

MUSTAFA GÖKÇE

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

GLP-1 AGONİSTİ LİRAGLUTİD'İN YÜKSEK GLUKOZ
İLE İNDÜKLENEN İNFLAMASYON, OKSİDATİF STRES
VE NLRP3 İLE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

MUSTAFA GÖKÇE

DANIŞMAN
DOÇ. DR. F. İLKAY ALP YILDIRIM

FARMAKOLOJİ ABD
FARMAKOLOJİ

İSTANBUL-2024

İTHAF

Ayşe'me ve Alp'ime.

TEŞEKKÜR

Doktora ve lisans eğitimim süresince, bir rol model olarak sevgi ve saygı ile andığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Vecdi Melih ALTAN'a, Tez çalışmalarım bana ışık tutan, değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. F. İlkay ALP YILDIRIM'a ve bilimsel ve mesleki tecrübesi ile bana yön veren Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Sönmez UYDEŞ DOĞAN'a,

Ayrıca, doktora eğitimim süresince bilimsel ve manevi desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalımız Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Alper OKYAR'a, Prof. Dr. Gökçe TOPAL TANYILMAZ'a, Doç. Dr. Zeliha PALA KARA'ya, Doç. Dr. Nihan ÇARÇAK YILMAZ'a, Doç. Dr. Gülsev ÖZEN YORGANCIGİL'e, Dr. Öğr. Üye. Deniz KALELİ DURMAN'a ve Dr. Öğr. Üye. Narin ÖZTÜRK SEYHAN'a ve Arş. Gör. Dr. Erkan CİVELEK'e,

Çalışmalarımda gecesini gündüzüne katarak kahrımı çeken sevgili hocam Dr. Öğr. Üye. Dilek ÖZTÜRK CİVELEK'e, iyi ki yanımda dediğim ablam Ecz. Aylin VİDİN ŞEN'e, mental sağlığını korumamda en büyük yoldaşımdan biri olan Ecz. Zeynep ÇELİK'e,

Kardeş olma duygusunu bana sonuna kadar yaşatan, sevgi ve minnet duyduğum abilerim Doç. Dr. Eray Metin GÜLER'e ve Dr. Öğr. Üye. Muhammed Yunus BEKTAY'a ve deney aşamasında sağladığı değeri katkılardan dolayı Kübra BOZALİ'ye,

Deneylerim boyunca bana her türlü destek sağlayan ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi olanaklarını kullanmamı mümkün kılan Sayın Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım süresince beni her zaman destekleyen, ilgi gösteren, sabırla yanımda olan ve sevgiyle güvenlerini hissettiren sevgili aileme, yaşamımın her aşamasında olduğu gibi, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP birimi (No:20220203), İstanbul Üniversitesi BAP birimi (No:TSA-2022-38649), TÜBİTAK 1002 - Hızlı Destek Programı (No:720075) tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İİ
TEŞEKKÜR.....	İİİ
İÇİNDEKİLER	İV
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Diabetes Mellitus	5
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Sınıflandırma	6
2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	6
2.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	7
2.1.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus.....	7
2.1.2.4. Diğer Diyabet Türleri.....	7
2.1.3. Tanı.....	8
2.2. Glukoz Metabolizması	10
2.2.1. Normal Glukoz Homeostazı	10
2.2.2. Glukoz Homeostazının Önemi	11
2.3. İnsülin Salgısında İncretinlerin Rolü	11
2.3.1. Enteroinsüler Eksen Aktivitesi (İncretin Etkisi)	12
2.3.2. Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1).....	13
2.3.3. Gastrik İnhibitör Polipeptit (GIP).....	14
2.3.4. Enteroinsüler Eksen Aktivitesi ve Tip 2 Diabetes Mellitus	16
2.3.5. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde İncretin Bazlı Tedaviler	17
2.3.5.1. GLP-1 Reseptör Agonistleri	18
2.4. İnflamasyon, Endotel Disfonksiyonu ve Tip 2 Diabetes Mellitus Zemininde NLRP3.....	21

2.4.1. NLRP3 İnflamazomu ve İnflamatuvar Regülatörler	22
2.4.1.1. NLRP3 İnflamazomu	22
2.4.2. NLRP3 İnflamazomunun Aktivasyon Mekanizması.....	28
2.4.3. İnflamazom Aktivasyonunda İlk Adım: Endotel Disfonksiyonu	29
2.4.4. NLRP3 İnflamazomunun Diyabetteki Rolü ve İnflamazomun Metabolik Sinyallerle Aktivasyonu	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Materyaller	36
3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	36
3.1.2. Kimyasal Maddeler	37
3.1.3. Kullanılan Antikorlar.....	39
3.1.4. Kullanılan Kitler	40
3.1.5. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları.....	40
3.2. Yöntem.....	41
3.2.1. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde LDH Seviyelerinin Ölçümü.....	43
3.2.2. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Migrasyon Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi.....	44
3.2.3. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde MTT Testi ile Hücre Canlılığının Ölçümü	44
3.2.4. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	45
3.2.5. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi ..	45
3.2.6. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Oksidatif Stres Belirteçleri olan TAS, TOS ve OSI Seviyelerinin Ölçümü	46
3.2.7. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Kaspaz-1, ASC ve NLRP3 mRNA Ekspresyonlarının RT-PCR Yöntemi İle Değerlendirilmesi	47
3.2.8. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde ASC ve NLRP3 Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi İle Değerlendirilmesi.....	50
3.2.9. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde IL-1 β , IL-18 ve TNF- α Seviyelerinin ELISA Yöntemi İle Ölçümü.....	53
3.2.10. İstatistiksel Analiz	53
4. BULGULAR.....	55
4.1. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde LDH Seviyeleri Üzerine Etkileri.....	55
4.2. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Proliferasyon Üzerine Etkileri.....	57

4.3. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri	60
4.4. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkileri	62
4.5. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri	65
4.6. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde TAS, TOS ve OSI Seviyelerine Etkileri.....	67
4.7. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Kaspaz-1, ASC, NLRP3 ve eNOS mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	69
4.8. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde ASC, NLRP3 ve eNOS Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri	72
4.9. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Hücre içi IL-1 β , IL-18 ve TNF- α Seviyelerine Olan Etkisi	76
4.10. Sonuçlar Tablosu.....	79
5. TARTIŞMA	81
KAYNAKLAR	89
HAM VERİLER	111
FORMLAR	112
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	113

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: GLP1 ve GIP'nin farklı dokulardaki etkileri.....	18
Tablo 3-1: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı.....	50
Tablo 3-2: Primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.....	51
Tablo 4-1: HUVEC ve HCAEC'de 48 saatlik 10 nM ve 100 nM Liraglutid inkübasyonu sonrası elde edilen bulgular.....	80



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: PRR aktivasyon modelleri.....	22
Şekil 2-2: NLRP3 inflamazom kompleksi.....	23
Şekil 2-3: NLRP3 inflamazomunun genel aktivasyon modeli.....	24
Şekil 2-4: NLRP3, endotel disfonksiyonu ve tip 2 diyabet arasındaki ilişki.....	33
Şekil 2-5: NLRP3'ün metabolik sinyaller ile aktivasyonu.....	34
Şekil 4-1: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücrelerinde LDH seviyeleri üzerine etkileri.....	56
Şekil 4-2: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde proliferasyon üzerine etkilerinin ışık mikroskopu ile incelenmesi (A) ve analiz sonuçları (B).....	57
Şekil 4-3: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde proliferasyon üzerine etkilerinin ışık mikroskopu ile incelenmesi (A) ve analiz sonuçları (B)	59
Şekil 4-4: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücre canlılığı üzerine Etkileri	61
Şekil 4-5: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri ve analiz sonuçları	63
Şekil 4-6: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik Koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri ve Analiz Sonuçları	65
Şekil 4-7: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) seviyelerine etkileri.....	68
Şekil 4-8: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) seviyelerine etkileri	69
Şekil 4-9: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde kaspaz-1 (A), ASC (B) ve NLRP3 (C) mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri	70

Şekil 4-10: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde kaspaz-1 (A), ASC (B) ve NLRP3 (C) mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri.....	71
Şekil 4-11: Protein standart ölçü eğrisi.....	72
Şekil 4-12: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde ASC protein ekspresyonları üzerine etkileri	73
Şekil 4-13: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde NLRP3 protein ekspresyonları üzerine etkileri	74
Şekil 4-14: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde ASC protein ekspresyonları üzerine etkileri	75
Şekil 4-15: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde NLRP3 protein ekspresyonları üzerine etkileri	76
Şekil 4-16: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde hücre içi IL-1 β (A), IL-18 (B) ve TNF- α (C) seviyelerine olan etkisi.....	78
Şekil 4-17: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde hücre içi IL-1 β (A), IL-18 (B) ve TNF- α (C) seviyelerine olan etkisi	79

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

- ADP:** Adenozin difosfat
- AGE:** Gelişmiş glikasyon son ürünleri
- ASC:** Apoptoz–ilişkili nokta benzeri protein
- ATP:** Adenozin trifosfat
- CARD:** Kaspaz aktivasyon ve işe alım bölgesi
- CRP:** C reaktif protein
- DAMP:** Hasar ilişkili moleküler paternler
- DPP-4:** Dipeptidil peptidaz 4
- eNOS:** Endotelial nitrik oksit sentaz
- ER:** Endoplazmik retikulum
- GDM:** Gestasyonel diabetes mellitus
- GIP:** Gastrik inhibitör polipeptit
- GLP-1:** Glukagon benzeri peptit-1
- GLP-1R:** Glukagon benzeri protein reseptörü
- GLUT 2:** Glukoz transporter-2
- GSH:** Glutatyon
- HbA1c:** Hemoglobin A1c
- HCAEC:** İnsan koroner arter endotel hücreleri
- HFD:** Yüksek yağlı diyet
- HUVEC:** İnsan umbilikal ven endotel hücreleri
- IL-18:** İnterlökin-18
- IL-1 β :** İnterlökin-1 beta
- IL-6:** İnterlökin-6
- KVH:** Kardiyovasküler hastalık
- LRR:** Lösinden zengin tekrarlar
- MAPK:** Mitojen ile aktive protein kinaz
- MCP-1:** Monosit kemoatraktan protein-1
- MODY:** Gençlerin olgun başlangıçlı diyabet formu
- NADPH:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

- NF- κ B:** Nükleer faktör kappa B
- NLRP3:** NOD-, LRR- ve pirin içeren protein 3
- NO:** Nitrik oksit
- NOD:** Nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı
- OGTT:** Oral glukoz tolerans testi
- PAMP:** Patojen ilişkili moleküler paternler
- PI:** Propidyum iyodür
- PI3K:** Fosfatidilinositol 3-kinaz
- PRR:** Patern tanıma reseptörleri
- PYD:** Amino terminalindeki pirin alanı
- ROS:** Reaktif oksijen türleri
- T1DM:** Tip 1 diyabet
- T2DM:** Tip 2 diyabet
- TAS:** Total antioksidan seviye
- TNF- α :** Tümör nekrozis faktör alfa
- TOS:** Total oksidan kapasite
- TXNIP:** Tiyoredoksin-etkileşimli protein
- VCAM-1:** Vasküler hücre adhezyon molekülü-1

ÖZET

Gökçe, M (2023). GLP-1 Agonisti Liraglutid'in Yüksek Glukoz ile İndüklenen İnflamasyon, Oksidatif Stres ve NLRP3 ile İlişkili Sinyal Yolakları Üzerine Etkisinin İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık Fakültesi Farmakoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Diabetes Mellitus'a bağlı endotel disfonksiyonu, hücre sinyalizasyonundaki değişim, artan oksidatif stres ve proinflamatuvar süreçlerin aktivasyonu, diyabetle ilişkili vasküler komplikasyonların ana nedenidir. NLRP3, immün yanıtta önemli bir rol oynayan ve inflamatuvar kaspazların aktivasyonunu sağlayan bir protein kompleksidir. Bu çalışma, GLP-1R agonisti Liraglutid'in insan endotel hücre kültürlerinde inflamasyona zemin hazırlayan immün yanıt yolaklarıyla ilişkili hedef moleküllere olan etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve insan koroner arter endotel (HCAEC) hücreleri, normoglisemik (5.5 mM) veya hiperglisemik (25 mM) ortamda 48 saat boyunca Liraglutid'in 10 nM ve 100 nM konsantrasyonları ile inkübe edilmiştir. Ardından hücrelerde canlılık, proliferasyon, apoptoz, hücre döngüsü, NLRP3 inflamazomunda rol oynayan proteinlerin (ASC, Kaspaz-1, NLRP3) mRNA ve protein ekspresyonu ve oksidatif stres tayini yapılmıştır. Hiperglisemik ortamın, HUVEC ve HCAEC hücrelerinde, hücre proliferasyonunu azalttığı, oksidatif stresi artırdığı, NLRP3 inflamazom bileşenlerinin mRNA ekspresyonlarını artırdığı, proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini değiştirmedeği ve hücre membran bütünlüğünde bir hasara sebep olduğu gözlenmiştir. Liraglutid inkübasyonunun ise hiperglisemi ile azalan proliferasyonu daha da şiddetlendirdiği, artan oksidatif stresi azalttığı, artan NLRP3 inflamazom bileşenlerinin mRNA ekspresyonları ile proinflamatuvar sitokinlerin düzeylerini normalize ettiği ve hücre membranındaki hasarı azalttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, Liraglutid'in insan kaynaklı venöz ve arteriyel endotel hücrelerinde hiperglisemi ile indüklenen inflamasyon ve immün yanıt aktivasyonuna bağlı olarak oluşan hücresel hasarı azaltma potansiyelinin olabileceğine işaret etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endotel disfonksiyonu, Hiperglisemi, Vasküler inflamasyon, Liraglutid, NLRP3

Bu çalışma, Bezmialem Vakıf Üniversitesi BAP birimi (No:20220203), İstanbul Üniversitesi BAP birimi (No:TSA-2022-38649), TÜBİTAK 1002 - Hızlı Destek Programı (No:720075) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Gökçe, M. (2023). Evaluation of the Effect of GLP-1 Agonist Liraglutide on High Glucose-Induced Inflammation, Oxidative Stress, and NLRP3-Associated Signaling Pathways. Istanbul University, Institute of Health Sciences, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacology. PhD Thesis. Istanbul.

Diabetes Mellitus related endothelial dysfunction, alteration in cell signaling, increased oxidative stress and activation of proinflammatory processes are the main causes of diabetes-related vascular complications. NLRP3 is a protein complex that plays an important role in the immune response and enables the activation of inflammatory caspases. This study aims to investigate the effect of the GLP-1R agonist Liraglutide on target molecules related to immune response pathways that predispose to inflammation in human endothelial cell cultures. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human coronary artery endothelial cells (HCAEC) cells were incubated with 10 nM and 100 nM concentrations of Liraglutide for 48 hours in normoglycemic (5.5mM) and hyperglycemic (25 mM) cell medium. Then, cell viability, proliferation, apoptosis, cell cycle, and oxidative stress the mRNA and protein expression of proteins that play a role in NLRP3 inflammasome (ASC, Caspase-1, NLRP3) were determined. It has been observed that hyperglycemic environment reduces cell proliferation, increases oxidative stress, increases mRNA expression of NLRP3 inflammasome components, does not change the levels of proinflammatory cytokines, and causes damage to cell membrane integrity in HUVEC and HCAEC cells. Liraglutide incubation further aggravated the proliferation decreased by hyperglycemia, reduced the increased oxidative stress, normalized the mRNA expressions of NLRP3 inflammasome components and proinflammatory cytokines levels, and reduced the damage of the cell membrane. Our results indicate that Liraglutide may have the potential to decrease cellular damage by reducing hyperglycemia-induced inflammation and immune response activation in human venous and arterial endothelial cells.

Keywords: Endothelial dysfunction, Hyperglycemia, Vascular inflammation, Liraglutide, NLRP3

This study was supported by the Bezmialem Vakif University BAP unit (No: 20220203), Istanbul University BAP unit (No: TSA-2022-38649), TUBITAK 1002-Rapid Support Program (No: 720075).

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize, insülin eksikliği ve/veya insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbohidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı metabolik bir hastalıktır. Uluslararası Diyabet Federasyonu 2021 verilerine göre dünya genelinde 537 milyon diyabetli birey bulunmakta, 2045 yılı itibarıyla bu sayının 783 milyonu bulması beklenmektedir [1]. Diabetes Mellitus etiyolojik olarak Tip 1 diyabet (T1DM), Tip 2 diyabet (T2DM), gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet türleri olarak sınıflandırılır. Diyabetli bireylerin çoğunluğunu Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır [2]. Tip 1 Diabetes Mellitus'ta pankreasta beta hücrelerin yıkımı (%90'ında otoimmün, %10 kadarında ise non-otoimmün yıkım) nedeniyle gelişen mutlak insülin eksikliği vardır. T2DM ise, insülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir [3].

Son yıllarda yapılan çalışmalar insülin direnci ve inflamasyon arasındaki ilişkiye dikkat çekmekte, T2DM ve obezite patogenezinde aktive olmuş inflamatuvar yanıtın önemli bir yere sahip olduğu, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α), interlökin-6 (IL-6), interlökin-1 β (IL-1 β) ve interlökin-18 (IL-18) gibi pro-inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin kronik hiperglisemiye ve pankreatik β hücre ölümüne neden olduğu belirtilmektedir. Proinflamatuvar bir sitokin olan TNF- α , glukoz ve lipid metabolizmasını etkilemekte; insülinin etkisini inhibe etmek ve pankreas hücre fonksiyonunu bozmak suretiyle T2DM ile ilişkili sistemik insülin direncinin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır [4,5]. Glukoz metabolizmasında IL-1 β ve IL-18 de giderek artan bir öneme sahip olmaktadır. IL-1 β 'nin uzun dönemde artan ekspresyonunun, farelerde diyetle indüklenen obezite modelinde insülin seviyelerini, glukoz alımını ve metabolizmasını artırdığı, bunu da makrofajlarda artan insülin reseptör ekspresyonu ve inflamasyon yoluyla gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. IL-1 β 'nin makrofajlarda insülin duyarlılığını azaltıp, glukoz absorpsiyonunu ve reaktif oksijen türleri (ROS) seviyelerini artırdığı gösterilmiştir [6]. IL-18, dendritik hücreler, makrofajlar, T hücreleri ve B hücreleri gibi çeşitli bağışıklık hücreleri tarafından üretilen proinflamatuvar bir sitokindir ve başlangıçta interferon gama indükleyici faktör olarak kabul edilen IL-1 sitokin ailesinin

bir üyesidir [7,8]. IL-18'in obezite [9], insülin direnci [10] ve dislipidemi [9] gelişimi ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur.

İnflamasyona zemin hazırlayan immün cevap, temelde doğal ve adaptif bağışıklığa dayanmaktadır [11]. Doğal bağışıklık yanıtı, endojen veya ekzojen patojenleri algılamak için patern tanıma reseptörlerini (PRR) kullanmaktadır. Bugüne kadar beş farklı tipte PRR tanımlanmıştır [12]. Bu PRR'ler, özgül ligandlarına bağlanarak nükleer faktör-kappa B (NF- κ B), mitojen ile aktive protein kinaz (MAPK) ve tip 1 interferon yollarını uyarmaktadırlar. Bu süreç sonucunda proinflatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi ve salımı sağlanmaktadır [13]. PRR'ler, "hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP'lar)" olarak adlandırılan endojen molekülleri tanımaktadırlar. DAMP'lar, hücre ya da doku hasarı olmadığı durumlarda, hücre içinde veya ekstraselüler matrikste bulunmaları nedeniyle immün sistem tarafından tespit edilemezler; ancak hücrel stres veya hasar meydana geldiğinde serbest hale gelirler [14]. İnflamazom, infeksiyöz ajanlara ve fizyolojik hasara karşı konakçı savunma mekanizmalarını düzenlemek amacıyla inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan multimerik bir protein kompleksidir. İnflamazom kompleksleri, bulundurdukları PRR yapısına göre adlandırılırlar. Şu ana kadar 5 inflamazom türü tanımlanmıştır ve bunların içinden nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı (NOD-), Lösinden zengin tekrarlar (LRR-) ve pirin içeren protein 3 (NLRP3) en iyi karakterizasyonu yapılan tür olarak yerini almıştır [15]. Araştırmalar özellikle obeziteye ve yağlı beslenmeye bağlı gelişen insülin direncinde NLRP3'ün hayati bir rol oynadığının altını çizmektedir [16,17]. Yüksek IL-1 β seviyelerinin, obez bireylerde insülin direncine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bu bireylerin yağ dokusunda, özellikle makrofajlarda, NLRP3 inflamazom bileşenleri olan kaspaz-1 aktivitesi ve IL-1 β seviyesi artmakta ve bu bileşenler doğrudan insülin direnci, metabolik sendrom ve T2DM'nin şiddeti ile ilişkilendirilmektedir [16,17]. Ayrıca, NLRP3, obezite gelişimi sırasında glukoz, doymuş yağ asitleri gibi metabolik sinyal molekülleri tarafından aktive edilerek IL-1 β ve sitokinlerin üretimine yol açabilmektedir [18,19]. NLRP3'ün kaspaz-1 yolağı ile monosit gibi immün hücrelerde indüklediği sitokin ve kemokin salımının bir benzerini, pankreastaki beta hücrelerde gerçekleştirerek uzun dönemde propitoz yolu ile beta hücre harabiyetine yol açtığı ve bunun da insülinemi ile karakterize T2DM'ye yol açabileceği gösterilmiştir [20].

Oksidatif stres, insülin direncinin gelişiminden, pankreas β hücrelerinden yetersiz insülin salgılanmasından ve T2DM patogenezinin sorumlu olan diğer faktörleri tetiklemekten sorumlu ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir. Klinik çalışmaların sonuçları, oksidatif stresin T2DM prevalansı ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu göstermektedir. T2DM'li hastaların pankreas biyopsilerinde, plazmasında ve serumunda prooksidanların ve oksidatif stresin neden olduğu doku hasarı biyobelirteçlerinin seviyelerinin yükseldiği bildirilmiştir [21]. Total antioksidan seviyenin (TAS), T2DM'de önemli ölçüde azaldığı çeşitli deneysel çalışmalarda kanıtlanmıştır [22,23]. Ek olarak, pankreas β hücreleri hiperglisemiye maruz kaldığında, hücre içi Ca^{2+} seviyelerinin arttığı, bunun da adenosin difosfat (ADP) tüketiminin artmasına ve yüksek ROS üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir [24]. Mitokondriyal fonksiyon, NLRP3 inflamazomunun aktivitesiyle de yakından ilişkilidir. Mitokondriyal hasarın bir sonucu olarak mitokondriyal ROS'un salınması, NLRP3 inflamazomunun ana aktivasyon sinyallerinden biridir [25]. Bu anlamda hem mitokondriyal hem de ektramitokondriyal ROS üretiminin NLRP3 inflamazomu aktive edebildiği [26] ya da nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazın spesifik inhibisyonunun NLRP3 inflamazom aktivasyonunu önlediği [27] gösterilmiştir.

Endotel disfonksiyonu, T2DM'nin erken aşamalarında kompleks bir mekanizma ile gelişir; değişen hücre sinyalizasyonu, artan oksidatif stres, proinflamatuvar aktivasyon ve mitokondriyal disfonksiyon bu sürecin temelini oluşturur. Bu vasküler patoloji, yüksek glukoz, yüksek yağ seviyeleri, insülin direnci ve hipertansiyonla ilişkilidir [28,29]. T2DM'nin kardiyovasküler hastalıklarla yakından ilişkili olduğunu ve normogliseminin sürdürülmesinin kardiyovasküler bozuklukları önlemede kilit olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [30,31]. Beyin mikro ve makro damarlarının morfolojik değişimleri arasında kollajen birikimi ile bazal laminanın kalınlaşması, lipid peroksidasyon yan ürünlerinin birikmesi ve perisitler ile endotel hücrelerinin dejenerasyonu bulunmaktadır [32–34].

Kronik hiperglisemi, inflamasyon ve oksidatif stres de dahil olmak üzere çeşitli komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, yüksek glukoz seviyelerinin ROS üretimi ve mitokondriyal disfonksiyon aracılığıyla makrofajlarda NLRP3 inflamazomu aktive ettiği gösterilmiştir [19]. Sharma ve arkadaşları, hipergliseminin pankreatik adacıklarda NLRP3 inflamazom

aktivasyonuna neden olduğunu ve bu durumun beta hücre işlev bozukluğuna katkıda bulunduğunu göstermiştir [35]. Bununla birlikte hiperglisemiye bağlı ROS üretiminin endotel disfonksiyonuna ve diyabette vasküler komplikasyonlara katkıda bulunduğu gösterilmiştir [36].

Günümüzde antidiyabetiklerin inflamatuvar-metabolik çerçevedeki etkileri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bununla birlikte, antidiyabetik ilaç gruplarından biri olan glukagon benzeri peptit-1 (GLP-1) reseptör agonistlerinin NLRP3 ile ilişkisinin değerlendirildiği çalışmalar kısıtlı sayıdadır. H9c2 kardiyomiyoblast hücre kültüründe GLP-1 reseptör agonisti Liraglutid'in NLRP3'e bağlı propitozu ve ROS seviyelerini azalttığı gösterilmiştir [37]. Bir başka çalışmada ise, Liraglutid'in insan karaciğer kanseri (HepG2) hücrelerinde lipit birikimini azalttığı, mitokondri fonksiyonunu koruduğu ve NLRP3 inflamazomunun inhibisyonu ile propitotik hücre ölümünün azalmasına yol açtığı bildirilmiştir [38]. Öte yandan, Goto-Kakizaki soyu sıçanlarla oluşturulan T2DM modelinde, sol ventrikülde artan NLRP3 seviyelerinin 8 haftalık Liraglutid uygulanması ile azalmadığı, dolayısıyla GLP-1 reseptör agonistlerinin kardiyoprotektif etkilerinin NLRP3'ten bağımsız olduğu ileri sürülmüştür [39]. Bir başka GLP-1 reseptör agonisti olan Dulaglutid'in HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamda (25 mM) inkübasyonunun, hipergliemik ortamda artan oksidatif stres, LDH seviyeleri ve NLRP3 inflamazom protetinlerinin ve mRNA ekspresyonlarını azalttığı gösterilmiştir [40].

Periferik insülin direncinde inflamasyon, endotel disfonksiyon, oksidatif stres ve immün yanıtın önemli bir rol oynadığı bilinmekle birlikte, NLRP3 ve endotel disfonksiyonu ilişkisinde Liraglutid'in rolünün değerlendirildiği bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada, insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve insan koroner arter endotel hücre (HCAEC) kültürlerinde karşılaştırmalı olarak, hücre canlılığı, hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, yüksek glukoz ile indüklenen inflamasyon, oksidatif stres ve NLRP3 ile ilişkili sinyal yolları üzerinde GLP-1 reseptör agonisti Liraglutid'in etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile karakterize, insülin eksikliği ve/veya insülin etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbohidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı metabolik bir hastalıktır [1]. Diabetes Mellitus etiyolojik olarak Tip 1 diyabet (T1DM), Tip 2 diyabet (T2DM), gestasyonel diyabet ve diğer spesifik diyabet türleri olarak sınıflandırılır. Diyabetli bireylerin çoğunluğunu Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalar oluşturmaktadır [2]. Tip 1 Diabetes Mellitus'ta pankreasta beta hücrelerin yıkımı (%90'ında otoimmün, %10 kadarında ise non-otoimmün yıkım) nedeniyle gelişen mutlak insülin eksikliği vardır. T2DM ise, insülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir [3].

Diyabet ve özellikle T2DM, artan obezite oranlarıyla paralel olarak 21. yüzyılda önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer kardiyovasküler risk faktörleri ile birlikte tedavi edilmeyen hiperglisemi, diyabetli bireylerde erken ölümün en yaygın nedeni olan miyokard enfarktüsü ile kendini gösteren kardiyovasküler hastalığa (KVH) neden olabilir [41]. KVH veya makrovasküler komplikasyonlara paralel olarak, hipergliseminin derecesi ve süresi ile ilişkili olarak mikrovasküler komplikasyonlarda meydana gelebilmektedir. Mikrovaskülopati olan kişilerde, potansiyel görme kaybıyla birlikte retinopati, böbrek yetmezliğine yol açan nefropati, vaskülopati ile birlikte ayak ülseri ve amputasyon riskini artıran periferik nöropati görülebilir. Ayrıca, erektil disfonksiyon, işitme kaybı ve demans gibi diğer komplikasyonların diyabetli bireylerde daha yaygın olduğu ve daha erken ortaya çıktığı bilinmektedir. Diyabet ile ilişkili komplikasyonlar, sağlık bakım maliyetlerini artırdığı ve verimlilik kaybına neden olduğu için önemli bir halk sağlığı sorunu teşkil etmektedir [42].

