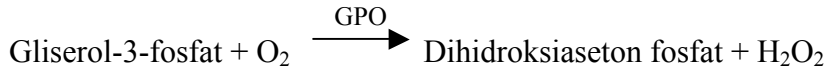
- 1 ml glukoz ayırıcı örnek ve standart etiketli tüplere konuldu.
- Kör olarak işaretli tüpe 1 ml glukoz ayırıcı konuldu.
- Plazma örnekleri ve glukoz standart çözeltisinden 10 μ l alınarak etiketli tüplere ilave edildi.
- 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- 510 nm dalga boyunda köre karşı absorbans ölçüldü.

Hesap :

Glukoz konsantrasyonu (mg / dL) = $A_{örn} / A_{std} \times 100$

3.4.2. TRİGLİSERİD ANALİZİ

Prensip : Trigliseridler lipoproteinlipaz (LPL) varlığında gliserol ve yağ asitlerine hidroliz olurlar. Gliserol gliserokinaz (GK) ile gliserol-3-fosfata fosforillendikten sonra gliserol-3-fosfat oksidaz (GPO) ile dihidroksiaseton ve H₂O₂ 'e dönüşür. H₂O₂ peroksidaz (POD) varlığında 4-aminofenazon ve fenol ile kırmızı menekşe renkli kinonimin bileşiğini oluşturur. Oluşan bu bileşiğin 510 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülür.



Trigliserid analizi kit kullanılarak yapıldı (52).

Çözeltiler :

Trigliserid Ayırıcı : Tampon	50 mmol / L, pH 7.5
Fenol	3 mmol / L
4-aminofenazon	0.3 mmol / L
Gliserokinaz	≥ 1000 U / L
Lipoproteinlipaz	≥ 2000 U / L
Peroksidaz	≥ 2000 U / L
GPO	≥ 2500 U / L
ATP	2 mmol / L
Magnezyum klorür	20 mm / L
Sodyum azid	< % 0,1
Tigliserid standart çözeltisi: Gliserol	200 mg / dL

Uygulama :

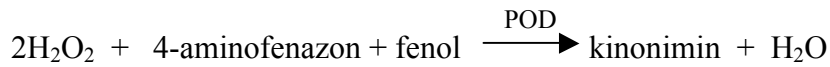
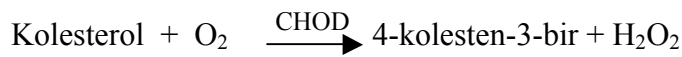
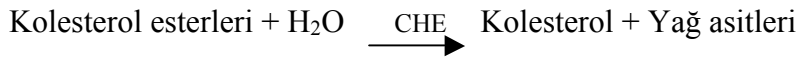
- 1 ml ayıraç örnek ve standart etiketli tüplere konuldu.
- Kör olarak işaretli tüpe 1 ml trigliserid ayırıcı konuldu
- Plazma örnekleri ve trigliserid standart çözeltisinden 10 µl alınarak ilave edildi.
- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 520 nm dalga boyunda köre karşı absorbands ölçüldü.

Hesap :

$$\text{Trigliserid (mg / dL)} = A_{\text{örn}} / A_{\text{std}} \times 200$$

3.4.3. TOTAL KOLESTEROL ANALİZİ

Prensip : Kolesterol esterleri, kolesterol esteraz (CHE) varlığında yağ asitleri ve serbest kolesterole hidroliz olurlar. Daha sonra kolesterol, kolesterol oksidaz (CHOD) ile 4-kolesten-3-bir ve H₂O₂'e oksitlenir. H₂O₂ peroksidaz (POD) varlığında 4-aminofenazon ve fenol ile kırmızı menekşe renkli kinonimin bileşiğini oluşturur. Oluşan bu bileşiğin 520 nm dalga boyundaki absorbandsı ölçülür.



Kolesterol analizi kit kullanılarak yapıldı (51).

Çözeltiler :

Kolesterol Ayırıcı : Tampon	50 mmol / L, pH 6.8
Fenol	3 mmol / L
4-aminofenazon	0.28 mmol / L
Kolesterol esteraz	≥ 300 U / L
Kolesterol oksidaz	≥ 300 U / L
Peroksidaz	≥ 2000 U / L
Sodyum azid	< % 0,1
ATP	4 mmol / L

Kolesterol standart çözeltisi: 200 mg / dL

Uygulama :

- 1 ml kolesterol ayırıcı örnek ve standart etiketli tüplere konuldu.
- Kör olarak işaretli tüpe 1 ml kolesterol ayırıcı konuldu.
- Plazma örnekleri ve kolesterol standart çözeltisinden 10 μ l alınarak ilave edildi.
- 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
- 520 nm dalga boyunda köre karşı absorbans ölçüldü.

Hesap :

$$\text{Total kolesterol (mg / dL)} = A_{\text{örn}} / A_{\text{std}} \times 200$$

3.4.4. İNSÜLİN ANALİZİ

Prensip : Test, insülinin spesifik epitoplarına karşı monoklonal antikorları kullanır. Kalibratörler ve örnekler, kuyucuklarda kaplı olan monoklonal antikorlar (MAb 1) ile ve HRP ile işaretli monoklonal antikorlarla (MAb 2) reaksiyona girer.

İnkübasyondan sonra MAb 1-insan insülini-MAb 2-HRP şeklinde bir sandviç yapı oluşur. Plaka yıkanarak bağlanmamış enzim işaretli antikorlar uzaklaştırılır. Bağlanmış enzim işaretli antikorlar kromojenik reaksiyon ile ölçülür. Bu amaçla kromojenik

solüsyon ilave edilir ve inkübasyona bırakılır. Stop solüsyonla reaksiyon durdurularak uygun dalga boyunda okuma yapılır.

Kolorimetrik olarak ölçülen absorbans ile insülin miktarı doğru orantılıdır. Kalibrasyon eğrisi çizilir ve örneklerdeki insülin konsantrasyonu eğriden yararlanılarak hesaplanır.

İnsülin analizi kit kullanılarak yapıldı. (BIOSOURCE: KAP 1251) (18)

Çözeltiler :

Anti INS kaplı 96 kuyulu plaka

Konjugat: HRP işaretli monoklonal antikorlar

İnsülin kalibratörleri: 0-500 μ U/ml

Yıkama solüsyonu: Tris-HCl

İnsülin kontrolleri: 1-2 μ U/ml

Kromojen TMB (tetrametilbenzidin)

Stop solüsyonu: H_2SO_4

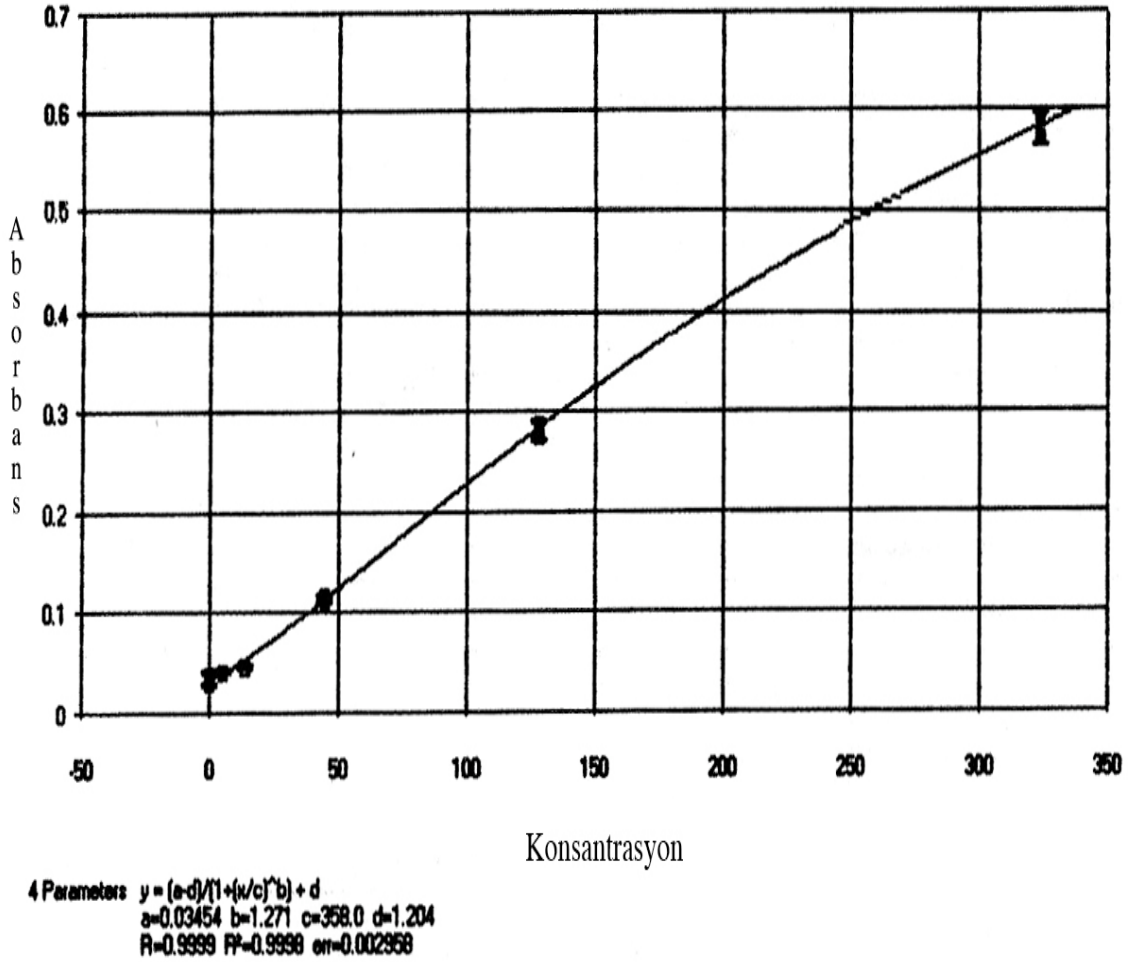
Substrat tamponu: asetat/sitrat tampon

Uygulama :

- Kalibratörler, kontroller, kromojen ve yıkama solüsyonu kittede önerildiği şekilde hazırlandı.
- Kalibratör, kontrol ve örneklerden 50'şer μ l işaretli kuyulara pipetlendi.
- Her kuyuya seyreltilmiş 50 μ l anti-INS-HRP pipetlendi.
- 30 dakika oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyudaki sıvı aspire edildi ve her kuyuya 3 kere 0,4 ml yıkama çözeltisi ilave edilip yıkanmasını takiben kuyu içeriği aspire edildi.
- 200 μ l taze hazırlanmış kromojen her kuyuya pipetlenerek 15 dakika yatay çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyuya 50 μ l stop solüsyonu pipetlendi.

- 450 nm’de 650 nm referans dalga boyuna karşı okundu.

Hesap : Her bir standart konsantrasyonu X eksenine, standartlara ait absorbanslar Y eksenine yerleştirilerek 4-parametrelili lojistik fonksiyon kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerin konsantrasyonları kalibrasyon eğrisinden hesaplandı.



Şekil 3-1: İnsülin standart grafiği

3.4.5. C-PEPTİD ANALİZİ

Prensip: Belirli miktardaki HRP (horseradish peroksidaz) ile işaretlenmiş C-peptid, sınırlı sayıdaki spesifik antikorlara bağlanmak için, kalibratörler, kontroller ve plazma örneklerindeki işaretlenmemiş C-peptid ile yarışır. Oda sıcaklığında 2 saatlik inkübasyondan sonra plaka yarışmalı reaksiyonu durdurmak amacıyla yıkanır.

Kromojenik solüsyon eklenir ve 30 dakika inkübasyona bırakılır. Stop solüsyonun eklenmesiyle reaksiyon sona erdirilir ve plaka uygun dalga boyunda okunur.

C-peptid konsantrasyonu ölçülen absorbans ile ters orantılıdır. Kalibrasyon eğrisi çizilir ve örneklerdeki C-peptid konsantrasyonu eğri kullanılarak hesaplanır.

C-peptid analizi kit kullanılarak yapıldı. (BIOSOURCE: KAP 0401) (17)

Çözeltiler :

Anti C-peptid kaplı 96 kuyulu plaka

Konjugat: HRP işaretli C-peptid

Konjugat tamponu: Tris malat tamponu

C-peptid kalibratörleri: 0-5 pmol/ml

Yıkama solüsyonu: Tris-HCl

C-peptid kontrolleri: 1-2 pmol/ml

Kromojen TMB (tetrametilbenzidin)

Stop solüsyonu: HCl

Uygulama :

- Kalibratörler, kontroller, C-peptid-HRP konjugatı ve yıkama solüsyonu hazırlandı.
- Kalibratör, kontrol ve örneklerden 100'er µl uygun kuyulara pipetlendi.
- Her kuyuya seyreltilmiş 50 µl anti-C-peptid-HRP pipetlendi.
- 2 saat oda sıcaklığında yatay çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyudaki sıvı aspire edildi ve her kuyuya 3 kere 0,4 ml yıkama solüsyonu ilave edilip kuyu içeriği aspire edildi.
- 100 µl kromojenik solüsyon her kuyuya pipetlenerek 30 dakika yatay çalkalayıcıda 700 rpm'de inkübasyona bırakıldı.
- Her kuyuya 100 µl stop solüsyonu pipetlendi.
- 450 nm'de 650 nm referans dalga boyuna absorbanslar okundu.

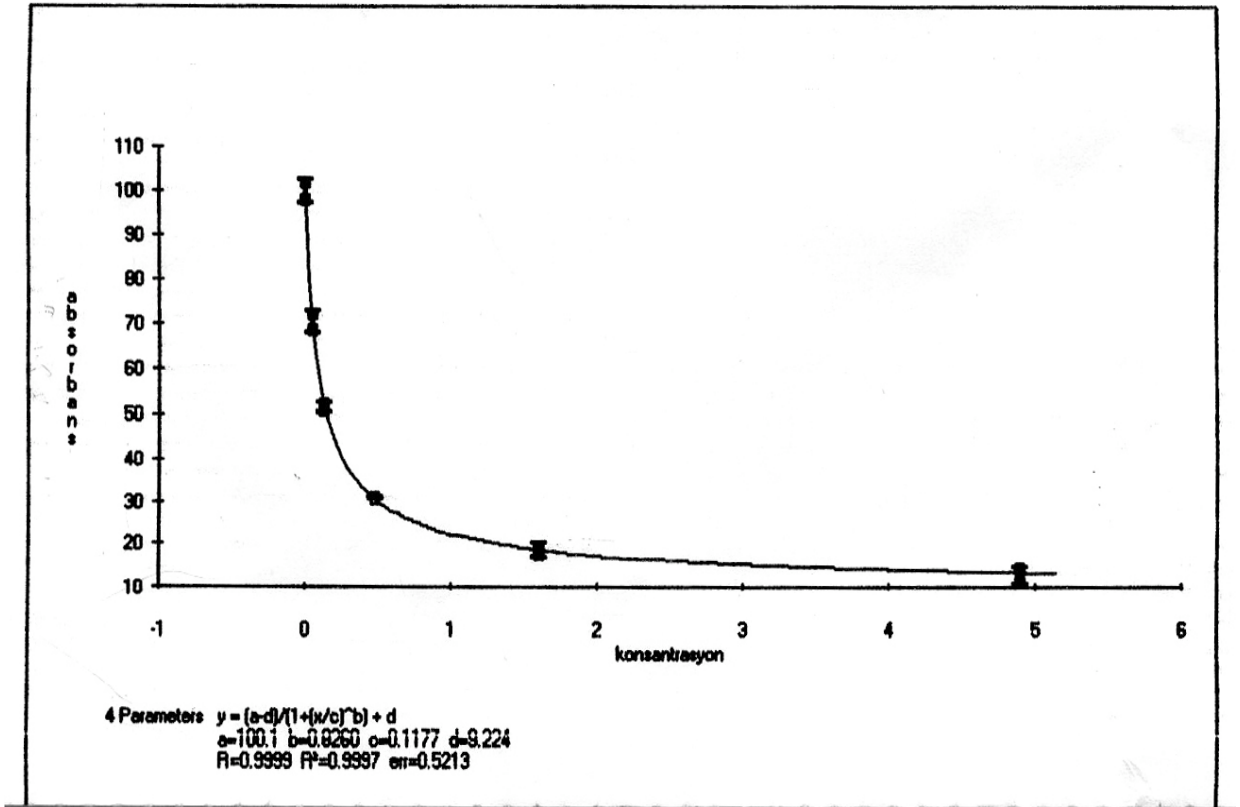
Hesap :

OD (kalibratör / kontrol / örnek)

$$\% B/B_0 = \frac{\text{OD (kalibratör / kontrol / örnek)}}{\text{OD (kalibratör 0)}} \times 100$$

OD (kalibratör 0)

Kalibratörlere ait B/B₀ değerleri Y eksenine, kalibratör konsantrasyonları X eksenine yerleştirilerek 4 parametrelili lojistik fonksiyon kalibrasyon eğrisi çizildi. Örneklerin, % inhibisyon değerleri kullanılarak standart kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonları bulundu.



Şekil 3-2: C-peptid standart grafiği

3.4.6. HEMOGLOBİN A1c ANALİZİ

Prensip: Kan örnekleri, kırmızı kan hücrelerini lize edip, hemoglobin açığa çıkaran ve labil Schiff baz prekürsörlerini uzaklaştıran ayırıcı ile karıştırılır. Sonra Hemoglobinin A1c diğer glikozillenmiş ve glikozillenmemiş hemoglobinlerden katyon değişimi

kromatografisi yöntemi ile ayrılır. Ölçüm, HbA1c fraksiyonunun absorbanşı ile örnekteki hemoglobinleri içeren solüsyonun absorbanşını 415 nm de kıyaslayarak yapılır. Değerler 20-28 derece sıcaklıkta sabit kalır (122).

Çözeltiler:

Ayıraç 1 : Potasyum bifatalat 1x10 ml

Ayıraç 2 : 30 mmol/L tampon, LiCl, pH 6 1x160 ml

Ayıraç 3 : 30 mmol/L tampon, LiCl, pH 6 1x160 ml

Kolonlar : iyon değişimi kromatografisi kolonları

Uygulama:

- 0,050 ml kan örneği 0,200 ml ayıraç 1 ile karıştırılarak hemolizat hazırlandı.
- Hazırlanan kolonlara 15 dakika bekletilmiş 0,050 ml hemolizat pipetlendi. 3 dakika beklendi.
- 4 ml Ayıraç 2 pipetlenerek sıvının tamamen akması sağlandı, eluat atıldı.
- 4 ml Ayıraç 3 ilave edilerek sıvının akması sağlandı. Eluat HbA1c fraksiyonunu içermektedir.
- Eluat toplanarak 415 nm dalga boyunda distile suya karşı ölçüldü.
- Hemolizatta 0,050 ml alınarak 12 ml distile su ile karıştırıldı.
- 415 nm dalga boyunda distile suya karşı ölçüldü.

Hesap:

$$(A_{HbA1c}) / (3 \times A_{Hb\ TOTAL}) \times 100 = \% HbA1c$$

3.4.7. TIYAMİN PİROFOSFAT (TPP) ANALİZİ

Prensip : Tam kanda tiyaminin aktif formu olan tiyamindifosfat'ın izokratik HPLC sisteminde floresans dedektörü kullanılarak direkt ölçülmesine dayanır. Bu ayırimda kitte belirtilen kolon ve mobil faz kullanılır.