2.1.1. Epidemiyoloji

Uluslararası Diyabet Federasyonu 2021 verilerine göre dünya genelinde 537 milyon diyabetli birey bulunmakta, 2045 yılı itibarıyla bu sayının 783 milyonu bulması beklenmektedir [1]. Son 20 yılda dünya çapında DM insidansı ve prevalansında sürekli bir artış olmuştur. Gelişmekte olan ülkelerde 2030'a kadar %20 ile %69 arasında bir artış öngörülmüştür. Bu artışın çoğu, diyabetin en yaygın türü olan T2DM'ye atfedilmektedir (vakaların %87-95'i). 2020 yılında dünyada her 11 kişiden 1'inin diyabet hastası olduğu tahmin edilmektedir. 2021'da yayınlanan güncel Diyabet Atlası'na göre Türkiye Avrupa

lkeleri arasında diyabet prevalansının en yüksek olduğu (%11.1) lkelerden biridir [1]. TURDEP-II alışması verilerine göre ülkemizde erişkin nüfusun %42'si diyabetik ya da prediyabetiktir [3]. Türkiye'de ve dünya genelinde diyabet prevalansındaki bu artış, diyabeti teşhis etme yeteneğindeki artışa, yaşam sresindeki artışa ve küresel olarak görülen kötüleşen obezite ve fiziksel hareketsizlik salgınlarına bağlanmıştır. Veriler, obezite ve sedanterizm ile sonuēlanan modern yaşam tarzının önceden var olan diyabet genleriyle etkileşime girebileceğini ve epigenetik modifikasyonlara yol aēabileceęini göstermektedir. T1DM insidansı da küresel olarak artmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde, özellikle 15 yaşın altındaki çocuklar arasında T1DM insidansının arttığı ve 2050 yılına kadar prevalansta %20 ve %70 arasında bir artış olacağı tahmin edilmektedir [1].

2.1.2. Sınıflandırma

DM sınıflamasında dört klinik tip vardır. Bunlardan ē primer (T1DM, T2DM ve gestasyonel diyabet), diğerleri (spesifik diyabet tipleri) sekonder olarak sınıflandırılmaktadır. Primer formlar çeşitli özelliklerle birbirinden ayrılır. Bozulmuş glukoz regülasyonu, bozulmuş glukoz toleransını veya bozulmuş aēlık glukozunu iēermektedir. Bu durum DM iēin gēl bir risk faktörüdür ve hastalığın fiili başlangıcından yıllar önce ortaya çıkabilir [43].

2.1.2.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 Diabetes Mellitus'da, otoimmün pankreatik beta hücre yıkımı nedeniyle mutlak insülin eksikliği vardır. Bu durum, genetik olarak duyarlı kişilerde çevresel faktörler tarafından tetiklenebilir. Beta hücrelerinin yıkımı, insülin konsantrasyonunun artık plazma glukoz seviyelerini kontrol edemediği bir noktaya düşene kadar aylar veya yıllar boyunca devam eder. Tip 1 Diabetes Mellitus genellikle çocukluk veya ergenlik döneminde gelişir. B hücrelerinin otoimmün yıkımı, çoklu genetik yatkınlığa sahiptir ve hala tam olarak anlaşılamayan çevresel tetikleyici faktörlerle ilgilidir. Bu hastalar ayrıca otoimmün tiroid hastalığı, Addison hastalığı, vitiligo, otoimmün hepatit, miyastenia gravis, lyak hastalığı ve pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün bozukluklara da yatkındır [2].

2.1.2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

T2DM, insülinin yetersiz salgılanması ile karakterize bir durumdur. Hastalığın erken döneminde insülin seviyeleri genellikle çok yüksektir ve bu durum hastalık gelişiminin ilerleyen dönemlerinde de devam edebilir. Bununla birlikte, periferik insülin direnci ve karaciğer tarafından artan glukoz üretimi, insülin seviyelerinin plazma glukoz seviyelerini normalleştirmek için yetersiz kalmasına neden olur. Daha sonra insülin üretimi azalır ve hiperglisemi kötüleşir. T2DM genellikle yetişkinlerde gelişir ve yaşlandıkça daha yaygın hale gelir. Plazma glukoz seviyeleri, genç yetişkinlere göre yaşlılarda yemeklerden sonra daha yüksek seviyelere ulaşır. Bu durum, özellikle yüksek karbohidratlı besinlerin alımı ile gerçekleşir. Kısmen visceral ve abdominal yağ birikiminin artması ve kas kütlesinin azalması nedeniyle seviyelerin normale dönmesi için daha fazla zaman gerekir. Günümüzde T2DM, çocuklar arasında her zamankinden daha yaygın hale gelmiştir bu durum ile ilişkili olarak çocukluk çağı obezitesi bir salgın halini almıştır. Çocuklarda yeni başlayan diyabetin yaklaşık %50'si T2DM'dir. Diyabetli yetişkinlerin %90'ından fazlası bu forma sahiptir. Hispanikler, Amerikan Kızılderilileri ve Asyalıların yanı sıra diğer etnik gruplarda ve hastaların akrabalarında T2DM yaygınlığını etkileyen açık genetik faktörler mevcuttur. Birkaç genetik polimorfizm tanımlanmıştır, ancak tanımlanmış tek bir nedensel gen olmamıştır [30].

2.1.2.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM), gebelik sırasında gelişen bir formdur. Genellikle insülin eksikliği veya insülin direnci nedeniyle karbohidratları metabolize etme yeteneğinin bozulması ile karakterizedir. Bebeğin doğumundan sonra durum kaybolur. Ancak önemli sayıda vakada yıllar sonra T2DM olarak geri döner. Plasental laktojenin ve plasenta tarafından önemli ölçüde insülin yıkımının GDM'yi hızlandırmada rol oynadığını gösteren kanıtlar vardır [44].

2.1.2.4. Diğer Diyabet Türleri

Monojenik Diyabet: Bazı nadir diyabet formları, tek bir gendeki mutasyonlardan kaynaklanır ve monogenik olarak adlandırılır. Gençlerde tüm diyabet vakalarının yaklaşık %1-5'ini oluştururlar. Çoğu durumda gen mutasyonu kalıtsaldır; kalan durumlarda gen mutasyonu kendiliğinden gelişir. Bu mutasyonların çoğu vücudun insülin üretme yeteneğini azaltır. Hiperglisemi ilk olarak çocuklukta tespit edildiğinde yanlışlıkla T1DM olarak teşhis edilebilir ve yetişkinlikte teşhis edildiğinde yanlışlıkla T2DM olarak

teşhis edilebilmektedir. Bazı monogenik diyabet formları, oral diyabet ilaçlarıyla tedavi edilebildiğinden ve bu da daha iyi glukoz kontrolünü sağlayabileceğinden, doğru teşhis uygun tedavi için önemlidir. Genetik testler, monogenik diyabetin çoğu formunu teşhis edebilir ve diyabet riski altında olup olmadıklarını belirlemek için diğer aile üyelerinin test yapması gerekliliği belirtilebilir. Monogenik diyabetin iki ana formu, neonatal diyabetes mellitus ve gençlerin olgunluk başlangıçlı diyabeti olarak adlandırılır [45].

Gençlerin Olgunluk Döneminde Başlayan Diyabeti (MODY): Bu modelde, β -hücre fonksiyonundaki monogenik kusurlar, insülin sekresyonunda bozulmaya neden olmaktadır. Farklı kromozomlar üzerindeki altı genetik bölge, hepatosit nükleer faktör-1 α olarak adlandırılan bir hepatik transkripsiyon faktöründeki kromozom 12'deki mutasyonlarla ilişkili en yaygın formla tanımlanmıştır [46]. İkinci bir form, 7p kromozomu üzerindeki (glukoz sensörü olarak görev yapan) glukokinaz genindeki mutasyonlarla ilişkilidir. Hasarlı glukokinaz molekülü, daha az glukozu glukoz-6-fosfata dönüştürür ve bu nedenle β -hücresi tarafından daha az insülin salgılanmasını uyarır. Bu kusur, plazma glukoz seviyelerinin artmasına neden olur. Daha az yaygın formlar, hepatosit nükleer faktör -4 α , hepatosit nükleer faktör 1 β , insülin promotör faktörü-1 ve NeuroD1 dahil olmak üzere diğer transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bu hastalıklarda hiperglisemi tamamen disregüle edilmediğinden, daha az gözlenen komplikasyon vardır ve aslında glukokinaz genindeki mutasyonlara bağlı gelişen MODY'li bireyler genellikle tedaviye ihtiyaç duymamaktadır. Hepatosit nükleer faktör-1 α veya hepatosit nükleer faktör-4 α 'daki mutasyonlara sahip hastaların genellikle tercih edilen ajan olan sülfonilürelerle iyi yanıt verdiği gözlenmiştir [47].

Neonatal Diyabet; Yenidoğan diyabeti, yaşamın ilk 6 ayında teşhis edilen ve geçici veya kalıcı olabilen diyabet için kullanılan bir terimdir. En yaygın olan tipinde, ZAC/HYAMI genlerinde bir kusur bulunmaktadır. Hastalığın kalıcı formu, β -hücresinde K_{ATP} kanalının Kir6.2 alt birimini kodlayan gende bir kusura sahiptir. Sülfonilürelerle başarılı bir şekilde tedavi edilebildiği için bu bozukluğun teşhisinin konulması önem arz etmektedir [48,49].

2.1.3. Tanı

Diyabet tanısı koymak için kullanılan dört kriter vardır: 6,5 mmol/L ve üzeri Hemoglobin A1c (HbA1c) değeri, 126 mg/dL ve üzeri açlık plazma glukozu, oral glukoz tolerans testi (OGTT) de 2. saat plazma glukozunun 200 mg/dl ve üzeri olması veya

diyabet semptomlarına ilaveten rastgele plazma glukozunun 200 mg/dL ve üzeri olması. HbA1c testini kullanmanın avantajları, herhangi bir zamanda aç olma şartı olmaksızın yapılabilmesidir. Ayrıca HbA1c akut hastalıklardan daha az etkilenir, daha yüksek bir preanalitik stabiliteye sahiptir ve standardize edilmiştir. HbA1c tayini elde etmenin bir başka nedeni de komplikasyonlar için altın standart haline gelmesi ve sadece mikrovasküler komplikasyonlar için değil aynı zamanda KVH ve mortalite için de bir belirteç oluşturmasıdır [50]. Bu testin dezavantajları kırmızı hücre döngüsü ve hemoglobinopatilerdeki değişiklikten etkilenebilme, gelişmekte olan dünyanın belirli bölgelerinde daha yüksek maliyete sahip olma ve sınırlı bulunabilirliktir. HbA1c değerleri yorumlanırken hemoglobinopatiler ve/veya anemiye ek olarak yaş, ırk veya etnik köken gibi diğer faktörlerin de dikkate alınması gerekir [51].

Glukoz tolerans testleri 75 veya 100 g glukoz verilerek yapılır. Bu test, tek başına açlık glukozundan daha hassas ve spesifik olmasına rağmen, uzun ve külfetlidir. Test sabahları, bir gecelik açlıktan ve en az 3 gün karbohidrattan zengin, sınırsız bir diyetten sonra yapılmalıdır. Denek test boyunca oturmalı ve sigara içmesine izin verilmemelidir. Teşhis için iki veya daha fazla değer karşılanması veya aşılması gerekir. Glisemik değerler büyük ölçüde değişir ve vücut ağırlığı, gıda alımı, fiziksel aktivite, stres, gebelik, kortikosteroid veya diğer ilaçların kullanılması durumlarına göre hiperglisemi veya glukoz intoleransının derecesi iyileşebilir veya kötüleşebilir [43].

Erken evrelerde, özellikle T2DM'de, hipergliseminin derecesi patolojik değişikliklere neden olmak için yeterlidir, ancak klinik semptomlara yol açmak için yeterli değildir. Bu nedenle, teşhis konana kadar hastalığın sessiz fazı uzun süre devam edebilir. Tipik olarak hastalık prediyabetten T2DM'ye ilerler. Sağlıklı bireylere tanı koymanın maliyet etkinliğini artırmak için, yüksek riskli popülasyonlarda test yapılması düşünülmelidir. HbA1c ölçümü, hastalar için daha kolay ve daha kabul edilebilir olduğundan, artık klinik ortamlar için tercih edilen tarama testidir. Testin pratik ve uygun maliyetli olması gerekir ve hem OGTT hem de açlık plazma glukozu aynı zamanda uygun testlerdir. Güncel testlerin, özellikle HbA1c tespitlerinin mevcudiyeti ile hem prediyabet hem de diyabet tanısı kolaylıkla konabilir; ancak vurgu, teşhisin müdahale ve sonuçları iyileştirme için nasıl kullanıldığına kaydırılmalıdır [51].

Hamilelik sırasında diyabet testiyle ilgili en güncel öneriler, ilk obstetrik muayenesinde yüksek riskli hastaların T2DM için taranmasını içerir. Yüksek riskli

sayılmayan bireylerde, tek aşamalı veya iki aşamalı strateji kullanılarak 24-28. gebelik haftalarında tarama yapılmalıdır. İki yaklaşım vardır: tek aşamalı ve iki aşamalı yaklaşım. 2011 Bakım Standartlarından bu yana, Amerikan Diyabet Derneği ilk kez, Uluslararası Diyabet ve Gebelik Derneği'nin tavsiyesine dayanarak, daha önce diyabeti olmadığı bilinen tüm hamile kadınların 24-28. gebelik haftalarında 75 g OGTT'den geçmesini tavsiye etmiştir [51]. 2013'te Ulusal Sağlık Enstitüsü, 1 saatlik 50 g glukoz yükleme testi (açlık olmayan) ve ardından 1 saat sonra bir plazma glukozu taramasını önermiş, yüklemeden 1 saat sonra ölçülen plazma glukoz düzeyi 140 mg/dL üzeri ise, bunun tanısal 3 saatlik 100 g OGTT ile izlenmesini tavsiye etmiştir. Tanısal OGTT kullanıldığında, GDM'li kadınların yaklaşık %80'i 140 mg/dL eşik değeri ile tanımlanır. 130 mg/dL'lik bir eşik değeri kullanıldığında ise GDM'li kadınların %90'ı belirlenmiş olur [52].

2.2. Glukoz Metabolizması

2.2.1. Normal Glukoz Homeostazi

24 saatlik bir süre boyunca arteriyel plazma glukoz değerleri ortalama yaklaşık 100 mg/dL (~5.5 mmol/L) olup, maksimum konsantrasyon (yemek sonrası) genellikle 165 mg/dL'yi (~9 mmol/L) aşmamaktadır. Egzersiz sonrası veya açlıkta bu değer 55 mg/dL (~3 mmol/L) seviyelerine kadar düşebilmektedir [53]. Glukoz seviyelerindeki bu göreceli kararlılık, dalgalanmaları çok daha geniş ölçüde değişen gliserol, laktat, serbest yağ asitleri ve keton cisimcikleri gibi diğer substratların durumuyla çelişir. Normoglisemik aralık, karmaşık bir düzenleyici ve karşı düzenleyici nörohormonal sistem aracılığıyla sürdürülür: plazma glukozundaki 20 mg/dL kadar küçük bir azalma bile, insülin salınımını baskılayacak ve beyindeki belirli alanlarda (örneğin, glukoz sensörlerinin bulunduğu hipotalamus) glukoz alımını azaltacaktır. ; bu da sempatik sinir sistemini harekete geçirecek ve karşı düzenleyici hormonların (glukagon, katekolaminler, kortizol ve büyüme hormonu) salınmasını tetikleyecektir. Tüm bu değişiklikler, normoglisemiyi eski haline getirmek için plazmaya glukoz salınımını artıracak ve uzaklaştırılmasını azaltacaktır. Öte yandan, plazma glukozunda 10 mg/dl'lik (~0.5 mmol/L) bir artış, insülin salınımını uyaracak ve daha fazla artışı önlemek ve normoglisemiyi eski haline getirmek için glukagon sekresyonunu baskılayacaktır [54].

Plazmadaki glukoz ya diyet kaynaklarından, karaciğerde glikojenin parçalanmasından, laktat, piruvat, amino asitler ve gliserol (glikoneogenez) gibi diğer karbon bileşiklerinden üretilmektedir. Plazmadan uzaklaştırılan glukozun farklı

dokularda ve farklı koşullar altında (örneğin, emilim sonrası ve yemek sonrası) farklı akıbetleri olabilir, ancak atılması için yollar nispeten sınırlıdır. (1) hemen glikojen olarak depolanabilir veya (2) oksidatif olmayan piruvat (laktata indirgenebilir veya alanin oluşturmak için transaminasyona tabi tutulabilir) olabilen veya trikarboksilik asit yoluyla daha da oksitlenen asetil CoA'ya dönüştürülerek oksidatif olabilen glikolize maruz kalabilir. Oksidatif olmayan glikoliz karbonları glukoneogeneze uğrar ve yeni oluşan glukoz ya glikojen olarak depolanır ya da plazmaya geri salınır [55].

2.2.2. Glukoz Homeostazının Önemi

Serbest yağ asitleri çoğu organ için ana enerji kaynağı olmasına rağmen, glukoz fizyolojik koşullar altında beyin için zorunlu metabolik yakıttır. Bu, diğer olası alternatif substratların (örn. keton cisimcikleri) dolaşımdaki düşük konsantrasyonları veya kan-beyin bariyerlerinden taşınmasındaki sınırlamalar (örn. serbest yağ asitleri) nedeniyle oluşur [56]. Uzun süreli açlıktan sonra, dolaşımdaki konsantrasyonlarındaki artış nedeniyle, keton cisimleri beyin tarafından önemli ölçüde kullanılabilir [57]. Beyin, glukozu sentezleyemez veya birkaç dakikadan fazla glikojen olarak depolayamaz. Bu nedenle beyin, plazmadan sürekli bir glukoz kaynağına bağımlıdır. Normal seviyelerin 20 mg/dL (~1 mmol/L) kadar altındaki plazma glukoz konsantrasyonlarında, glukoz transportu beyin glukoz kullanımı için hız sınırlayıcı bir basamak haline gelir [56]. 55 mg/dl'nin (3 mmol/L) altındaki glukoz plazma konsantrasyonları serebral işlevi bozarken [58], daha şiddetli ve uzun süreli hipoglisemi konvülsiyonlara, kalıcı beyin hasarına ve hatta ölüme neden olur. Öte yandan, hiperglisemi veya DM'nin kendi sağlık riskleri vardır ve bozulmuş glukoz toleransı olan hastalarda meydana gelen hafif derecede yüksek plazma glukoz konsantrasyonu bile kardiyovasküler morbidite riskini artırır [59,60].

2.3. İnsülin Salgısında İncretinlerin Rolü

Besin maddelerine yanıt olarak bağırsak mukozasından salgılanan belirli faktörlerin pankreası insülin salımı için uyarabileceği kavramı ilk olarak, oral olarak verilen glukoz yükünün aynı miktarda verilen intravenöz glukoz yüküne kıyasla plazma insülin düzeylerinde daha fazla bir artışa sebep olduğunun görülmesi üzerine ortaya atılmıştır. İncretin terimi bu faktörleri belirtmek için kullanılmıştır. İki ana incretin, gastrik inhibitör polipeptit (GIP) ve glukagon benzeri peptit-1'dir [61]. Her iki peptit de besin alımından dakikalar sonra bağırsak endokrin mukozasından (L ve K hücreleri) salgılanır ve dipeptidil peptidaz-4 (DPP-4) adı verilen bir proteolitik enzim tarafından

hızlı inaktivasyona uğrar bu nedenle de bağlı olarak kısa yarılanma ömrüne (dakika) sahiptirler. GLP-1 ve GIP, glukagon sekresyonunu inhibe ederken sadece GLP-1 gastrik boşalmayı geciktirir ve sadece GLP-1 muhtemelen nöral bir mekanizma yoluyla tokluğu artırır, gıda alımını azaltır ve kilo kaybına yol açar [61].

2.3.1. Enteroinsüler Eksen Aktivitesi (İnkretin Etkisi)

Bağırsak faktörlerinin pankreatik endokrin sekresyonunu uyardığı fikri ilk olarak sekretinin keşfinden sonra önerilmiştir. Bu kavram, diyabetli hastalarda bağırsak ekstresi uygulamasının glukozüriyi iyileştirdiğini gösteren Moore ve meslektaşları tarafından da test edilmiştir [62]. İnsülin deneylerinin geliştirilmesinden kısa bir süre sonra, bir dizi araştırmacı, benzer glisemik seviyelere rağmen, glukozun oral olarak verildiğinde, intravenöz glukoz uygulamasına kıyasla daha fazla yükseldiğini bildirmiştir. Bu gözlemler, karbonhidrat alımına yanıt olarak salınan bağırsak faktörlerinin insülin salınımını uyardığına dair önceki hipotezi doğrulamıştır. Köpeklerde sekretin içermeyen bağırsak ekstraktlarının glukoz seviyelerini düşürdüğünü gösteren çalışmalara dayanarak, başlangıçta vücuttaki iç salgıları uyaran endojen faktörleri ifade etmek için kullanılan bir terim olan bu faktörler topluca inkretin olarak adlandırılmıştır [63]. Aynı miktarda bir intravenöz glukoz infüzyonuna kıyasla oral olarak verilen glukozun nispeten daha yüksek insülin salgısına sebep olmasına inkretin etkisi adı verilmiştir. Sonraları, inkretin etkisinin yemek yendikten sonra insülin salgılanmasının %30-70'inden sorumlu olduğu kabul edilmiştir [63].

Normal glukoz toleransı olan sağlıklı bireylerde, 25-100 g glukoz alımından sonra oluşan glisemik sapma hemen hemen aynıdır. Glukoz alımındaki dört kat artışa rağmen postprandiyal glisemiye dar bir aralıkta tutabilme yeteneği, postprandiyal insülin sekresyonundaki progresif artışa ve alınan karbonhidrat miktarıyla orantılı inkretin etkisine bağlıdır. Bu nedenle, glukoz seviyesi β -hücre yanıtı için önemli bir uyarıcı iken, inkretin etkisi, alınan besin miktarına bağlı olarak insülin çıkışındaki orantılı artışı kontrol eder [63].

Çok sayıda çalışmadan elde edilen bulgular, iki ana peptidin (GLP-1 ve GIP), inkretinler gibi davrandığını ve toplu olarak postprandiyal insülin salgılanmasının %70 kadarından sorumlu olduğunu göstermiştir. Bu peptitler, besin alımına yanıt olarak bağırsak mukozasındaki özel hücreler tarafından salgılanır ve adacık hücreleri ile diğer dokularda eksprese edilen spesifik G-protein kenetli reseptörler yoluyla etki eder [61].

2.3.2. Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1)

30 amino asitli bir peptit ve proglukagon geninin bir ürünü olan GLP-1, gastrointestinal (GI) yol boyunca ağırlıklı olarak alt ince bağırsak ve kolonda bulunan bağırsak endokrin L hücrelerinden karbohidrat ve yağ alımından sonraki dakikalar içinde salgılanır. GLP-1'in plazma seviyeleri, yemekten sonraki 30-60 dakika içinde ve yemek boyutuyla orantılı olarak artan insülin seviyeleri ile paralellik gösterir [64].

Alınan besinler ile L-hücresi arasındaki mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Yine de, GLP-1 besin maddelerinin bağırsağın ucuna ulaşmadan çok daha önce salgılandığından, sensörlerin uzak konumdaki L hücrelerini doğrudan besin kaynaklı aktivasyonundan ziyade hormonal veya nöral faktörler yoluyla aktive ettiği öne sürülmüştür. Karbohidrat, GLP-1 sekresyonunun en güçlü uyarıcısı iken, alınan besinlerin yanı sıra alınan yağ ve protein, hem T2DM'li hem de T2DM'siz bireylerde L hücre aktivasyonunu artırmaktadır [65].

L-hücrelerinden salındıktan sonra GLP-1, dolaşımda ve kılcal damar endotelinde bulunan her yerde bulunan bir proteaz olan DPP-4 tarafından hızla metabolize edilir ve dolaşımını 1-2 dakikalık bir yarılanma ömrü ile tamamlar. DPP-4, GLP-1'den iki N-terminal amino asidi ayırır ve GLP-(9-39)'un insülinotropik aktivitesini sonlandırır [66].

GLP-1 etkilerine, pankreas adacık hücreleri ve vagal afferent sinirler, mide gibi belirli beyin alanları dahil olmak üzere çeşitli dokularda eksprese edilen bir Glukagon benzeri protein reseptörü (GLP-1R) ile aracılık eder. GLP-1'in β -hücrelerindeki klasik etkisi, glukozla uyarılan insülin salgılanmasını arttırmaktır, ancak GLP-1 aynı zamanda insülin biyosentezini de artırır [67]. GLP-1R geni silinmiş fareler üzerinde yapılan çalışmalar, normal glukoz homeostazında GLP-1 sinyalinin önemli rolünü desteklemiştir. Bu farelerde insülin sekresyonunun azaldığı ve kontrol farelerine kıyasla glukoz toleransının bozulduğu gözlenmiştir. Ayrıca söz konusu farelerde adacıkların, streptozotosinin toksik etkilerine karşı daha hassas olduğu ve kısmi pankreatektomi takiben telafi için büyüme kapasitesinden yoksun olduğu görülmüştür [68].

GLP-1R'nün pankreatik β -hücrelerinde aktivasyonunu, cAMP/protein kinaz A sisteminin aktivasyonunun aracılık ettiği hücre içi sinyalizasyon başlatır. GLP-1'in β -hücreler üzerindeki glukoz aracılı kalsiyum salınımı, membran depolarizasyonu ve insülin ekzositozu gibi akut etkilerine esas olarak cAMP/PKA sisteminin aracılık ettiği gibi düşünülmektedir. Bununla birlikte, GLP-1'in anti-apoptotik ve proliferatif etkiler gibi

β -hücreleri üzerindeki kronik etkilerine daha çok fosfatidilinositol-3 kinaz aktivitesi (PI-3K) aracılık eder [67].

GLP-1 insülin salgılatıcı etkisinin ötesinde, normal adacık gelişiminde önemli bir rol oynar. GLP-1 sinyali, β -hücre büyümesinin ve replikasyonunun doğrudan uyarılmasıyla, pankreatik kanal hücrelerinin insülin üreten hücelere farklılaşmasıyla ve β -hücre apoptozunu inhibe ederek β -hücre kütlelerinin artışı teşvik eder [69].

Ayrıca, GLP-1'in glisemiye azaltıcı etkilerine hem açlık hem de tokluk sırasında kısmen pankreas α -hücresi üzerindeki inhibitör etkilerinin aracılık ettiği varsayılmıştır. Hem diyabetik hem de diyabetik olmayan bireylerde açlık durumunda GLP-1'in glisemik etkisinin azalması, bu peptidin glukagonostatik etkileri ile ilişkilendirilmiştir [70].

GLP-1'in veya GLP-1R agonistlerinin yüksek farmakolojik dozlarda uygulanmasının, değişen otonom sinir sistemi aktivitesinin bir sonucu olarak gastrik boşalmayı geciktirerek postprandial glukoz salınımını azalttığı da gösterilmiştir [71].

Endojen GLP-1'in glukoz metabolizması üzerindeki fizyolojik etkileri, insanda güçlü bir GLP-1R antagonisti olan eksendin-(9-39)'un sürekli infüzyonu kullanılarak incelenmiştir. GLP-1R'nin blokaj postprandiyal hiperglisemiye neden olmakta, bu da endojen GLP-1'in glukoz düzeylerinin regülasyonu için gerekli olduğunu göstermiştir.. Bununla birlikte, eksendin-(9-39) infüzyonunun neden olduğu eş zamanlı hiperglisemi nedeniyle GLP-1R blokajının glukoz veya yemek alımına karşı oluşan insülin yanıtı üzerindeki etkisi net değildir. Endojen GLP-1'in glisemik seviyelerden bağımsız olarak adacık hücre hormonu salgılanması üzerindeki etkisi, hiperglisemik klamp ve besin sindirimi üzerinden incelenmiştir. Bu deney kullanarak, GLP-1R antagonistin infüzyonu, sağlıklı bireylerde postprandial insülin sekresyonunu %30-40 oranında baskılamış ve glukagon sekresyonunu arttırmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular endojen GLP-1'in (GLP-1'in farmakolojik konsantrasyonlarının aksine) mide boşalması üzerinde minimal bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, bu peptidin fizyolojik seviyelerdeki insülinotropik özelliğine besin geçiş hızındaki değişikliklerin aracılık etmediği düşünülmektedir [72–74].

2.3.3. Gastrik İnhibitör Polipeptit (GIP)

GIP, prepro-GIP'den özel olarak, besinin bağırsağa gelişini algılamak için ideal bir yer olan duodenum ve üst jejunumda bulunan endokrin K-hücreleri tarafından üretilen

42 amino asitli bir peptittir. Karbohidrat sindirimine veya alımına müdahale eden koşulların GIP sekresyonunu azalttığı gösterildiğinden, bağırsak lümeninde besin varlığı GIP salımını tetikleyen tek faktör gibi görünmemektedir. GLP-1'e benzer şekilde, tüm makro besinler, besin alımının boyutuyla orantılı olarak K hücrelerini uyarır, ancak glukozu yağ ve protein eklenmesi, GLP-1 salgılanmasının aksine GIP salgılanması üzerinde sinerjistik bir etkiye sahiptir [65].

GLP-1'e benzer şekilde, GIP de 5-7 dakika dolaşım yarı ömrüne sahiptir. Dolaşıma salındığında, GIP hızla DPP-4 tarafından metabolize edilir; bu enzim, GIP'i spesifik olarak 2. ve 3. bölgelerini etkileyerek GIP-(3-42)'yi insülinotropik aktivitesine son verir. GIP'in tüm fizyolojik etkilerine, GLP-1 ve glukagon reseptörleri ile bir miktar homolojiye sahip olan tek bir spesifik G-protein-bağlı reseptör, GIP reseptörü (GIPr) aracılık eder. GIPr, pankreas adacığının α hem de β hücrelerinde, ön bağırsak, adipositler, adrenal korteks, hipofiz ve bazı beyin bölgelerinde eksprese edilir. β -hücresindeki GIP sinyali, GLP-1'e nispeten benzerdir. β -hücresi üzerindeki reseptörüne bağlanan GIP, adenilat siklazı aktive eder ve hücre içi cAMP'yi artırır, ancak aynı zamanda PI3 kinaz ve büyüme faktörü yolları yoluyla da etki eder [74].

Kemirgen modellerinde, bir GIP-R antagonisti kullanmak veya dolaşımdaki GIP'i immün nötralizasyon yöntemiyle ortadan kaldırmak, insülin sekresyonunun azalması sonucunda glukoz intoleransına yol açar. Ayrıca, farelerde GIP reseptörünün hedeflenen gen delesyonu, normal açlık glukoz seviyelerine ve intraperitoneal glukoz uygulamasına normal insülin tepkilerine rağmen bu hayvanlarda anormal glukoz intoleransı ve insülin sekresyonu ile sonuçlanmıştır. Bu bulgular, GIP'in inkretin özelliklerinin göstergesidir. Bununla birlikte, GIP sinyalinin obeziteyi teşvik ettiği de gösterilmiştir. GIP reseptörünün delesyonu veya GLP-1R antagonisinin infüzyonu veya GIP salgılayan endokrin hücrelerinin ablasyonu yoluyla farelerde endojen GIP etkilerinin ortadan kaldırılması, hayvanları yüksek yağlı diyet veya buna ikincil olarak leptin eksikliğine bağlı aşırı yemenin neden olduğu kilo alımına karşı korur. Bu zayıf fareler, şişman farelere göre daha iyi glukoz toleransına sahiptir [75–78].

İnsülin salgılatıcı etkisinin ötesinde GIP, β -hücre dizilerinin çoğalmasını teşvik eder ve apoptoza karşı korur. GIP'in sağlıklı insanlarda insülinotropik özelliğine rağmen, GIP'in farmakolojik dozlarının T2DM'li kişilerde uygulanması insülin sekresyonunu artırmaz. Ek olarak, GIP'in (GLP-1'in aksine) α -hücresi salgılama fonksiyonu üzerinde

uyarıcı etkisi vardır ve bu da T2DM'li hastalarda glukoz kontrolü için istenmeyen bir etkidir [79].

2.3.4. Enteroinsüler Eksen Aktivitesi ve Tip 2 Diabetes Mellitus

İnkretin etkisini ölçmek için klasik bir yöntemin kullanıldığı 2 günlük bir çalışmada, 1. günde oral glukoz tolerans testi ve ardından 2. günde glisemik uyumlu i.v. glukoz infüzyonu sonucunda, T2DM'li hastalarda inkretin etkisinde önemli bir bozulma olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, daha iyi glisemik kontrolü olan T2DM'li bir grup hastada, hiperglisemik klemp sırasında bir öğün tolerans testinin 1 günlük çalışması kullanılarak ölçülen inkretin etkisinin, sağlıklı kontrollerdekine benzer çıktığı bildirilmiştir. Bu kohort çalışmasındaki diyabetik hastalar arasında, açlık glukozu ve HbA1c seviyeleri, ölçülen inkretin etkisi ile ters orantılı çıkmış; bu da zayıf glisemik kontrolün, daha düşük bir inkretin etkisi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. Anormal glukoz tolerans değerleri olan diyabetik olmayan bireylerde, diyabetik olmayan kritik hastalarda ve β -hücrelerini etkilediği bilinen immünsüpresan ilaç kullanan kalp ve karaciğer nakli alıcılarında da azalmış inkretin etkisi bildirilmiştir. T2DM'li veya bozulmuş glukoz toleransı olan ergenlerde de bozulmuş inkretin etkisi rapor edilmiştir, Bu da inkretin anormalliklerinin diyabetin erken evresinde mevcut olduğunu düşündürmektedir [80–82].

Bu bulgular, T2DM'li kişilerde inkretin salgılanmasının veya etkinliğinin tamamen korunup korunmadığı sorusunu gündeme getirmiştir. GLP-1'in tokluk plazma düzeylerinin, sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında T2DM'li kişilerde arttığı [83], azaldığı [84] veya değişmediği [85] yönünde farklı bulgular yayınlanmıştır.

Öte yandan, T2DM'li kişilerde inkretin kaynaklı β -hücre salgısı azalır. Diyabette inkretinlerin azaltılmış etkinliğinin patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak genel olarak anormal β -hücre fonksiyonunun azalmış inkretin etkisine ve inkretinlerine β -hücre yanıtına katkıda bulunması olasıdır. Bu hipotezi destekleyen veriler, 4 hafta boyunca tıbbi müdahale ile iyileştirilmiş glisemik kontrolün, muhtemelen iyileştirilmiş genel β -hücre fonksiyonu nedeniyle GLP-1 ve GIP'e β -hücre yanıtını düzeltebileceğini gösteren verilerdir. GLP-1 etkisinin tokluk insülin sekresyonuna relatif katkısının, diyabetik bireylerde β -hücre fonksiyonu azalmış olsa da, iyi kontrol edilen T2DM'li hastalarda ve eşleştirilmiş sağlıklı kontrollerde benzer olduğunu gösterildiğini belirtmekte fayda vardır [86,87].

T2DM'li bireylerde GLP-1'e azalmış β -hücre duyarlılığına rağmen, GLP-1'in farmakolojik miktarlarının uygulanması, esas olarak artan insülin sekresyonu ve kısmen glukagon baskılanması nedeniyle açlık glukoz seviyelerini normalleştirir. Buna karşılık, diyabetli ve orta derecede glisemik kontrolü olan hastalarda, daha yüksek dozlarda GIP uygulanması hafif derecede glisemik veya insülinotropik etkiye sahiptir. Diyabette azalmış GIP etkinliğinin altında yatan mekanizmalar büyük ölçüde bilinmemektedir, ancak GIP açığının, hasta bireylerde genel olarak azalmış inkretin etkisinin sorumlusu olabileceği düşünülmektedir [86,87].

2.3.5. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde İnkretin Bazlı Tedaviler

Son yirmi yılda, enteroinsüler eksen bileşenleri, özellikle GLP-1 sinyalini hedefleyenler, diyabet için terapötik seçeneklerin geliştirilmesinin odak noktası olmuştur. İlk çalışmalar, GLP-1'in insülinotropik etkilerinin, GIP'den farklı olarak, T2DM'li hastalarda korunduğunu ve GIP yerine GLP-1R sinyali etrafında ilaç geliştirme çabalarının haklı gerekçelerini göstermiştir [88]. Ayrıca GLP-1'in, insülin sekresyonunu ve biyosentezini uyarmak, glukagon salgılanmasını inhibe etmek, gastrik boşalmayı geciktirmek ve hepatik glukoz çıkışını baskılamak dahil olmak üzere gelişmiş glukoz metabolizmasını teşvik eden geniş bir etki yelpazesine sahip olduğu kabul edilmiştir (Tablo 2-1) [89,90]. Bununla birlikte, dolaşımdaki son derece kısa yarı ömrü göz önüne alındığında, bu peptidin terapötik bir seçenek olarak kullanımına ilişkin sınırlamalar vardır. GLP-1'in DPP-4 tarafından hızla bozulmasını önlemek için tasarlanmış iki strateji geliştirilmiştir. Bunlardan biri, DPP-4 metabolizmasına daha az duyarlı olan değiştirilmiş GLP-1 veya GLP-1R agonistleridir. Diğeri, DPP-4'ün etkisini engelleyen moleküllerin geliştirilmesine odaklanmıştır. İlk yaklaşım, bu bileşiklerin farmakolojik konsantrasyonlarını kullanarak GLP-1R sinyalini destekleyen ve cilt altına uygulanan ilaç sınıfına ve ikincisi, endojen GLP-1'in dolaşım seviyelerini artıran ve oral olarak uygulanan bir grup küçük molekülün sentezine yol açmıştır [91]. GLP-1'in insülin ve glukagon sekresyonuna olan etkisinin glukozla bağlı olması nedeniyle, bu ilaçlarla birlikte başka insülin sekretagogu veya insülin uygulanmadıkça hipogliseminin oluşması pek mümkün olmamaktadır. DPP-4 inhibitörleri, GLP-1R agonistlerinin insülin ve glukagon etkisini paylaşırken, mide boşalması üzerinde minimum etkiye sahiptirler. DPP-4 inhibitörlerinin bir sonucu olarak benzer şekilde artan endojen GLP-1'in vücut

ağırlığı üzerinde hiçbir etkisi yok gibi görünürken, farmakolojik dozlarda GLP-1R agonistlerinin glisemik iyileşme ile birlikte kilo kaybını indüklediği gösterilmiştir [92].

2.3.5.1. GLP-1 Reseptör Agonistleri

T2DM'nin tedavisi için geliştirilmiş sürekli bir etkiye sahip, yapısal olarak rafine edilmiş birkaç GLP-1 türevi geliştirilmiştir. Bu ilaçlar arasında Eksenatid, Liksisenatid, Liraglutid, Dulaglutid, Albiglutid ve Semaglutid bulunmaktadır [93].

Tablo 2-1: GLP1 ve GIP'nin farklı dokulardaki etkileri. Bu tablo [94]' den değiştirilerek uyarlanmıştır

	GLP1	GIP
Pankreas	↑ İnsülin salımı ↓ Glukagon salımı	↑ İnsülin salımı
Periferal	↓ Hepatik glukoz salımı ↑ Kas glukoz alımı	—
Gastrik	Gecikmiş gastrik boşaltım	↓ Suprafizyolojik düzeyde gastrik asit aşımı
SSS	↑ Doygunluk ↓ İştah ↓ Ağırlık	—

Eksenatid , sentetik bir 39-amino asitlik bir peptit zincirine sahiptir (ilk olarak gila canavarı olarak da bilinen Heloderma supeum'un tükürüğünde eksendin-4 olarak keşfedilmiştir). Eksendin-4'ün ilk 30 amino asit zinciri, GLP-1'e %53 oranında bir benzerliğe sahipken, C-terminal nonapeptit uzantısının benzerliği bulunmamaktadır. GLP-1'den farklı olarak eksendin-4, N-terminusta ikinci amino asit konumunda bir glisine sahiptir ve bu, peptidi DPP-4 aracılı bozunma ve etkisizleştirmeden korumaktadır. i.v., i.p. veya s.c. uygulamada sıçanlarda eksendin-4'ün yarı ömrü sırasıyla 18-41 dakika,

125-174 dakika ve 90-216 dakika olarak ölçülmüştür. Bu farmakokinetik parametreler, insanlarda günde iki kez uygulamayı makul bir seçenek haline getirmektedir. T2DM'li hastalarda Eksenatid, açlık ve tokluk kan glukoz seviyelerini düşürür, mide boşalmasını yavaşlatır, kardiyovasküler risk faktörlerini azaltır ve gıda alımını baskılayarak vücut ağırlığını azaltır. T2DM hastalarının eksenatid ile 82 haftalık tedavisinden sonra, başlangıca göre kaybı yaklaşık kilo kaybı %5 olarak ölçülmüştür. Haftada bir kez kullanılan bir Eksenatid formülasyonu geliştirilmiş ve 2012'den beri pazarlanmaktadır. Günde iki kez verilen klasik Eksenatid (BID) ile karşılaştırıldığında, 2 mg doz seviyesinde haftada bir (QW) uygulanan formülasyon, ilacın sürekli verilmesi nedeniyle kararlı durumda (300 pg/ml) nispeten stabil bir plazma konsantrasyonu sağlamaktadır [95,96].

Liksisenatid, 38. pozisyonundaki prolinin çıkarıldığı ve C-terminaline altı sıralı lizin kalıntısının eklendiği bir Eksenatid analogudur. Liksisenatid, Eksenatid'e göre karşılaştırılabilir farmakokinetik özelliklere sahiptir ve 3-4 saatlik bir yarılanma ömrü ile insanlarda günlük kullanım için pazarlanmaktadır. T2DM'li hastalarda, günde iki kez veya bir kez Liksisenatid uygulaması arasında HbA1c'deki azalmanın farklılık göstermediği rapor edilmiştir [97].

1,2 mg ve 1,8 mg dozlarındaki Liraglutid, 2009 yılında T2DM tedavisi için onaylanmıştır. Liraglutid, 28. pozisyonundaki lizinin arginin ile değiştirildiği doğal GLP-1 dizisine dayanır. N-terminalinden ikinci pozisyonundaki alanin, Liraglutid içinde korunmaktadır. Bununla birlikte, 20. pozisyonundaki lizin, bir gammaglutamik asit ayırıcı vasıtasıyla palmitik aside (C16:0) bağlanır; bu, albümine bağlanma yoluyla ilacı, DPP-4 proteolizine daha az duyarlı hale getirir. Açılasyon ayrıca enjeksiyon bölgesinden difüzyonu yavaşlatan multimerik oluşumu da destekler. Aslında, yağ asidinin albümine kovalent olmayan şekilde bağlanması, renal klirensi önler. Özetle, bu kimyasal modifikasyonlar, insanlarda günde bir kez enjeksiyona olanak sağlayan, gelişmiş biyoyararlanım ve 12 saatlik bir yarı ömür ile kendini gösterir. Daha yüksek doz Liraglutid (3 mg) 2014'ten beri obezite tedavisi için onaylanmıştır. 3 mg'da Liraglutid'in neden olduğu kilo kaybı, diyabetik olmayan obez hastalarda 52 haftalık tedaviden sonra tipik olarak %5-10 aralığındadır [98–101].

Haftada bir kez 0,5 mg ve 1,0 mg dozlarında Semaglutid T2DM tedavisi için onaylanmıştır ve 2018'den beri pazarlanmaktadır. Semaglutid esasen bir Liraglutid

analoğudur. Liraglutid'in ikinci N-terminal pozisyonundaki DPP-4'e duyarlı alanin, bir aminoizobütirik asit (Aib) ile değiştirilir. Ek olarak, Liraglutid içindeki palmitik (C16:0) yağlı monoasit, dikarboksilik-stearik aside (C18:0) değiştirilir ve bu diasit bazlı yağ asidine olan bağlantı, sentetik bir ayırıcı tekrarı ile Liraglutid'e görel olarak uzatılır. Bu kimyasal modifikasyonlar, Semaglutid'in yarı ömrünü insanlarda ciltaltı enjeksiyondan sonra 160 saate uzatarak haftada bir uygulamayı destekler. Haftada bir Semaglutid enjeksiyonları, doza bağlı olarak %7'ye varan vücut ağırlığı kaybına neden olur ve T2DM hastalarında 40 haftalık tedaviden sonra HbA1c'yi %1,8 azaltır. Daha yüksek bir dozda Semaglutid, diyabetik olmayan obez hastaların tedavisi için klinik olarak araştırılmaktadır ve alternatif bir oral Semaglutid formülasyonu, T2DM için Faz 3 klinik deneylerini tamamlamıştır. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), 7 mg veya 14 mg Rybelsus® (Semaglutid) tabletlerin, daha önce diyabet tedavisi görmemiş T2DM'li için birinci basamak tedavi seçeneği olarak kullanıma izin vermiştir [98,102].

0,75 mg ve 1,5 mg Dulaglutid, T2DM hastalarının tedavisi için onaylanmıştır. Dulaglutid, bir glisin ve serin bazlı aralayıcı yoluyla immünoglobulin G4'ün (IgG4) bir insan Fc fragmanına C-terminallerinde kaynaşmış iki GLP-1 molekülünden oluşur. İki GLP-1 motifinin her birinde, doğal GLP-1 kalıntılarının yerini alması için belirli eksendin-4 kalıntıları eklenir. İkinci N-terminal pozisyonundaki bir glisin, molekülü DPP-4 inaktivasyonundan korurken, 16 pozisyonundaki bir glutamik asit ikincil yapıyı stabilize eder ve potensi artırmaktadır. GLP-1'in (7e37) C-terminalindeki doğal glisin ile birlikte 30 pozisyonundaki bir glisin değişikliği, IgG4 Fc fragmanlarını sabitleyen ayırıcıya giden bir öncü sekans görevi görür. Bu modifikasyonlar biyoyararlanımı artırır ve renal klirensi yavaşlatır. İnsanlarda ortaya çıkan 90 saatlik yarı ömür, ilacı haftada bir kez enjeksiyon yoluyla uygulamaya uygun hale getirir. T2DM hastalarında 26 hafta süreyle haftada bir 1.5 mg Dulaglutid uygulaması vücut ağırlığını başlangıca göre yaklaşık %3 azaltır ve HbA1c'yi % 1.4 düşürür [103].

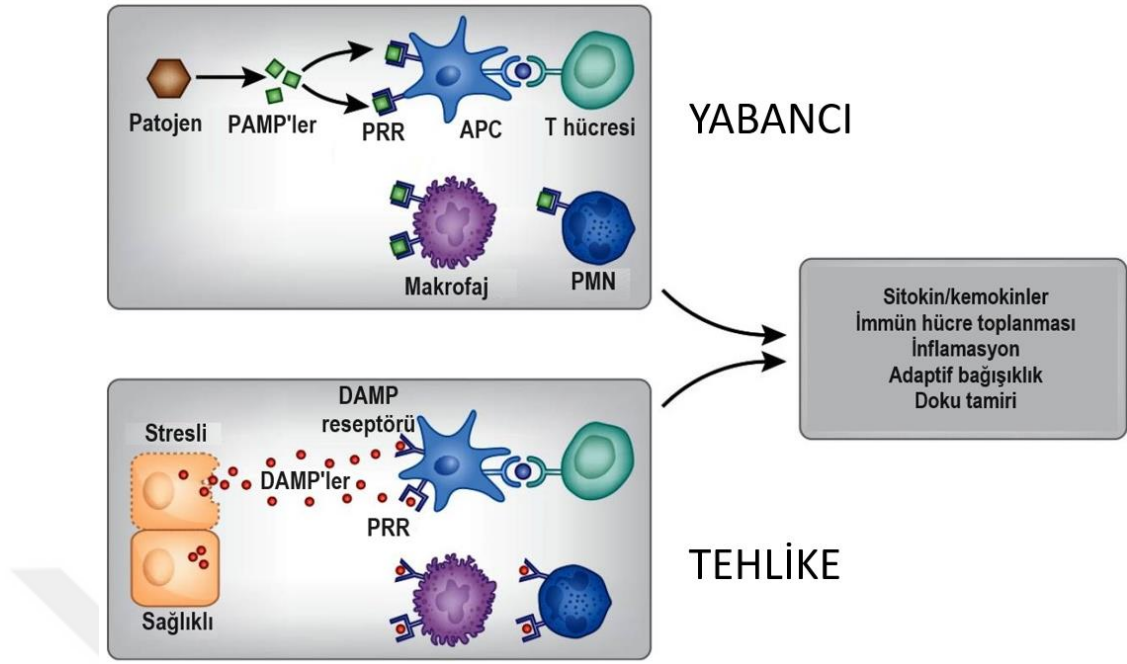
Albiglutid, birinci molekülün C-terminalinin ikincinin N-terminaline kaynaştığı iki GLP-1 molekülünden meydana gelmiştir. İki GLP-1 molekülünün her biri, DPP-4'e duyarlı kısımlarda bir glisin süstitüsyonuna sahiptir. İkinci GLP-1'in C-terminali, insan albüminine kovalent olarak bağlanır, böylece böbrek klirensini yavaşlatır ve insanlarda yarılanma ömrünü 120 saate yükselterek haftada bir uygulamaya uygun hale getirir. 50 mg Albiglutid T2DM tedavisi için onaylanmıştır ancak artık pazarlanmamaktadır [104].

GLP-1 analogları yaygın şekilde doza bağılı olarak mide bulantısı, kusma ve diyare gibi gastrointestinal yan etkilere neden olmaktadır. Kısa etkili GLP-1 analogları (iki günde bir kullanılan Eksenatid gibi) ile karşılaştırıldığında, uzun etkili analoglar daha az mide bulantısı ve kusma, ancak daha fazla diyare prevalansı ile ilişkilendirilmiştir [105].

2.4. İnflamasyon, Endotel Disfonksiyonu ve Tip 2 Diabetes Mellitus Zemininde NLRP3

İnflamasyon, çok sayıda akut ve kronik patolojik durumda ortaya çıkan temel bir biyolojik süreci temsil etmekte ve çeşitli onarım mekanizmalarının indüklenmesi yoluyla doku homeostazını eski haline getirmek için doku bütünlüğündeki herhangi bir değişikliğe yanıt olarak kendisini göstermektedir. Bu mekanizmaların uygun regülasyonu, ilk inflamatuvar yanıtın kontrolsüz bir şekilde büyümesine ve doku onarımından hasar ve hastalık gelişimine kaymayı önlemek için gereklidir [106].

Organizma tarafından tehlikenin uygun şekilde tanınması, uygun uyarlanabilir tepkilerin detaylandırılması için birincil öneme sahiptir. Patojenle ilişkili moleküler modellerin (PAMP'ler) ve hasarla ilişkili moleküler modellerin (DAMP'ler) algılanması, diğerlerinin yanı sıra gelişmiş glikasyon son ürünleri için reseptörü içeren karmaşık bir model tanıma reseptörleri (PRR) kurulumu ile sağlanır. Doğal bağışıklık yanıtı, endojen veya ekzojen patojenleri algılamak için bu PRR'yi kullanmaktadır. Bugüne kadar beş farklı tipte PRR tanımlanmıştır [12]. Bu PRR'ler, özgül ligandlarına bağlanarak nükleer faktör- κ B (NF- κ B), mitojen ile aktive protein kinaz (MAPK) ve tip 1 interferon yollarını uyarmaktadırlar. Bu süreç sonucunda proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin üretimi ve salgılanması başlamaktadır [13]. PRR'ler, "hasar ilişkili moleküler paternler (DAMP'lar)" olarak adlandırılan endojen molekülleri tanımaktadırlar. DAMP'lar, hücre ya da doku hasarı olmadığı durumlarda, hücre içinde veya ekstraselüler matrikste bulunmaları nedeniyle immün sistem tarafından tespit edilemezler; ancak hücrel stres veya hasar meydana geldiğinde serbest hale gelirler [14]. Bu tür sinyal kaskadları, doku onarımı ve homeostaz restorasyonu için gerekli olan sitokinlerin, kemokinlerin, enzimlerin, büyüme faktörlerinin ve ek moleküllerin ekspresyonunu destekler [107] (Şekil 2-1).



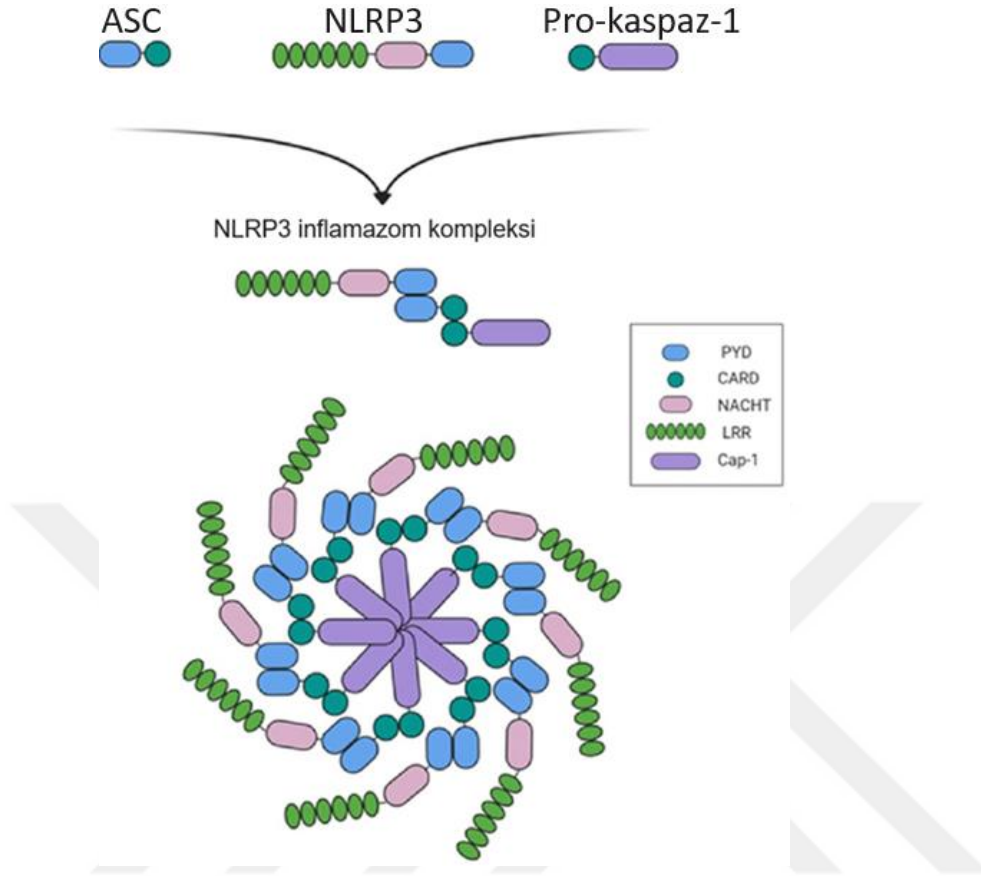
Şekil 2-1: PRR aktivasyon modelleri. Yabancı modeline göre, patojenlere bağlı gelişen enfeksiyonlar bağışıklık hücreleri üzerindeki PRR'lere bağlanarak PAMP'lerin salınmasına neden olur ve inflamasyon ile adaptif bağışıklık aktivasyonunun da rol oynadığı bir bağışıklık tepkisi oluşturur. Tehlike modeli, hücrelerin stres altında olduğu veya yaralandığı benzer olaylar ile birlikte nekrotik hücrelerin genellikle hücre içinde gizli olan molekülleri salgıladığını kabul eder. Hücre dışındaki ortamda, bu DAMP'lar, pro-inflamatuvar mediatörlerin salınımını teşvik ederek ve dokuya bağışıklık hücrelerini çekerek bağlanabilir. Bu şekil [107]'den değiştirilerek uyarlanmıştır.