Analiz kit kullanılarak yapıldı. (CHROMSYSTEMS: 35000) (28).

Parametreler:

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (autosampler ile)

Akış süresi: 6 dakika

Akış hızı: 1 ml/dakika

Kolon temperaturü: Oda ısısı (~ 20°C)

Fluoresans dedektörü : eksitasyon 367 nm, emisyon 435 nm

Kolon : no.17001

Cihazın analize hazırlanması :

- Kolon yerleştirilmeden önce sistem 50 ml mobil faz ile 1 ml/dakika akış hızında yıkandı.
- Kolon yerleştirildi ve baseline sabitlenene kadar yaklaşık 15-20 dakika boyunca 1 ml/dk akış hızıyla mobil faz geçirilerek, sistemin dengelenmesi sağlandı.
- Önceden hazırlanmış kalibrasyon standardı, iki farklı kromatogram tamamen aynı alıkonulma zamanı ve pik alanını gösterene kadar tekrar tekrar enjekte edilerek sistemin kalibrasyonu sağlandı.
- Mobil faz sirküle edildi.

Kromatografik ayırım : TPP için alıkonulma zamanı 1 ml/dakika akış hızında 3 dakikadır. İşlem zamanı yaklaşık 5-6 dakikadır.

Kalibrasyon standartlarının hazırlanması:

- Liyofilize tam kan kalibrasyon standardına 1 ml distile su ilave edilerek, tam bir rekonstitüsyon sağlanması amacıyla oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.

Kontrollerin hazırlanması :

- Liyofilize kontrollere 2 ml distile su ilave edilerek 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

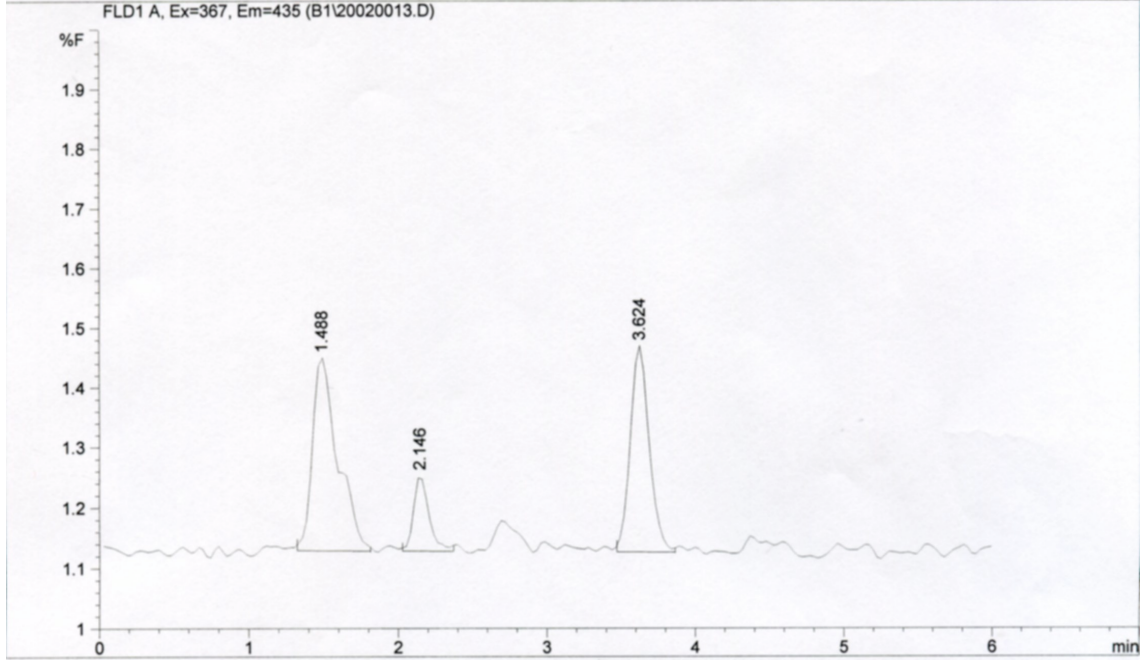
Derivatizasyon karışımının hazırlanması :

- Derivatizasyon çözeltisi 1' e (no.35005) 0.3 ml distile su ilave edildi.

- Bu çözeltiden 100 µl alınarak 2 ml derivatizasyon çözeltisi 2 (no.35006) ile 1:20 oranında karıştırıldı.
- Karışım örneklerin hazırlanmasında derivatizasyon karışımı olarak taze kullanıldı.

Örneklerin hazırlanması :

- Işık geçirmeyen renkli ependorf tüplere 20 µl tam kan örnekleri konuldu ve üzerlerine 100 µl ekstraksiyon tamponu ilave edildi. (no.37003) 2 saniye vortekslendi.
- Üzerlerine 300 µl presipitasyon çözeltisi ilave edildi. (no. 37004) 30 saniye vortekslendi.
- 5 dakika 9000 g'de santrifüj edildi.
- Yeni ependorf tüpler hazırlanarak içlerine 200 µl derivatizasyon karışımı konuldu.
- 100 µl süpernatant eklenerek karıştırıldı.
- 100 µl nötralizasyon tamponu ve 100 µl stabilizasyon tamponu ilave edilerek karıştırıldı.
- 20 dakika beklendi ve içlerinden 50 µl alınarak HPLC sistemine verildi.
- Aynı işlemler kalibratör ve kontroller içinde uygulandı.



Şekil 3-3 TPP kromatogram örneği

Hesap :

$$C_{\text{örnek}} (\mu\text{g/L}) = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \times C_{\text{standart}} (\mu\text{g/L})$$

$A_{\text{örnek}}$ = Örneğin kromatogramdaki pik alanı

A_{standart} = Kalibrasyon standardının kromatogramdaki pik alanı

C_{standart} = Kalibrasyon standardının konsantrasyonu

Referans değerleri:

28-85 $\mu\text{g/L}$

3.4.8. PİRİDOKSAL-5 -FOSFAT (PLP) VİTAMİNİ ANALİZİ

Prensip: Örneklerin hazırlanması sürecinde uygulanan protein presipitasyon ve ekstraksiyon aşamaları optimum koşullarda B6 vitamininin (piridoksal-5-fosfat,PLP) bağlı olduğu bileşiklerden ayrılmasını sağlar. Bunları takip eden dervatizasyon aşaması ise fluorensans veren PLP türevleri oluşturur. Kromatograf ayırım izokratik HPLC sisteminde fluorensans dedektörü ile yapılır.

Analiz kit kullanılarak yapıldı. (CHROMSYSTEMS: 31000) (29).

Parametreler:

Enjeksiyon hacmi: 50 µl (autosampler ile)

Akış süresi: < 8 dakika

Akış hızı : 1.2 ml/dakika

Kolon temperaturü : 25°C

Fluoresans dedektörü : eksitasyon 320 nm, emisyon 415 nm

Kolon : no.17001

Cihazın analize hazırlanması :

- Kolon yerleştirilmeden önce sistem 30 ml HPLC grade su ve ardından 30 ml mobil faz ile 1.3 ml/dakika akış hızında yıkandı.
- Kolon yerleştirildi ve baseline sabitlenene kadar yaklaşık 10 dakika boyunca 1.2 ml/dk akış hızıyla mobil faz geçirilerek, sistemin dengelenmesi sağlandı.
- Önceden hazırlanmış kalibrasyon standardı, iki farklı kromatogram tamamen aynı alıkonulma zamanı ve pik alanını gösterene kadar tekrar tekrar enjekte edilerek sistemin kalibrasyonu sağlandı
- Mobil faz sirküle edildi.

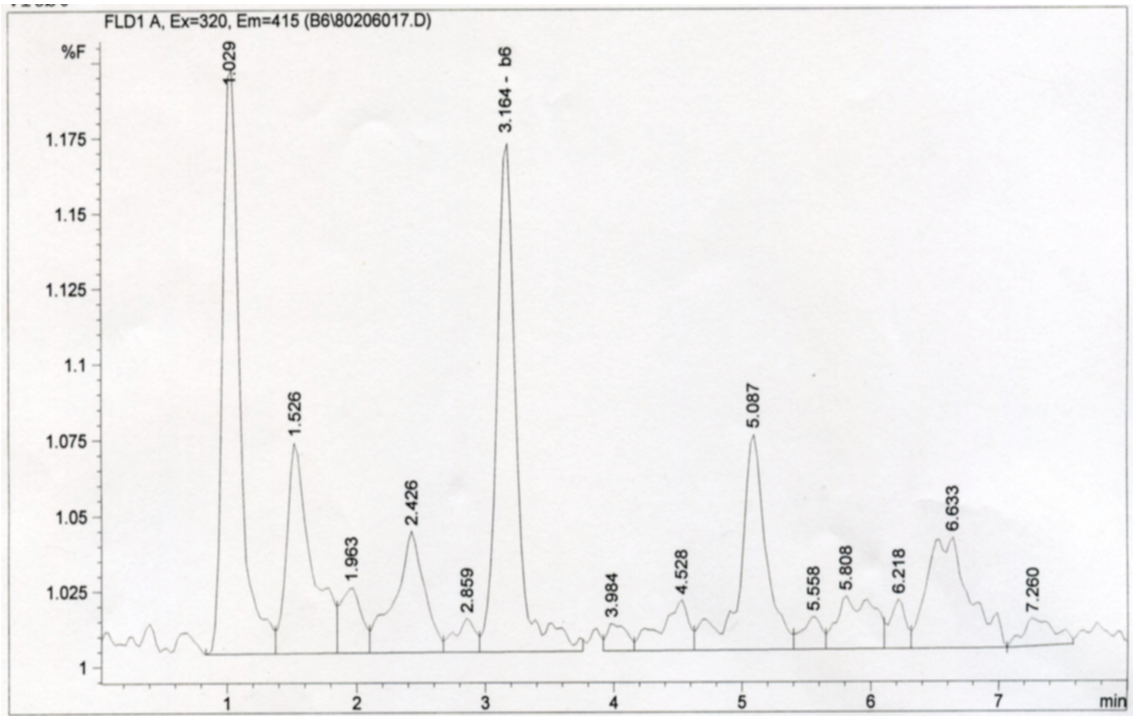
Kromatografik ayırım : PLP için alıkonulma zamanı 1 ml/dakika akış hızında 4 dakikadır.

Kalibrasyon standartlarının hazırlanması: Liyofilize tam kan kalibrasyon standardına 1 ml distile su ilave edilerek, tam bir rekonstitüsyon sağlanması amacıyla oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi.

Kontrollerin hazırlanması : Liyofilize kontrollere 2 ml distile su ilave edilerek 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.

Örneklerin hazırlanması :

- Işık geçirmeyen renkli ependorf tüplere 200 µl tam kan örnekleri konuldu ve üzerlerine 300 µl presipitasyon çözeltisi ilave edildi. 30 saniye vortekslendi.
- Örnekler 10 dakika +4 derecede inkübe edildikten sonra 5 dakika 13000 rpm de santrifüj edildiler.
- 250 µl süpernatant yeni ependorf tüplere aktarıldı. Üzerlerine 250 µl nötralizasyon çözeltisi ilave edilerek hafifçe karıştırıldı.
- 100 µl derivatizasyon çözeltisi eklenerek 20 dakika 60 °C su banyosunda inkübe edildi.
- Örnekler buzda soğutulduktan sonra 10 dakika +4 derecede inkübasyona bırakıldı.
- 2 dakika 13000 rpm de santrifüj edildi.
- Süpernatant autosampler viallere aktarılaraq sisteme 50 µl enjekte edildi.
- Aynı işlemler kalibratör ve kontroller içinde uygulandı.



Şekil 3-4: PLP kromatogram örneği

Hesap :

$$C_{\text{örnek}} (\mu\text{g/l}) = \frac{A_{\text{örnek}}}{A_{\text{standart}}} \times C_{\text{standart}}$$

$A_{\text{örnek}}$ = Örneğin kromatogramdaki pik alanı

A_{standart} = Kalibrasyon standardının kromatogramdaki pik alanı

C_{standart} = Kalibrasyon standardının konsantrasyonu

Referans değerleri:

3.6-18 $\mu\text{g/L}$

3.4.9. PLAZMA %AGE-PEPTİD ANALİZİ

Prensip: Plazma örneklerine ait düşük molekül ağırlıklı AGE-peptidlerin AGE komponentleri floresans, peptid komponentleri ise absorbans ölçülerek analizlendi. HPLC akış sisteminde seri olarak bağlı spektrofotometrik (ex : 247nm, em : 440nm) ve spektrofotometrik (280 nm) dedektörler kullanıldı. Kalibrasyon eğrisi kullanılarak , floresans/ absorbans (F/ A) oranlarından AGE-peptidlerin AGE konsantrasyonları hesaplandı (165).

Çözeltiler:

Fosfat tamponu 0,2 mol/L pH 7.4

Glukoz 0,5 mol/L

Albumin 50 g/L

Proteinaz K 8 g/L

NaCl 9 g/L

Trikloroasetik asit 0,15 mol/L

Kloroform

Metanol

İsopropil alkol

Kalibratörlerin hazırlanması:

- AGE- peptid kalibratörünün hazırlanması : Albumin (50g/L), glukoz (0,5mol/) ile fosfat tamponunda (0,2 mol/L, pH 7,4) 37 °C’de ve karanlıkta 60 gün süreyle inkübe edildi.
- Peptid kalibratörünün hazırlanması : Aynı koşullarda albumin, glukoz içermeyen ortamda inkübe edildi.İnkübasyon süresi sonunda diyaliz yapıldı.
- 90µL AGE-albumin diyalizatına 10µL Proteinaz K (8g/L) eklendi ve karıştırıldı. 37 °C’de ve karanlıkta 24 saat inkübe edildi.
- Albumin diyalizatı Proteinaz K ile aynı koşullarda inkübe edildi.
- İnkübasyonlar sonucunda AGE-peptid ve peptid kalibratörleri elde edildi.1:5 oranında %9 NaCl ile seyreltme yapıldı.
- AGE-peptid kalibratörünün AGE konsantrasyonu %100 olarak kabul edildi.AGE-peptid ve peptid kalibratörleri (0:1), (1:8), (1:5), (1:3), (1:2) oranlarında karıştırılarak peptid konsantrasyonları benzer, AGE konsantrasyonları farklı kalibratörler hazırlandı.

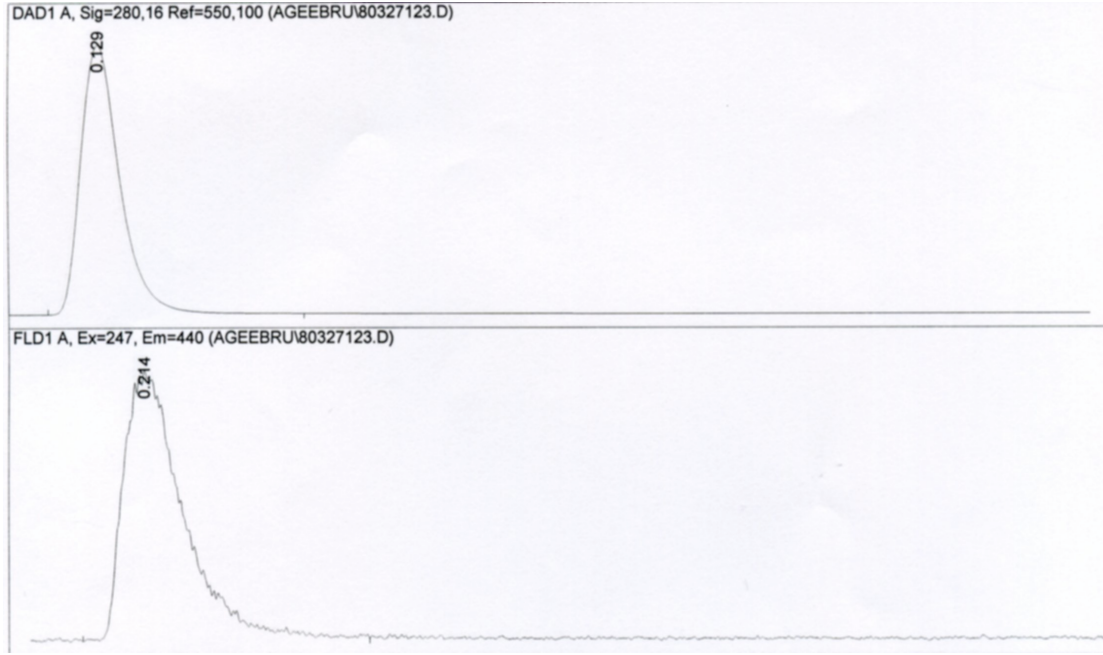
Uygulama:

- Ependorf tüplerine 480µL TCA konuldu.
- 20µL AGE-peptid kalibratörü, plazma ve kör için deiyonize su eklendi.10 dakika bekletildi.
- 100µL kloroform katıldı.Tüpler kuvvetlice çalkalandı. 10 dakika 13000 g’ de santrifüj edildi.
- Süpernatantlar 0.22µm Millipore filtreden süzüldü.Süzüntüler viallere konuldu.

HPLC Sisteminin Analize Hazırlanması ve Floresans-Absorbans Ölçümleri:

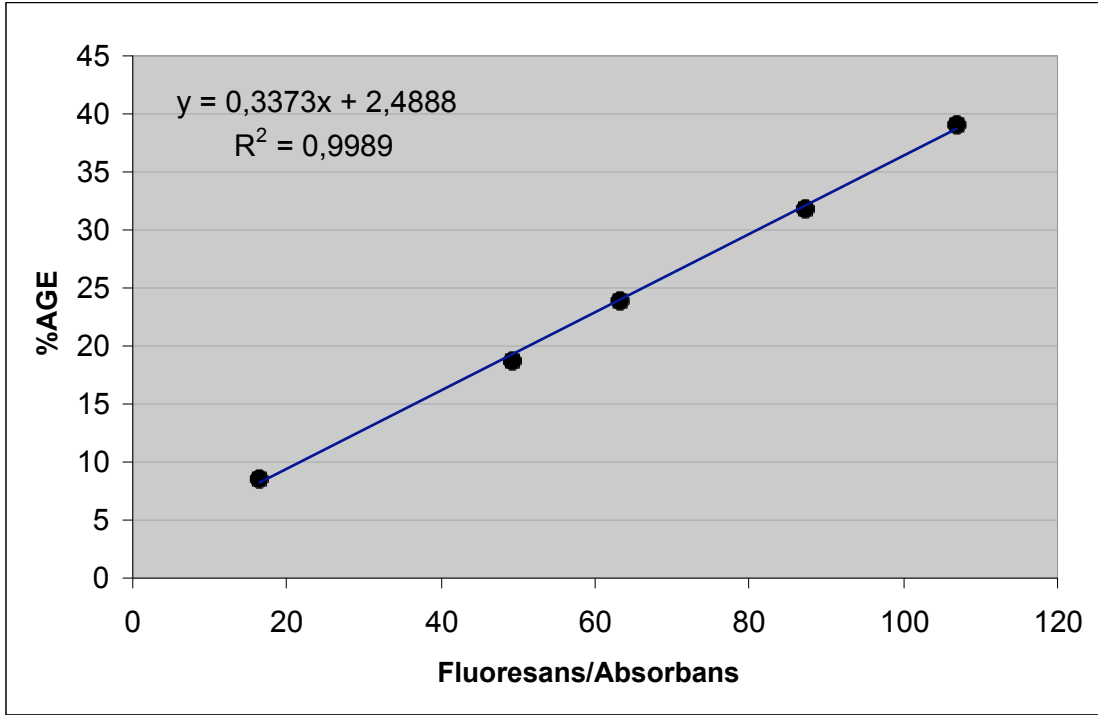
- Deiyonize su Milli-Q HPLC Grade su sistemi ve Waters vakum süzme sisteminde hazırlandı.
- Filtreler ve şişeler ultrasonik banyoda bir kez % 20-60 metanol veya izopropil alkol ile 5 dakika , 2 kez deiyonize su ile 10’ ar dakika yıkandı.
- Tubinglerden 10-15 dakika süre ile deiyonize su geçirilerek hava kabarcığının kalmaması sağlandı.
- Akış hızı 0.5mL/dk değerinde sabit tutuldu.