Bununla birlikte, bu tür bir doku onarımının yeterince meydana gelmeyebileceği, kalıcı hücresel stresle sonuçlanan ve inflamatuvar yanıtı güçlendiren durumlar da vardır. Bu koşullarda süreç, homeostazın sistemik ve kalıcı bozulması ile doku fonksiyonlarında önemli değişikliklere yol açar. Diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar, bu tür kronik inflamatuvar değişikliklerle ilişkili patolojik süreçlerin tipik örnekleridir [108,109].

2.4.1. NLRP3 İnflamazomu ve İnflamatuvar Regülatörler

2.4.1.1. NLRP3 İnflamazomu

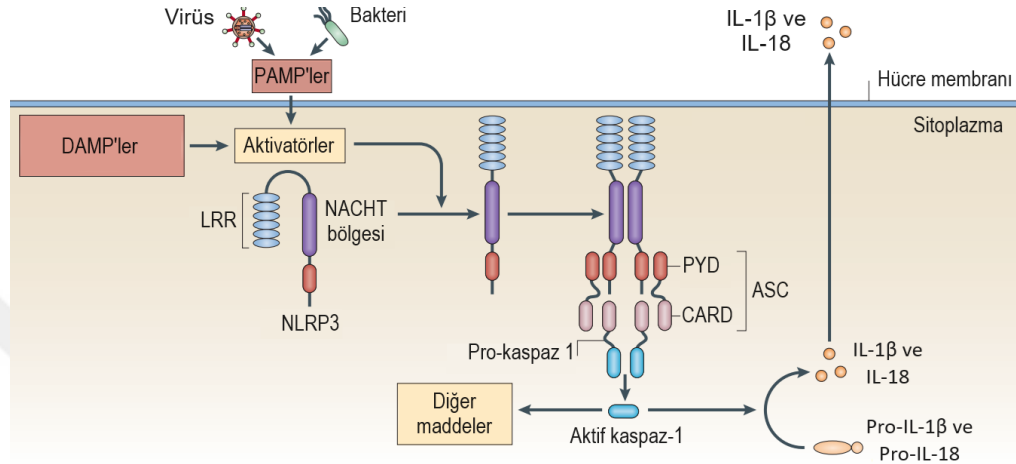
İnflamazom, enfeksiyöz ajanlara ve fizyolojik hasara karşı konakçı savunma mekanizmalarını düzenlemek amacıyla inflamatuvar hücreler tarafından oluşturulan multimerik bir protein kompleksidir [110]. (Şekil 2-2).



Şekil 2-2: NLRP3 inflamazom kompleksi. NLRP3 inflamazomu, NLRP3, ASC ve prokaspaz-1'den oluşan bir komplekstir. Bu kompleks üç bölgeden oluşur: amino terminalindeki pirin alanı (PYD), NACHT alanı ve karboksi terminalindeki lösin açısından zengin tekrar alanı (LRR). NLRP3, PYD-PYD etkileşimi yoluyla kaspaz-1 (Cap-1) ve apoptoz ilişkili nokta benzeri protein (ASC) aktivasyonuna sebep olur. Buna karşılık, prokaspaz-1, NLRP3-ASC-prokaspaz-1 inflamazomunu oluşturmak için CARD-CARD etkileşimleri yoluyla ASC tarafından aktive edilir. Bu şekil [111]'den değiştirilerek uyarlanmıştır.

İnflamazom kompleksi, genellikle bir PRR (NOD-benzeri reseptörler ailesinden), adaptör protein ASC (apoptoz ilişkili nokta benzeri protein), ve aktif kaspaz-1'den oluşur [112]. İnflamazom kompleksi, NLR'ler tarafından düzenlenerek, proinflamatuar kaspaz-1'in aktivasyonunu başlatır. NLR, oligomerize olur ve protein-bölge etkileşimleriyle ASC adaptör proteinine bağlanır. ASC, pro kaspaz-1'i aktif kaspaz-1'e dönüştürür. Aktif kaspaz-1, IL-1 β ve IL-18 sitokinlerinin öncül formlarını proteolitik olarak keser ve olgun hale getirir (Şekil 2-4). İnflamazom kompleksleri, içerdikleri PRR yapısına göre

adlandırılırlar. Şu ana kadar bir kaç inflamazom türü tanımlanmıştır ve bunların içinden NOD-, LRR- and pirin içeren protein 3 (NLRP3) en iyi karakterizasyonu yapılan tür olarak yerini almıştır [15]. Bu kompleks, monositler, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi uyarılmış bağışıklık hücrelerinin sitozolünde bulunur [110].



Şekil 2-3: NLRP3 inflamazomunun genel aktivasyon modeli. DAMP: hasar ilişkili moleküler paternler, PAMP: patojen ilişkili moleküler paternler, LRR: Lösinden zengin tekrarlar, CARD: Kaspaz aktivasyon ve işe alım bölgesi, ASC: apoptoz-ilişkili nokta benzeri proteini, NLRP3: NOD-, LRR- ve pirin içeren protein 3. Bu şekil [113]'den değiştirilerek uyarlanmıştır.

İnflamazomlar NOD-benzeri reseptör (NLR) inflamazomları ve Pirin ve hematopoetik interferon-indüklenebilir nükleer (HIN) alanı içeren protein (PYHIN) inflamazomları olmak üzere 2 ana sınıfa ayrılır. NLR'ler, bağışıklık sisteminin hücre içi reseptörleridir ve NLRP1, NLRP2, NLRP3, NLRC4, NLRP6, NLRP7 ve NLRP12'yi içeren bir alt kümesi, duyuşal rollere sahip inflamatuvar komplekslerin bir bileşeni olarak işlev görür. PYHIN inflamazomları, duyuşal parçalar olarak işlev görür ve viral veya bakteriyel çift sarmallı DNA (dsDNA) ile etkileşime girebilir [110].

Kaspazlar sistein proteazlarıdır. Birincil rolleri apoptozu düzenlemektir. Bununla birlikte, bazı kaspazların birincil aktivitesinin inflamasyonu kontrol ettiğine dair kanıtlar mevcuttur. Proinflamatuvar kaspazlar, grup I kaspazları olarak bilinir. Memelilerde on üç adet kaspaz tanımlanmıştır. Bunlardan dördü, yani kaspaz-1, -4, -5 ve -12, insanlarda

proinflamatuar kaspazlar olarak rol oynamaktadır. Tüm proinflamatuar kaspazlar arasında kaspaz-1 en detaylı şekilde çalışılmış ve karakterize edilmiştir [114,115].

İnterlökin-1 β -dönüştürücü enzim (ICE) olarak da bilinen kaspaz-1'in inflamasyondaki kritik rolü, proinflamatuar sitokinler pro-IL-1 β (31 kDa) ve pro-IL-18'in (24 kDa) biyolojik olarak aktif formları olan IL-1 β (17.5 kDa) ve IL-18'e (18 kDa) hücre içi dönüşümünü katalize etmektir. Bu adım, sitokinlerin sitozolden ekstraselüler boşluğa salınması için bir gerekli bir basamaktır, bu yolla sitokinleri çevreleyen hücrelerin reseptörleri üzerinde parakrin bir şekilde proinflamatuar etkilerini göstermeleri mümkün hale gelir. Elastaz, katepsin G ve proteinaz 3 gibi proteazlar, kaspaz-1'den bağımsız olarak IL-1 β 'yi aktive edebilir. Kaspazlar zimojenler olarak sentezlenir. İnflamasyonların önemli işlevlerinden biri, onları aktive eden kaspazların bölünmesine aracılık etmektir [116,117].

IL-1, bir ana düzenleyici sitokindir. Bu inflamatuvar/immün aracı, bağışıklık tepkilerinin birkaç seviyesinde önemli bir rol oynar, örneğin, diğer inflamatuvar sitokinler ve kemokinler üretmek için hücreleri aktive eder [118].

IL-1 β güçlü bir proinflamatuar sitokindir. IL-1 β , endotel hücrelerini hücre zarı yapışma moleküllerini ve pıhtılaşma önleyici aktiviteyi artırmaktadır. Dolayısıyla lökositleri kan dolaşımından yakalamak mümkündür. NLRP3 inflamazomunun PRR proteinleri, PAMP'leri veya DAMP'leri tanımlayan molekülleri tanıdığına, IL-1 β transkripsiyonel olarak regüle edilmektedir. IL-1 β üretimi için iki sinyal gereklidir. İlk sinyal, endozomlarda veya hücre yüzeyinde bulunan TLR'ler ve sitoplazmada bulunan NLR'ler gibi PRR'lerin uyarılmasından sonra meydana gelen hücre içi pro-IL-1 β 'nin sentezidir. İkinci sinyal, pro-kaspaz-1'in aktivasyonu sonucu pro-IL-1 β 'nin kaspaz-1 tarafından olgun formuna, yani IL-1 β 'ya işlenmesidir (proteolitik bölünme). Çoğu durumda, pro-kaspaz-1'in aktivasyonu ASC tarafından sağlanmaktadır [119].

IL-1 β sadece monositler, makrofajlar, nötrofiller, lenfositler B, dendritik hücreler gibi immün hücreler tarafından değil, aynı zamanda keratinositler gibi immün olmayan hücreler tarafından da salgılanır. Güçlü proinflamatuar sitokin IL-1 β 'nin, diyabet de dahil olmak üzere çeşitli metabolik hastalıklarda inflamatuvar yanıtta katkıda bulunduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, IL-1 β 'nin ayırt edici bir metabolik işlev bozukluğunda indüklendiği mekanizma, yakın zamanda gün ışığına çıkmıştır ve inflamazom aktivasyonu ile bağlantılı gibi görünmektedir [120].

2011'de yapılan bir çalışmada NLRP3 inflamazomunun anormal aktivasyonunun ve IL-1 β 'nin aşırı ekspresyonunun diyabet gelişimi ve komplikasyonlarındaki rolü incelenmiştir [121]. Klinik araştırmalar, IL-1 β 'nin adipozit inflamasyonu ve insülin direnci ile bağlantılı olduğunu ve biyoaktif IL-1 β salgılanmasını kontrol eden faktörlerin terapötik etkileri olduğunu göstermektedir. IL-1 β , insülin reseptörü substrat-1'in (IRS-1) tirozin fosforilasyonunu ve bunun gen ekspresyonunu azaltır. Bu durum, glisemiye kontrol etmek için gerekli olan insülin sinyalizasyonunu inhibe ederek insülin direncini indüklemektedir. Ayrıca IL-1 β , aynı zamanda insülin direncini de destekleyen tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)'nın ekspresyonuna katkıda bulunur. IL-1 β ve IL-18'in aracılık ettiği yağ dokularında lenfositlerin aşırı birikmesi nedeniyle insülin duyarlılığı daha da azalabilir. Yüksek yağlı bir diyetle (HFD) beslenen farelerde, IL-1 β eksikliğinin, yağ dokusu inflamasyonu ve insülin direnci gelişimi açısından koruyucu bir etkisi olduğu gösterilmiştir [122,123].

IL-1 β iki ana düzlemde etkisini gösterir. Bir yandan hepatositlerde ve adipositlerde insülin sinyaline müdahale eder, insülin kaynaklı glukoz alımını inhibe eder, lipogenezi baskılar ve adiponektin salınımını azaltır. Öte yandan ise β -hücre hasarına aracılık eder. Yüksek seviyelerde glukoz veya serbest yağ asitleri tarafından indüklenen yüksek IL-1 β seviyeleri, insülin sekresyonunun azalmasına, bozulmuş β -hücre replikasyonuna ve artmış β -hücre apoptozuna katkıda bulunurken, düşük IL-1 β seviyelerinin pankreasta zıt etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. IL 1 β , mitojenle aktive olan protein kinazların (MAPK) ve NF- κ B'nin aktivasyonunu etkilemekte ve bu da β -hücre ölümü sürecinde kodlayıcı genlerin ekspresyonunu regüle etmektedir. Muhtemelen, T2DM öncesi aşamada, insülin direnci hücrelere glukoz alımını azaltarak geçici postprandiyal hiperglisemiye neden olmaktadır. Bununla birlikte, glukoz kaynaklı IL-1 β üretimi ve NF- κ B aktivasyonunun, β -hücre glukotoksitesinin ana araçları olması pek olası değildir ve geçici hipergliseminin obeziteden diyabete geçişi tetiklemek için yeterli olmadığı düşünülmektedir. Proinflamatuvar sitokinlerin, özellikle IL-1 β 'nin nötralizasyonun, pankreas adacıklarının inflamatuvar sürecini hafifletebildiği ve böylece kan glukoz seviyelerini normalleştirip ve insülin direncini azaltabileceği öne sürülmüştür. Obez bireylerde yüksek miktarda IL-1 β ekspresyonlarının insülin duyarsızlığının nedeni olabildiği ve bu tür bireylerin adipoz dokusunda, NLRP3 inflamazom bileşenlerinin ifadesi olan, kaspaz-1 aktivitesi ve IL-1 β seviyesinin arttığı gözlenmiş ve bunların tümü

insülin direnci, metabolik sendrom ve T2DM şiddeti ile doğrudan ilişkilendirilmiştir [124–126].

İnterferon-gama indükleyici faktör olarak da bilinen IL-18, önemli bir proinflamatuvar faktör olarak rol oynamakta ve NK hücreleri ile T hücrelerinin sitotoksik aktivitesinin regülasyonu ile beraber inflamatuvar ajanların indüklenmesinde yer almaktadır. Ayrıca IL-18'in, sitokin profiline bağlı olarak farklı T helper (Th) hücrelerinin farklılaşmasına ve aktivasyonuna yardımcı olduğu bilinmektedir. Enfektif patojenlere karşı immün savunmadaki yerinin yanı sıra, IL-18, otoimmün ve kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde de yer almaktadır [127].

IL-1 β üretimi için gerekli olan aynı iki sinyal, IL-18'i üretmek için de gereklidir. İlk sinyal, endozomlarda veya hücre yüzeyinde yer alan TLR'ler ve sitoplazmada yer alan NLR'ler gibi PRR'lerin uyarılmasından sonra ortaya çıkan hücre içi pro-interlökin sentezidir. IL-18'in aktif olmayan bir öncüsü olan pro-IL-18 bölünür ve kaspaz-1 tarafından biyolojik olarak aktif sitokin IL-18'e dönüştürülür. IL-18 işlendikten sonra hücre dışı boşluğa salınır. 2012 yılında Bellora ve ark. IL-18'in sadece salgılanan bir form olarak değil, aynı zamanda hücre zarında da eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır [128]. Aktif olmayan form, dendritik hücreler, keratinositler, makrofajlar, Kupffer hücreleri, mikroglia, bağırsak epitel hücreleri, astrositler ve osteoblastlar dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde gözlenmiştir. Özetle, birçok hematopoietik ve hematopoietik olmayan hücre tipi IL-18 üretme potansiyeline sahiptir [129].

Krogh-Madsen ve ark. TNF- α ile indüklenen insülin direncinin, kas dokusunda artmış IL-18 gen ekspresyonu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir, bu da hem TNF- α hem de IL-18'in insülin direncinin patogeneğinde belirgin roller oynayabileceğini düşündürmektedir. Esposito ve ark., yeni teşhis edilmiş T2DM'li kişilerde açlık IL-18 düzeylerinin, sağlıklı deneklere göre daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, tek bir yüksek yağlı yemeğin, T2DM'si olan ve olmayan deneklerde dolaşımdaki IL-18 düzeylerini önemli ölçüde artırmak için yeterli olduğu sonucuna varılmıştır. Thorand ve ark. insan popülasyonuna dayalı bir kohort çalışmasında, IL-18'in yüksek serum düzeylerinin, önemli ölçüde artmış T2DM riski ile ilişkili olduğunu ve bu ilişkinin CRP ve IL-6'dan bağımsız olduğunu göstermiştir. Genel olarak, bu bulgular, IL-18'in, insülin direncine ve T2DM gelişimine yol açabilecek inflamatuvar yanıtları indüklediğini göstermektedir [130–132].

2.4.2. NLRP3 İnflamazomunun Aktivasyon Mekanizması

Monosit ve makrofaj gibi bağışıklık hücreleri, iki aşamalı süreçte NLRP3 inflamazomunu aktive etmektedir. İlk adımda, PAMP'ler, DAMP'ler veya çevresel stres; TLR'ler veya TNF- α gibi sitokinler tarafından tanınır ve NF- κ B'nin aktivasyonunun akabinde NLRP3, pro-IL-1 β ve pro-IL-18 ekspresyonunu ve aktivasyonunu tetikler. Aynı zamanda ASC fosforilasyonu da gerçekleşir. İkincil bir uyarın, inaktif NLRP3'ü oligomerize ederek inflamazomun aktivasyonuna neden olur. Yani, aktivasyon ile birlikte NLRP3, bir oligomerik kompleksin oluşumuna izin vermek için nükleotid bağlama bölgesini (NBD) ve N-terminal pirin bölgesini açığa çıkaran ve pro-kaspaz-1'in alımını ve aktivasyonunu kolaylaştıran konformasyonel bir değişikliğe uğrar [133,134].

İnflamazom aktivasyonu, literatürde tercih edilen üç farklı model kullanılarak açıklanmıştır: hücre dışı ATP (K⁺ kanal modeli) tarafından indüklenen potasyum iyonu (K⁺) akışı, PAMP'ler ve DAMP'ler yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi (ROS modeli) ve lizozomal yırtılma kaynaklı katepsin B salınımına neden olan kristal yapılar (lizozomal hasar modeli). Bu modellerin inflamazomu aktive ettiği moleküler mekanizma halen belirsizliğini korumaktadır [135].

İlk model, iyon akışlarının, özellikle K⁺ akışının, NLRP3 inflamazom aktivasyonunda bir sinyalcisi gibi hareket ettiğini öne sürmektedir. Hücre kültüründe K⁺ dışı akışının inhibisyonu ile elde edilen hücre içi yüksek K⁺ konsantrasyonunun, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu baskılayabildiğini göstermiştir. Bu model, agonist ATP tarafından indüklenen NLRP3 komplekslerinin düzenlenmesine akılcı bir yönden yaklaşmaktadır. K⁺ akışı, pirojenik bir P2X7-ATP'ye bağlı gözenek aracılığıyla gerçekleşir. Bu eylem, hücre dışı NLRP3 agonistlerinin sitozole girmesine ve NLRP3 protein kompleksine bağlanmasına izin verir ve inflamazom tarafından IL-1 β salgılanmasını tetikler. Bu modele uygun olarak, birkaç çalışma, yüksek bir hücre dışı potasyum konsantrasyonunun NLRP3 kompleksi aktivasyonunu önlediğini, oysa azalmış bir sitoplazmik potasyum konsantrasyonunun NLRP3 inflamatuvar aktivasyonunu başlattığını göstermiştir. Bununla birlikte, azalmış sitozolik potasyum seviyeleri ile NLRP3 aktivasyonu arasındaki moleküler yol daha detaylı incelemeye ihtiyaç duymaktadır [136,137].

İkinci model, ROS üretiminin inflamazom aktivasyonunda önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Hemen hemen tüm NLRP3 aktivatörleri, hücre içi ROS

üretimini artırmaktadır. Ayrıca, ROS'un spesifik temizleyicilerle inhibisyonunun, bir dizi NLRP3 aktivatörüne yanıt olarak inflamazom aktivasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. Başka bir araştırmada ise, tiyoredoksin-etkileşimli proteinin NLRP3'e ROS'a bağlı bir şekilde bağlanabileceğini ortaya çıkarmıştır, bu da ek olarak ROS'un inflamazom aktivasyonundaki kritik rolüne işaret etmektedir [138,139].

Üçüncü model, lizozomal katepsin B'nin sitozolik salınımının, inflamazom aktivasyonun başlattığını ortaya çıkarmıştır. Bu modelde, çevresel moleküllerin fagositozunun NLRP3 kompleksini aktive ediyor gibi görünmektedir. Bu kristal yapılar, lizozomal atığı tetiklemekte ve lizozomal sistein proteaz ile katepsin B'nin aracılık ettiği bir mekanizma aracılığıyla atığı sitozole salarak NLRP3 kompleksi aktivasyonunu artırmaktadır. Ayrıca, son araştırmalar, NLRP3'ün post-translasyonel modifikasyonlarının, aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür [140,141].

2.4.3. İnflamazom Aktivasyonunda İlk Adım: Endotel Disfonksiyonu

Endotel hücreleri, kan damarlarının iç yüzeyini tek bir tabaka halinde kaplamakta ve birçok işlevi yerine getirmektedir. Besinlerin (glukoz dahil), hormonların ve makromoleküllerin kandan çevre dokulara taşınmasından, o dokuların büyümesinden ve uygun metabolizmanın sağlanmasından sorumludur. Endotel hücreleri, hücre yapışmasını, damar duvarının bütünlüğünü, vasküler geçirgenliği, trombus oluşumunu ve fibrinolizi etkilemekte; kan akışını düzenlemekte ve kan vizkozitesini, lökosit hareketini, anjiyogenezi regüle etmektedir. Ayrıca vasküler tonusu düzenleyen endotelin-1 ve tromboksan A2 gibi vazokonstriktörler ile nitrik oksit (NO), prostasiklin ve endotel kaynaklı hiperpolarize edici faktör gibi vazodilatör mediatörlerin salımından sorumludur. Endotel hücreleri, kan ve dokular arasında bir bariyer sağlar ve bu nedenle inflamatuvar yanıtta önemli bir rol oynar [142,143]. Bu hücreler, enfeksiyonlara veya inflamasyona neden olan endojen moleküllere veya mikroorganizmalara karşı bir savunma hattı oluşturmaktadır. Pek çok PAMP ve DAMP, doğuştan gelen bağışıklık sistemi reseptörleri sayesinde endotel hücreleri tarafından tespit edilebilir. Hasarlı bir endotelyumun özellikleri arasında fenotipik değişiklikler, inflamasyon ve bozulmuş geçirgenlik bulunmaktadır [144].

Bozulmuş vazodilatasyon, artmış pro-trombosiz ve proinflamasyon ve artan redoks hali endotel disfonksiyonunun özelliklerindendir. Diyabette gelişen endotel

disfonksiyonu, hipergliseminin erken evresinde gelişen vasküler inflamasyon ve aterosklerotik lezyonların oluşturduğu patolojilerin bir bütünü olarak tanımlanır. Endotel disfonksiyonu, değişen hücre sinyali, artmış oksidatif stres, proinflamatuvar aktivasyon ve mitokondriyal disfonksiyonu içeren karmaşık bir mekanizma ile T2DM'nin çok erken bir aşamasında gelişmektedir. Diyabetteki bu vasküler patoloji, kanda yüksek glukoz, yüksek yağ seviyeleri, insülin direnci ve hipertansiyon ile ilişkilendirilmiştir [28,29]. Hipergliseminin neden olduğu vasküler endotel inflamasyonunun genişlemesi, diyabetle ilişkili vaskülopati ile sonuçlanan endotel bariyer disfonksiyonuna yol açmaktadır. Sonuç olarak, vasküler komplikasyonlar, diyabetli hastalarda birincil ölüm ve sakatlık sebebi haline gelmektedir. T2DM'de, insülin direnci ve endotel disfonksiyonunun hiperglisemi gelişmesinden önce ortaya çıktığı ve insülin direncinin genellikle hiperglisemi ve diyabetten yıllar önce geliştiği kaydedilmiştir. Pek çok çalışma, diyabetin kardiyovasküler hastalık ile yakın bir ilişkisi olduğunu ve normogliseminin sürdürülmesinin kardiyovasküler bozuklukların önlenmesinde önemli olduğunu göstermektedir [145–147].

Endotel hücrelere glukoz taşınması insülininden bağımsızdır ve glukoz transporter-4 (GLUT-4) tarafından aracılık edilen çizgili kas hücrelerinin aksine glukoz transporter 1 (GLUT-1) tarafından gerçekleştirilir. Bu nedenle, endotel hücrelerindeki glukoz seviyesi, insülin duyarlılığından bağımsız olarak kandaki ile aynı seviyededir. Bununla birlikte, kandaki insülin seviyesi, iki bağımsız insülin sinyal yolu aracılığıyla endotelyum tarafından NO ve endotelin-1 üretimini etkilemektedir. İnsülin direncinin NO üretimini etkilediği ancak endotelin-1 üretimi üzerinde etkisinin bulunmadığı düşünülmektedir [148]. İnsülinle uyarılan NO ve endotelin-1 salınımı, sırasıyla fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) bağımlı ve MAPK bağımlı sinyaller ile regüle edilir. Artan insülin sinyalini, endotelin-1 üretimini de artırmaktadır. İnsülin direnci, NO üretimi ile endotelin-1 salınması arasında bir dengesizliğe neden olur. PI3K aktivasyonunun ve kompensatuvar hiperinsülinemi mekanizmasının bozulmasının, insülinin pro-hipertansif, aterosklerotik, trombojenik ve pro-koagülan etkileri yoluyla endotel disfonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkisi vardır [149,150].

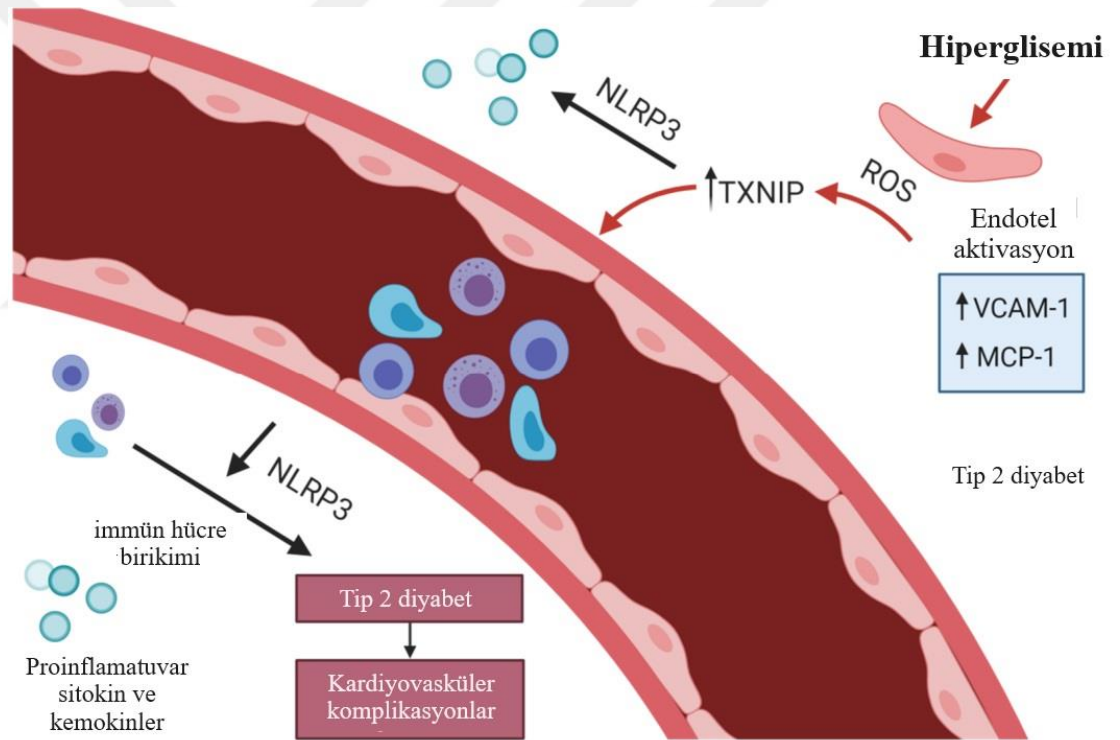
Hiperglisemi, çeşitli biyokimyasal yollarla diyabetik komplikasyonlara yol açan hücresel hasara neden olan ROS'un aşırı üretimiyle oksidatif strese ve endotel disfonksiyonuna neden olur [151].

ROS'un en önemli kaynağı, mitokondride ATP üretiminin ana bölgesi olan mitokondriyal elektron taşıma zincirinin aşırı aktivasyonu ve NADPH-bağımlı oksidazın glukoz kaynaklı aktivasyonudur. ROS'un aşırı üretimi DNA hasarına neden olur. Bu yol ile Poli-ADP-riboz polimeraz 1 aktive edilir ve ardından glikolitik enzim gliseraldehit-3 fosfat dehidrojenaz inhibe edilir. Poliöl yolağı olarak da adlandırılan bu yolak, hekzosamin yolağı ile diaçilgliserol ve protein kinaz C (PKC) yolağını etkileyen glikolitik metabolitlerin birikmesine ve gelişmiş glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) oluşumuna yol açmaktadır. Artan poliöl aktivitesi, sorbitol ve fruktoz birikimi ile sonuçlanır ve sonuç olarak H_2O_2 ile ROS'un aşırı üretimine, oksidatif stresin artmasına ve PKC'yi aktive eden metilglioksal (AGE'lerin öncüsü) ve diaçilgliserol oluşumuna yol açmaktadır. PKC, insülin reseptörü substratları 1 ve 2'yi etkileyerek PI3K yolunun ve endotelial NO sentazın (eNOS) inaktivasyonuna ve endotel hücrelerinde NO üretimine neden olur. Ardından, NF- κ B ve pro-oksidan enzim NOX'in aktivitesi artar. NF- κ B'nin aktivasyonu, vasküler adezyon molekülleri, sitokinler ve kemoatraktanların üretimini ve sonuç olarak vasküler duvardaki inflamatuvar hücrelerin aktivasyonunu artırır. AGE'ler, proteinlerin, nükleik asitlerin ve lipidlerin enzimatik olmayan glikasyonu sonucunda oluşur. AGE'ler reseptörlerine bağlanarak işlevlerini yerine getirmeye başlarlar. Son olarak, AGE'ler, proinflamatuvar sitokinlerin ve TNF- α , IL-6, hücreler arası adezyon molekülü-1, vasküler hücre adezyon molekülü ve monosit kemoatraktan protein 1 gibi inflamatuvar moleküllerin varlığı ile karakterize edilen inflamasyonu indükler. Hekzosamin yolunun aktivasyonu, PI3K/AKT sinyalini azaltan O-glukozilasyonun düzensizliğine yol açar ve bu da eNOS'un serin/treonin protein kinaz B (AKT) ile fosforilasyonunu azaltıp NO'nun daha az üretimine sebep olur [152–154].

İnsülin direnci durumunda, endoplazmik retikulum (ER) stresi aktive olur ve insülin direncine katkıda bulunur. ER, hücredeki en büyük organeldir ve kalsiyum (Ca^{2+}) depolama, karbohidrat ve lipid metabolizması, protein sentezi, olgunlaşma, katlanma ve taşıma gibi birçok işlevi yerine getiren dinamik bir yapı oluşturur. Aşırı bozulmuş protein sentezi ve katlanmamış veya yanlış katlanmış proteinlerin ER boşluğunda birikmesi, katlanmamış protein yanıtı (UPR) olarak bilinen karmaşık bir sinyal ağının aktivasyonuna yol açan ER stresine sonuçlanır. UPR, ana rolü protein katlama kapasitesini artırmak olan hayatta kalmaya yönelik bir mekanizmadır. ER stresi, hiperglisemiye benzer şekilde, oksidatif stresi indükleyerek aşırı ROS üretimine ve patolojik etkilere neden olur. Diyabette yüksek bir protein sentezi ihtiyacı olduğundan, doğal olmayan disülfid

bağlarının aşırı oluşumu aşırı glutatyon (GSH) tüketimine yol açar. Bu, ROS'u temizlemek içindir. Hücrede indirgenmiş GSH stoklarının tükenmesi, oksidatif strese bir artışa yol açar. Yanlış katlanmış proteinler ER lümeninde birikir ve büyük miktarlarda Ca^{2+} mitokondriye sızarak ROS üretimini artırır. Mitokondri içindeki aşırı Ca^{2+} , ROS üretimine yol açar. Sonraki aşamada ER'de Ca^{2+} homeostazı kaybolur, bu da ER stresini ve oksidatif stresi uyarak endotel disfonksiyonuna yol açar. ER stresini, protein kinaz benzeri endoplazmik retikulum kinaz yolu olan katlanmamış protein cevabı yoluyla insülin direncine katkıda bulunur [155,156].

NLRP3 inflamazomunun insan vücudundaki rolü göz önüne alındığında, NLRP3 aracılı inflamasyonun baskılanması, hiperglisemik toksisiteyi azaltmak ve vasküler komplikasyonun başlamasını önlemek için yeni bir yaklaşım olabilir (Şekil 2-5).

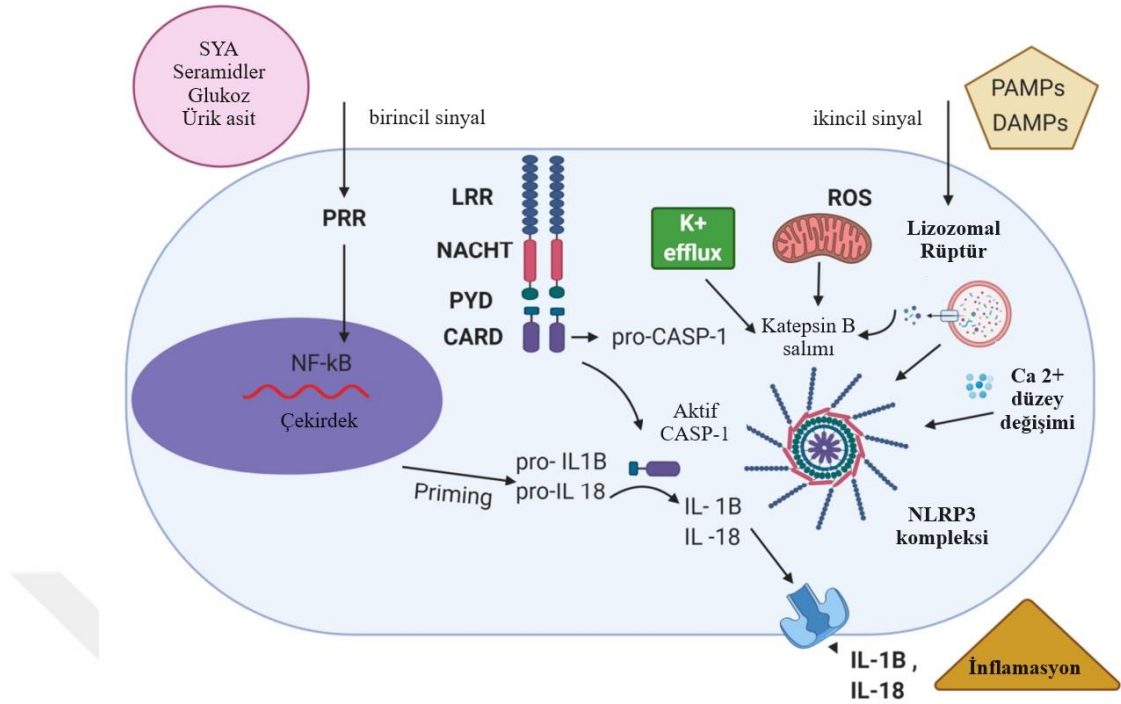


Şekil 2-4: NLRP3, endotel disfonksiyonu ve tip 2 diyabet arasındaki ilişki. NLRP3: NOD-, LRR- and pirin içeren protein 3, TXNIP: Tiyoredoksin-etkileşimli protein, ROS: Reaktif oksijen türleri, VCAM-1: Vasküler hücre adhezyon molekülü-1, MCP-1: Monosit kemoatraktan protein-1. Bu şekil [157] dan değiştirilerek uyarlanmıştır.

İnflamatuvar Kawasaki hastalığı deneysel modeli oluşturulmuş fareler, artan kaspaz-1, IL-1 β ve vasküler hücre yapışma molekülü-1 ekspresyonuna bağlı olarak gelişen endotel hasarı ile ilişkili damar gevşeme yanıtlarında azalma göstermişlerdir. Ayrıca NLRP3 eksikliği, hiperkolesterolemik farelerde vasküler süperoksit anyon oluşumunun engellenmesine ve eNOS aktivitesinin artmasına bağlı olarak endotel fonksiyonunu korumaktadır. *In vitro* deneyler, NLRP3 geninin susturulmasının, *Lactobacillus casei*'nin hücre duvarı fragmanları ile uyarılan endotel hücrelerinde kaspaz-1 ve IL-1 β aktivasyonunu engellemiş, Bu da NLRP3'ün endotel fonksiyonu üzerindeki modülatör rolünü de göstermiştir. Ek olarak, spontan hipertansif sıçanlarda kan basıncını kontrol eden beyin bölgelerinde NLRP3 inflamazom bileşenlerinin ekspresyonunun arttığı ve bunun da vasküler hasar ile yüksek tansiyon ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Bilim adamları, NLRP3 ablasyonunun, farelerin koroner arter endotelindeki sıkı bağlantı bozukluğunu önlediğini gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde, NLRP3 geninin susturulmasının, fare vasküler endotel hücrelerindeki sıkı bağlantı proteinlerinin *in vitro* ortamda yüksek glukozla bağlı down-regülasyonunu engellediği gösterilmiştir. Hiperglisemi ile endotelial NLRP3 inflamazomunun ROS'a bağımlı aktivasyonunun, diyabette endotel disfonksiyonunu tetikleyen mekanizmayı başlatmak için gerekli olabileceği sonucuna varılmıştır [158–160].

2.4.4. NLRP3 İnflamazomunun Diyabetteki Rolü ve İnflamazomun Metabolik Sinyallerle Aktivasyonu

NLRP3 inflamazomu, doymuş serbest yağ asitleri, seramidler, yüksek seviyelerde glukoz, ürik asit ve adacık Amiloid Polipeptidi dahil olmak üzere obezite sürecinde biriken metabolik tehlike sinyalleri (endojen DAMP'ler ve PAMP'ler) için bir sensör görevi görüyor gibi görünmektedir. NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve ardışık IL-1 β üretimi ilk olarak pankreas β -hücrelerinde ve adacığa sızan makrofajlarda gösterilmiştir. Bu işlem IL-1 β üretimi ile sonuçlanıp çok sayıda sitokin ve kemokin indüklenmiş olur [110].



Şekil 2-5: NLRP3'ün metabolik sinyaller ile aktivasyonu. DAMP: hasar ilişkili moleküler paternler, PAMP: patojen ilişkili moleküler paternler, LRR: Lösinden zengin tekrarlar, CARD: Kaspaz aktivasyon ve işe alım bölgesi, ASC: apoptoz–ilişkili nokta benzeri proteini, NLRP3: NOD-, LRR- and pirin içeren protein 3, IL-1 β : İnterlökin 1 β , IL-18: İnterlökin 18, ROS: reaktif oksijen türleri, PRR: patern tanıma reseptörleri, NF- κ B :nükleer faktör- κ B. Bu şekil [157]'den değiştirilerek uyarlanmıştır

NLRP3 inflamazomunun, inflamasyonun prognozunda ve T2DM'nin ilerlemesindeki etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Liu ve ark. NLRP3'ün T2DM patogenezindeki kritik rolünü irdelemiş ve IL-1 β düzeylerinin T2DM hastalarında yükseldiğini göstermişlerdir [161]. T2DM'de aşırı IL-1 β üretiminin birkaç sonucu vardır: (1) inflamatuvar reaksiyonu güçlendiren IL-1 reseptör sinyalini kullanarak diğer inflamatuvar mediatörlerin (IL-18, IL-33) ekspresyonunun indüksiyonu; (2) T2DM ile ilişkili olan oksidatif stres ve ER stresinin artışı; ve (3) c-Jun N-terminal kinazların (JNK'ler) aktivasyonu sonucu, insülin reseptör substratı-1'in (IRS-1) serin fosforilasyonunu indüksiyonu ve insüline duyarlı dokularda insülin-PI3K/AKT sinyal yolunun aktivitesinde azalma [162,163]. Bitto ve ark. sağlıklı hayvanlara kıyasla T2DM hayvan modellerinde yara iyileşmesi sırasında NLRP3, ASC, kaspaz-1, IL-18 ve IL-1 β 'nin up regüle olduğunu bildirmiştir [164]. Coll ve ark. NLRP3 aracılı inflamasyonu

inhibe eden MCC950'nin T2DM'de potansiyel bir anti-inflamatuvar tedavi ajanı olarak uygulanabileceğini bildirmiştir [165]. NLRP3 inflamazomunun T2DM'deki patojenik rolüne yönelik incelemelerde, antidiyabetik bir ajan olan Gliburid'in monositlerde inflamasyon aracılı IL-1 β salınımını baskıladığı ortaya konmuştur [166]. Metforminin ayrıca AMPK aktivasyonu ile IL-1 β seviyelerini düşürdüğü de rapor edilmiştir [167]. Bu gözlemler, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonunun insülin direnci ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Bununla birlikte, T2DM'de NLRP3 inflamazom aktivasyonunun mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır ve bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyaller

3.1.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

- Vorteks (Benchmark®, USA)
- Ayarlanabilir Otomatik Pipetler (1-2,5 µL; 1-10 µL 10-100 µL; 20-200 µL; 100-1000 µL) (Thermo®, ABD)
- 150 °C Dondurucu (Bosch®)
- 20 °C Dondurucu (Bosch®)
- 80 °C Dondurucu (Siemens®)
- Akım sitometrisi (Muse®, Luminex)
- Blok ısıtıcı (Stuart®, SBH200D)
- Biorad Chemidoc Jel Görüntüleme Sistemi (BIORAD®, ABD)
- CO₂'li inkübatör (Nuair®, NU-5831)
- Çalkalayıcı (IKA®, MTS4)
- Dikey elektroforez sistemi ve ıslak blotlama sistemi (BIORAD®, ABD)
- Gerçek Zamanlı Polimer Zincir Reaksiyonu (PCR) döngü cihazı (Qiagen®, RotorGene Q)
- Hassas terazi (Shimadzu®, ATX224)
- Kemiluminesans görüntüleme cihazı (BIORAD®, ABD)
- Laminar kabin (ScanLaf®, Mars)
- Multimod Plaka Okuyucu (EnSpire-PerkinElmer®)
- Mikroplaka okuyuculu spektrofotometre (BioTek®, Synergy H1)

- Otoklav (Zealway®, GR85DR)
- pH metre (Hanna®, H183141)
- Real-Time PCR System StepOnePlus (Thermo®ABD)
- Soğutmalı mikro santrifüj (Beckman Coulter ®, 22R)
- Soğutmalı santrifüj (Sigma®, 2-16K)
- Spin santrifüj (Thermo Scientific®, Espresso)
- Termal döngü cihazı (BIORAD®, ABD)
- Ters faz ışık mikroskobu (Carl Zeiss®, Primovert)
- Ultra saf su cihazı (Thermo®, ABD)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Liraglutid (Novo Nordisk®, Danimarka)
- RIPA hücre parçalama tamponu (Santa Cruz®, ABD)
- Tris-HCl (Sigma®, ABD)
- Sodyum dodesil sülfat (Merck®, Almanya)
- Yağsız süt tozu (Applichem®, Almanya)
- PVDF 0,45 µm membran (Millipore®, ABD)
- %10'luk TGX Stain-Free Fast Cast (BIORAD®, ABD)
- Proteaz inhibitör karışımı (CST®, ABD)
- Betamerkaptoetanol (Merck®, Almanya)
- Laemmli örnek hazırlama tampon (BIORAD®, ABD)

- APS (Alfa Aesar®, ABD)
- Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma®, ABD)
- Boyalı protein marker (GangNam-Stain®, Kore)
- Hidroklorik asit (Merck®, Almanya)
- Tween 20 (Affymetrix®, ABD)
- Glisin (Affymetrix®, ABD)
- TEMED (Alfa Aesar®, ABD)
- Akrilamid (Affymetrix®, ABD)
- Bisakrilamid (Affymetrix®, ABD)
- İzopropanol (Merck®, Almanya)
- ECL substratı (Lumiglo) (CTS®, ABD)
- Sensifast SYBR No-Rox Kit (Bioline®, ABD)
- ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England Biolabs®, ABD)
- Serum fizyolojik (Eczacıbaşı®, Türkiye)
- Propilen glikol (Tekkim®, Türkiye)
- Distile su (HPLC grade) (Human Power I Scholor UV, JJS®, ABD)
- Çinko sülfat hepta hidrat (Merck®, Almanya)
- Orto-fosforik asit (Merck®, Almanya)
- Asetonitril (HPLC grade) (Merck®, Almanya)
- Amonyum asetat (Merck®, Almanya)

- Metanol (HPLC grade) (Merck®, Almanya)
- Agaroz (Research Products International®, ABD)
- Boyalı DNA marker (Invitrogen®, ABD)
- Penisilin-Streptomisin (10,000 U/mL) 100mL 15140122 (Thermo®ABD)
- FBS, kalifiye, ısı ile aktive edilmiş, 500 mL 10500064 (Thermo®ABD)
- Trypsin-EDTA (0.25%), fenol kırmızısı 100mL (Thermo®ABD)
- Restore Plus Western Blot Stripleme Tamponu (Thermo®ABD)
- Pierce™ 20X PBS Tween™ 20 Tamponu (Thermo®ABD)
- Metanol (Thermo®ABD)
- Colormixed protein marker 180, 500 UL (Abclonal®, ABD)
- İnsan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) (ATCC®, ABD)
- İnsan Koroner Arter Endotel Hücreleri (HCAEC) (ATCC®, ABD)
- Endotel Hücre Besiyeri, Glukozsuz (Sciencell®, ABD)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Biomatik® A2424)
- HRP konjugatı β -aktin (Santa Cruz Biotechnology® (sc-47778))
- MitoTracker Green FM boya M7514 (Thermo®ABD)
- MTT (Thermo®ABD)

3.1.3. Kullanılan Antikorlar

- Kaspaz-1 (D7F10) Rabbit mAb (Abcam®, ABD)
- ASC/TMS1 (E1E3I) Rabbit mAb (Abcam®, ABD)

- HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (AS014) (Abcam®, ABD)
- NLRP3 (D4D8T) Rabbit mAb (Abcam®, ABD)
- GAPDH Mouse mAb (AC033) (Abcam®, ABD)
- Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (AS071) (Abcam®, ABD)

3.1.4. Kullanılan Kitler

- NucleoSpin RNA kiti (Macherey Nagel®, Almanya)
- ProtoScript II First Strand cDNA Sentez (New England Biolabs®, ABD Kiti)
- Sensifast SYBR No-Rox Kit (Bioline®, ABD)
- CyQUANT™ LDH Sitotoksosite Testi (Thermo Fisher®, ABD)
- Human IL-1 β Human ELISA Kit (Elk Biotechnology®, ABD)
- Human IL-18 Human ELISA Kit (Elk Biotechnology®, ABD)
- Human TNF- α ELISA Kit (Elk Biotechnology®, ABD)

3.1.5. Kullanılan Bilgisayar Yazılım Programları

- Graphpad Prism 8.00 (GraphPad Software®, ABD)
- ImageJ (ImageJ®, ABD)
- IBM SPSS Statistics 22 (IBM®, ABD)
- BioRender (BioRender®, ABD)

3.2. Yöntem

Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC)'den temin edilen insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve insan koroner arter endotel hücreleri (HCAEC) hücreleri kullanılmıştır. Hücreler uygun hücre kültürü plaklarından çoğaltıldıktan sonra kriyojenik viallerde ara pasaj numaraları ile sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Bu amaçla hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra 15 mL'lik falkonda 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir. Üst faz atıldıktan sonra üzerine mililitrede yaklaşık 1×10^6 hücre olacak şekilde %5 DMSO içeren besiyeri ilave edilmiştir. Pipetaj yapıldıktan sonra kriyojenik viallere aktarılmış ve dondurulmak üzere sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Hücreler çalışmaya başlamadan önce hücre büyütmeye kullanılan besiyerinde ve 37 °C'de ısıtılmıştır. Hücreler çözöldükten sonra kriyojenik vialden 15 mL'lik falkona aktarılmış ve hücre süspansiyonu üzerine yavaşça taze besiyeri ilave edilmiştir. 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilip üst faz atılmıştır. Hücre pelleti üzerine taze besiyeri ilave edildikten sonra pipetleme yapılarak hücreler süspande edilmiş ve büyütölmek üzere steril hücre kültürü kaplarına ekilmiştir.

HCAEC ve HUVEC hücre hattı için besiyerleri: ECM-GF besiyerine 50 mL inaktive edilmiş FBS (%10), 5 mL %1'lik antibiyotik çözöltisi eklenerek son hacim 500 mL olacak şekilde çalışma öncesinde taze hazırlanmıştır. Ardından %50 lik glukoz çözöltisinden bu besiyerine sırası ile 100 uL glukoz/50 mL besiyeri ve 450 uL glukoz/50 mL besiyeri şeklinde eklenerek düşük glukozlu ve yüksek glukozlu (sırası ile 1 mmol/L ve 25 mmol/L) besiyerleri ayrıca oluşturulmuştur.

Fetal sığır serumu (FBS) kullanımı için hazır inaktive edilmiş FBS tercih edilmiştir. Ancak, FBS inaktive edilmemişse, 56 °C'de 30 dakika boyunca inkübe edilerek inaktivasyon gerçekleştirilmiştir. İnaktive edilen FBS çözöltisi 15 mL'lik falkonlara bölünerek -20 °C'de saklanmıştır. Deney öncesinde 37 °C'de çözöndürölerek kullanılmadan önce, FBS besiyerine eklenmeden önce 0,22 µm steril naylon filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir.

Antibiyotik çözöltisi [penisilin (100 U) / streptomisin (100 µg/mL) %10], 1 mL penisilin (100U) / streptomisin (100 µg/mL) ana stok çözöltisinden alınarak, 10 mL'ye CMF-PBS ile tamamlanmıştır.

Hücre dondurma çözeltisi, şu şekilde hazırlanmıştır: 5 mL DMSO (%5, v/v), 9,5 mL FBS ve 0,95 mL %1'lik antibiyotik çözeltisi hücreler için uygun besiyeri ile 100 mL'ye tamamlanarak oluşturulmuştur.

Hücreler Tripan mavisi yöntemiyle sayılmıştır. Tripan mavisi hücre canlılık testinde, hücre zarı bütünlüğü bozulmamış canlı hücreler tripan mavisi boyasını hücre içine almazken, membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücrelerde boya hücre içerisine girmektedir. Işık mikroskobu ile incelendiğinde canlı hücrelerin sadece membranları mavi renkli gözlenmektedir. Diğer yandan ölü hücreler ise tamamıyla mavi renge boyanmış olarak görünmektedir.

Pasaj yapılacak hücreler tripsin ile muamele edilerek toplanmış ve 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz atılmış, hücreler 1 mL 1X dPBS'te süspande edilmiştir. 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırılan hücrelerin sayımı ışık mikroskobunda, Thoma lamı (hemositometre) adı verilen ve 1 mm² alana ve 0,1 mm derinliğe sahip 4×16 küçük kareden oluşan özel sayım lamaları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 4×16 küçük kareye düşen ölü ve canlı hücreler sayılmıştır. Sayılan 4 alanın ortalaması alınmış ve % canlılık hesaplanmıştır. Hesaplama yapılırken şu formül kullanılmıştır:

Hücre sayısı (mL)= Sayılan hücre x 2 (Dilüsyon faktörü) x 10⁴ x hücre süspansiyonunun bulunduğu total hacim (mL)

1 mM: 1 mg Liraglutid 266 µL DMSO'da çözündürülmüş, 50 µL'lik porsiyonlanarak -20 °C'de saklanmıştır.

10 µM: 10 µL 1 mM Liraglutid çözeltisi 990 µL DMSO ile seyreltilmiş, -20 °C'de saklanmıştır.

Liraglutid Konsantrasyonlarının Hazırlanması: 10 µM Liraglutid stok çözeltisinden, DMSO ile seyreltilerek 100 nM ve 1000 nM Liraglutid çözeltisi hazırlanmıştır. Bu konsantrasyonlar besiyeri içerisinde 1/10 oranında seyreltilerek son konsantrasyonlar 10 nM ve 100 nM olacak şekilde hücre kültürü ortamına uygulanmıştır.

İstenilen koşullarda ve sayıda çoğaltılan hücreler 10 nM ve 100 nM Liraglutid dozlarına 48 saat süresince maruz bırakılmıştır. İlaç maruziyetleri sırasında DMSO konsantrasyonu %1'i geçmeyecek şekilde ayarlanmıştır. Kontrol grubu hücreleri %1 DMSO içeren DMEM besiyerine aynı sürelerde maruz bırakılmıştır.

Maruziyet için hücreler dört gruba ayrılmış ve 48 kuyulu hücre kültürü plakalarında inkübe edilmiştir:

1. Grup: Kontrol grubu (5.5 mM glukoz)
2. Grup: Yüksek glukoz konsantrasyonu (25 mM glukoz) uygulanan grup
3. Grup: Yüksek glukoz konsantrasyonu (25 mM glukoz) ortamında + Liraglutid (10 nM) uygulanan grup
4. Grup: Yüksek glukoz konsantrasyonu (25 mM glukoz) ortamında + Liraglutid (100 nM) uygulanan grup

3.2.1. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde LDH Seviyelerinin Ölçümü

Laktat dehidrojenaz (LDH), birçok farklı hücre tipinde bulunan sitozolik bir enzimdir ve hücrel toksisitenin köklü ve güvenilir bir göstergesidir. Plazma zarının hasar görmesi, LDH'nin hücreyi çevreleyen hücre kültürü ortamına salınmasına neden olur. Bu ekstraselüler LDH, LDH'nin, NAD⁺'nin NADH'ye indirilmesi yoluyla laktatın piruvata dönüşümünü katalize ettiği bir enzimatik reaksiyonla ölçülebilir. Diaphorase NADH'ı kullanarak tetrazolyum tuzunu (INT) 490 nm'de ölçülebilen kırmızı bir formazan ürününe indirir. Formazan oluşum düzeyi ortama salınan LDH miktarı ile doğru orantılıdır.

Çalışmada ekstraselüler LDH ölçümü için CyQUANT LDH Sitotoksik Ölçüm deney kiti kullanılmıştır. İlk olarak kit bileşenleri CyQuant LDH Test kılavuzuna göre birleştirilmiştir. 12 mL reporter karışım, reaktif stokunu oluşturmak için 1 mL Reaktif Karışımı ile birleştirilmiş, sıvı nitrojen içinde dondurulmuş ve ileride kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Daha sonra LDH analizleri üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirilmiştir. Lizis çözeltisi (pozitif kontrol), hücre besiyeri (negatif kontrol) ve Liraglutid 40 dakikalık plak inkübasyonunun ardından, hücre ortamının 10 µL'si siyah, şeffaf tabanlı 96 oyuklu bir plaka aktarılmıştır. Santrifüj kullanılarak 1 dakika boyunca 300 rpm'de döndürülmüştür. Daha sonra her bir oyuğa 10 µL Reaktif Stok çözeltisinden ilave edilmiş, plak 300 rpm'de 1 dakika süreyle döndürülmüş ve ardından karanlıkta 10 dakika süreyle inkübe edilmiştir. LDH reaksiyonu daha sonra 10 µL durdurma solüsyonu eklenmiş, plak 300 rpm'de 1 dakika süreyle döndürülmüş ve 15 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilmiştir. Son olarak plak okuyucuda 560 nm ve 590 nm dalgaboyunda absorbans ölçülmüştür. Veriler Prism 8 yazılımı (GraphPad) kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.2. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Migrasyon Yöntemi ile Hücre Proliferasyonunun Değerlendirilmesi

Liraglutidin hücre migrasyonuna ve proliferasyonuna olan etkisi CytoSelect® Wound Healing Assay Kit (Cell Biolabs®, Inc., San Diego, CA, USA) ile incelenmiştir. Hücreler 96'lık plakaya ekildikten sonra 24 saat beklenilmiş ve bu süre öncesi ve sonrası alınan görüntülerin kıyaslaması yapılmıştır. İlacın proliferasyona olan etkisinin değerlendirilmesi kontrol grubuna göre yapılmış ve 3 tekrarlı çalışılmıştır. Proliferasyon hesabı için aşağıdaki denklem kullanılmıştır:

$$\% \text{ proliferasyon} = \text{hücre yüzeyi migrasyonu} \times 100 / \text{toplam yüzey alanı}$$

3.2.3. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde MTT Testi ile Hücre Canlılığının Ölçümü

3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit (MTT) tetrazolyum bileşiğinin in vitro ortamda canlı hücre sayısını ölçmek için kullanılması ilk olarak 1983 yılında Mosmann tarafından tarif edilmiştir [168]. Canlı ve mitokondriyal fonksiyonu bozulmamış hücrelerin MTT bileşiğindeki tetrazolyum halkasını mitokondriyal süksinat dehidrojenaz enzimi ile suda çözünmeyen formazan kristallerine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. MTT bileşiği kültür ortamında çözünür ve hücre membranından geçebilen bir yapıdadır. MTT 5 mg/mL konsantrasyonda PBS içinde hazırlanmış ve doğrudan kültürdeki hücrelere eklenmiştir. 3 saat inkübe edildikten sonra canlı hücreler, tetrazolyumu, hücrelerin içinde ve kültür ortamında biriken mor bir formazan kristaline indirgemıştır. 570 nm absorbansta ölçmeden önce formazan kristal çökeltisi uygun çözücüde çözündürülmüştür. Absorbans miktarı, canlı hücre sayısı ile orantılıdır.