- Dedektör sinyallerinin bazal düzeye oturrması için yaklaşık15-20 dakika beklendikten sonra peptid absorbansı “Diode Array Detector” (DAD) de 280 nm’de(referans dalga boyu 550 nm) ,AGE fluoresansı fluoresans dedektörde (ex:247nm, em:440nm) (Band genişliği 17nm cut off filter 370nm) ölçüldü.
- Sinyal ölçümünde pik yüksekliği kullanıldı.



Şekil 3-5: AGE kromatogram örneği

- Kör için ölçülen fluoresans ve absorbans değerleri kalibratörler veya örnekler için ölçülen değerlerden çıkarıldı ve fluoresans (F) değerleri absorbans (A) değerlerine bölünerek F/A oranları hesaplandı.
- AGE-peptid kalibratörünün içeriği % 100 olarak kabul edilerek ,diğer AGE-peptid kalibratörlerinin ve peptid kalibratörünün AGE içerikleri hesaplandı.
- Kalibratörlerin F/A oranları y eksenine , %AGE konsantrasyonları x eksenine yerleştirilerek kalibrasyon eğrisi çizildi.
- Kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=0,3373x+2,4888$ olarak hesaplandı.
- Örneklerin %AGE konsantrasyonları eğri denkleminden hesaplandı.



Şekil 3-6: AGE standart eğrisi

3.4.10. HOMA-IR (Homeostasis model assessment: insulin resistance) :

HOMA-IR skoru Matthews tarafından tanımlanan şu formül ile hesaplandı (95);

$$\text{HOMA-IR} = (\text{açlık plazma insülini } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{açlık plazma glukoza (mmol/L)}) / 22,5$$

İnsülin direnci için referans değer yoktur ancak 4,5 değeri önemlidir.

3.5. BULGULARIN İSTATİKSEL DEĞERLENDİRİLMESİ

İki grubun başlangıç değerlerinin karşılaştırılmasında Student's t testi, 5 aylık sürenin başlangıç ve sonundaki grup içi değerlerinin karşılaştırılmasında küçük eşlendirilmiş serilerde t testi kullanıldı. Gruplarda bu süre içinde saptanan farkların karşılaştırılmasında Covariance analizi kullanıldı; nefropatisiz grubun başlangıç değerlerine göre düzeltme yapıldı ve post hoc Bonferroni testi uygulandı.

Gruplarda çalışılan parametreler arasındaki ilişkiler Pearson korelasyon katsayısı ile belirlendi.

4. BULGULAR

Nefropatili ve nefropatisiz diyabet gruplarının klinik özellikleri Tablo 4-1’ de gösterildi.

Deney gruplarında ölçülen parametrelerin değerleri Tablo 4-2 (Nefropatili diyabet grubunda parametrelerin vitamin verilmesinden önce ve 5 ay sonraki değerleri), Tablo 4-3 (Nefropatisiz diyabet grubunda parametrelerin başlangıç ve 5 ay sonraki değerleri), Tablo 4-4 (B1+B6 grubunda parametrelerin vitamin verilmesinden önce ve 5 ay sonraki değerleri) ve Tablo 4-5’de (B6 grubunda parametrelerin vitamin verilmesinden önce ve 5 ay sonraki değerleri) gösterildi.

Tüm deney gruplarının Ortalama $\pm$ SD değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları Tablo 4-6, Tablo 4-7 ve Tablo 4-8’ de gösterildi.

Hasta yaşları, “Nefropatisiz diyabet” grubunda $59,58 \pm 8,07$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $61,29 \pm 9,45$; B1+B6 grubunda $60,26 \pm 9,91$; B6 grubunda $62,58 \pm 9,1$ olarak saptandı. Grupların istatistiksel karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmadı.

VKİ (kg/m²), “Nefropatisiz diyabet” grubunda $31,50 \pm 5,33$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $29,23 \pm 3,41$; B1+B6 grubunda $29,81 \pm 3,50$; B6 grubunda $28,70 \pm 3,38$ olarak saptandı. Grupların istatistiksel karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Diyabet yaşı (yıl), “Nefropatisiz diyabet” grubunda $6,57 \pm 6,14$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $6,57 \pm 5,09$; B1+B6 grubunda $5,9 \pm 4,01$; B6 grubunda $7,18 \pm 6,04$ olarak saptandı . Grupların istatistiksel karşılaştırılmasında anlamlı farklılık saptanmadı.

Açlık plazma glukoz değeri (mg/dL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $132,29 \pm 30,44$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $137,57 \pm 29,35$; B1+B6 grubunda $134,07 \pm 25,65$; B6 grubunda $141,95 \pm 34,07$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $138,42 \pm 21,22$; B1+B6 grubunda $138,22 \pm 22,55$; B6 grubunda $142,27 \pm 23,14$ olarak saptandı.

HbA1c değeri (%), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $7,05 \pm 0,83$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $7,33 \pm 2,02$; B1+B6 grubunda $7,30 \pm 2,42$; B6 grubunda $7,37 \pm 1,45$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $6,78 \pm 0,83$; B1+B6 grubunda $7,02 \pm 1,16$; B6 grubunda $6,14 \pm 0,50$ olarak saptandı. B6 verilen nefropatili diyabet grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra saptanan değerler arasında

istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p=0,033$).B6 grubunun önceki ve sonraki değerleri arasındaki farkın “Nefropatisiz diyabet” grubundaki farka kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ($p=0,020$)

Kreatinin değeri (mg/dL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $1,00\pm0,26$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $1,01 \pm0,31$; B1+B6 grubunda $0,99\pm0,33$; B6 grubunda $1,02 \pm0,33$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $1,00\pm0,26$; B1+B6 grubunda $1,12\pm0,30$; B6 grubunda $1,00 \pm0,21$ olarak saptandı.

İnsülin değeri (μ IU/mL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $16,18\pm9,44$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $18,43 \pm9,30$; B1+B6 grubunda $17,98\pm8,69$; B6 grubunda $19,05 \pm10,48$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $17,08\pm8,67$; B1+B6 grubunda $23,78\pm9,02$; B6 grubunda $18,70 \pm8,21$ olarak saptandı.

HOMA-IR değeri , başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $5,40\pm3,64$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $6,38 \pm3,70$; B1+B6 grubunda $6,04\pm3,16$; B6 grubunda $6,84 \pm4,46$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $5,88\pm3,53$; B1+B6 grubunda $7,83\pm3,04$; B6 grubunda $6,71 \pm3,54$ olarak saptandı.

C-peptid değeri (pmol/mL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $1,81\pm1,54$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $1,80 \pm1,42$; B1+B6 grubunda $1,68\pm1,52$; B6 grubunda $1,94 \pm1,33$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $2,59\pm2,09$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $3,78 \pm1,83$; B1+B6 grubunda $3,77\pm2,08$; B6 grubunda $3,78 \pm1,55$ olarak saptandı. B1+B6 verilen nefropatili diyabet ve B6 verilen nefropatili diyabet gruplarında vitamin verilmesinden önce ve sonra saptanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu ($p=0,006$ ve $p=0,004$). B1+B6 ve B6 verilen nefropatili diyabet gruplarının önceki ve sonraki değerleri arasındaki farklar arasında anlamlı farklılık bulunmadığı saptandı.

Trigliserid değeri (mg/dL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $152,56\pm70,52$; ”Nefropatili Diyabet” grubunda $191,46 \pm128,52$; B1+B6 grubunda $200,49\pm126,81$; B6 grubunda $180,17 \pm135,37$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $204,84\pm79,12$; B1+B6 grubunda $209,95\pm127,09$; B6 grubunda $194,30 \pm82,39$ olarak saptandı.”Nefropatisiz diyabet” grubunun 5 aylık süre sonundaki değerleri ile başlangıç değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,001$).

Kolesterol değeri (mg/dL), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $159,87 \pm 32,03$; ”Nefropatili Diyabet” grubunda $159,23 \pm 29,53$; B1+B6 grubunda $145,29 \pm 19,54$; B6 grubunda $176,64 \pm 31,30$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $154,15 \pm 24,32$; B1+B6 grubunda $151,38 \pm 23,73$; B6 grubunda $164,32 \pm 29,59$ olarak saptandı.

Plazma AGE-peptid değeri (%), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $9,02 \pm 4,68$; ”Nefropatili diyabet” grubunda $16,68 \pm 12,60$; B1+B6 grubunda $13,70 \pm 7,68$; B6 grubunda $20,40 \pm 16,53$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $11,78 \pm 6,91$; B1+B6 grubunda $12,82 \pm 4,76$; B6 grubunda $16,64 \pm 10,23$ olarak saptandı. ”Nefropatili diyabet” grubu ile “Nefropatisiz diyabet” grubunun başlangıç değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu saptandı ($p=0,005$). ”Nefropatisiz diyabet” grubunda 5 aylık süre sonunda saptanan değerler ile başlangıç değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p=0,042$).

TPP değeri ($\mu\text{g/L}$), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $47,61 \pm 13,09$; ”Nefropatili Diyabet” grubunda $47,55 \pm 15,90$; B1+B6 grubunda $47,05 \pm 18,94$; B6 grubunda $48,19 \pm 11,84$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $47,42 \pm 20,13$; B1+B6 grubunda $78,51 \pm 26,42$; B6 grubunda $59,28 \pm 25,01$ olarak saptandı. B1+B6 verilen nefropatili diyabet grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra saptanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu bulundu. ($p=0,001$). B1+B6 grubunun vitamin verilmesinden önceki ve sonraki değerleri arasındaki farkın B6 grubundaki farka kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu bulundu ($p=0,036$).

PLP değeri ($\mu\text{g/L}$), başlangıçta “Nefropatisiz diyabet” grubunda $17,26 \pm 11,92$; ”Nefropatili Diyabet” grubunda $24,96 \pm 25,50$; B1+B6 grubunda $25,42 \pm 25,03$; B6 grubunda $24,40 \pm 27,19$; **5 aylık süre sonunda** “Nefropatisiz diyabet” grubunda $24,57 \pm 30,70$; B1+B6 grubunda $108,88 \pm 79,69$; B6 grubunda $125,17 \pm 110,92$ olarak saptandı.” B6 verilen nefropatili diyabet grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra saptanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark olduğu bulundu ($p=0,004$).

Tablo 4-1: Nefropatili ve nefropatisiz diyabet gruplarının klinik özellikleri

DN(+) (n=27)	Cinsiyet	Yaş	Diyabet Yaşı (yıl)	VKİ (kg/m ²)	Mikro albüminüri (mg/24sa)	Hipertansiyon*
A.A.	E	59			216	+
İ.K.	E	46	8	38,1	45	-
S.Ç.	K	48			55	
N.S.	K	55			111	-
G.C.	K	48	3	30,7	150	-
V.Ç.	E	58	5	25,7	87,5	-
S.S.	E	71	10	31,8	30,6	+
A.P.	K	68	10	28,6	39	-
C.S.	E	61			89	
N.Ö.	K	65	12	32	40	+
K.U.	E	75	3	26,6	32	-
S.G.	K	75	11	28,1	30	+
B.M.	E	66		28,2	112	+
S.Ç.	K	66	5	30,3	30	+
E.B.	K	59	5	29,9	190	+
K.Ö.	E	58	20	23	46	+
S.Ö.	K	65	2	25,3	37	+
R.A.	K	75	5	26,3	35	+
Ş.T.	E	60	2	26,8	154	+
N.Ö.	E	60	2	27	81	-
M.Ü.	E	45	3	35,8	46	-
H.A.	E	51		27,5	34,4	-
M.K.	E	58	17	27,8	77	
C.K.	E	73	6	28,7	45	+
R.T.	K	70	4	31,2	94	+
Ş.S.	E	48	1	30,9	33	+
N.Y.	E	72	4	32,1	117	+
Ort		61,30	6,57	29,23	76,17	
SD		9,45	5,09	3,41	52,20	

DN(-) (n=30)	Cinsiyet	Yaş	Diyabet Yaşı (yıl)	VKİ (kg/m ²)	Mikro albüminüri (mg/24sa)	Hipertansiyon*
A.A.	K	57	1	35,1	6,6	+
M.G.	K	68	1	26,2	6	+
G.G.	K	56	4	25,3	6	-
O.K.	E	57	7	25,4	4	+
S.K.	E	61	5	29,1	7,5	+
K.Ç.	K	59	10	36,9	11	+
H.G.	E	67	9	32,8	16,5	+
Z.K.	K	57			7,5	
B.A.	K	60	1	32,3	6	+
G.E.	K	47	3	42,8	8	-
H.K.	E	56		34,9	10	+
B.Y.	K	66	10	37,4	10	+
H.K.	E	59	6	37,2	6	+
N.Y.	K	54	3	33,5	20	-
R.A.	K	81	2	25	11	+
R.Ç.	E	47	2	24,3	9	-
G.E.	K	48	1	23	9	+
Z.S.	K	47	13	38,5	10	+
R.K.	E	63	6	28,7	5,2	-
H.E.	K	58	1	37,5	7,5	-
H.A.	K	56	16	32,9	9	+
A.T.	K	58		30,9	13,5	+
M.D.	K	64	20	31,2	8,5	+
Ş.K.	E				12,2	+
A.E.	E	58	2	22,5	13,2	-
N.S.	K	60	6	36,1	8,1	+
Y.T.	E	67	5	31,9	10,5	+
İ.S.	E	52	8	26,8	5	+
A.A.	K	70	25	35	8	-
M.G.	E	75	4	29	8,4	-
Ort		59,59	6,58	31,51	9,11	
SD		8,07	6,15	5,34	3,45	

* $\geq 130 / 80$ mmHg (27).

Tablo 4-2: Nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri

Hasta n=27	Glukoz (mg/dL)		HbA1c %		Kreatinin (mg/dL)		İnsülin (μ IU/mL)		HOMA-IR		C-peptid (pmol/ml)		Trigliserid (mg/dL)		Kolesterol (mg/dL)		AGE %		TPP (μ g/L) tam kan		PLP (μ g/L) tam kan	
	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra
A.A.	118,11	109,79	6,10				8,94	10,75	2,61	2,91	5,14	3,87	179,71	135,21	84,61	122,20	8,57	12,75	50,21	110,68	9,54	203,92
İ.K.	104,60	103,14	6,00	6,10	1,10	1,76	36,26	21,78	9,36	5,55	2,62	1,40	205,00	223,18	166,43	142,85	15,86	14,92	31,05	63,75	13,83	58,16
S.Ç.	153,42	139,16			0,70		8,30	15,61	3,14	5,36	0,84	0,50	393,38	633,80	143,12	174,52	10,23	9,20	33,85	64,89	8,05	280,82
N.S.	114,38	177,16					16,68		4,71		1,25	4,16	171,90	237,68	134,37	154,94	32,25	12,79	29,87	62,23	14,51	69,23
G.C.	107,64	138,58	5,60	5,40			14,37	38,23	3,82	13,08	0,48	2,19	87,36	142,02	148,36	131,86	8,43	14,92	43,11	68,00	13,09	118,25
V.Ç.	154,88	146,45	7,10	7,00		0,90	18,95	18,47	7,25	6,68	0,24	1,41	92,95	182,60	149,54	142,85	13,28	14,92	30,61	32,22	22,42	24,27
S.S.	106,72	154,33	5,90	6,20		1,20	22,30	19,99	5,88	7,62	1,46	1,90	57,89	202,89	221,09	146,15	8,06	7,87	66,71	66,16	14,01	14,51
A.P.	127,58	151,04	6,60	7,10		1,21	14,37	15,61	4,53	5,82	1,13	4,16	483,09	211,26	153,75	143,94	10,55	9,71	52,80	104,20	10,82	53,11
C.S.	137,92	127,97					30,43	19,59	10,36	6,19	0,65	7,54	249,47	250,70	149,81	193,63	14,21	6,93	54,11	122,29	10,75	131,79
N.Ö.	161,18	159,44	7,50	7,10	0,80	0,96	24,95		9,93		1,51	4,16	115,00	143,66	162,23	182,16	12,13	14,35	26,21	58,58	11,23	65,83
K.U.	147,40	148,95	6,50		1,60		10,79	31,73	3,93	11,67	5,14	4,16	62,10	154,93	136,72	115,92	5,38	7,79	34,20	95,94	44,34	194,28
S.G.	140,80	155,94	7,10	8,20	0,80	0,79	16,68	23,94	5,80	9,22	0,81	5,48	107,04	118,31	165,16	187,26	8,24	13,33	81,63	114,56	105,10	204,38
B.M.	123,54	139,16		7,90		1,00	25,04	26,58	7,64	9,13	0,77	1,67	120,00	219,71	142,54	147,77	5,40	8,06	57,53	86,03	30,31	104,60
S.Ç.	130,76	122,36					22,30	10,75	7,20	3,25	1,24	3,30	177,50	135,21	211,18	165,60	7,60	10,98	52,77	38,27	9,43	84,46
E.B.	179,81	109,09	6,30	6,10	0,75			12,62		3,40	5,14	5,10	50,52	194,36	158,54	133,75	16,31	14,92	53,83	97,57	21,40	140,50
K.Ö.	142,20	148,95	10,20	6,90	1,10		5,67	12,62	1,99	4,64	0,77	2,70	58,94	163,38	187,63	147,77	7,40	12,38	63,64	57,96	105,31	356,85
S.Ö.	181,34	116,08	6,80	5,30	0,80	0,80	32,56	12,01	14,58	3,44	1,75	1,74	86,31	118,31	212,36	132,48	9,50	9,48	47,56	49,61	10,01	9,57
R.A.	95,40	111,84	6,70	5,90	0,70	0,84	8,30	17,91	1,96	4,95	4,14	4,15	276,05	192,50	181,98	144,05	16,26	9,81	30,38	24,22	10,68	75,03
Ş.T	85,63	157,23	7,90	6,10	1,50	1,17	5,69	29,68	1,20	11,52	1,80	4,14	384,50	372,50	199,39	151,04	48,80	40,11	43,64	113,00	13,47	429,63
N.Ö.	96,83	101,52	6,50	5,90			5,69	23,40	1,36	5,87	1,48	7,50	256,33	251,22	153,75	128,76	23,02	15,14	29,97	84,80	13,62	88,71
M.Ü.	161,84	172,36					17,25	12,01	6,89	5,11	1,20	7,54	470,00	337,50	151,04	218,18	10,23	9,48	41,10	53,33	15,60	19,19
H.A.	151,43	155,92					36,79	23,40	13,76	9,01	1,78	4,16	107,04	215,00	121,92	153,84	54,15	26,07	37,61	61,30	15,65	219,17
M.K.	172,41	167,10					22,30	34,75	9,49	14,34	0,85	3,71	109,85	117,50	156,75	186,01	35,08	18,11	54,00	57,40	44,34	140,98
C.K.	176,14	163,81			1,29		11,40	12,01	4,96	4,86	1,25	2,77	171,83	150,00	177,17	218,18	10,35	28,92	30,68	33,40	21,54	19,31
R.T.	119,68	128,28	7,80	6,50			24,95	27,00	7,37	8,55	1,90	4,19	211,59	132,50	140,65	174,82	21,09	7,82	56,30	59,12	13,54	262,74
Ş.S.	194,48	159,86	14,00	9,20	0,93	1,05	24,50	21,24	11,76	8,38	1,87	4,18	368,11	120,00	136,26	158,04	12,34	10,94	67,20	52,10	32,28	13,54
N.Y.	128,34	115,13		6,30		1,25	13,78	42,16	4,37	11,98	1,34	4,16	115,94	125,00	152,74	144,05	25,62	26,50	83,33	57,40	41,38	22,28
	137,57	140,02	7,33	6,66	1,01	1,08	18,43	21,34	6,38	7,30	1,80	3,78	191,46	202,99	159,23	157,13	16,68	14,51	47,55	69,96	24,96	116,12
	29,35	22,47	2,02	1,03	0,31	0,27	9,30	8,85	3,70	3,27	1,42	1,83	128,52	107,85	29,53	26,77	12,60	7,75	15,90	27,12	25,50	93,23