Deneyde Kullanılan Kimyasallar:

- 1 mM Liraglutid Stok Çözeltisi
- Negatif Kontrol Çözeltisi: DMSO
- 5 mg/mL MTT Çözeltisi: 50 mg MTT + 10 mL 1x PBS.
- Pozitif Kontrol Çözeltisi: 100 µL Triton X-100 + 900 µL 1x PBS. -20 °C'de saklanmıştır.

Deneyin Yapılışı: Hücreler 96'lık mikropklara 1x10⁴/kuyucuk olacak şekilde ekilmiş ve hücrelerin yapışması için 24 saat beklenilmiştir. İlaç uygulaması öncesinde kuyucuklardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırılarak, hücrelerin üzerlerine 99 µL ECM-GF besiyeri eklenmiştir. Her bir gruptaki kuyucuklara, 3 tekrar olacak şekilde her bir kuyuda

son konsantrasyon 10 nM ve 100 nM olacak şekilde Liraglutid eklenmiştir. 48 saat sonunda besiyerleri kuyucuklardan uzaklaştırılmıştır. Kuyucuklara 100 µL taze besiyeri eklenmiş ve üzerine 20 µL MTT çözeltisi eklenmiştir. Mikroplak, 2 dakika boyunca 150 rpm ile çalkalanıp %5 CO₂ içeren 37 °C'deki inkübatörde 3 saat süreyle inkübe edilmiştir. Süre sonunda kuyucuklardan MTT'li besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara 100 µL DMSO eklenmiştir. Formazan kristallerini çözündürmek amacıyla plaka 150 rpm ile 10 dakika çalkalayıcıda bekletilmiştir. Oluşan renk şiddeti (OD), mikroplak okuyuculu spektrofotometre ile 590 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Hücre canlılığı, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{örnek OD590} - \text{pozitif kontrol OD590}) / (\text{negatif kontrol OD590} - \text{pozitif kontrol OD590}) \times 100$$

3.2.4. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

Apoptoz profilleri Muse® Annexin V ve Ölü Hücre Kiti (#MCH100105, Merck Millipore, Billerica, MA, ABD) kullanılarak incelenmiştir. HUVEC ve HCAEC hücreleri, öncesinde 25cm² lik flasklara ekilerek 4'er gruba bölünmüş (LG, HG, HG+Liraglutid 10 nM, HG+Liraglutid 100 nM) ve 48 saatlik bir tedavi sürecine maruz bırakılmıştır. Ardından hücreler PBS ile yıkanmış, trypsinize edilmiş, toplanmış, %2 FBS (100 µL) içeren PBS içerisinde yeniden süspanse edilmiş ve 100 µL Muse® Annexin V ve Ölü Hücre reaktifi eklenmiştir. Karanlıkta oda sıcaklığında 20 dakika boyamanın ardından hücrelerin apoptoz profilleri, üreticinin talimatlarına göre Muse® Hücre Analizörü kullanılarak kaydedilmiştir.

3.2.5. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Hücre Döngüsünün Değerlendirilmesi

Hücre döngüsü dağılımı Muse® Hücre Analizörü kullanılarak analiz edilmiştir. HUVEC ve HCAEC hücreleri, öncesinde 25cm² lik flasklara ekilmiş ve 48 saatlik bir tedavi sürecine maruz bırakılmıştır. Sonrasında hücreler PBS içerisinde yeniden süspanse edilmiş ve %70 etanol ile fikse edilerek ve 24 saat boyunca -20°C'de saklanmıştır. Etanolla fikse edilmiş hücreler daha sonra PBS ile yıkanmış ve karanlıkta oda sıcaklığında 30 dakika boyunca 200 µL Muse™ Hücre Döngüsü Reaktifi (MCH100106, Merck Millipore, Billerica, MA, ABD) ile boyanmış ve Muse akış hücre analizörü kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, DNA içeriği profil histogramlarıyla ilişkili olarak

hücre döngüsünün Sub G1, G0/1, S ve G2/M fazlarındaki hücrelerin yüzdesi olarak ifade edilmiştir.

3.2.6. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Oksidatif Stres Belirteçleri olan TAS, TOS ve OSI Seviyelerinin Ölçümü

Total Antioksidan Seviye (TAS), Erel tarafından geliştirilen tam otomatik bir yöntem olup [169], güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan seviyesini ölçen bir metoddur. Fe^{2+} -o-dianisidin kompleksi H_2O_2 ile Fenton tipi reaksiyon oluşturarak $\text{OH}^\cdot$ radikalini oluşturmaktadır. Bu güçlü reaktif oksijen türü indirgen düşük pH'da renksiz o-dianisidin molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi dianisidil radikallerini meydana getirmektedir. Dianisidil radikalleri ileri oksidasyon reaksiyonlarına katılarak renk oluşumunu artırmaktadır. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını bastırarak renk oluşumunu durdurmaktadırlar. Bu reaksiyon otomatik analizörde spektrofotometrik olarak ölçülerek sonuç verilmektedir.

Reaktif 1: 75 mM Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 10 mM o-dianisidin dihidroklorür ve 45 uM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanmıştır.

Reaktif 2: Clark tamponu (pH:1,8) içerisinde 7,5 mM H_2O_2 çözdürülerek hazırlanmıştır. 240 nm'de spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılmıştır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analog olan Trolox kullanılmıştır. Sonuçlar Trolox Equivalent/L olarak ifade edilmiştir.

Total Oksidan Seviye (TOS), örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla oksitlemektedir. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır [170]. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ve tam otomatik kolorimetrik bir yöntemdir.

Reaktif 1: 140 mM NaCl çözeltisi içerisinde 25 mM H_2SO_4 çözülerek ana solüsyon hazırlanmıştır. Ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözüldürülmüş daha sonra 250 uM ksilenol turuncusu çözülerek hazırlanmıştır.

Reaktif 2: Ana solüsyon içerisinde önce 10 mM o-dianisidine dihydrochloride çözdürülüp sonra 5 mM Amonyum ferröz sülfat çözülerek hazırlanmıştır. 560 nm'de

spektrofotometrik olarak End-Point ölçüm yapılmıştır. Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-odianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlemiştir. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmıştır. Ferrik iyonlar asidik ortamda ksilenol turuncusu ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan renk şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Standart olarak H₂O₂ kullanılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L olarak ifade edilmiştir.

Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) ise Total Oksidan Seviye (TOS) / Total Antioksidan Seviye (TAS) şeklinde bölünerek Oksidatif Stres indeksi (OSİ) hesaplanmıştır. Birimi (TOS, $\mu\text{mol, H}_2\text{O}_2$ Equivalent/L)/(TAS, $\mu\text{mol Trolox Equivalent/L}$) olarak belirlenmiştir.

3.2.7. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Kaspaz-1, ASC ve NLRP3 mRNA Ekspresyonlarının RT-PCR Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Hücre lizatları, -80 °C'de saklanan örnekler sıvı azot kullanılarak parçalanmıştır, ardından NucleoSpin RNA kiti (Macherey Nagel®, Almanya) kullanılarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Sıvı azotla parçalanan dokular boş Eppendorf tüplere alınmış ve 350 μL hücre parçalama tamponu ile 3,5 μL beta-merkaptoetanol eklenerek 30 saniye boyunca vorteks yapılmıştır. Karışım, NucleoSpin (Macherey Nagel®, Almanya) filtrelerine aktarılmış ve 11.000 devir/dakika hızında 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Filtre atılmış, alt kısımda biriken materyal 350 μL %70 etanol ile karıştırılmıştır. NucleoSpin kartuşlarına yüklenerek 11.000 devir/dakika hızında 30 saniye süreyle santrifüj edilmiştir. Kartuşun üzerine, 350 μL membranı tuzdan arındıran tampon eklenmiş ve 11.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Sonrasında, 10 μL sulandırılmış DNAaz ve 90 μL reaksiyon tamponu karıştırılmıştır. Filtrenin üzerine bu karışımdan 95 μL eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Yıkama tamponu I'den 200 μL eklenerek 11.000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edilmiştir. Yıkama tamponu II'den 600 μL eklenerek 11.000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüj edilmiştir. Yıkama tamponu II'den 250 μL eklenerek 11.000 rpm'de 2 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. En son olarak, 60 μL RNAaz içermeyen distile su eklenerek 11.000 rpm'de 1 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Tüpte toplanan çözelti, elde edilen total RNA'yı oluşturmuştur. Elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı, NanoDrop 8000 (Thermo®, ABD) spektrofotometre cihazıyla ölçülerek ng/mL olarak belirlenmiştir.

İzole edilen total RNA'ların komplementer DNA'larının (cDNA) sentezi için ProtoScript II First Strand cDNA Sentez Kiti (New England Biolabs®, ABD) tercih

edilmiştir. cDNA sentezi için, 1-6 µL total RNA kullanılarak Tablo 11'de belirtilen karışım hazırlanmıştır.

Tablo 3-1: Hazırlanan cDNA reaksiyon karışımı

İçerik	Miktar
ProtoScript II Reaksiyon karışımı (2X)	10 µL
10X RT Random Primer	2µL
Ters Transkriptaz Enzim Karışımı	2 µL
ddH ₂ O	0-5 µL
RNA	1-6 µL
Toplam Hacim	20 µL

Total RNA'ların üzerine hazırlanan reaksiyon karışımı eklenerek örnekler, 25°C'de 5 dakika, 42°C'de 60 dakika, 85°C'de 5 dakika ve 4°C'de 5 dakika olacak şekilde programlanmış termal çevrim PCR cihazına yerleştirilmiştir. Reaksiyon süresinin sonunda elde edilen cDNA örnekleri, gen ekspresyonlarını belirleme aşamasına geçilene kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

cDNA'lardan hedef genler ASC, Kaspaz-1 ve NLRP3 mRNA seviyesindeki azalış veya artış oranları referans gen RPLP ekspresyonu ile kıyaslanması sonrasında saptandı. Bunun için, Tablo 3-2'de gösterilen primerler ASC, Kaspaz-1, NLRP3 ve RPLP genlerine özgül olarak tasarlanıp sentezlenmiştir. Bu genlere özgül liyofilize halde gelen primerler son konsantrasyonları 100µM olacak şekilde PCR saflığındaki su ile çözülerek ana stokları hazırlanmıştır. Hazırlanan stoktan 1/10 dilüsyon yapılarak 10µM final konsantrasyonlardaki ara stoklar oluşturulmuştur. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklıkları (T_m) gradient PCR yapılarak belirlenmiştir.

Tablo 3-2: Primer dizileri ve erime sıcaklığı değerleri.

Gen	Primer Dizisi	Erime Sıcaklığı (T_m)
NLRP3	İleri: CTG GCA TCT GGG GAA ACC T Geri: GCC CTT CTG GGG AGG ATA GT	59 °C
Kaspaz-1	İleri: TTG GAG ACA TCC CAC AAT GG Geri: TGA AAA TCG AAC CTT GCG GA	61 °C
ASC	İleri: ATC CAG GCC CCT CCT CAG Geri: AGA GCT TCC GCA TCT TGC TT	61 °C
RPLP	İleri: GGA AAC TCT GCA TTC TCG CTT CC Geri: CCA GGA CTC GTT TGT ACC CGT TG	59 °C

Her bir örnek için, 6 µL distile su, 1 µL ileri primer, 1 µL geri primer ve 10 µL SensiFAST SYBR Mix (Bioline®, ABD) içeren PCR karışımı hazırlanmıştır. Mikrosantrifüj tüplerine konulan bu karışım, vortekslenerek her bir örnek için kapiller tüplere 18 µL olacak şekilde transfer edilmiş ve 2 µL cDNA örnekleri eklenerek tamamlanmıştır. Termal döngü, 95°C’de 2 dakika ön denatürasyonun ardından toplam 40 döngü şu adımlardan oluşmuştur: 95°C’de 5 saniye denatürasyon, her primere özgü erime sıcaklığına (T_m) göre 10 saniye bağlanma ve 72°C’de 20 saniye boyunca sentez.

SYBR Green’e bağlı floresan artışı gözlemlenen inceleme örneklerinden elde edilen grafiklerdeki döngü eşik değeri (CT) verileri değerlendirilmiştir. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için qRT-PCR deneylerinde kullanılan 58 örnek,

her biri ikili olarak çalışılarak elde edilen CT değerlerinin ortalaması alınmıştır. Genlerin artış ve azalış oranları, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (hedef gen-referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Yöntem formülü; $\Delta C_t = C_t(\text{hedef}) - C_t(\text{referans})$ $\Delta\Delta C_t = 2^{-\Delta C_t} = \text{Ürün miktarı oranı}$

3.2.8. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde ASC ve NLRP3 Protein Ekspresyonlarının Western Blot Yöntemi İle Değerlendirilmesi

Liraglutid maruziyeti sonrası hücreler 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti üzerine yıkama yapmak amacıyla 1x dPBS ilave edilip süspande edilmiş ve hücre süspansiyonu 1,5 mL'lik ependorflarda 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Üst faz uzaklaştırıldıktan sonra hazırlanan RIPA lizis tamponu eklenmiş, karıştırıldıktan sonra 5 defa 15 sn vorteks + 5 dk soğukta (buz üzerinde) bekletme işlemi uygulanmıştır. Ardından karışım -80°C 'ye kaldırılmıştır. Karışımın en az 1 gece bekletilmesinin ardından, soğutmalı santrifüjde $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 30 dakika boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Elde edilen üst faz, ayrı bir Eppendorf tüpüne transfer edilmiş ve -80°C 'de saklanmıştır. Total protein konsantrasyonu, Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo®, ABD) cihazı kullanılarak ölçülmüştür.

Kullanılan Kimyasallar

Örnek yükleme tamponu hazırlanması için, 900 μL LDS örnek tamponu (4X) ve 100 μL β -merkaptoetanol bir araya getirilmiştir.

Akrilamid jellerin hazırlanması için:

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8): 18,2 g Triz baz, 90 mL ddH₂O ile çözündürülmüştür. pH değeri %37'lik HCl ile 8,8'e ayarlandıktan sonra ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

1 M Tris-HCl (pH 6,8): 12,1 g Triz baz, 90 mL ddH₂O ile çözündürülmüştür. pH değeri %37'lik HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra ddH₂O ile 100 mL'ye tamamlanmıştır. Bu çözelti $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

%10 SDS: 1 g SDS, ddH₂O ile çözündürülerek 10 mL'ye tamamlanmıştır.

%10 APS: 0,11 g APS, 1 mL ddH₂O ile çözündürülmüştür (deney öncesi taze hazırlanmıştır).

%30'luk Akrilamid-Bis akrilamid çözeltisi

TEMED, SDS-PAGE protein markeri

Yürütme Tamponu: 6,06 g (50 mM) Tris baz, 28,52 g glisin (380 mM), 5 g SDS (% 0,5), 900 mL ddH₂O ile çözündürülmüştür. pH 8,5-8,7 %37'lik HCl ile ayarlanmış ve son hacim 1 L'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Jellerin Hazırlanması: İzole edilen proteinlerin elektroforez ile yürütülmesi için akrilamid jeller (yürütme jeli ve ayırma jeli) hazırlanmıştır. Bunun için önce 1,5 mm'lik SDS-PAGE jel hazırlama camlarının alt tarafından 6 cm yüksekliğe kadar yürütme jeli dökülmüştür. Jel polimerize olduktan sonra ayırma jeli dökülmüş ve 10 kuyucuklu taraklar takılmıştır. Jel tamamen polimerize olana kadar beklenmiştir.

Yürütme Jeli (%12): ddH₂O -- 3,3 mL 1,5 M Tris-HCl (pH: 8,8) --2,5 mL %30 Akrilamid-bisakrilamid -- 4 mL %10 SDS -- 100 µL %10 APS -- 100 µL TEMED -- 8 µL

Ayırma Jeli (%5): ddH₂O -- 2,7 mL 1 M Tris-HCl (pH: 6,8) -- 500 µL %30 Akrilamid-bisakrilamid -- 670 µL %10 SDS -- 40 µL %10 APS -- 40 µL TEMED -- 8 µL

Protein konsantrasyonu belirlenmiş örneklerden 40 µg protein 1x örnek yükleme tamponu ile karıştırılmıştır. Proteinlerin denatürasyonu için 95 °C'de 5 dk bekletilmiştir. Örnekler soğutulduktan sonra elektroforez tankına yerleştirilmiş akrilamid jellerin 10'luk taraklarla oluşturulmuş kuyucuklarına eşit hacimde yüklenmiştir. Yükleme kontrolü olarak β-aktin kullanılmıştır. Yürütme tamponu eklenmiştir. Proteinlerin yürümesini takip etmek için örneklerle eş zamanlı olarak bir kuyucuğa 3-5 µL protein markeri koyulmuştur. Proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılmasını sağlamak için +4°C'de önce 10 dk 120 V ile yürütülmüş, daha sonra 100 V ile jelin sonuna gelene kadar yürütülmüştür.

Kullanılan Kimyasallar:

Transfer tamponu: 3,03 g Tris baz (25mM), 14,26 g glisin (190 mM) 800 mL ddH₂O ile çözündürüldükten sonra üzerine 200 mL metanol eklenmiştir. +4°C'de saklanmıştır.

Nitroselüloz membran: Kullanım öncesi transfer tamponunda 5 dk bekletilmiştir.

PVDF membran: Kullanım öncesi metanol içinde 10 dk bekletilmiştir.

TBS (Tris Tamponu): 12,1 g Tris baz (100 mM), 8,76 g NaCl (150 mM) 900 mL ddH₂O ile çözündürüldükten sonra pH 7,5'e %37'lik HCl ile ayarlanmış ve son hacim 1 L'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

TBST (%0,1 Tween-20 içeren TBS): 1 L TBS 1 mL Tween-20 ile karıştırılmıştır.

%5 Yağsız Süt Tozu Çözeltisi: 5 g Yağsız süt tozu 100 mL TBST ile çözündürülmüştür.

Primer antikorlar: eNOS, kaspaz-1, ASC, NLRP3 ve GAPDH primer antikorlarından 5'er µL alınıp ayrı tüplerdeki 5 mL yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırılmıştır (1:1000).

Sekonder antikorlar: Anti-rabbit (sc-516102, Santa Cruz Biotechnology) ve Antimouse (sc-2357, Santa Cruz Biotechnology) HRP konjuge sekonder antikorlarından ayrı ayrı 0,5 µL alınıp 5 mL yağsız süt tozu çözeltisi ile karıştırılmıştır (1:10000).

Ponceau S boyası: 0,1 g Ponceau S 500 µL asetik asit ile çözündürüldükten sonra 50 mL'ye ddH₂O ile tamamlanmıştır.

Jellerdeki proteinlerin nitroselüloz veya PVDF membrana aktarılması için ıslak transfer sistemi uygulanmıştır. Tank içerisinde transfer tampon bulunan sistemde proteinlerin membrana aktarımı +4 °C'de sabit 75 voltta 3 saat süre içerisinde gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin nitroselüloz membrana düzgün bir şekilde aktarılıp aktarılmadığını kontrol etmek için membran Ponceau S boya çözeltisine konulmuş, TBST ile çalkalanarak yıkanmıştır. Bloklama işlemi için membranlar oda sıcaklığında 1 saat %5 yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde çalkalanmıştır. Bloklamadan sonra membranlar 3 kez 5 dk TBST ile yıkanmıştır. Yıkamanın sonrasında membranlar hedeflenen proteinlere özgü primer antikorlarla +4 °C'de gece boyunca çalkalanarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün membranlar tekrar 3 kez 5 dk TBST ile yıkanmıştır. Ardından primer antikorun üretildiği canlıya özgü üretilmiş olan, HRP konjuge sekonder antikorlar ile 2 saat oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 3 kez 5 dk TBST ile yıkanan membranlar Kemilüminesans Substrat Kit (Pierce® ECL Western Blotting Substrate) ile 2 dk muamele edilmiş ve protein bantları Biorad® Chemidoc Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülenmiştir. Western blotlama ile elde edilen protein bantlarının yoğunlukları ImageJ programıyla analiz edilmiştir. Kontrol olarak proteinler kendi GAPDH protein bantlarına oranlanarak normalize edilmiştir.

3.2.9. HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde IL-1 β , IL-18 ve TNF- α Seviyelerinin ELISA Yöntemi İle Ölçümü

Hücre lizatları, ELISA mikropalaklarındaki kuyucuklarda anti-IL-1 β , anti-IL-18 ve anti-TNF- α monoklonal antikorlarla kaplanmıştır. Antikorla kaplama işleminden sonra bir gece beklenmiş ve ertesi gün ELISA kitinin içerisinde bulunan IL-1 β , IL-18 ve TNF- α 'nın çeşitli konsantrasyonlarındaki standartlar ile doku örnekleri, mikropalakadaki kuyucuklara yüklenmiştir. Yüklenen standart ve örneklerdeki IL-1 β , IL-18 ve TNF- α , monoklonal antikorlar tarafından tutulmuştur. ELISA kitinin özel yıkama solüsyonları kullanılarak bağlanmamış komponentler uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, kuyucuklara biotin bağlı anti-IL-1 β , anti-IL-18 ve anti-TNF- α poliklonal antikorlar eklenmiş ve örneklerdeki anti-IL-1 β , anti-IL-18 ve anti-TNF- α 'ya bağlanması sağlanmıştır. Yeniden yapılan yıkama işlemi ile bağlanmayan sekonder antikorlar uzaklaştırılmıştır. Mikropalakadaki kuyucuklara ELISA kiti içerisinde bulunan Streptavidin-Horse Radish Peroksidaz enzim solüsyonu eklenerek, 20 dakika boyunca ışıktan korunacak şekilde inkübasyon sağlanmıştır. Daha sonra substrat solüsyonu eklenmiştir. Enzim-substrat reaksiyonu sonucu oluşan rengin yoğunluğu, örnekte bulunan IL-1 β , IL-18 ve TNF- α miktarı ile doğru orantılıdır. Reaksiyon, ortama asit ilavesi ile sonlandırılmış ve 450 nm dalga boyunda kolorimetrik ölçüm ELISA okuyucuda yapılmıştır.

3.2.10. İstatistiksel Analiz

Western blot analizlerinde, film üzerindeki bantlar, Image Studio 5.2 bilgisayar programı kullanılarak analiz edilmiştir. Dimer bantlarının optik yoğunluğu, monomer bantlarının optik yoğunluğuna oranlanarak dimer/monomer oranı üzerinden analiz gerçekleştirilmiştir. Deney gruplarında belirtilen “n” sayısı her grup için tekrar sayısını göstermektedir. qRT-PCR analizlerinde genlerin mRNA seviyeleri her bir örnek için tespit edilen CT değerleri Aktin (referans gen) ile standardize edilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ matematiksel modeline göre hesaplanmıştır [$\Delta Ct = (CT \text{ ilgili gen} - CT \text{ referans gen})$]. İstatistiksel analiz, ΔCt değerleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. ELISA ölçümlerinde, hücre süpernatantlarındaki IL-1 β , IL-18 ve TNF- α konsantrasyonları standartlar için elde edilen kalibrasyon eğri denkleminde elde edilerek normalize edilmiştir. Tüm sonuçlar “ortalama $\pm$ SEM” şeklinde verilmiştir. Deney sonuçlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Shapiro-Wilk testi ile verilerin normal dağılım gösterip göstermediğine bakılmıştır. Normal dağılımın gösterildiği durumlarda grupların ortalamalarının kıyaslanması için tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA), F testi

ve sonrasında Bonferroni'nin çoklu karşılaştırmalar testi kullanılmıştır. p değeri 0,05'ten küçük olan karşılaştırmalar anlamlı kabul edilmiştir. Analizlerde GraphPad (Prism) 5.0 programı kullanılmıştır.



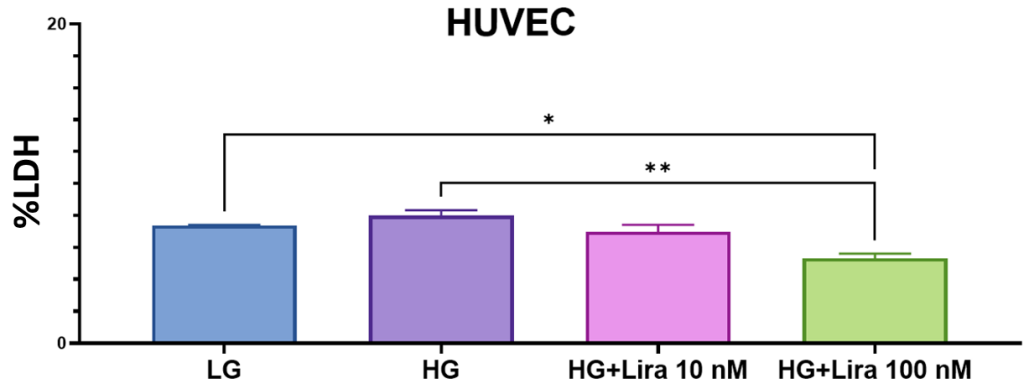
4. BULGULAR

4.1. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde LDH Seviyeleri Üzerine Etkileri

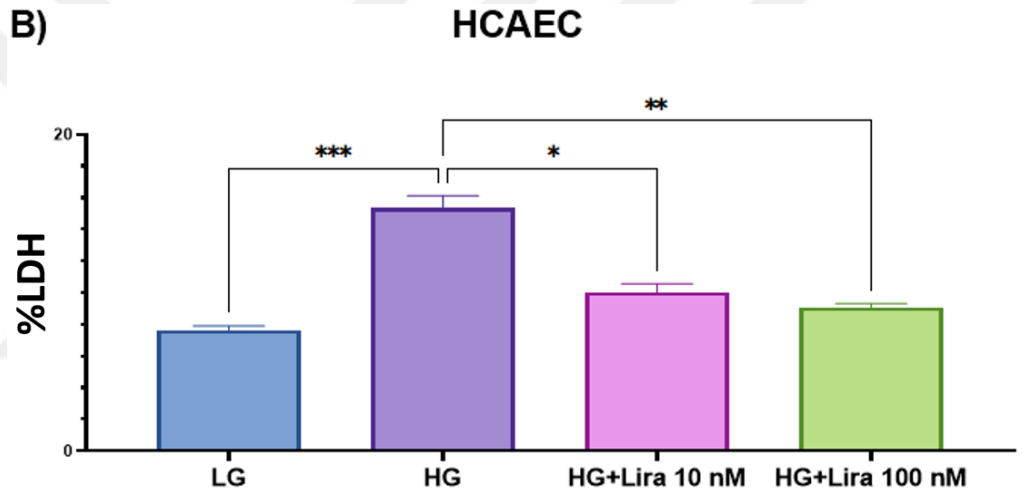
Çalışmada ekstraselüler LDH ölçümü için CyQUANT LDH Sitotoksosite Ölçümü deney kiti kullanılmıştır. Hiperglisemik ortam, normoglisemik ortama kıyasla HUVEC hücrelerinde LDH seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. Hiperglisemik koşullarda 10 nM Liraglutid uygulaması LDH seviyelerinde bir değişikliğe neden olmazken, 100 nM Liraglutid LDH seviyelerinde %38'lik ($p<0,01$) bir azalmaya neden olmuştur. Aynı zamanda 100 nM Liraglutid konsantrasyonunun normoglisemik ortama kıyasla LDH seviyelerini azalttığı gösterilmiştir ($p<0,05$) (Şekil 4-1 A).

Öte yandan, hiperglisemik ortam HCAEC hücrelerinde LDH seviyelerinde anlamlı bir artışa neden olmuştur ($p<0,001$). 10 nM ve 100 nM Liraglutid, LDH seviyelerinde sırasıyla %42 ($p<0,05$) ve %55'lik ($p<0,01$) konsantrasyon bağımlı bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4-1 B).

A)



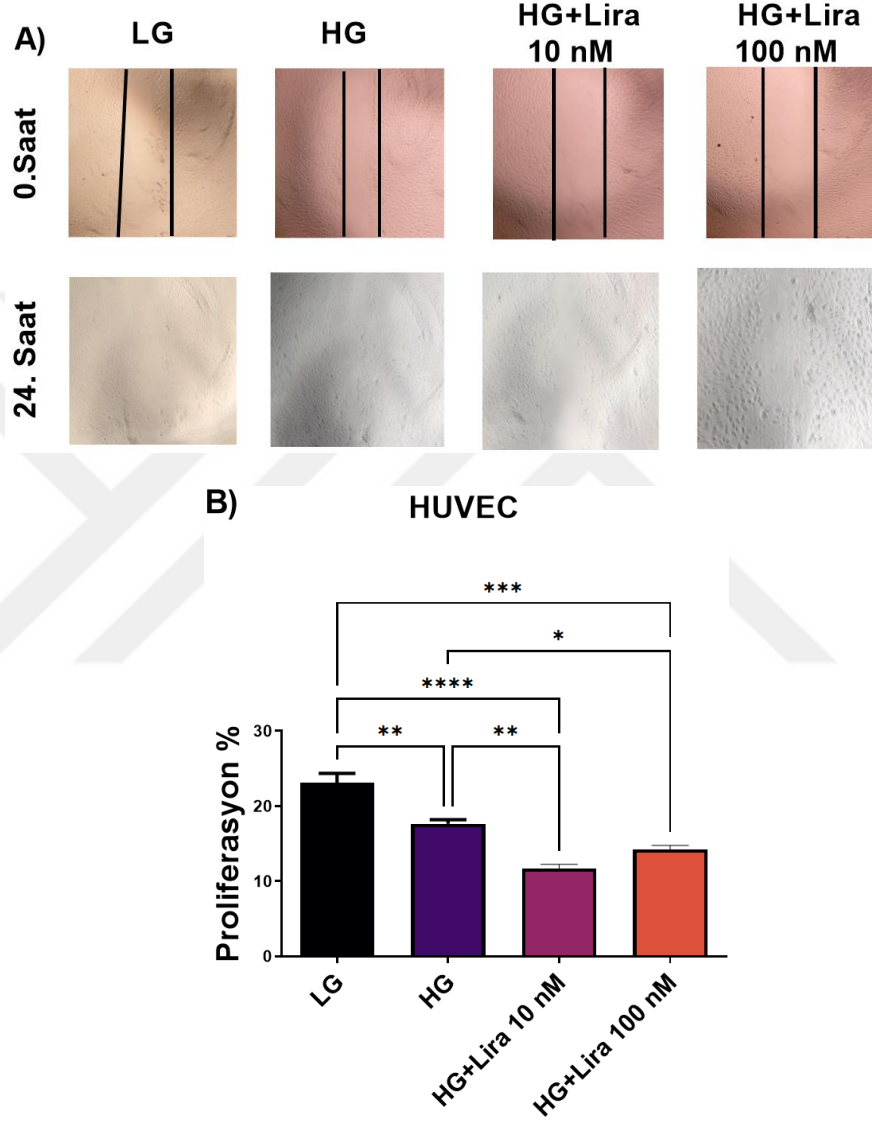
B)



Şekil 4-1: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücrelerinde LDH seviyeleri üzerine etkileri (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p < 0,05$ ve ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.2. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Proliferasyon Üzerine Etkileri

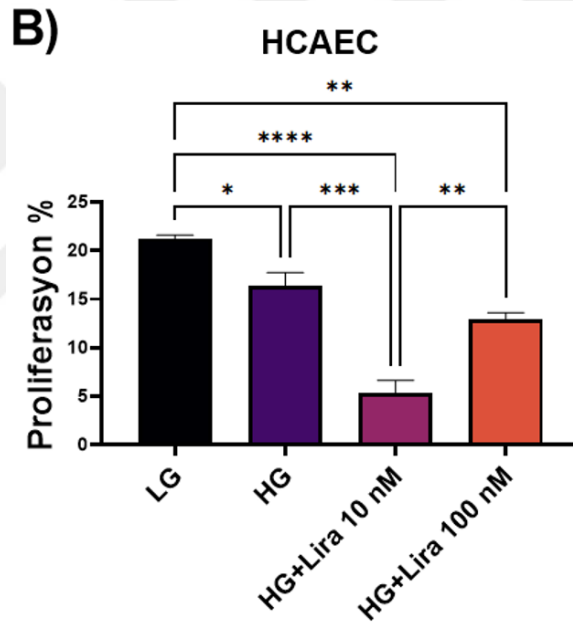
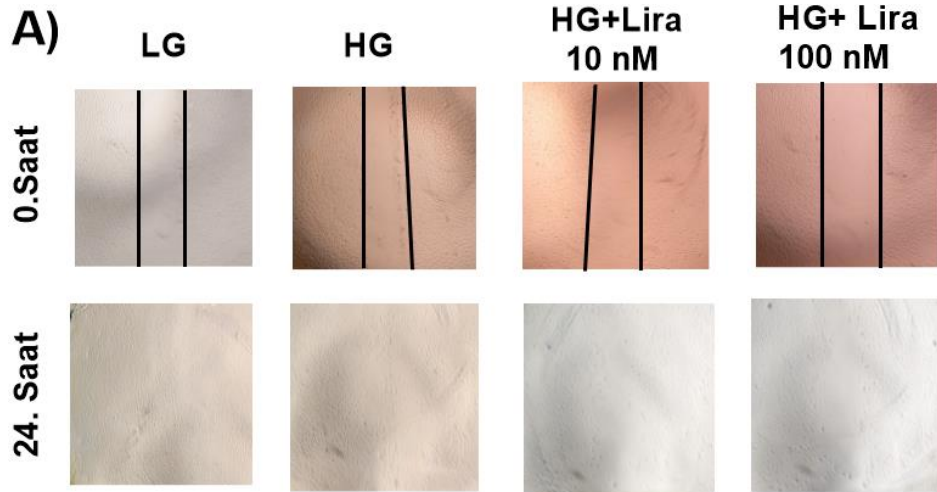
HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın hücre proliferasyonu azalttığı ($p<0,05$), 10 nM Liraglutid inkübasyonunun hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortama kıyasla bu azalmayı şiddetlendirdiği ($p<0,05$) gösterilmiştir (Şekil 4-2 B).



Şekil 4-2: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde proliferasyon üzerine etkilerinin ışık mikroskopu ile incelenmesi (A) ve analiz sonuçları (B) (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

HCAEC hücrelerinde de hiperglisemik ortamın hücre proliferasyonu azalttığı ($p<0,05$), 10 nM Liraglutid inkübasyonunun hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortama kıyasla bu azalmayı şiddetlendirdiği ($p<0,05$) gösterilmiştir. 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise normoglisemik ortama kıyasla hücre proliferasyonunu %8 ($p<0,01$) oranında azalttığı bulunmuştur (Şekil 4-3 B)



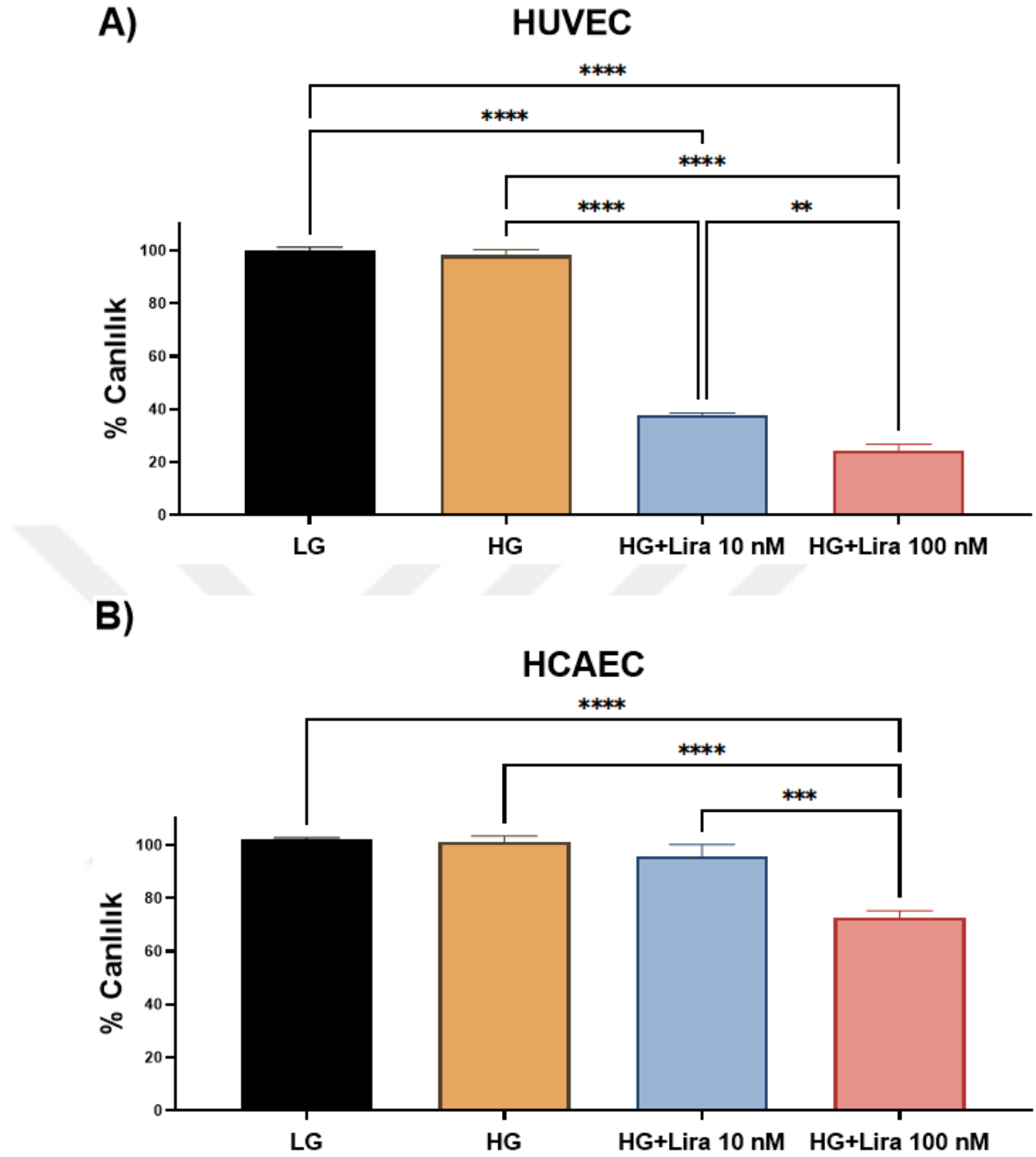


Şekil 4-3: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde proliferasyon üzerine etkilerinin ışık mikroskobu ile incelenmesi (A) ve analiz sonuçları (B) (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.3. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücre Canlılığı Üzerine Etkileri

Liraglutid'in hiperglisemik ven (HUVEC) ve arter (HCAEC) hücrelerinde hücre canlılığı üzerinde meydana getirdiği değişiklikler Şekil 4-1'de gösterilmiştir. Buna göre hiperglisemik ortam, normoglisemik ortama kıyasla HUVEC hücre canlılığında anlamlı bir değişikliğe sebep olmamıştır. 10 nM ve 100 nM Liraglutid hücre canlılığında sırasıyla %62 ($p<0,0001$) ve %75'lik ($p<0,0001$) konsantrasyon bağımlı bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4-4 A).

Benzer şekilde HCAEC'de de hiperglisemik ortam normoglisemik ortama kıyasla hücre canlılığında anlamlı bir değişime sebep olmamıştır. 10 nM Liraglutid uygulaması hücre canlılığı üzerinde bir değişikliğe neden olmazken, 100 nM Liraglutid hücre canlılığında %29'lik ($p<0,0001$) bir azalmaya neden olmuştur (Şekil 4-4 B).

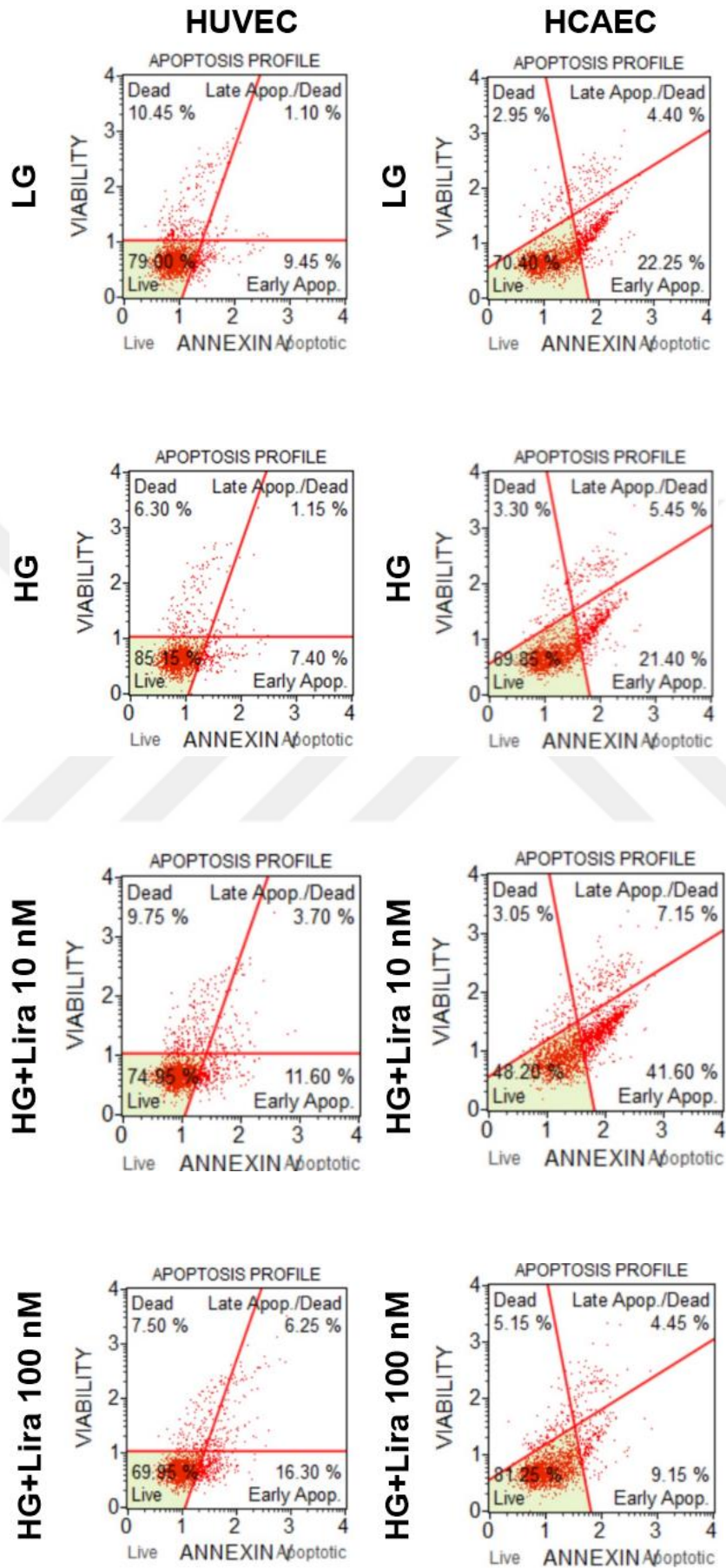


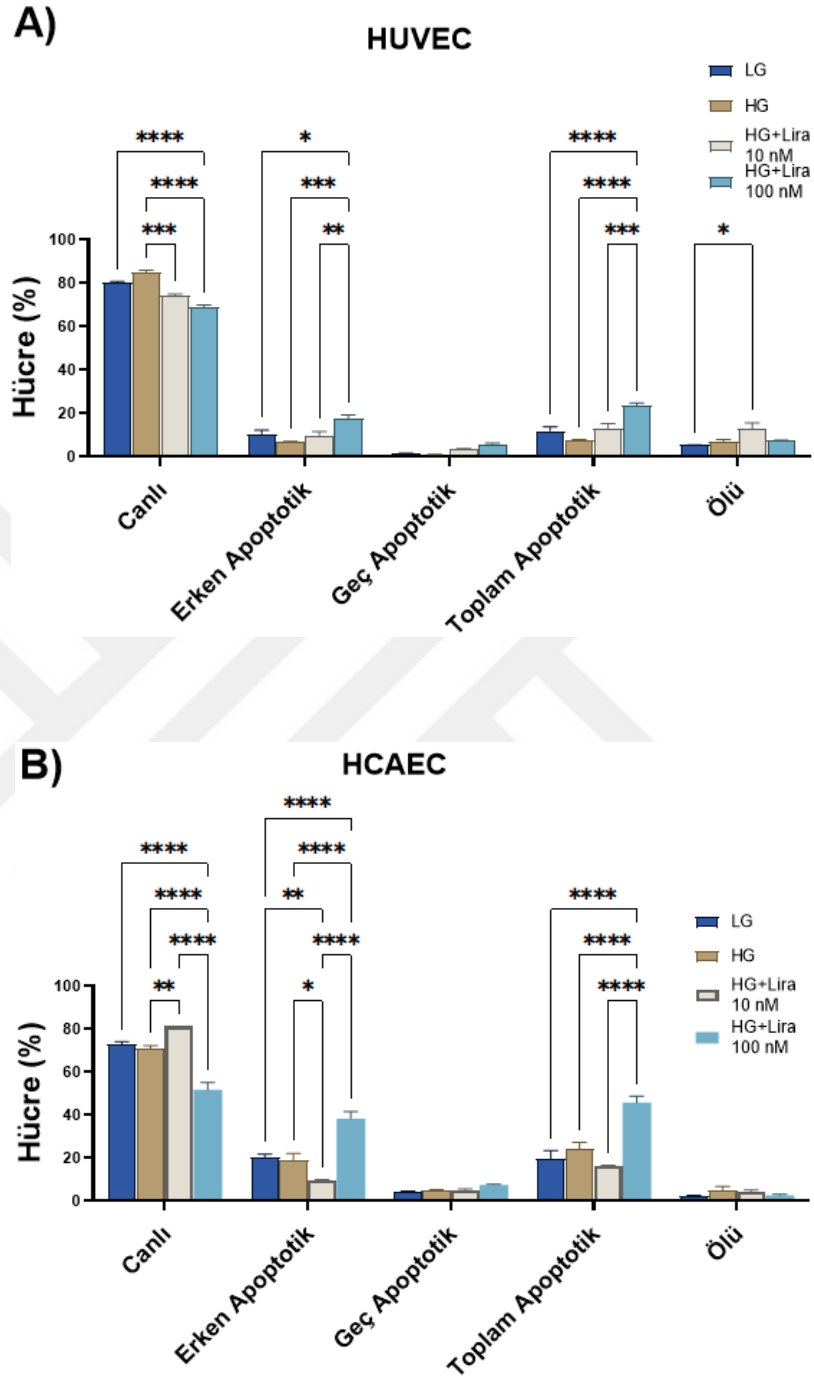
Şekil 4-4: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücre canlılığı üzerine Etkileri (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.4. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Apoptoz Üzerine Etkileri

HUVEC ve HCAEC'lerin apoptoz profilleri Muse™ Annexin V ve Ölü Hücre Kiti kullanılarak akış sitometrisi ile incelenmiştir (Şekil 4-6). Hiperglisemik ortam HUVEC hücrelerinde canlı hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 nM ve 100 nM Liraglutid inkübasyonunun canlı hücre oranını sırasıyla ile %10 ve %16 azalttığı bulunmuştur ($p<0,0001$ ve $p<0,0001$). 100 nM Liraglutid inkübasyonunun canlı hücre oranını normoglisemik ortama göre %11 oranında azalttığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Hiperglisemik ortam HUVEC hücrelerinde erken apoptotik hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. 100 nM Liraglutid erken apoptotik hücre oranında %11 azalmaya neden olmuştur ($p<0,0001$). 100 nM Liraglutid inkübasyonunun canlı hücre oranını normoglisemik ortama göre %7 oranında artırdığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması geç apoptotik hücre oranında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Hiperglisemik ortam HUVEC hücrelerinde toplam apoptotik hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Öte yandan, 100 nM Liraglutid uygulamasının toplam apoptotik hücre oranını %16 artırdığı bulunmuştur ($p<0,0001$). Hiperglisemik ortam HUVEC hücrelerinde ölü hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Öte yandan, 10 nM Liraglutid uygulamasının toplam apoptotik hücre oranını %7 artırdığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4-5 A).

Hiperglisemik ortam HCAEC hücrelerinde canlı hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 nM Liraglutid inkübasyonunun canlı hücre oranını %10 artırdığı ($p<0,01$), 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise canlı hücre oranını %19 azalttığı ($p<0,0001$) gözlenmiştir. Hiperglisemik ortam HCAEC hücrelerinde erken apoptotik hücre oranı üzerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 nM Liraglutid inkübasyonunun erken apoptotik hücre oranını %9 azalttığı ($p<0,01$), 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise %19 artırdığı gösterilmiştir ($p<0,0001$). Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması HCAEC hücrelerinde geç apoptotik hücre oranında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Benzer şekilde hiperglisemik ortam HCAEC hücrelerinde ölü hücre oranı üzerinde de bir değişikliğe neden olmamıştır. Öte yandan, 10 nM Liraglutid inkübasyonunun toplam apoptotik hücre oranını %8 azalttığı ($p<0,05$), 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise toplam apoptotik hücreleri oranını %26 artırdığı gözlenmiştir (Şekil 4-5 B).

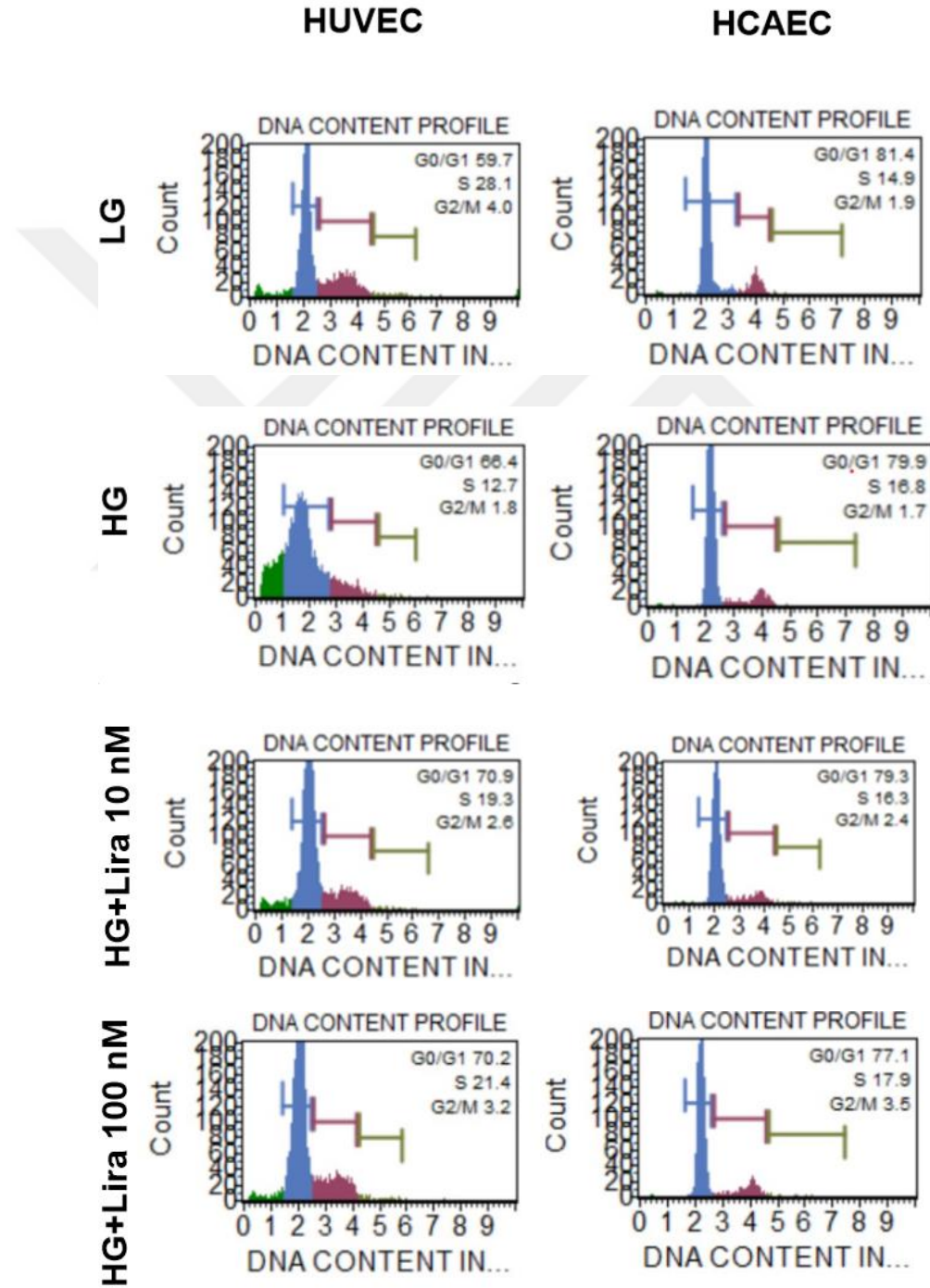


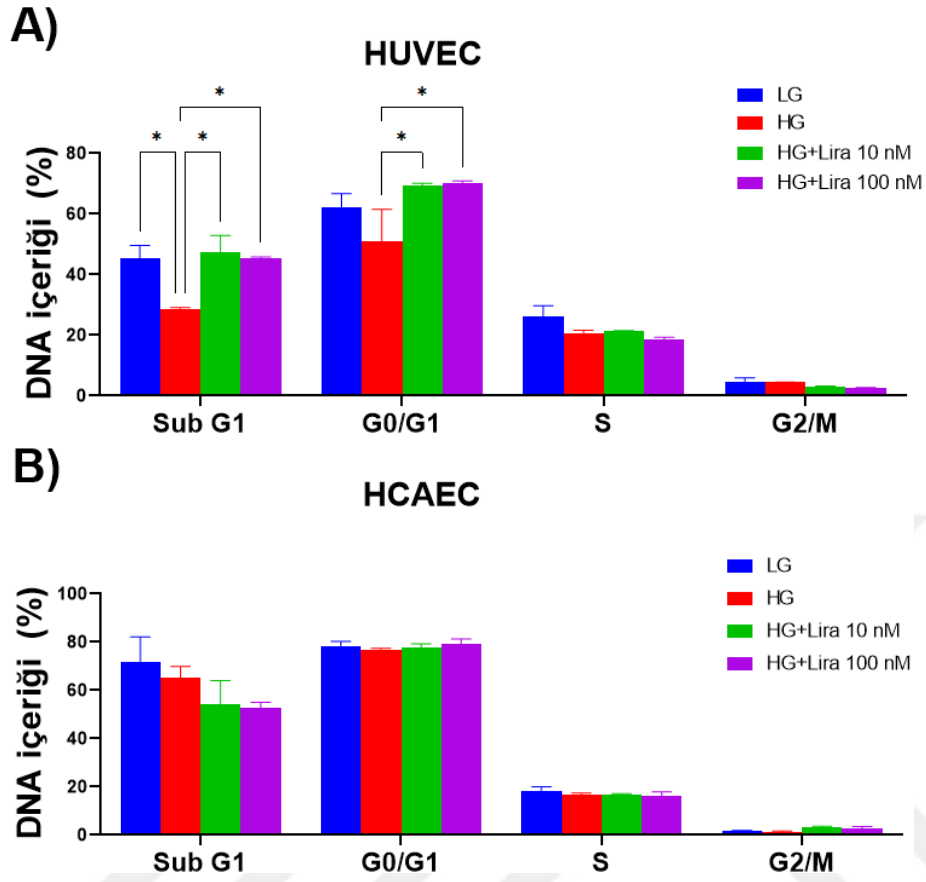


Şekil 4-5: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) hücrelerinde apoptoz üzerine etkileri ve analiz sonuçları (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.5. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri

Şekil 4-6'da Muse™ Hücre Analizörü ile yapılan hücre döngüsü sonuçları verilmiştir.