Tablo 4-3: Nefropatisiz diyabet grubunda 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında çalışılan parametrelerin değerleri

Hasta n=30	Glukoz (mg/dL)		HbA1c %		Kreatinin (mg/dL)		İnsülin (μ IU/mL)		HOMA-IR		C-peptid (pmol/ml)		Trigliserid (mg/dL)		Kolesterol (mg/dL)		AGE %		TPP (μ g/L) tam kan		PLP (μ g/L) tam kan	
	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra
A.A.	106,29	125,17	6,30		0,60		12,60	10,75	3,31	3,32	5,14	1,49	150,72	197,18	108,79	155,41	6,84	10,20	44,63	53,12	11,33	15,39
M.G.	96,85	106,29	7,60	7,00	0,90	0,90		10,11		2,65	2,55	0,87	202,89	109,85	142,85	154,14	7,70	17,24	44,69	43,35	16,40	16,08
G.G.	180,82	106,29	5,90	5,00				13,23		3,47	5,14	1,14	314,04	272,46	143,75	145,05	8,51	11,78	35,75	41,49	19,95	12,25
O.K.	184,58	165,03	7,60	8,60	1,60	1,71	17,25	26,58	7,86	10,83	1,82	0,95	62,80	188,73	127,50	149,04	8,37	38,68	26,22	36,71	10,16	10,20
S.K.	126,71	123,62	6,10	6,40	1,20	1,10	8,94	22,33	2,80	6,82	1,05	8,08	46,28	173,91	131,87	134,06	16,74	9,90	26,55	38,49	16,50	13,75
K.Ç.	154,88	141,95	7,00		1,10		23,95		9,16		1,69	0,87	173,29	154,93	123,12	143,94	8,37	22,41	95,23	140,41	56,63	58,78
H.G.	138,81	155,11	7,90	7,00		1,07	22,85	20,14	7,83	7,71	0,52	0,87	255,00	200,00	174,82	127,47	7,57	14,74	41,23	45,86	10,91	14,42
Z.K.	118,04	126,77					21,19	13,23	6,18	4,14	0,73	0,25	77,89	156,52	146,90	135,16	7,58	11,78	39,55	47,93	6,15	5,22
B.A.	116,51	149,60	7,50				14,95		4,30		0,64	1,29	84,21	214,49	171,63	141,75	4,47	11,78	38,06	35,86	6,37	11,17
G.E.	102,44	112,58					10,18	8,12	2,57	2,26	0,36	1,35	50,52	92,95	165,09	196,17	7,17	12,51	29,09	27,15	10,47	14,22
H.K.	100,00	144,09	5,40	5,60			10,79	3,24	2,66	1,15	0,90	6,83	190,00	324,63	121,67	115,38	5,42	4,09	47,40	46,39	16,06	20,48
B.Y.	85,63	118,89	6,70	6,70	1,10		5,01	11,38	1,06	3,34	1,68	3,16	228,16	347,82	201,21	140,65	7,33	5,99	56,66	44,62	20,09	11,80
H.K.	144,03	152,75	7,10	7,00	0,90	0,90	20,08	25,00	7,14	9,43	0,58	1,94	70,52	243,47	154,90	140,65	6,07	11,99	50,80	40,63	15,60	12,04
N.Y.	159,19	174,82	7,90	8,00	0,90		35,74		14,05		4,97	4,47	216,90	188,73	161,56	200,00	8,53	5,33	54,52	48,76	11,83	23,69
R.A.	125,65	155,94	6,30	6,90	1,20	1,30	17,25	19,59	5,35	7,54	1,16	8,08	177,50	245,07	212,58	159,23	4,66	11,71	61,97	54,33	14,85	11,28
R.Ç.	150,86	83,20	5,90	5,70		0,98	30,43	11,38	11,33	2,34	3,00	2,44	83,09	60,97	124,92	135,61	7,80	4,39	45,19	40,81	17,89	16,02
G.E.	109,48	125,87	6,10	5,80			10,18	9,46	2,75	2,94	0,81	2,77	85,91	107,04	155,55	202,54	13,68	11,78	35,56	25,31	17,55	157,87
Z.S.	135,16	148,95	7,80	7,70			16,11	18,47	5,38	6,79	1,78	4,30	148,42	188,73	144,00	137,58	5,35	6,25	53,39	36,24	18,31	20,53
R.K.	135,52	148,95	8,00	6,50	1,20		10,79	6,73	3,61	2,48	0,73	1,25	95,00	138,02	148,25	177,07	11,21	11,06	36,03	48,53	9,19	17,03
H.E.	187,76	130,51	6,40		0,80	0,75		20,14		6,49	3,09	2,34	149,47	222,53	183,27	135,03	13,68	17,80	53,02	41,43	15,28	15,22
H.A.	161,46	122,13	8,70				11,40	13,83	4,54	4,17	0,85	2,19	134,73	156,09	241,45	126,02	5,43	9,35	52,13	51,51	18,00	17,55
A.T.	107,33	134,26	6,80	6,90	0,80	0,80	3,60	23,40	0,95	7,76	0,76	5,35	116,84	230,98	213,09	171,97	8,80	4,81	56,25	49,17	56,63	18,50
M.D.	94,25	158,04	8,00	7,20		1,05	7,02	16,19	1,63	6,32	1,06	0,80	130,98	230,98	146,54	145,22	8,79	8,78	50,25	74,29	11,57	30,77
Ş.K.	135,53	139,16						17,34		5,96	5,14	1,49	82,50	121,12	144,05	150,31	13,60	11,78	47,94	52,93	8,43	7,06
A.E.	109,86	170,62	6,90	6,90			7,02	6,73	1,90	2,84	0,63	2,53	230,00	366,19	138,13	180,89	27,76	22,23	51,10	40,61	4,70	5,12
N.S.	194,86	130,26	6,40	6,10	0,70	0,82	7,67	20,14	3,69	6,48	0,73	3,02	205,00	150,00	191,60	151,04	4,97	7,57	42,39	26,33	11,70	10,57
Y.T.	111,20	155,24	7,00	6,40		0,82	14,37		3,95		1,01	1,01	240,84	366,19	138,13	180,89	6,98	5,20	59,35	47,80	19,37	26,88
İ.S.	167,52	162,23	7,80	7,50	1,20		31,50	17,34	13,03	6,95	1,01	2,99	130,98	160,56	158,55	142,67	6,98	13,50	43,29	41,27	19,06	19,87
A.A.	121,71	153,94	7,60	6,60	0,85	0,85	11,40	22,86	3,43	8,69	1,05	1,79	215,00	260,00	212,58	206,99	13,38	9,50	55,98	59,53	16,49	96,78
M.G.	105,92	130,26	7,60	7,60			38,36	31,22	10,03	10,04	3,68	1,88	227,50	275,00	167,83	142,65	6,84	9,38	53,98	41,77	30,41	26,66
	132,29	138,42	7,05	6,78	1,00	1,00	16,18	17,08	5,40	5,88	1,81	2,59	152,56	204,84	159,87	154,15	9,02	11,78	47,61	47,42	17,26	24,57
	30,44	21,22	0,83	0,84	0,26	0,26	9,44	8,67	3,64	3,53	1,54	2,09	70,52	79,12	32,03	24,32	4,68	6,91	13,09	20,13	11,92	30,70

Tablo 4-4: B1+B6 verilen nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri

Hasta n=15	Glukoz (mg/dL)		HbA1c %		Kreatinin (mg/dL)		İnsülin (μ IU/mL)		HOMA-IR		C-peptid (pmol/ml)		Trigliserid (mg/dL)		Kolesterol (mg/dL)		AGE %		TPP (μ g/L) tam kan		PLP (μ g/L) tam kan	
	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra
A.A.	118,11	109,79	6,10				8,94	10,75	2,61	2,91	5,14	3,87	179,71	135,21	84,61	122,20	8,57	12,75	50,21	110,68	9,54	203,92
İ.K.	104,60	103,14	6,00	6,10	1,10	1,76	36,26	21,78	9,36	5,55	2,62	1,40	205,00	223,18	166,43	142,85	15,86	14,92	31,05	63,75	13,83	58,16
S.Ç.	153,42	139,16			0,70		8,30	15,61	3,14	5,36	0,84	0,50	393,38	633,80	143,12	174,52	10,23	9,20	33,85	64,89	8,05	280,82
N.S.	114,38	177,16					16,68		4,71		1,25	4,16	171,90	237,68	134,37	154,94	32,25	12,79	29,87	62,23	14,51	69,23
G.C.	107,64	138,58	5,60	5,40			14,37	38,23	3,82	13,08	0,48	2,19	87,36	142,02	148,36	131,86	8,43	14,92	43,11	68,00	13,09	118,25
V.Ç.	154,88	146,45	7,10	7,00		0,90	18,95	18,47	7,25	6,68	0,24	1,41	92,95	182,60	149,54	142,85	13,28	14,92	30,61	32,22	22,42	24,27
A.P.	127,58	151,04	6,60	7,10		1,21	14,37	15,61	4,53	5,82	1,13	4,16	483,09	211,26	153,75	143,94	10,55	9,71	52,80	104,20	10,82	53,11
C.S.	137,92	127,97					30,43	19,59	10,36	6,19	0,65	7,54	249,47	250,70	149,81	193,63	14,21	6,93	54,11	122,29	10,75	131,79
N.Ö.	161,18	159,44	7,50	7,10	0,80	0,96	24,95		9,93		1,51	4,16	115,00	143,66	162,23	182,16	12,13	14,35	26,21	58,58	11,23	65,83
K.U.	147,40	148,95	6,50		1,60		10,79	31,73	3,93	11,67	5,14	4,16	62,10	154,93	136,72	115,92	5,38	7,79	34,20	95,94	44,34	194,28
S.G.	140,80	155,94	7,10	8,20	0,80	0,79	16,68	23,94	5,80	9,22	0,81	5,48	107,04	118,31	165,16	187,26	8,24	13,33	81,63	114,56	105,10	204,38
B.M.	123,54	139,16		7,90		1,00	25,04	26,58	7,64	9,13	0,77	1,67	120,00	219,71	142,54	147,77	5,40	8,06	57,53	86,03	30,31	104,60
N.Ö.	96,83	101,52	6,50	5,90			5,69	23,40	1,36	5,87	1,48	7,50	256,33	251,22	153,75	128,76	23,02	15,14	29,97	84,80	13,62	88,71
Ş.S.	194,48	159,86	14,00	9,20	0,93	1,05	24,50	21,24	11,76	8,38	1,87	4,16	368,11	120,00	136,26	158,04	12,34	10,94	67,20	52,10	32,28	13,54
N.Y.	128,34	115,13		6,30		1,25	13,78	42,16	4,37	11,98	1,34	4,18	115,94	125,00	152,74	144,05	25,62	26,50	83,33	57,40	41,38	22,28
	134,07	138,22	7,30	7,02	0,99	1,12	17,98	23,78	6,04	7,83	1,68	3,77	200,49	209,95	145,29	151,38	13,70	12,82	47,05	78,51	25,42	108,88
	25,65	22,55	2,42	1,16	0,33	0,30	8,69	9,02	3,16	3,04	1,52	2,08	126,81	127,09	19,54	23,73	7,68	4,76	18,94	26,42	25,03	79,69

Tablo 4-5: B6 verilen nefropatili diyabet (DN) grubunda vitamin verilmesinden önce ve sonra çalışılan parametrelerin değerleri

Hasta n=12	Glukoz (mg/dL)		HbA1c %		Kreatinin (mg/dL)		İnsülin (μ IU/mL)		HOMA-IR		C-peptid (pmol/ml)		Trigliserid (mg/dL)		Kolesterol (mg/dL)		AGE %		TPP (μ g/L) tam kan		PLP (μ g/L) tam kan	
	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra	önce	sonra
S.S.	106,72	154,33	5,90	6,20		1,20	22,30	19,59	5,88	7,46	1,46	1,90	57,89	202,89	221,09	146,15	8,06	7,87	66,71	66,16	14,01	14,51
S.Ç.	130,76	122,36					22,30	10,75	7,20	3,25	1,24	3,30	177,50	135,21	211,18	165,60	7,60	10,98	52,77	38,27	9,43	84,46
E.B.	179,81	109,09	6,30	6,10	0,75			12,62		3,40	5,14	5,10	50,52	194,36	158,54	133,75	16,31	18,62	53,83	97,57	21,40	140,50
K.Ö.	142,20	148,95	10,20	6,90	1,10		5,67	12,62	1,99	4,64	0,77	2,70	58,94	163,38	187,63	147,77	7,40	12,38	63,64	57,96	105,31	356,85
S.Ö.	181,34	116,08	6,80	5,30	0,80	0,80	32,56	12,01	14,58	3,44	1,75	1,74	86,31	118,31	212,36	132,48	9,50	9,48	47,56	49,61	10,01	9,57
R.A.	95,40	111,84	6,70	5,90	0,70	0,84	8,30	17,91	1,96	4,95	4,14	4,15	276,05	192,50	181,98	144,05	16,26	9,81	30,38	24,22	10,68	75,03
Ş.T	85,63	157,23	7,90	6,10	1,50	1,17	5,69	29,68	1,20	11,52	1,80	4,16	384,50	372,50	199,39	151,04	48,80	40,11	43,64	113,00	11,34	159,77
M.Ü.	161,84	172,36					17,25	12,01	6,89	5,11	1,20	7,54	470,00	337,50	151,04	218,18	10,23	9,48	41,10	53,33	15,60	19,19
H.A.	151,43	155,92					36,79	23,40	13,76	9,01	1,78	4,16	107,04	215,00	121,92	153,84	54,15	26,07	37,61	61,30	15,65	219,17
M.K.	172,41	167,10					22,30	34,75	9,49	14,34	0,85	3,71	109,85	117,50	156,75	186,01	35,08	18,11	54,00	57,40	44,34	140,98
C.K.	176,14	163,81			1,29		11,40	12,01	4,96	4,86	1,25	2,77	171,83	150,00	177,17	218,18	10,35	28,92	30,68	33,40	21,54	19,31
R.T.	119,68	128,28	7,80	6,50			24,95	27,00	7,37	8,55	1,90	4,16	211,59	132,50	140,65	174,82	21,09	7,82	56,30	59,12	13,54	262,74
	141,95	142,28	7,37	6,14	1,02	1,00	19,05	18,70	6,84	6,71	1,94	3,78	180,17	194,30	176,64	164,32	20,40	16,64	48,19	59,28	24,40	125,17
	34,07	23,14	1,45	0,50	0,33	0,21	10,48	8,21	4,46	3,54	1,33	1,55	135,37	82,39	31,30	29,59	16,53	10,23	11,84	25,01	27,19	110,92

Tablo 4-6: Nefropatili ve nefropatisiz diyabet gruplarında 5 aylık sürenin başlangıcında ORT $\pm$ SD değerleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları

	NEFROPATİLİ DİYABET n=27	NEFROPATİSİZ DİYABET n=30	Student's t- test
Glukoz (mg/dl)	137,57 $\pm$ 29,35	132,29 $\pm$ 30,44	n.s.
HbA1c (%)	7,33 $\pm$ 2,02	7,05 $\pm$ 0,83	n.s.
Kreatinin (mg/dl)	1,01 $\pm$ 0,31	1,00 $\pm$ 0,26	n.s.
İnsülin (μIU/ml)	18,43 $\pm$ 9,30	16,18 $\pm$ 9,44	n.s.
HOMA-IR	6,38 $\pm$ 3,70	5,40 $\pm$ 3,64	n.s.
C-peptid (pmol/ml)	1,80 $\pm$ 1,42	1,81 $\pm$ 1,54	n.s.
Trigliserid (mg/dl)	191,46 $\pm$ 128,52	152,56 $\pm$ 70,52	n.s.
Kolesterol (mg/dl)	159,23 $\pm$ 29,53	159,87 $\pm$ 32,03	n.s.
AGE (%)	16,68 $\pm$ 12,60	9,02 $\pm$ 4,68	p=0,05
TPP (μg/ml)	47,55 $\pm$ 15,90	47,61 $\pm$ 13,09	n.s.
PLP (μg/ml)	24,96 $\pm$ 25,50	17,26 $\pm$ 11,92	n.s.