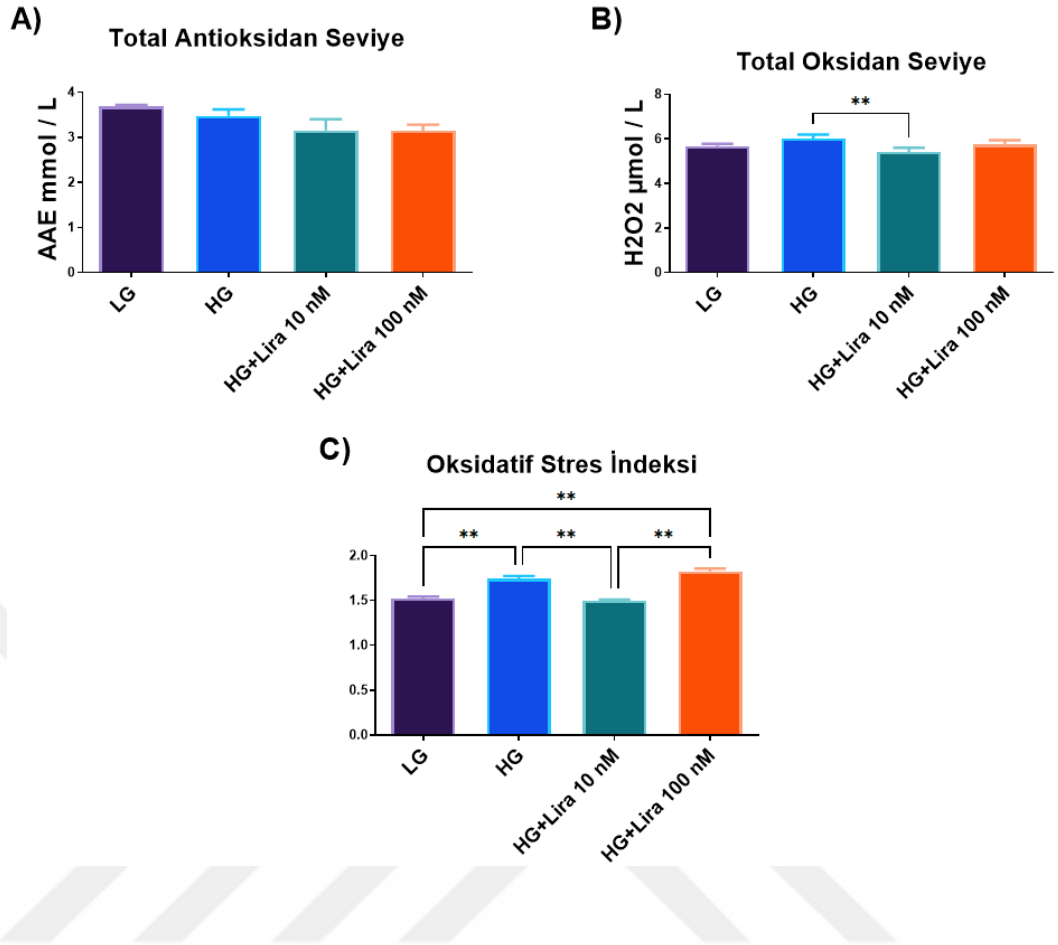


Şekil 4-6: Liraglutid’in normoglisemik ve hiperglisemik Koşullarda HUVEC (A) ve HCAEC (B) Hücre Döngüsü Üzerine Etkileri ve Analiz Sonuçları (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 Nm Liraglutid). * $p < 0,05$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın normoglisemik ortama göre Sub G1 evresindeki hücre sayısını azalttığı ($p<0,05$), 10 nM ($p<0,01$) ve 100 nM ($p<0,05$) Liraglutid konsantrasyonlarının ise hiperglisemi ile azalan Sub G1 evresindeki hücre sayısını normal düzeylere döndürdüğü gözlenmiştir. Hiperglisemik ortam G0/G1 evresindeki hücre sayısında normoglisemik ortama göre bir farklılığa neden olmamıştır. 10 nM ve 100 nM Liraglutid inkübasyonları hiperglisemik ortama kıyasla G0/G1 evresindeki hücre sayısında bir artışa neden olmuştur (sırasıyla $p<0,01$ ve $p<0,01$). Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması S ve G2/M evresindeki hücre sayısında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4-6 A). HCAEC hücrelerinde hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması hiçbir evrede hücre sayısında herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4-6 B).

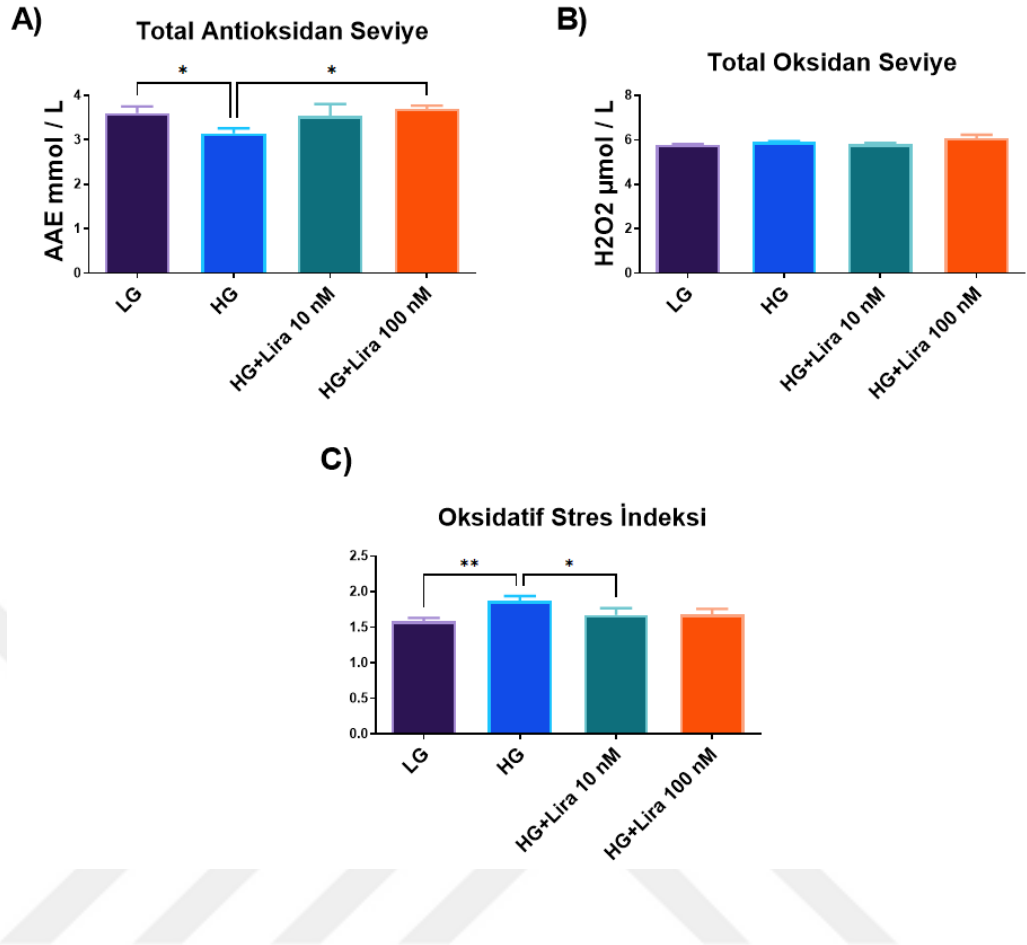
4.6. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde TAS, TOS ve OSI Seviyelerine Etkileri

HUVEC'de hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid inkübasyonu TAS seviyelerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Hiperglisemik ortamın TOS seviyelerinde de bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. 10 nM Liraglutid'in ise TOS seviyesini azalttığı gözlenmiştir ($p<0,01$). Hiperglisemik ortamın OSI seviyelerini artırdığı ($p<0,01$), benzer şekilde Liraglutid inkübasyonu da konsantrasyon bağımlı olarak OSI seviyelerinde bir artışa neden olduğu gözlenmiştir ($p<0,01$). 100 nM Liraglutid inkübasyonunun normoglisemik ortama göre OSI seviyelerini artırdığı gözlenmiştir ($p<0,01$) (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) seviyelerine etkileri (n=5). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). **p<0,01, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

HCAEC'de hiperglisemik ortamın TAS seviyelerini azalttığı (p<0,05), 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise TAS seviyelerini artırdığı gözlenmiştir (p<0,05). Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid inkübasyonu TOS seviyelerinde bir değişikliğe neden olmamıştır. Hiperglisemik ortamın OSI seviyelerini artırdığı (p<0,01), 10 nM Liraglutid'in ise hiperglisemi ile artan OSI seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (p<0,01) (Şekil 4-8).

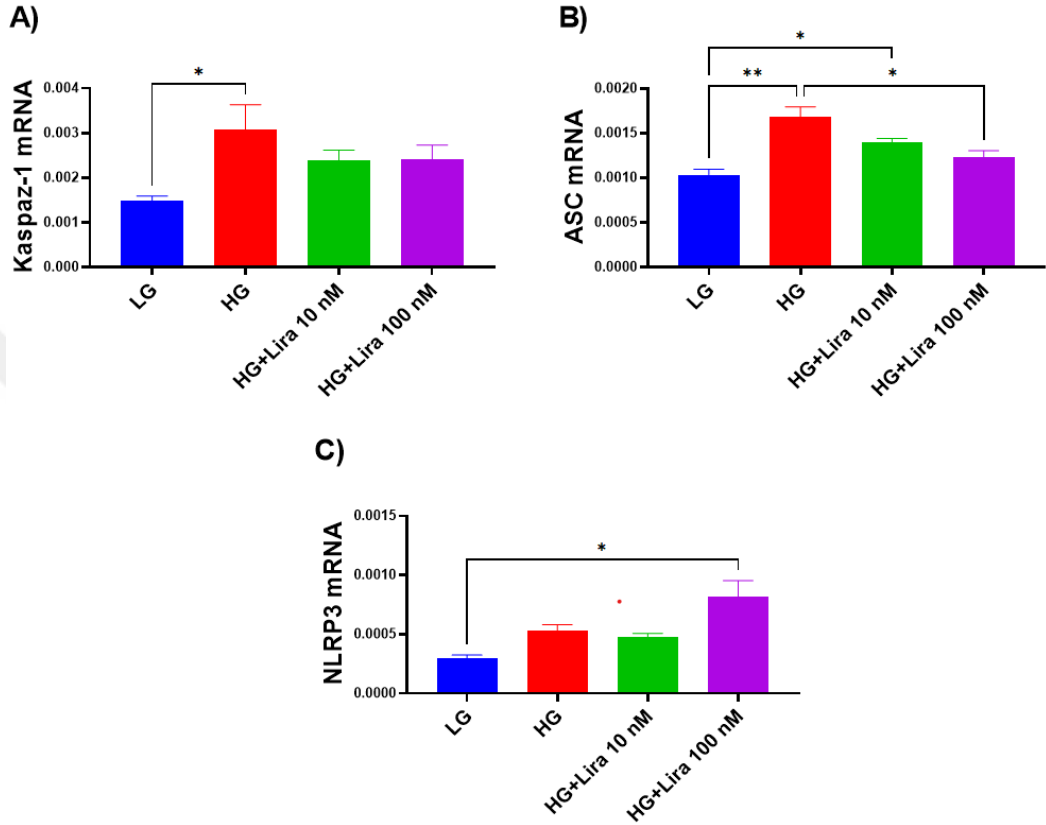


Şekil 4-8: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde TAS (A), TOS (B) ve OSI (C) seviyelerine etkileri (n=5). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). *p<0,05, **p<0,01, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.7. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Kaspaz-1, ASC, NLRP3 ve eNOS mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri

HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın Kaspaz-1 mRNA ekspresyonunu artırdığı (p<0,05) gözlenmiştir. Liraglutid inkübasyonunun ise Kaspaz-1 mRNA ekspresyonu üzerinde bir etkisi bulunmamıştır. Hiperglisemik ortamın ASC mRNA ekspresyonunu artırdığı (p<0,01) 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise bu artışı azalttığı (p<0,05) gözlenmiştir. 10 nM Liraglutid inkübasyonunun ise ASC mRNA ekspresyonunu normoglisemik ortama kıyasla azalttığı bulunmuştur (p<0,05).

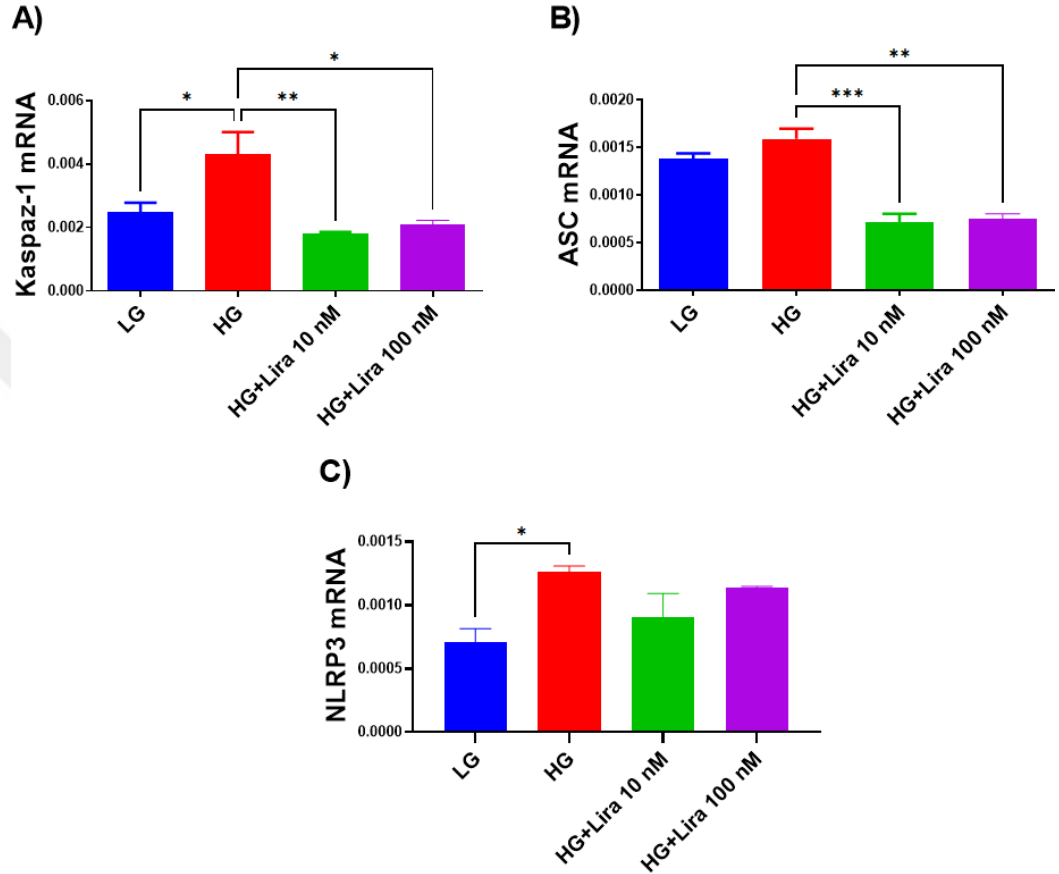
Hiperglisemik ortam NLRP3 mRNA ekspresyonu düzeyinde bir değişikliğe neden olmazken, 100 nM Liraglutid inkübasyonunun ise NLRP3 mRNA ekspresyonunu artırdığı bulunmuştur ($p<0,05$) (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: Liraglutid’in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC Hücrelerinde Kaspaz-1 (A), ASC (B), NLRP3 (C) mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$ ve ** $p<0,01$, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

HCAEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın Kaspaz-1 mRNA ekspresyonunu artırdığı ($p<0,05$) gözlenmiştir. 10 nM ($p<0,01$) ve 100 nM ($p<0,05$) Liraglutid inkübasyonunun ise hiperglisemi ile artan Kaspaz-1 mRNA ekspresyonu seviyelerini normal düzeylere döndürdüğü gözlenmiştir. Hiperglisemik ortam ASC mRNA ekspresyonunda bir değişikliğe neden olmamıştır. 10 nM ($p<0,001$) ve 100 nM ($p<0,001$)

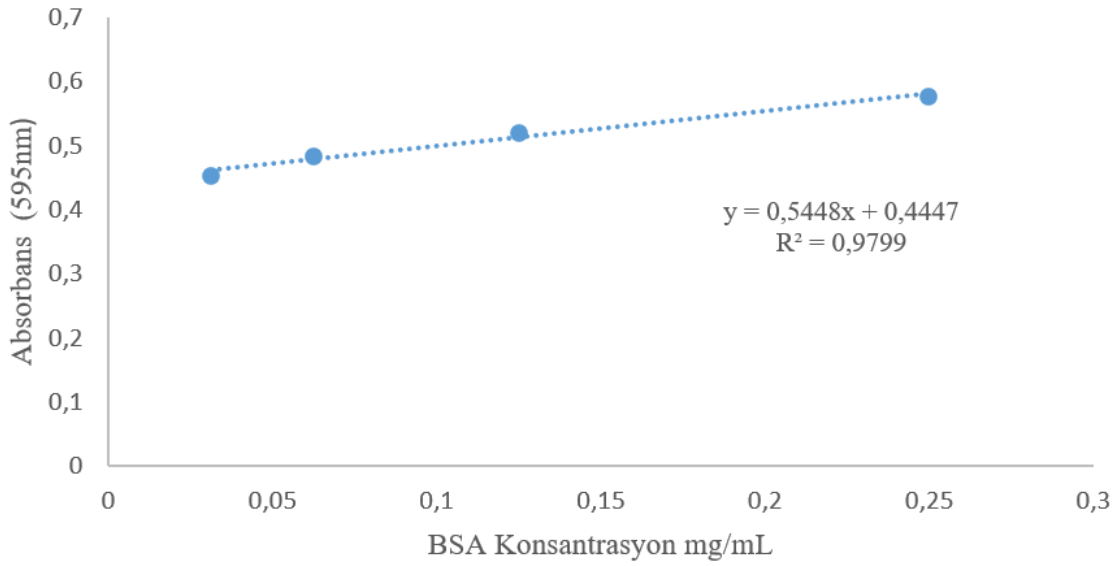
Liraglutid inkübasyonunun ise ASC mRNA ekspresyonunu azalttığı gözlenmiştir. Hiperglisemik ortam NLRP3 mRNA ekspresyonunu artırırken ($p<0,05$). Liraglutid inkübasyonunun bu artış üzerinde herhangi bir etkisi bulunmamıştır. (Şekil 4-10).



Şekil 4-10: Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HCAEC Hücrelerinde Kaspaz-1 (A), ASC (B), NLRP3 (C) mRNA Ekspresyonları Üzerine Etkileri (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$ çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

4.8. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde ASC, NLRP3 ve eNOS Protein Ekspresyonları Üzerine Etkileri

Protein ekspresyon analizine geçmeden önce, hazırlanan hücre lizatlarının protein miktarları standart BSA çözeltileri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon eğrisi ile hesaplanmıştır. Hazırlanan ölçü eğrisi ve denklemi Şekil 4-11'de verilmiştir. Eğri denkleminde örnek gruplarındaki protein miktarları hesaplanmıştır.

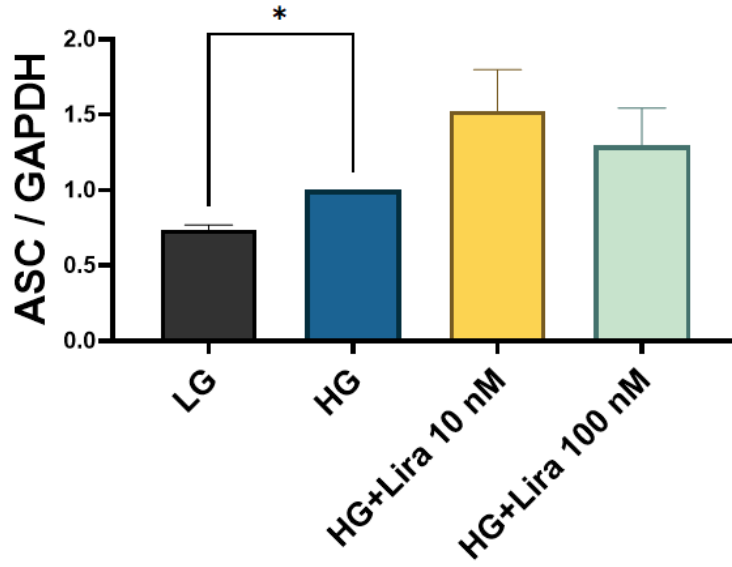


Şekil 4-11: Protein standart ölçü eğrisi

HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın ASC protein ekspresyonunu artırdığı ($p < 0,05$) gösterilmiştir. Liraglutid (10 nM ve 100 nM) inkübasyonunun ise ASC protein ekspresyonuna bir etkisi bulunmamıştır (Şekil 4-12 A).

A)

ASC



B)

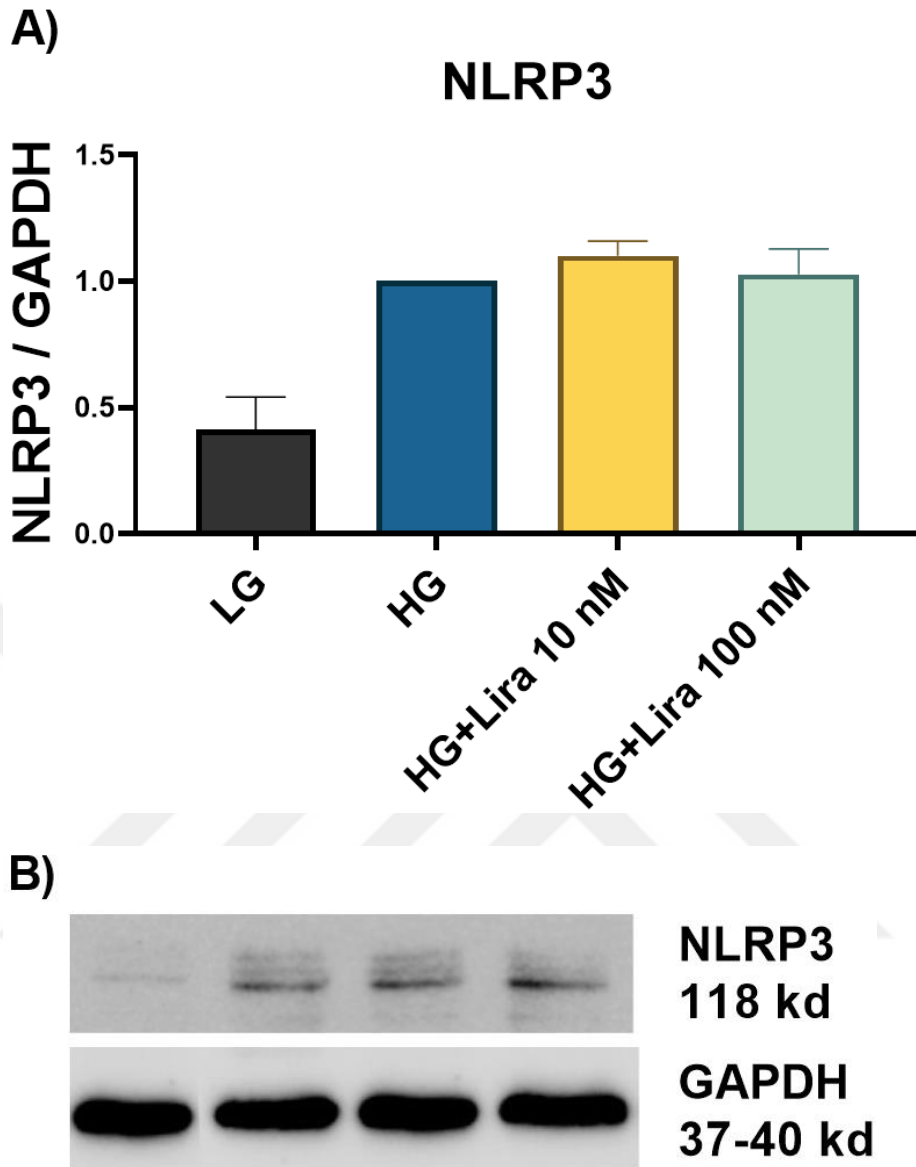


ASC
18-22 kd

GAPDH
37-40 kd

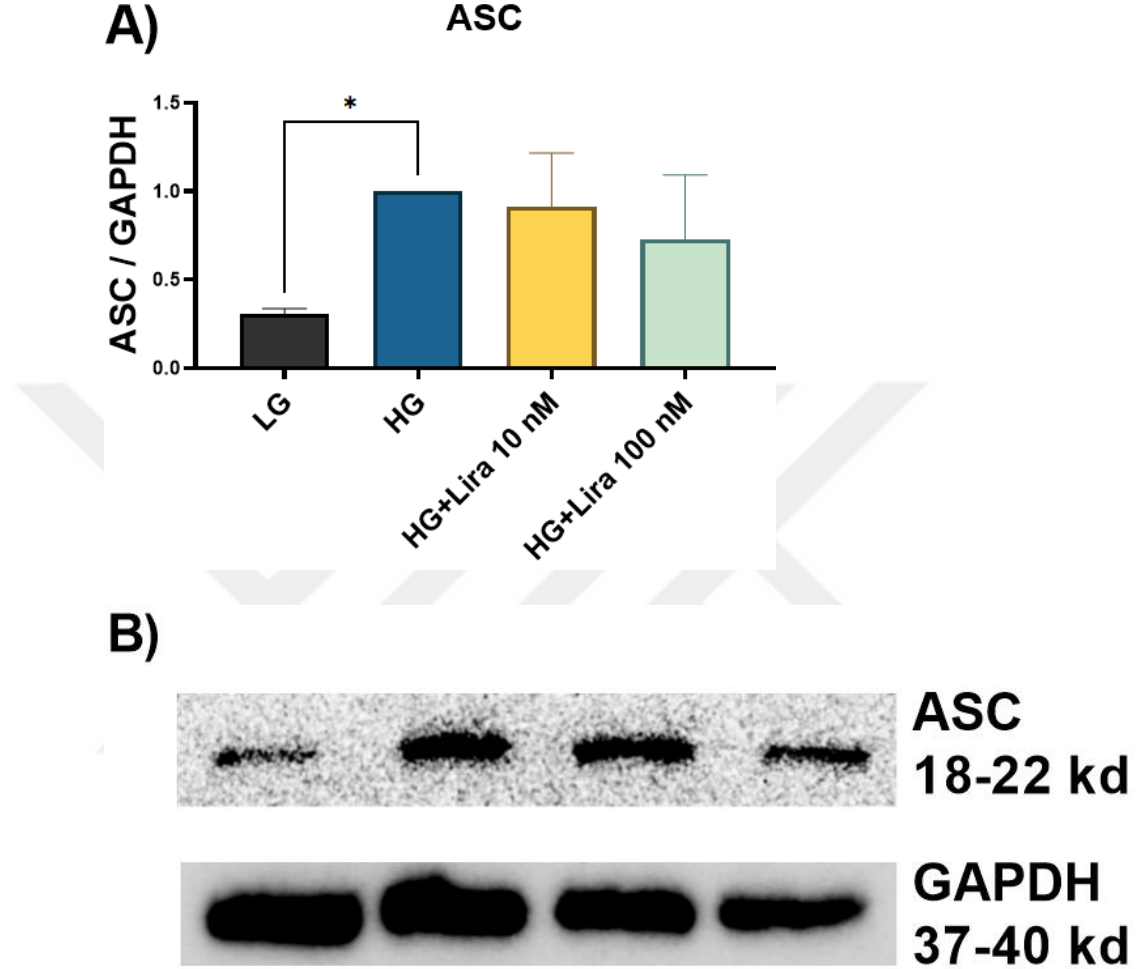
Şekil 4-12: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde ASC protein ekspresyonları üzerine etkileri (n=3). Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği (A) ve Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak GAPDH'in örnek western blot görüntüsü (B). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). *p<0,05, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması (10 nM ve 100 nM) NLRP3 protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4-13 A).