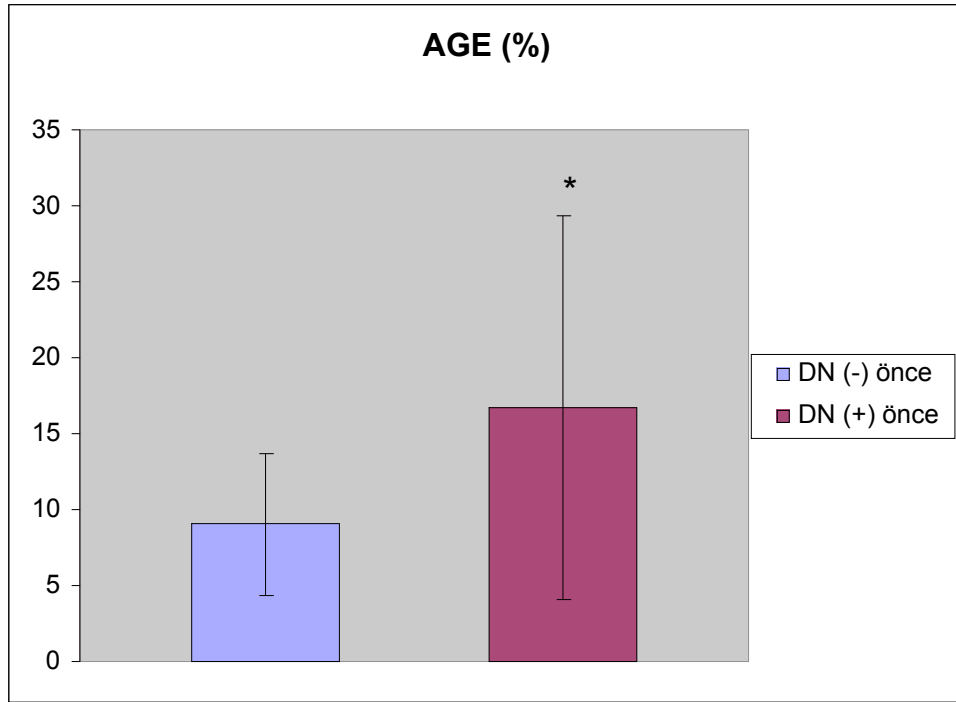
Tablo 4-7: Nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplarda 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında saptanan değerlerin istatistiksel karşılaştırılması

		ÖNCE	SONRA	paired t-test
NEFROPATİLİ DİYABET ORT ±SD n=27	Glukoz(mg/dl)	137,57±29,35	140,02±22,47	n.s.
	HbA1c(%)	7,33±2,02	6,66±1,03	p=0,045
	Kreatinin(mg/dl)	1,01±0,31	1,08±0,27	n.s.
	İnsülin(μIU/ml)	18,43±9,30	21,34±8,85	n.s.
	HOMA-IR	6,38±3,70	7,30±3,27	n.s.
	C-peptid (pmol/ml)	1,80±1,42	3,78±1,83	p<0,001
	Trigliserid(mg/dl)	191,46±128,52	202,99±107,85	n.s.
	Kolesterol(mg/dl)	159,23±29,53	157,13±26,77	n.s.
	AGE(%)	16,68±12,60	14,51±7,75	n.s.
	TPP(μg/ml)	47,55±15,90	69,96±27,12	p<0,001
	PLP(μg/ml)	24,96±25,50	116,12±93,23	p<0,001
NEFROPATİSİZ DİYABET ORT ±SD n=30	Glukoz(mg/dl)	132,29±30,44	138,42±21,22	n.s.
	HbA1c(%)	7,05±0,83	6,78±0,84	n.s.
	Kreatinin(mg/dl)	1,00±0,26	1,00±0,26	n.s.
	İnsülin(μIU/ml)	16,18±9,44	17,08±8,67	n.s.
	HOMA-IR	5,40±3,64	5,88±3,53	n.s.
	C-peptid (pmol/ml)	1,81±1,54	2,59±2,09	n.s.
	Trigliserid(mg/dl)	152,56±70,53	204,84±79,12	p<0.001
	Kolesterol(mg/dl)	159,87±32,03	154,15±24,32	n.s.
	AGE(%)	9,01±4,68	11,78±6,91	p=0.042
	TPP(μg/ml)	47,61±13,09	47,42±20,13	n.s.
	PLP(μg/ml)	17,26±11,92	24,57±30,70	n.s.

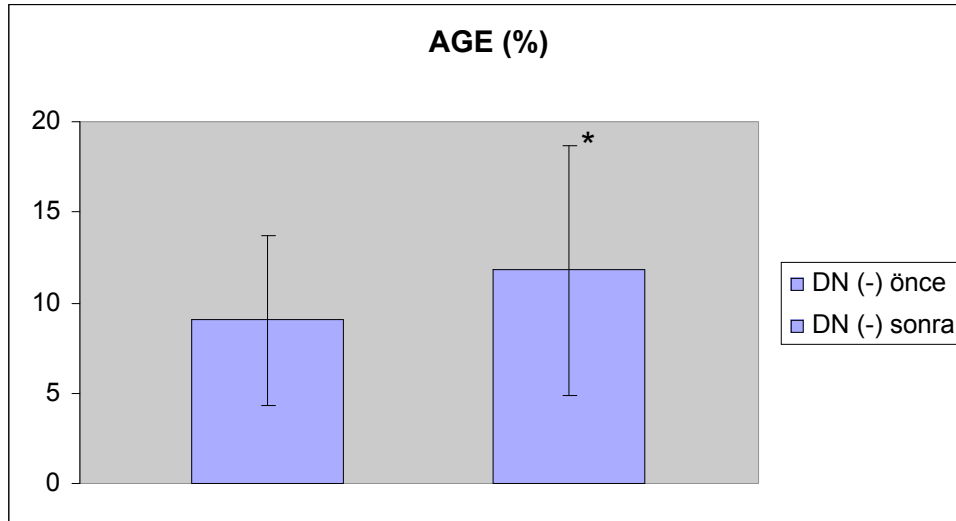
Tablo 4-8: B1+B6 ve B6 verilen DN gruplarında ve nefropatisiz grupta 5 aylık sürenin öncesinde ve sonrasında saptanan değerlerin ve farkların istatistiksel karşılaştırılması

		ÖNCE	SONRA	paired t-test	ANCOVA	
					FARK	Post hoc Bonferroni
DN (+) B1+B6 ORT ±SD n=15	Glukoz(mg/dL)	134,07±25,65	138,21±22,54	n.s.	4,14±23,16	
	HbA1c(%)	7,3±2,42	7,02±1,16	n.s.	-0,55±1,79	
	Kreatinin(mg/dL)	0,98±0,32	1,07±0,27	n.s.	1,11±0,30	
	İnsülin(μIU/mL)	17,98±8,68	23,77±9,02	n.s.	6,23±13,14	
	HOMA-IR	6,03±3,16	7,83±3,03	n.s.	1,99±4,44	
	C-peptid(pmol/mL)	1,68±1,52	3,76±2,08	p=0,006	2,08±2,50	
	Trigliserid(mg/dL)	200,49±126,81	209,95±127,09	n.s.	9,46±127,94	
	Kolesterol(mg/dL)	145,29±19,53	151,38±23,72	n.s.	6,09±23,41	
	AGE(%)	13,70±7,68	12,81±4,76	n.s.	-0,88±6,51	
	TPP(μg/mL)	47,04±18,94	78,51±26,42	p=0,001	31,46±27,33	p<0,001 a
	PLP(μg/mL)	25,42±25,02	108,88±79,69	p<0,001	83,46±78,99	p=0,02 a
DN (+) B6 ORT ±SD n=12	Glukoz(mg/dL)	141,94±34,07	142,27±23,141	n.s.	0,33±39,79	
	HbA1c(%)	7,37±1,44	6,14±0,49	p=0,033	-1,22±1,17	p=0,02 c
	Kreatinin(mg/dL)	1,02±0,32	1,00±0,21	n.s.	-0,06±0,24	
	İnsülin(μIU/mL)	19,04±10,48	18,69±8,21	n.s.	0,20±12,82	
	HOMA-IR	6,84±4,45	6,71±3,53	n.s.	1,68±5,61	
	C-peptid(pmol/mL)	1,94±1,33	3,78±1,55	p=0,004	1,84±1,76	
	Trigliserid(mg/dL)	180,16±135,36	194,30±82,38	n.s.	14,13±93,49	
	Kolesterol(mg/dL)	176,64±31,30	164,32±29,59	n.s.	-12,31±49,96	
	AGE(%)	20,40±16,52	16,63±10,22	n.s.	-3,76±12,01	
	TPP(μg/mL)	48,18±11,83	59,27±25,00	p<0,036	11,09±23,87	p=0,036 b
	PLP(μg/mL)	24,40±27,19	125,17±110,92	p<0,001	100,77±95,48	p<0,001 c
DN (-) ORT ±SD n=30	Glukoz(mg/dL)	132,29±30,44	138,42±21,22	n.s.	6,13±35,99	
	HbA1c(%)	7,05±0,83	6,78±0,84	n.s.	-0,24±0,56	
	Kreatinin(mg/dL)	1,00±0,26	1,00±0,26	n.s.	0,02±0,75	
	İnsülin(μIU/mL)	16,18±9,44	17,08±8,67	n.s.	2,35±8,94	
	HOMA-IR	5,40±3,64	5,88±3,53	n.s.	1,15±3,25	
	C-peptid(pmol/mL)	1,81±1,54	2,59±2,09	n.s.	0,78±2,74	
	Trigliserid(mg/dL)	152,57±70,53	204,84±79,12	p<0,001	52,27±68,46	
	Kolesterol(mg/dL)	159,87±32,03	154,15±24,32	n.s.	-5,72±37,82	
	AGE(%)	9,01±4,68	11,78±6,91	p=0,042	2,76±7,11	
	TPP(μg/mL)	47,60±13,09	47,42±20,13	n.s.	-0,18±12,96	
	PLP(μg/mL)	17,26±11,92	24,57±30,70	n.s.	7,31±30,45	

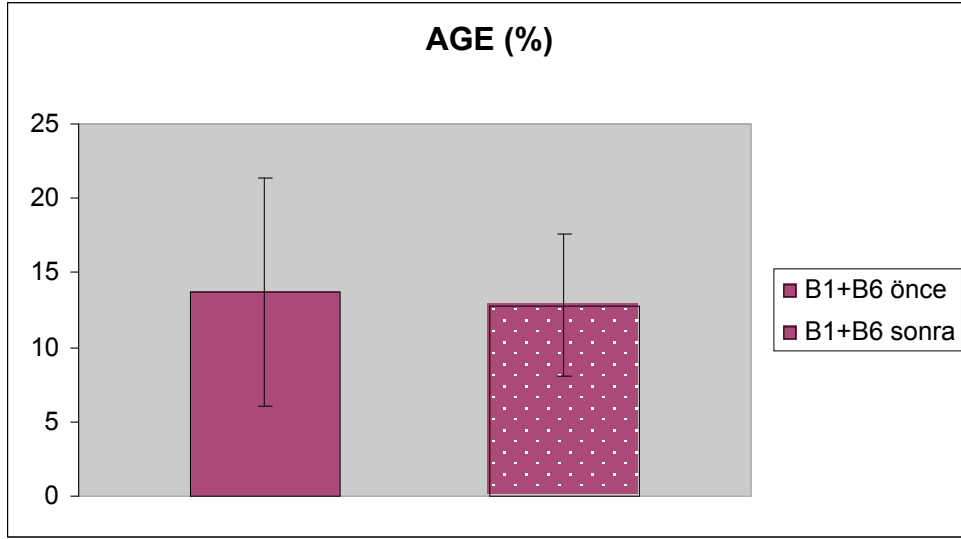
a= B1+B6 vs Nefropatisiz; b= B1+B6 vs B6; c= B6 vs Nefropatisiz



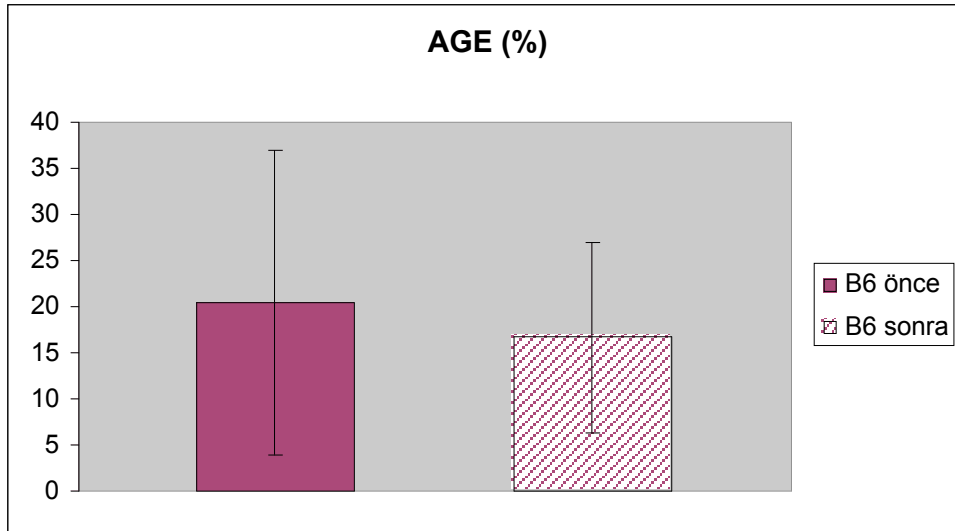
Grafik 4-1: Grupların plazma AGE (%) düzeyi histogramı



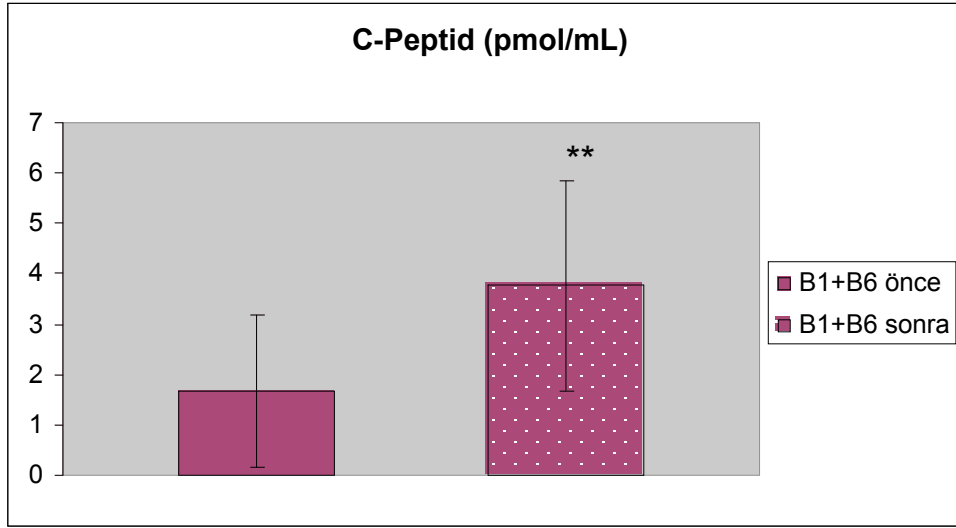
Grafik 4-2: Grupların plazma AGE(%) düzeyi histogramı



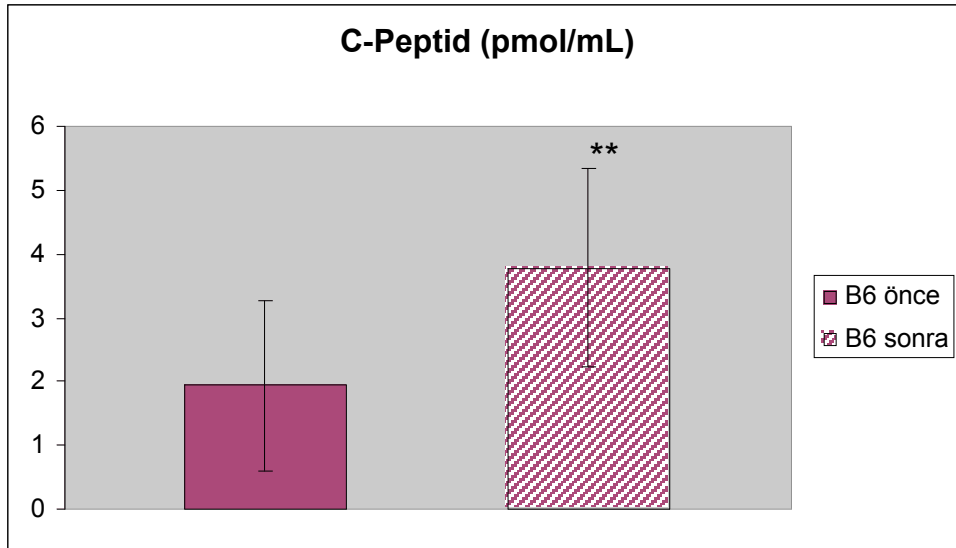
Grafik 4-3: Grupların AGE-peptid (%) düzeyi histogramı B1+ B6



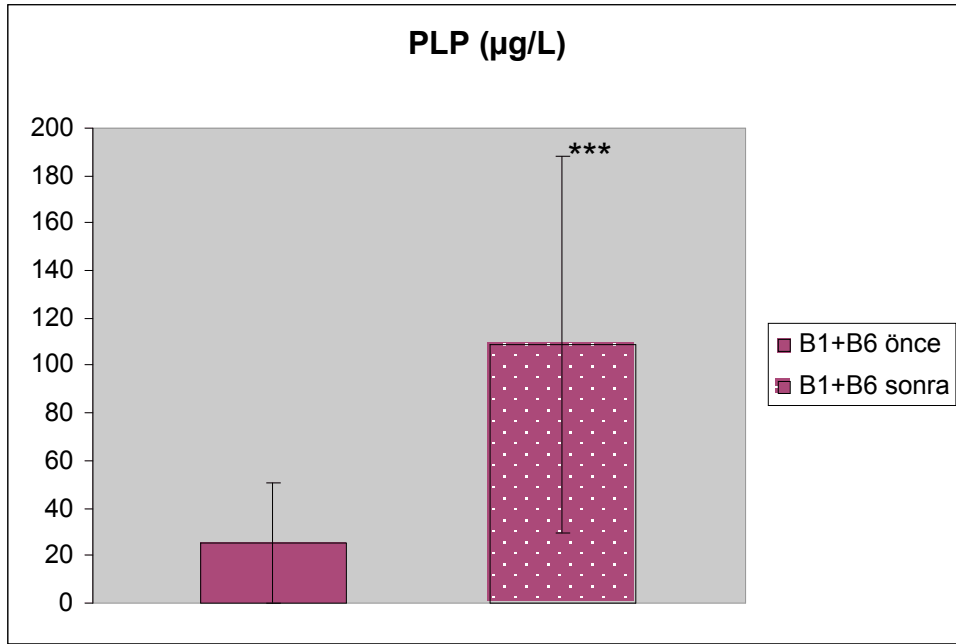
Grafik 4-4: Grupların AGE-peptid (%) düzeyi histogramı B6



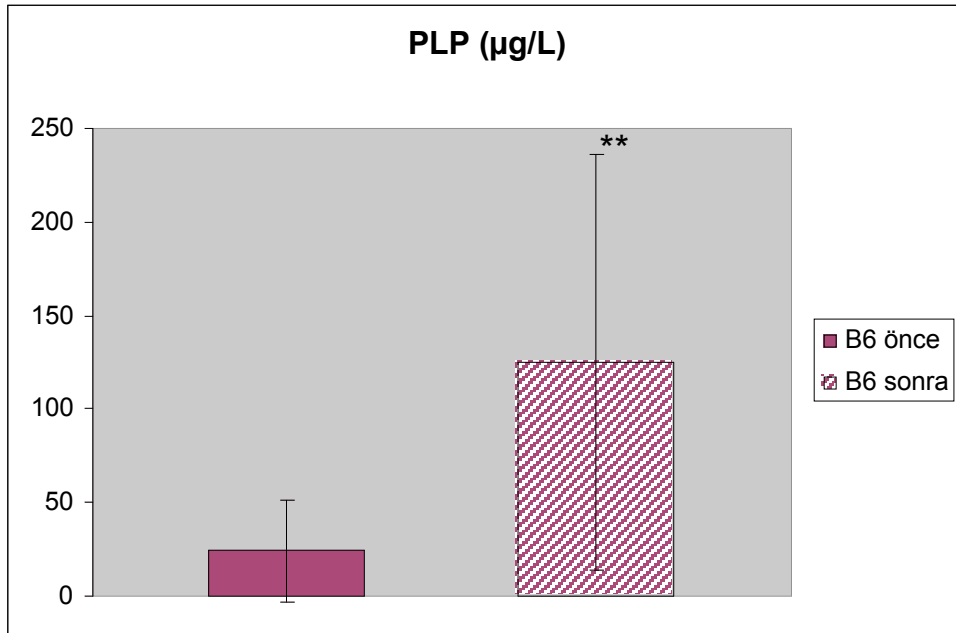
Grafik 4-5: Grupların C-peptid (pmol/mL) düzeyi histogramı



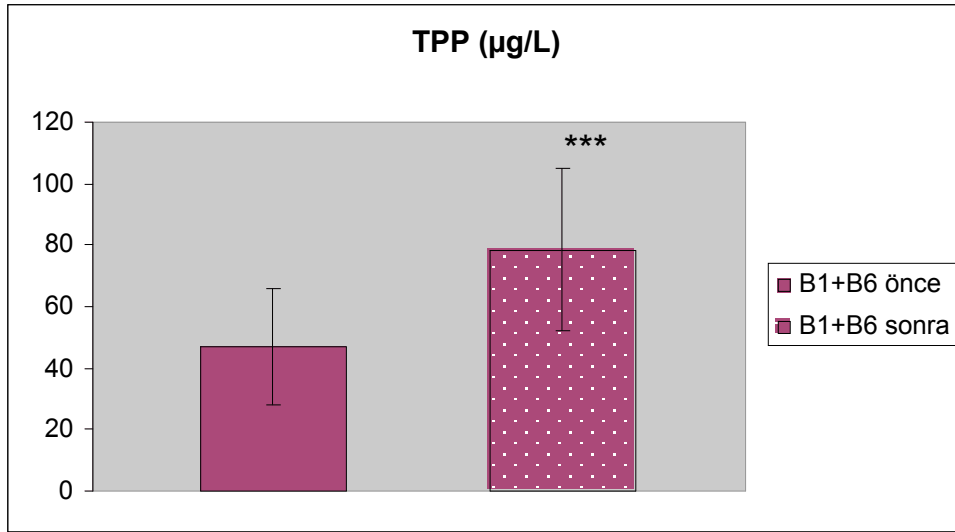
Grafik 4-6: Grupların C-peptid (pmol/mL) düzeyi histogramı



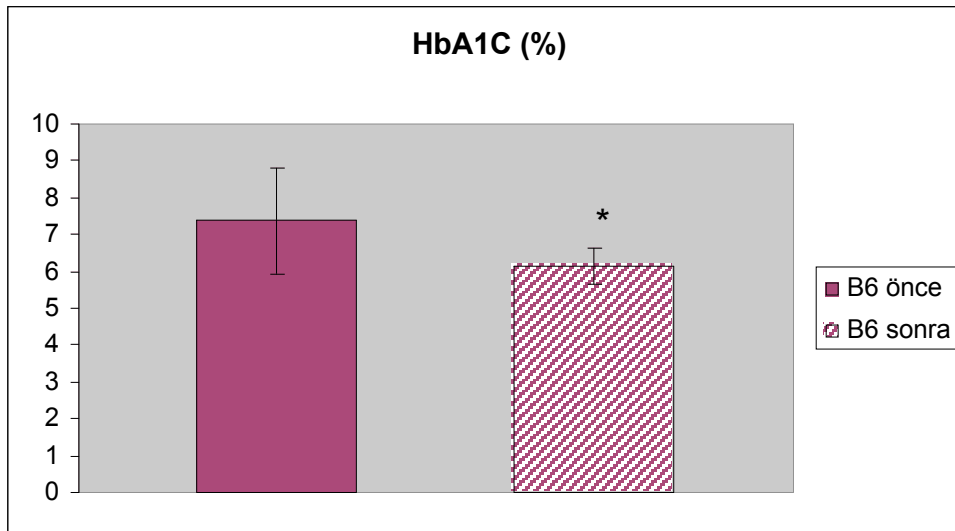
Grafik 4-7: Grupların PLP (µg/mL) düzeyi histogramı



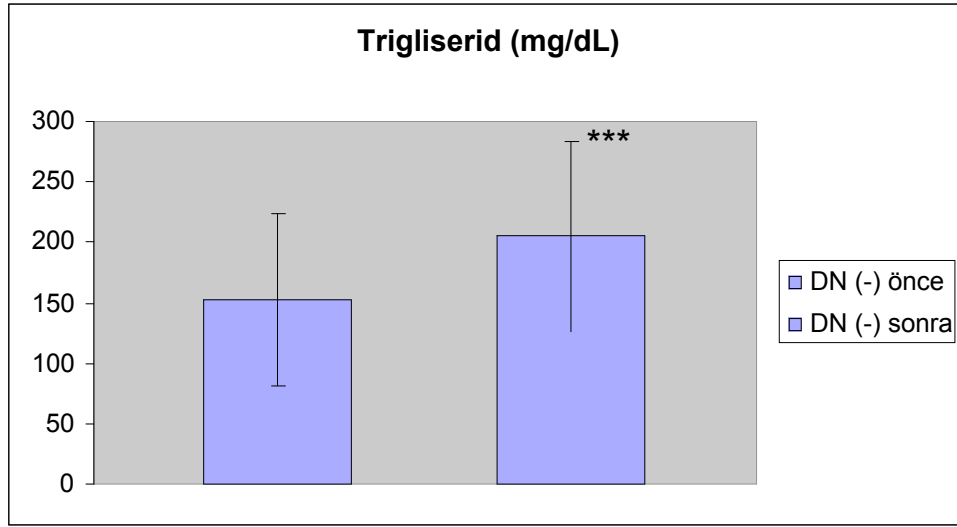
Grafik 4-8: Grupların PLP (µg/mL) düzeyi histogramı



Grafik 4-9: Grupların TPP (µg/L) düzeyi histogramı



Grafik 4-10: Grupların HbA1c (%) düzeyi histogramı



Grafik 4-11: Grupların Trigliserid (mg/dL) histogramı

4.1. KORELASYON BULGULARI

Hasta gruplarında çalışılan parametreler arasında saptanan Pearson korelasyon katsayıları ve anlamlılık dereceleri aşağıdaki gibi bulundu.

“Nefropatisiz Diyabet” grubunda başlangıçta :

- Glukoz ile HOMA-IR arasında $r=0,581$ ($p=0,002$)
- İnsülin ile HOMA-IR arasında $r=0,951$ ($p=0,000$)
- İnsülin ile C-peptid arasında $r=0,521$ ($p=0,006$)
- HOMA-IR ile C-peptid arasında $r=0,470$ ($p=0,015$)
- Triglisericid ile TPP arasında $r=0,375$ ($p=0,041$)
- TPP ile PLP arasında $r=0,625$ ($p=0,000$)

“Nefropatili Diyabet” grubunda vitamin verilmesinden önce :

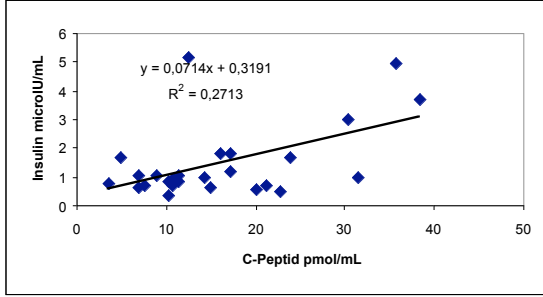
- Glukoz ile HOMA-IR arasında $r=0,602$ ($p=0,001$)
- İnsülin ile HOMA-IR arasında $r=0,924$ ($p<0,001$)
- TPP ile PLP arasında $r=0,545$ ($p=0,003$)

B6 verilen nefropatili diyabet grubunda vitamin kullanımına bağlı olarak parametrelerde saptanan farklar arasındaki korelasyonlar :

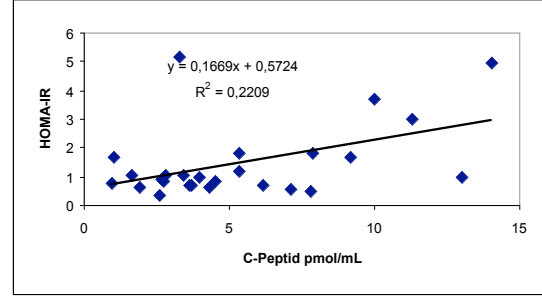
- Glukoz ile insülin arasında $r=0,688$ ($p=0,019$)
- Glukoz ile HOMA-IR arasında $r=0,813$ ($p=0,002$)
- İnsülin ile HOMA-IR arasında $r=0,973$ ($p=0,000$)
- C-peptid ile kolesterol arasında $r=0,700$ ($p=0,011$)

B1+B6 verilen nefropatili diyabet grubunda vitamin kullanımına bağı olarak parametrelerde saptanan farklar arasındaki korelasyonlar :

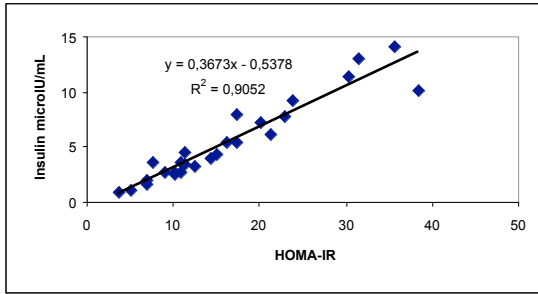
- Glukoz ile HbA1c arasında $r=0,784$ ($p=0,021$)
- İnsülin ile HOMA_IR arasında $r=0,963$ ($p=0,000$)
- C-peptid ile kreatinin arasında $r= - 0,974$ ($p=0,026$)
- Kolesterol ile kreatinin arasında $r=-0,976$ ($p=0,024$)
- TPP ile PLP arasında $r=0,609$ ($p=0,016$)



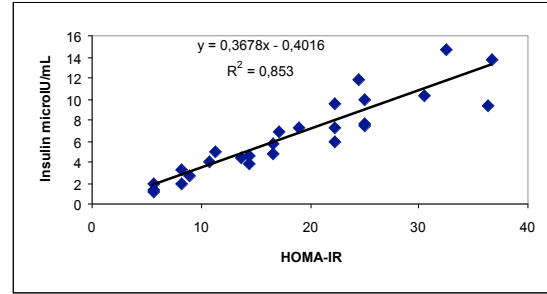
Grafik 4-12: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile C-peptid arasındaki ilişki



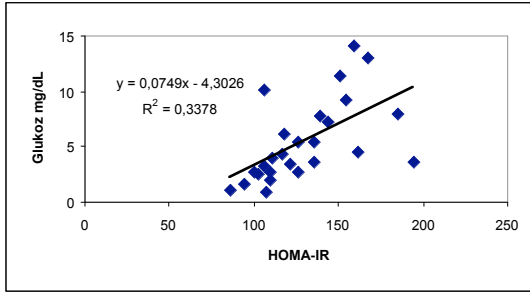
Grafik 4-13: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde HOMA-IR ile C-peptid arasındaki ilişki



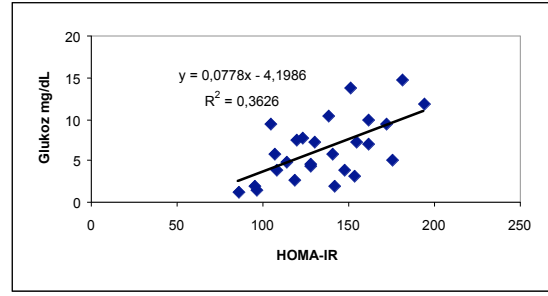
Grafik 4-14: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile HOMA-IR arasındaki ilişki



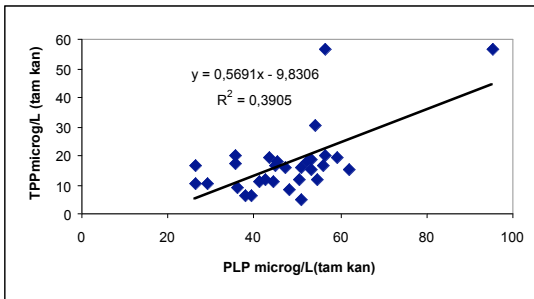
Grafik 4-15: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde insülin ile HOMA-IR arasındaki ilişki



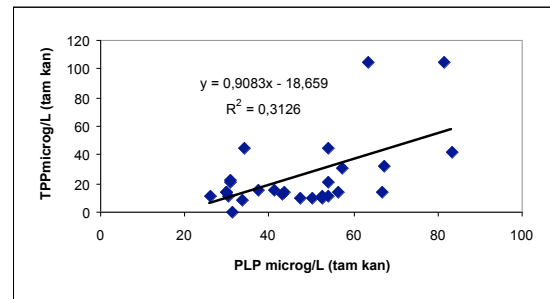
Grafik 4-16: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde glukoz ile HOMA-IR arasındaki ilişki



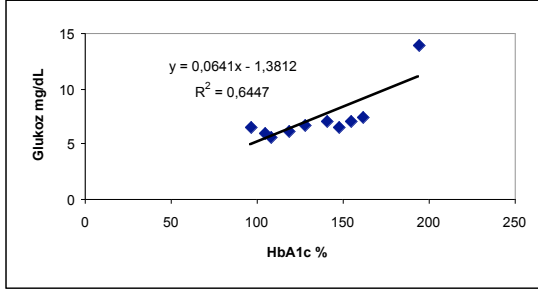
Grafik 4-17: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde glukoz ile HOMA-IR arasındaki ilişki



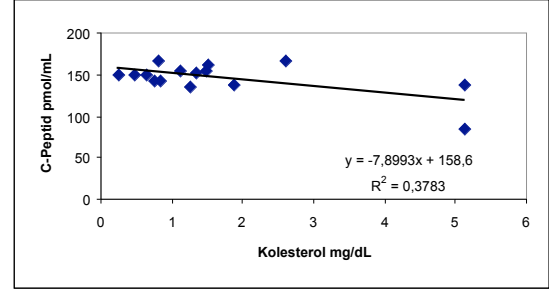
Grafik 4-18: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde TPP ile PLP arasındaki ilişki



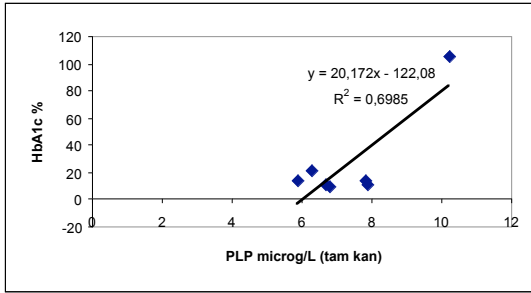
Grafik 4-19: Nefropatili diyabet grubunun önce değerlerinde TPP ile PLP arasındaki ilişki



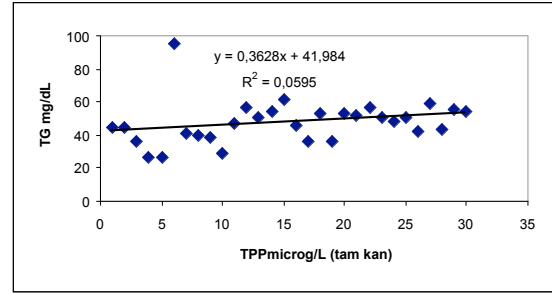
Grafik 4-20: B1+B6 grubunun önce değerlerinde glukoz ile HbA1c arasındaki ilişki



Grafik 4-21: B1+B6 grubunun önce değerlerinde C-peptid ile kolesterol arasındaki ilişki



Grafik 4-22: B6 grubunun önce değerlerinde HbA1c ile PLP arasındaki ilişki



Grafik 4-23: Nefropatisiz diyabet grubunun önce değerlerinde trigliserid ile TPP arasındaki ilişki

5. TARTIŞMA

Diyabetik nefropati Tip1 ve Tip 2 diyabet hastalarında mortalite ve morbiditenin en önemli nedenidir. AGE'lerin diyabetik nefropatideki klinik önemi ilk olarak bir AGE inhibitörü olan aminoguanidin ile yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur (21).

İleri glikasyon, oksidatif stres ve karbonil stres reaktif ara ürünleri tarafından proteinlerin modifikasyon ve dejenerasyona uğratıldığı ve AGE oluşumu ile sonuçlanan bir süreçtir. Fizyolojik koşullarda yaşlanma ile artan ileri glikasyon, diyabette hiperglisemi nedeni ile hızlanır. Üremiye bağlı karbonil stresle karakterize kronik renal yetmezlikte ileri glikasyon önemlidir. Diyabette AGE'lerin patofizyolojik etkilerine en hassas olan bölgenin böbrekler olduğu kabul edilmektedir. Renal yetmezliği olan diyabetik hastalarda hem böbrek dokusunda hem de serumda AGE düzeyleri artmıştır. Serum AGE düzeyleri organ hasarının şiddetiyle orantılıdır; azalmış renal fonksiyonlu hastalarda, normal fonksiyonlu diyabetik hastalarından birkaç kat daha fazladır. Sistemik dolaşımda kalan AGE-peptidler güçlü çapraz bağlanma özellikleri ile LDL ve IgG gibi plazma proteinlerine ve damar duvarı proteinlerine bağlanarak ikinci jenerasyon AGE'leri oluştururlar. Böbrek hasarına bağlı olarak klirensleri azalan ve plazmada konsantrasyonları artan AGE-peptidler DN'nin ve kardiyovasküler komplikasyonların ilerlemesine katkıda bulunur (31).

Böbrekte AGE birikimi ya dolaşımdaki AGE p reabsorbsiyonu sırasında mezangiyal tutulması ile ya da diyabetik böbrekte yeni AGE oluşumuyla gerçekleşir (164). Süzölmüş AGE'lerin reabsorbsiyonunu yapan asıl bölge proksimal tübüldür; reabsorpsiyon proksimal tübülün endolizozomal aparatının katıldığı aktif bir süreçtir (150). Tip 1 diyabetli hastalarda böbrek morfolojisindeki değişimden önce AGE birikiminin varlığı saptanmış ve AGE birikiminin mikroalbüminürinin prediktörü olduğu öne sürülmüştür. Diyabetik nefropatinin biyopsi bulguları ile AGE birikimi ve mikroalbüminüri arasında doğru orantılı bir ilişki bulunduğu gösterilmiştir (129).

İleri glikasyon hiperglisemiye bağlı doku hasarında etkin tek mekanizma değildir. AGE'ler tek başlarına veya diğer patolojik yollarla ilişkili olarak diyabetik komplikasyonlara neden olabilmektedir. AGE'lerin hiperglisemi yokluğunda dahi oluştuğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Diyabetik nefropati patogenezinde ileri

glukasyonun primer mekanizma olduğu öne sürölmektedir.AGE birikiminin azaltılmasına yönelik girişimlerin diyabette renoprotektif olduğu gösterilmiştir (79).

Bu tez çalışmasında tip 2 diabetes mellitusda nefropati varlığında plazma AGE düzeylerinde artış olup olmadığı araştırılmıştır. Diyabetik hastaların nefropatili alt-grubunda nefropatisiz alt-gruba göre plazma AGE-peptid düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında incelenen parametreler arasında, AGE-peptid düzeyi nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplar arasında tek anlamlı farklılık gösteren parametredir.Kan glukoz , HbA1c değerleri bakımından farklılık göstermeyen nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplar arasında sadece AGE-peptid düzeylerinin farklı saptanmış olması çarpıcı bir bulgu olarak dikkati çekmektedir. Nefropatisiz diyabetik grupta beş aylık süre sonunda AGE düzeylerinde artış olduğu ; ancak B1+B6 vitamin kombinasyonu veya B6 vitamini verilen nefropatili diyabetik grupta ise bu artışın olmadığı gözlenmiştir.Nefropati varlığında arttığını saptadığımız plazma AGE-peptid düzeyinin beş aylık süre sonunda artış göstermemesi uygulanan vitamin tedavisinin ileri glukasyon üzerindeki etkinliğini dolaylı olarak ortaya koymaktadır. Beklendiğı üzere vitamin tedavisine bağılı olarak TPP ve PLP düzeylerinin anlamlı derecede yükselmiş olduğu göröldü.

Suda çözünen vitaminlerden olan B grubu vitaminleri çeşitli metabolik reaksiyonlarda ve enerji üretiminde görev alan enzimlerin kofaktörleri olarak gereklidir (38).

B grubu vitaminlerinden olan tiyaminin aktif formu tiyamin pirofosfat, sitozolik transketolaz, pirüvat dehidrojenaz ve mitokondriyel dehidrojenazlar, _-ketoglutarat dehidrojenaz ve dallı zincirli ketoasid dehidrojenazın kofaktörüdür (31,101,102).

Tiyaminin deneysel diyabet modellerinde orta düzeyde eksikliği saptanmış ve bu eksikliğin renal klirensin artışına bağılı olduğu öne sürölmüştür. (74). EASD sempozyumunda diyabette orta düzeyde tiyamin eksikliği olduğu, bu eksikliğin giderilmesi gerektiğı bildirilmiştir.Hastalara günde 250-300 mg tiyamin verilmesi önerilmiştir (19).

Tiyamin eksikliğinde hiperglisemide glukoz girişinin insüline bağımlı olmadığı, intrasellüler hipergliseminin var olduğu ve glukolizin artış gösterdiği hücrelerde pirüvatın asetil CoA ya dönüşümü ve sitrik asit döngüsünde oksidasyonunun azalmasına bağılı olarak pirüvat, laktat ve trioz fosfatların konsantrasyonu artmaktadır (31,101,102). Tiyamin,diyabette intrasellüler hiperglisemiye bağılı olarak artan glukolizi,

glikolitik metabolitleri pentoz fosfat yoluna kanaliz ederek inhibe etmektedir. Glikolizin üç karbonlu metabolitleri glukozdan daha aktif glikasyon ajanlarıdır. Gliseraldehid 3-fosfat (GA3P) proteinleri glukozdan 200 kez daha fazla reaktif olarak glikozilleyen bir trioz fosfattır.

Diabetes mellitusda endotel hücrelerinde intrasellüler hiperglisemiye bağlı olarak mitokondride reaktif oksijen radikallerinin ve AGE'lerin oluşumu artmaktadır. Non-enzimatik olan ve kontrolsüz ilerleyen oksidasyon ve ileri glikasyon birbirine eşlik eden ve biri diğerini artıran süreçlerdir. Diabetes mellitusda glikoksidatif hasar söz konusudur. Tiyamin, önemli bir hücrel antioksidan olan glutatyon düzeylerini de artırmaktadır; tiyamin pentoz fosfat yolunu aktive ederek glutatyonun redüksiyonunu sağlayan NADPH üretimini artırmaktadır (121). Glutatyon konsantrasyonunun artması ile antioksidan savunma güçlenirken yüksek derecede reaktif glikasyon ajanı olan metilglioksal detoksifikasyonu da artmaktadır. Diyabette yüksek doz tiyamin tedavisi ile metilglioksal birikiminin önlendiği saptanmıştır.(74) Oksidatif stresin arttığı bu koşullarda pleiotropik bir transkripsiyon faktörü olan NF__ aktivasyonu da artmaktadır. Glikolitik metabolitlerden diaçilgliserol sentezinin arttığı koşullarda protein kinaz C aktive olmaktadır. Tiyaminin bu süreçleri önleyerek AGE oluşumunu azalttığı öne sürülmüştür (121).

Nefropatili STZ diyabetik sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 24 hafta yüksek doz oral tiyamin tedavisiyle mikroalbüminüri ve proteinürinin ortadan kalktığı saptanmıştır. Yüksek doz tiyamin tedavisiyle incipient nefropatinin önlenebileceği bildirilmiştir (12).

Aminoguanidin ile tiyaminin etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada tiyaminin AGE düzeylerini düşürmede daha etkili olduğu saptanmıştır (21).

Bu tez projesinde diyabetik nefropatili hastalarda B1 vitamini ile tedavinin protein glikasyonu üzerine etkili olup olmadığının incelenmesi amaçlanmış ve nefropatili diyabetik hastaların bir kısmına sadece B1 vitamini bir kısmına da plasebo verilmesi planlanmıştı. Ancak tez çalışmasına başladıktan sonra ,sadece B1 vitamini içeren preparatın imalattan kaldırılmış olduğu öğrenildi. Bu durumda B1 ve B6'yı birlikte içeren vitamin preparatı (250 mg tiyamin HCl ve 250 mg piridoksin HCl) ve plasebo olarak da B6 vitamini preparatı verildi. B6 vitamininin de glikasyonda etkili olabileceği öngörüldüğünden , B1 ve B6 vitaminlerinin birlikte kullanımı ile B6 vitamininin tek kullanımının etkileri karşılaştırıldı.

B6 vitamierlerinden olan piridoksamini in vitro koşullarda AGE oluşumunu inhibe ettiği; hiperglisemik ve hiperlipidemik hayvan modellerinde proteinlerin kimyasal modifikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir(164). Piridoksamin, Amadori rnnn AGE'lere dönüşümü aşamasında etkilidir.

Serbest karbonil grubuna sahip olan piridoksal fosfatın ise karbonil gruplu glikasyon ajanları ile yarışarak proteinlerin serbest amino gruplarına bağlandığı ve bu şekilde glikasyonu erken aşamada (Schiff baz) inhibe ettiği bilinmektedir (113). Bu bilgi ile uyumlu olarak çalışmamızda da nefropatili grubun B6 vitamini verilen alt grubunda HbA1c düzeylerinde azalma olduğu saptanmıştır.Ancak, B1+B6 vitamini verilen nefropatili grupta bu etki görülmemiştir.

Bu çalışmada nefropatisiz ve nefropatili diyabet gruplarının C-peptid düzeyleri de llmştir. Hepatik metabolizması olmayan C-peptidin insüline göre ,_ hücre fonksiyonlarının daha iyi bir göstergesi olduğu öne srlmştir.Ayrıca son zamanlarda yapılan çalışmalarda C-peptidin bazı biyolojik etkileri olduğu gösterilmiştir. C-peptidin kısa dönem infüzyonunun , tip 1 diyabetin ortaya çıkışından sonra erken dönemde glomerüler hiperfiltrasyonu azalttığı gösterilmiştir (118,142) Hayvan alışmalarında C-peptid verilmesiyle üriner albümin ekskresyonunda (UAE) azalma grlmştir. Yine C-peptid infüzyonunun iskelet kası ve deride kan akışını artırdığı, kan akışını güçlendirdiği gözlenmiştir (75,76). Diyabetik nefropatili hastalara kısa dönem C-peptid infüzyonu ile otonom sinir fonksiyonlarında düzelme grlmştir (72). Tip 1 diyabetli hastalarda yapılan bir çalışmada üç ay süreli kombine C- peptid ve insülin tedavisiyle renal fonksiyonların düzeldiği, UAE azaldığı ve otonom ve duysal sinir fonksiyon bozukluğunun iyileştiği saptanmıştır (72).

Çalışmamızda ,böbrekler tarafından dolaşımdan temizlenen C-peptidin plazmadaki düzeyinin nefropatili ve nefropatisiz diyabetli hastalar arasında farklılık gösterip göstermediği ve B1 ve B6 vitaminleri ile tedavinin nefropatili hastalarda plazma C-peptid düzeyleri üzerine olası etkileri araştırılmıştır. C-peptid düzeyleri açısından nefropatili ve nefropatisiz hastalarda farklılık olmadığı saptanmıştır. Diyabetik hastalarda nefropati yokluğunda plazma insülin ve C-peptid düzeyleri arasında saptadığımız korelasyonun ($r=0,521^{**}$) nefropati varlığında bulunmadığı grld.

Gerek B1+B6 kullanımının ve gerekse B6 kullanımının nefropatili hastalarda plazma C-peptid düzeylerini artırdığı saptandı. Bu bulgu B1+B6 /B6 kullanımına bağlı olarak C-peptid düzeyinin arttığını göstermektedir. C-peptidin yukarıda belirtilmiş olan

yararlı etkileri göz önüne alındığında, B1/B6 vitamin kullanımının C-peptid düzeyini artırıcı etkilerinin önemli olduğu görülmektedir. Diyabetik nefropatide B1/B6 vitamin kullanımının C-peptid düzeylerini artırıcı etkilerinin klinik önemi ileri çalışmalarla araştırılmalıdır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, plazma AGE-peptid düzeyinin nefropatili diyabetik hastalarda, nefropatisiz diyabetik hastalardan daha yüksek olduğunu saptanmıştır. Nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplar arasında kan glukoz ve HbA1c değerleri bakımından farklılık saptanmamıştır ve incelenen parametreler arasında, plazma AGE-peptid düzeyi nefropatili ve nefropatisiz diyabetik gruplar arasındaki tek anlamlı farklılık gösteren parametredir.

Diyabetik nefropatisi olmayan ve vitamin tedavisi uygulanmayan hastalarda plazma AGE-peptid düzeyleri beş aylık süre içinde artış gösterdiği halde B1+B6 vitamin kombinasyonu veya B6 vitamini verilen nefropatili diyabetik hastalarda bu artışın olmadığı gözlemi uygulanan vitamin tedavisinin ileri glikasyon üzerindeki etkinliğini dolaylı olarak ortaya koymaktadır. Bu nedenle B1 ve B6 ile ilgili çalışmaların devam ettirilmesi gerektiği inancındayız.

KAYNAKLAR

1. Abbas ZG, Swai ABM. Evaluation of the efficacy of thiamine and pyridoxine in the treatment of symptomatic diabetic peripheral neuropathy. *Ist AFR Med J*. 1997;74:803-808
2. Ahmed N. Advanced glycation end products-role in pathology of diabetic complications. *Diab Res Clin Pract* 2005;67:3-2
3. Ahmed N, Thornalley PJ. Advanced glycation endproducts:what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab* 2007;9:233-245
4. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Eng J Med* 1994;331:1480-7
5. 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;15:539-53
6. Alderson NL, Chachich ME, Youssef NY. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits lipemia and development of renal and vascular disease in Zucker obese rats. *Kidney Int*. 2003;63:2123-2133
7. Amarnath V, Amarnath K, Amarnath K. Pyridoxamine and extremely potent scavenger of 1,4 dicarbonyls. *Chem Res Toxicol* 2004;17:410-415
8. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diab Care* 2006;29:43-48
9. Asano M, Fujita Y, Ueda Y. Renal proximal tubular metabolism of protein-linked pentosidine, an advanced glycation end product. *Nephron* 2002;91:688-694
10. Ascher E, Gade PV, Hingorani A, Puthukkeril S MS, Kalakuri S, Scheinman M, Jacob T. Thiamine reverses hyperglycemia induced dysfunction in cultured endothelial cells. *Surgery* 2001;130:851-858

11. Ashokkumar B, Vaziri ND, Said HM. Thiamine uptake by the human-derived renal epithelial (HEK-293) cells:cellular and molecular mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:796-805
12. Babaei-Jadidi R, Karachalis N, Ahmed N, Battah S,Thornalley PJ. Prevention of incipient nephropathy by high dose thiamine and benfothiamine. *Diabetes* 2003 ;52:2110-2120
13. Beisswenger PJ, Makita Z, Curphey TJ. Formation of immunochemical advanced glycosylation end products preceeds and correlates with early manifestations of renal and retinal disease in diabetes. *Diabetes* 1995;44:824-829
14. Bernstein LH. Clinical chemistry and the geriatric patients. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations.* Lippincott Williams & Wilkins.USA. Fifth edition. 2005;647-649
15. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ubertalli Ape A, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfothiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem* 2006;281:9307-9313
16. Bertani T, Gmabara V, Remuzzi G. Structural basis of diabetic nephropathy in microalbuminuric NIDDM patients: a light microscopy study. *Diabetol* 1996; 39:1625-1628
17. Biosource Europe S.A-Rue de l'Industrie,Belgium. C-PEP-EASIA. KAP0401
18. Biosource Europe S.A-Rue de l'Industrie,Belgium. INS-EASIA. KAP1251
19. Bloomgarden ZT. The European Association for the Study of Diabetes. *Diab Care.* 2005;28:1250-1257
20. Bolton WK, Cattran DC, Williams ME. Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2004;24:32-40
21. Booth AA, Khalifah RG, Hudson BG. Thiamine pyrophosphate and pyridoxamine inhibit the formation of antigenic advanced glycation end products:comparison with aminoguanidine. *Biochem and Biophys Res Comm* 1996;220:113-119

22. Booth AA, Khalifah RG, Todd P, Hudson BG. In vitro kinetic studies of formation of antigenic AGEs. *J Biol Chem* 1997;272:5430-5437
23. Bouma B, Kroon-Batenburg LMJ, Wu YP, Brünjes B, Posthuma G, Kranenburg O, de Groot PG, Voest EE, Gebbink MFGB. Glycation induces formation of amyloid cross-B structure in albumin. *J Biol Chem* 2003;278:41810-41819
24. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal and vascular disease. *Am J Kidney Dis* 1995;26:875-88
25. Caramori ML, Kim Y, Huang C, et al. Cellular basis of diabetic nephropathy: Study design and renal structural-functional relationships in patients with long standing type 1 diabetes. *Diabetes* 2002;51:506-13
26. Ceolotto G, Gallo A, Miola M, et al. Protein kinase C activity is acutely regulated by plasma glucose concentration in human monocytes in vivo. *Diabetes* 1999;48:1316-22
27. Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 2003;289:2560-2572
28. Chromsystems Diagnostic By HPLC. Vitamin B1 in whole blood. FraunhoferstraBe 22 Martinsried/München.
29. Chromsystems Diagnostic By HPLC. Vitamin B6 in whole blood. FraunhoferstraBe 22 Martinsried/München.
30. Cohen CL, Gorecki GA, Silverstein SB, Ebersole JS, Solomon LR. Effect of pyridoxine: (vitamin B6) on diabetic patients with peripheral neuropathy. *J Am Podiatry Assoc* 1984; 74:394-397
31. Cooper ME. Importance of advanced glycation end products in diabetes-associated cardiovascular and renal disease. *AJH* 2004;17:31-38
32. Cooper ME, Thallas V, Forbes J. The cross link breaker N-phenacylthiazolium bromide prevents vascular AGEs. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:2125-2138
33. Coughlan MT, Cooper ME, and Forbes JM. Can advanced glycation end product inhibitors modulate more than one pathway to enhance renoprotection in diabetes? *Ann NY Acad Sci* 2005;1043:750-758

34. David M.Nathan.The pathophysiology of diabetic complications:How much does the glucose hypothesis explain? *Ann Int Med* 1996;124:86-89
35. De Fronzo RA. Pathogenesis of type 2 diabetes:metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diab Rew* 1998;5:177-269
36. Degenhardt TP, Alderson NL, Arrington DD. Pyridoxamine inhibits early renal diseases and dislipidemia in the streptozotocin diabetic rat. *Kidney Int* 2002;61:939-950
37. Degenhardt TP, Grasss L, Reddy S, Thorpe SR, Diamandis EP, Baynes JW. Technical note. The serum concentration of the advanced glycation end product N-epsilon (carboxymethyl) lysine is increased in uremia. *Kidney Int* 1997;52:1064-1067
38. Depeint F, Robert Bruce W, Shangari N, Mehta R, O'brian PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mithocondrial energy metabolism. *CBI* 2006;163:94-112
39. Dominiczak MH. The significance of the products of the Maillard (browning) reaction in diabetes. *Diabetic Med* 1991;8 505-516
40. Edelstein D, Brownlee M. Mechanistic studies of advanced glycosylation end-product inhibition by aminoguanidine. *Diabetes* 1992;41;26-29
41. Ekberg K, Brismar T, Johansson BL, Johansson B, Lindström P and Wahren J. Amelioration of sensory nerve dysfunction by C-peptide in patients with type 1 diabetes. *Diabetes* 2003;52: 536-541
42. Ergün Ahmet. Yağ hücrelerinden salgılanan maddeler, rezistin ve insülin direnci. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2003;56:25-30
43. Fasching P, Veitl M, Rohac M. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:4313-4317
44. Feest T. Epidemiology and causes of chronic renal failure. *Chronic renal failure. Medicine* 2007;35:8

45. Ferguson GP, Vanpatten S, Bucala R, Al Abed Y. Detoxification of methylglyoxal by the nucleophilic bidentate, phenylacetylthiazolium bromide. *Chem Res Toxicol* 1999;12:617-622
46. Fex M, Ntert MD, Wierup N, Sundler F, Ling C, Mulder H. Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetol* 2006;50:74-83
47. Freeman VS. Carbohydrates. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE. *Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins. USA. Fifth edition. 2005;277-299
48. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar GC, Lee F, Grand SL, Burrell LA, Jerums G, Osicka TM: reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002;51:3274-3282
49. Fraser DJ, Philips AO. Diabetic Nephropathy. Systemic disease and the kidney. *Medicine* 2007;35:9
50. Futura system S.R.l. Liqui Glucose enzymatic colorimetric method. *Apparecchi Scientifici Diagnostici*. 00060 FORMELLO-Zona Industriale (Roma)
51. Futura system S.R.l. Liqui Total cholesterol enzymatic colorimetric method. *Apparecchi Scientifici Diagnostici*. 00060 FORMELLO-Zona Industriale (Roma)
52. Futura system S.R.l. Liqui Triglycerides enzymatic colorimetric method. *Apparecchi Scientifici Diagnostici*. 00060 FORMELLO-Zona Industriale (Roma)
53. Gade PV, Tuan TL, Nimne ME, Subin B, Sank A. Hyperglycemia induced abnormal nitric oxide (NO) production by vascular endothelial cells: implications in diabetic wound healing. *Surg Forum*. 1995;XLV:697-699
54. Gallagher H, Andrews PA. What is diabetic renal disease? *Br.J. Diabetes Vasc. Dis.* 2002;2:96-100
55. Gambari V. Heterogeneous nature of renal in type 2 diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993;3:1458-1466

56. Gilbert RE, Cooper ME. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? *Kidney Int.* 1999;56:1627-1637
57. Gilbert RE, Kelly DJ, Atkins RC. Novel approaches to the treatment of progressive renal disease. *Current Opinion in Pharmacology.* 2001;1:183-189
58. Grankvist K, Marklund SL, Taljedal IB. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J* 1981;199:393-398
59. Hammes H-PX, Edelstein D. Benfotiamin blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003;9:294-299
60. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Activation of mitogen activated protein kinase cascade in diabetic glomeruli and mesangial cells cultured under high glucose conditions. *Kidney Int* 1997; 60:66-69
61. Haneda M, Araki S, Togawa M, Sugimoto T, Isono M, Kikkawa R. Mitogen activated protein kinase cascade is activated in glomeruli of diabetic rats and glomerular mesangial cells cultured under high glucose condition. *Diabetes* 1997;46:847-53
62. Higuchi O, Nakagawa K, Tsuzuki T, Suzuki T, Oikawa Sand, Miyazawa T. Aminophospholipid glycation and its inhibitor screening system: a new role of pyridoxal 5' -phosphate as the inhibitor. *J Lipid Res* 2006;47: 964-974.
63. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, van Y persele de Strihou C, Monnier VM, Witztum JL, Kurokawa K. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997;100:2995-3004
64. Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* 1982;72:375-80
65. Hunter SJ, Bell PM. Diabetes and hypertension. Management of diabetes. *Medicine* 2006;34:2

66. Huttenen HJ, Fages C, Rauvala H. Receptor for advanced glycated end-products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kB require cytoplasmic domain of the receptor but different downstream pathways. *J Biol Chem* 1999;274:19919-19924
67. Iacobini C, Amadio L, Oddi G, Ricci C, Barsotti P, Missori S, Sorcini M, Di Mario U, Pricci F, Pugliese G. Role of galectin-3 in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:264-270
68. Ido Y, Vindigni A, Chang K, Stramm L, Chance R, Heath WF. Prevention of vascular and neural dysfunction in diabetic rats by C-peptide. *Science* 1997;277:563-566
69. Işıldak M, Güven SG, Gürlek A. Metabolik sendrom ve insülin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*. 2004;35:96-99
70. Jandeleit-Dahm KA, Lassila M, Allen TJ. Advanced glycation end products in diabetes-associated atherosclerosis and renal disease. *Ann NY Acad Sci* 2005;1043: 759-766
71. Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res* 2004;53:131-142
72. Johansson B-L, Borg K, Fernqvist-Forbes E, Odergren T, Remahl S, Wahren J. C-peptide improves autonomic nerve function in IDDM patients. *Diabetol* 1996;39:687-695
73. Johansson BL, Borg K, Fernqvist-Forbes E, Kernell A, Odergren T, Wahren J. Beneficial effects of C-peptide on incipient nephropathy and neuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2000;17:181-189
74. Johansson BL, Kernell A, Sjöberg S, Wahren J. Influence of combine C-peptide and insulin administration on renal function and metabolic control in diabetes type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77: 976-981
75. Johansson BL, Linde B, Wahren J. Effects of C-peptide on blood flow capillary diffusion capacity and glucose utilization in Type I diabetic patients. *Diabetol* 1992;35:1151-1158

86. La Selva M, Beltramo E, Pagnozzi F. Thiamine corrects delayed replication and decreases production of lactate and AGEs in bovine retinal and human umbilical vein endothelial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetol* 1996;39:1263-1268
87. La Selva M, Beltramo E, Pagnozzi F, Bena E, Molinatti PA, Molinatti GM, Porta M. Thiamine corrects delayed replication and decreases production of lactate and advanced glycation end-products in bovine retinal and human umbilical vein endothelial cells cultured under high glucose conditions. *Diabetol* 1996;39:1263-1268
88. Lasilla M., Jandeleit-Dahm KA, Seah KK. Imatinib attenuates diabetic nephropathy in apolipoprotein-E knock out mice. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:363-373
89. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13:23-30
90. Lehmann R, Schleicher ED. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clin Chim Acta* 2000;297:135-144
91. Lim SC, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW, Horton ES, Veves A. Soluble intercellular adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule, and impaired microvascular reactivity are early markers of vasculopathy in type 2 diabetic individuals without microalbuminuria. *Diab Care* 1999;22:1865-1870
92. Lippert J, Ritz E, Schwarzbeck A, Schneider P. The rising tide of ESRF from diabetic nephropathy type II and epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:462-467
93. Loughrey CM, Young IS, Lightbody JH, McMaster D, McNamee PT, Trimble ER. Oxidative stress in haemodialysis. *Q J Med* 1994;87:679-683
94. Maillard LC. Action des acides amines sur les sucres; formation des melanoidines par voie methodique. *Acad Sci* 1912;154:66-68
95. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetol* 1985;28(7): 412-9

76. Johansson BL, Sjöberg S, Wahren J. The influence of human C-peptide on renal function and glucose utilization in type 1 (insulin dependent) diabetic patients. *Diabetol* 1991;35:121-128
77. Jürgen MH, Franke S, Stein G, Wolf G. Advanced glycation end products and the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005;289:645-659
78. Kalousova M, Skrha J, Zima T. Advanced glycation end-products and advanced oxidation protein products in patients with diabetes mellitus. *Physiol Res* 2002;51:597-604
79. Kalousova M., Zima T, Tesar V, Stipek S, Sulkova S. Advanced glycation end products in clinical nephrology. *Kidney Blood Press Res* 2004;27:18-28
80. Karachalias N, Babaei Jadidi R, Kupich C, Ahmed N, and Thornalley PJ. High dose thiamine therapy counters dyslipidemia and advanced glycation of plasma protein in streptozocin-induced diabetic rats. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1043:777-783
81. Kasper M, Funk RHW. Age-related changes in cells and tissues due to advanced glycation end products (AGEs). *Arch Gerontol Geriatr* 2001;32:233-243
82. Kislinger T, Fu C, Huberi B, Qu W, Taguchi A, Yan S, Hofmann M, Yan S, Pischetsrieder M, Stern D, Schmidt AM. N-(carboxymethyl)lysine adducts of proteins are ligand for receptor for advanced glycation end products that activate cell signaling pathways and modulate gene expression. *J Biol Chem* 1999;274:31740-31749
83. Klein R, Klein BE, Moss SE, David MD, Demets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy.III. Prevalance and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984;102:527-32
84. Knowler WC, Bennett PH, Ballintine EJ. Increased incidence of retinopathy in diabetics with elevated blood pressure. A six year follow up study in pima Indians. *N Eng J Med* 1980;302:645-50
85. Lane PH, Steffes MW, Fioretto P, Mauer SM. Periavascular interstitial expansion in insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int* 1993;43:661-7

96. Mayes PA. Glycolysis and the oxidation of pyruvate. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. Appleton & Lange USA. Twenty-fifth. edition. 2000;190-198
97. Mayes PA. Structure and the function of water soluble vitamins. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. Harper's Biochemistry. Appleton & Lange USA. Twenty-fifth. edition. 2000;627-635
98. McCormick DB, Klee GG. Çeviren: Onat T. Vitaminler. Burtis CA, Ashwood ER. Çeviri Editörü Aslan D. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Kitabın Özgün Adı:Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Palme Yayıncılık Ankara. Beşinci Baskıdan Çeviri. 2005;551-556
99. Metz TO, Alderson NL, Thorpe TR, Baynes JW. Pyridoxamine an inhibitor of advanced glycation and lipoxidation reactions: a novel therapy for treatment of diabetic complications. Arch Biochem Biophys 2003;419:41-49
100. Misur I and Turk Z. Substituted guanidine compounds as inhibitors of nonenzymatic glycation in vitro.Croatia Chem Acta 2001;74:455-465
101. Miyata T, Krokawa K, Van Y, Persele de Strihou C,Ueda Y, Ichimori K, Inagi R, Onoge H, Ishikawa N, Nangaku M. Angiotensin II receptor antagonists and angiotensin converting enzyme inhibitors lower in vitro the formation of advanced glycation end products:Biochemical Mechanisms. J Am Soc Nephrol 2002; 13:2478-2487
102. Monnier VM, Bautista O, Kenny D. Skin collagen glycation, glycooxidation, and crosslinking are lower in subjects with long term intensive versus conventional therapy of type 1 diabetes: relevance of glycated collagen products versus HbA1c markers of diabetic complications. DCTT Skin collagen Ancillary Study Group. Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 1999;48:870-880
103. Morise T, Takeuchi Y, Koni I, Takeda R, Kawano M. Increased plasma levels of immunoreactive endothelin and von Willebrand factor in NIDDM patients. Diab Care 1995;18:87-9
104. Motoshima H, Wu XD, Sinha MK ,et al. Differential regulation of adiponectin secretion from cultured human omental and subcutaneous

- adipocytes:effects of insulin and rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:5662-7
105. Muntner P, Coresh J, Powe NR, Klag MJ. The contribution of increased diabetes prevalence and improved myocardial infarction and stroke survival to the increase in treated end- stage renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1568-77
 106. Nagai Y, Yao L, Kobori H. Temporary angiotensin II blockade at the prediabetic stage attenuates the developement of renal injury in type 2 diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 2005;16:574-575
 107. Nangaku M, Miyata T, Sada T, Makato M, Inagi R, Ueda Y, Isikawa N, Yuzava H, Koike H, van Y persele de strihou C, Kurokawa K. Antihypertensive agents inhibit in vivo the formation of advanced glycation end products and improve renal damage in a type 2 diabetic nephropathy rat model. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:1212-1222
 108. Nascimento-Gomes G, Zaladek Gil F, Mello-Aires M. Alterations of the renal handling of H⁺ in diabetic rats. *Kidney Blood Press Res* 1997;20:251-257
 109. Nathan DM, Cleary PA, Backlund JY, et al. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Eng J Med* 2005; 353:2643-53
 110. Nathan DM, Singer DE, Godine JE, Harrington CH, Perimuter LC. Retinopathy in older type II diabetics. Association with glucose control . *Diabetes*. 1986;35:797-801
 111. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. *N Eng J Med* 1984;310:341-6
 112. Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, Fortier M, Guay C, Lamontagne J, Barbeau A, Przybytkowski E, Joly E, Masiello P, Wang S, Mitchell GA, Prentki M. Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetol* 2006; 49: 2120-2130

113. Onorato JM, Jenkins AJ, Thorpe SR and Baynes JW. Pyridoxamine ,an inhibitor of advanced glycation reactions, also inhibits advanced lipoxidation reactions. *J Biol Chem* 2000;28:21177-21184
114. Park JY, Ha SW, King GL.The role of protein kinase C activation in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Perit Dial Int* 1999;198(suppl2):222-227
115. Park L, Raman KG, Lee KJ, et al. Suppression of accelerated diabetic atherosclerosis by the soluble receptor for AGEs. *Nat Med* 1998; 4:1025-1031
116. Parving HH, Smidt UM, Friisberg B, Bonnevie-Nielsen V, Andersen AR. A prospective study of glomerular filtration rate and arterial blood pressure in insulin dependent diabetics with diabetic nephropathy. *Diabetol* 1981;20:457-61
117. Pick A, Clark J, Kubstrup C, Levisetti M, Pugh W,Bonner-Weir S, Polonsky K . Role of apoptosis in failure of beta cell mass compensation for insulin resistance and beta cell defects in the male Zucker diabetes fatty rat. *Diabetes*. 1998;47:358-364
118. Pickup JC. Diabetic control and its management. Pickup JC, Williams G. Williams Endocrine. Blackwell Science Ltd. USA. Second Edition. 1998;30,8-30,13
119. Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. *Diab Care* 1978; 1:168-88
120. Poitout V, Robertson RP. Glucolipotoxicity:Fuel excess and beta–cell dysfunction. *Endocr Rev* 2008;29:351-366
121. Pomero F, Min AM, La Selva M, Allione A, Molinatti GM, Porta M. Benfothiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001;38:135-138
122. Pronto. FAR S.r. I. Enrico Fermi. 37026 Settimo di Pescantiva. Glycosylated hemoglobin A1c. Chromatographic-spectrophotometric determination of hemoglobin A1c in blood ion-exchange, temperature non dependent method.

123. Raats CJ, Born J van den, Berden JH. Glomerular heperan sulfate alterations: mechanisms and relevance for proteinuria. *Kidney Int* 2000;57:385-400
124. Racker E, De LA, Haba G, Leder JG. Thiamine pyrophosphate a coenzyme of transketolase. *J Am Chem Soc* 1953;75:1010-1015
125. Rangasamy S, Muthuswamy B, Mohan R, Chinnaraj P, Viswanathan M. A novel advanced glycation index and its association with diabetes and microangiopathy. *Metabol Clin Exp* 2005;54:1002-1007
126. Rathanaswami R, Pourany A, Sunderasan R. Effects of thiamine deficiency on the secretion of insulin and the metabolism of glucose in isolated rat pancreatic islets. *Biochem Int* 1991;25:557-583
127. Rathanaswami R, Sundaresan R. Effects of thiamine deficiency on the biosynthesis of insulin in rats. *Biochem Int* 1991;24:1057-1062
128. Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Ann NY Acad Sci* 2002;967:363-78
129. Ritz E. Diabetic nephropathy. *Saudi J Kidney Dis Transplant* 2006;17:481-490
130. Rogers LE, Poter FS, Sidbury JB. Thiamine-responsive megaloblastic anemia. *J Pediatr* 1969;74:494-504
131. Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. *Life Sci* 2004;76:715-730
132. Rolo AP, Palmeira CM. Diabetes and mitochondrial function: Role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 212:167-168
133. Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP. Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Eng J Med* 2004;351:1941-51
134. Ruggenenti P, Remuzzi G. Nephropathy of type 1 and type 2 diabetes: diverse pathophysiology, same treatment? *Nephrol Dial Transplant* 2000;15:1900-1902

135. Sacks DB. Çeviren: Doç. Dr. Yeşim İlçöl. Karbonhidratlar. Burtis CA, Ashwood ER. Çeviri Editörü Aslan D. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Kitabın Özgün Adı:Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry. Palme Yayıncılık Ankara. Beşinci Baskıdan Çeviri. 2005;430-440
136. Schinzel R, Munch G, Heidland A, Sebekova K. Advanced glycation end products in end stage renal disease and their removal. *Nephron* 2001;87:295-303
137. Schrier RW, Estacio RO, Esler A, Mehler P. Effects of aggressive blood pressure control in normotensive type 2 diabetic patients on albuminuria, retinopathy and strokes. *Kidney Int* 2002; 61:1086-97
138. Sebekova K, Schinzel R, Munch G, Krivosikova Z, Dzuric R, Heidland A. AGE levels in subtotaly nephrectomized rat: beneficial effects of angiotensin II receptor I antagonist losartan. *Mineral Electrolyte Metab* 1999;25:380-383
139. Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995;44:1139-46
140. Shimaburukuro M, Zhou Y-T, Levi M, Unger RH. Fatty-acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:2498-2502
141. Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. *J Clin Invest* 2000;106:171-6
142. Sjökvist M, Huang W, Johansson BL. Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes. *Kidney Int* 1998;54:758-764
143. Soedamah-Muthu SS, Chatuverdi N, Schalkwijk CG, Stehouwer CDA, Ebeling P, Fuller JH. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and soluble E-selectin are associated with micro- and macrovascular complications in type 1 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2006;20:188-195
144. Steiner DF, Cunningham D, Spigelman L, Aten B. Insulin biosynthesis: evidence for a precursor. *Science* 1967;157:697-700

145. Stepuro II. Thiamine and Vasculopathies. Prostaglandines, Leukotrienes and Essential Fatty Acids 2005;72:115-127
146. Stitt A, Gardier TA, Alderson NL. The AGE inhibitor pyridoxamine inhibits development of retinopathy in experimental diabetes. Diabetes 2002;51:2826-2832
147. Tanaka Y, Tran PO, Harmon J, Robertso RP. A role for glutathione peroxidase in protecting pancreatic beta cells against oxidative stres in amodel of glucose toxicity. Proc Natl Acad Sci 2002;99:12363-12368
148. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium-dependent relaxation by activating protein kinase C. J Clin Invest 1991;87:1642-1648
149. The Expert Commitee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Commitee on the Diagnosis and Classsification of Diabetes Mellitus. Diab Care 2002;25:5-14
150. Thomas MC, Forbes JM, Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. Am J Therapeut 2005;12:562-572
151. Thomas S, Viberto GC. Diabetic nephropathy. Complication of diabetes. Medicine 2006;34:3
152. Thornalley PJ. Glycation free adduct accumulation in renal disease: the new AGE. Pediatr Nephrol 2005;20:1515-1522
153. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (pimagedine) to prevent the formation AGEs. Arch Biochem Biophys 2003;419:31-40
154. Thornalley PJ, Babaei Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, Ahmed A , Rayman G and Bodmer CW. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. Diabetol 2007;50:2164-2170
155. Thornalley PJ, Jahan I, Ahmed N, Ng R. The putative antiglycation agent phenacylthiazolium bromide supresses cellular triose phospathe accumulation in model hyperglycemia in vitro by stimulating the pentose phosphate pathway to

- consume glyceraldehyde-3-phosphate and produce ribose-5-phosphate. *Diabetes* 2000;49:612
156. Thornalley PJ, Minhas S. Rapid hydrolysis and slow α,α -dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links. *Biochem Pharmacol* 1999;57:303-307
 157. Trevisan R, Barnes DJ, Viberti G. Pathogenesis of diabetic nephropathy. Pickup JC, Williams G. Williams Endocrine. Blackwell Science Ltd. USA. Second edition. 1998;52,1-52,21
 158. Valerio G, Franzese A, Poggi V, Tenore A. Long term follow-up in two patients with the thiamine responsive megaloblastic anemia syndrome. *Diab Care* 1998;91:38-41
 159. Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature* 1996;382:275-278
 160. Verri A, Laforenza U, Gastaldi G, Tosco M, Rindi G. Molecular characteristics of small intestinal and renal brush border thiamine transporters in rats. *Biochim Biophys Acta* 2002;1558:187-197
 161. Weir GC, Leahy LL. Pathogenesis of Type II Diabetes Mellitus. Kahn R, Weir GC. Joslin's Diabetes Mellitus A. Waverly Company USA .Thirteenth edition . 1994;244-245
 162. Veldman BAJ, Vervoort G. Pathogenesis of renal microvascular complications in diabetes mellitus. *J Medicine* 2002;60(10):390-396
 163. Wendt TM, Tanji N, Guo J, Kislinger TR, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, Rong LL, Moser B, Markowitz GS, Stein G, Bierhaus A, Liliensiek B, Arnold B, Nawroth PP, Stern DM, D'Agati VD, Schmidt AM. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am J Pathol* 2003;162:1123-1137
 164. Williams ME. Clinical studies of advanced glycation end product inhibitors and diabetic kidney disease. *Curr Diab Rep* 2004;4:441-446
 165. Wrobel K, Wrobel K, Garay-Sevilla E, Nava LE, Malacara JM. Novel analytical approach to monitoring advanced glycosylation end products in

human serum with on-line spectrophotometric and spectrofluorometric detection in a flow system. Clin Chem 1997; 43:9:1563-1569

166. Wu S, Ren J. Benfothiamine alleviates diabetes induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end product, tissue factor and TNF- α . Neuroscience Letters 2006;394:158-162

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı :

İstanbul: / /

Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

İLGİ: 31.10.2005 tarihli, 2318 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Biyokimya Anabilim Dalında görevli Uzm.Öğr.Dr. EBRU ÇETİN'e ait " Tip 2 diabetli hastalarda protein glikasyonu ve nefropatili hastalarda B1 vitamininin etkilerinin incelenmesi" başlıklı çalışması hakkındaki ilgi yazınız ve ekleri 08 Kasım 2005 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya

Prof.Dr. Halil YANARDAĞ
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı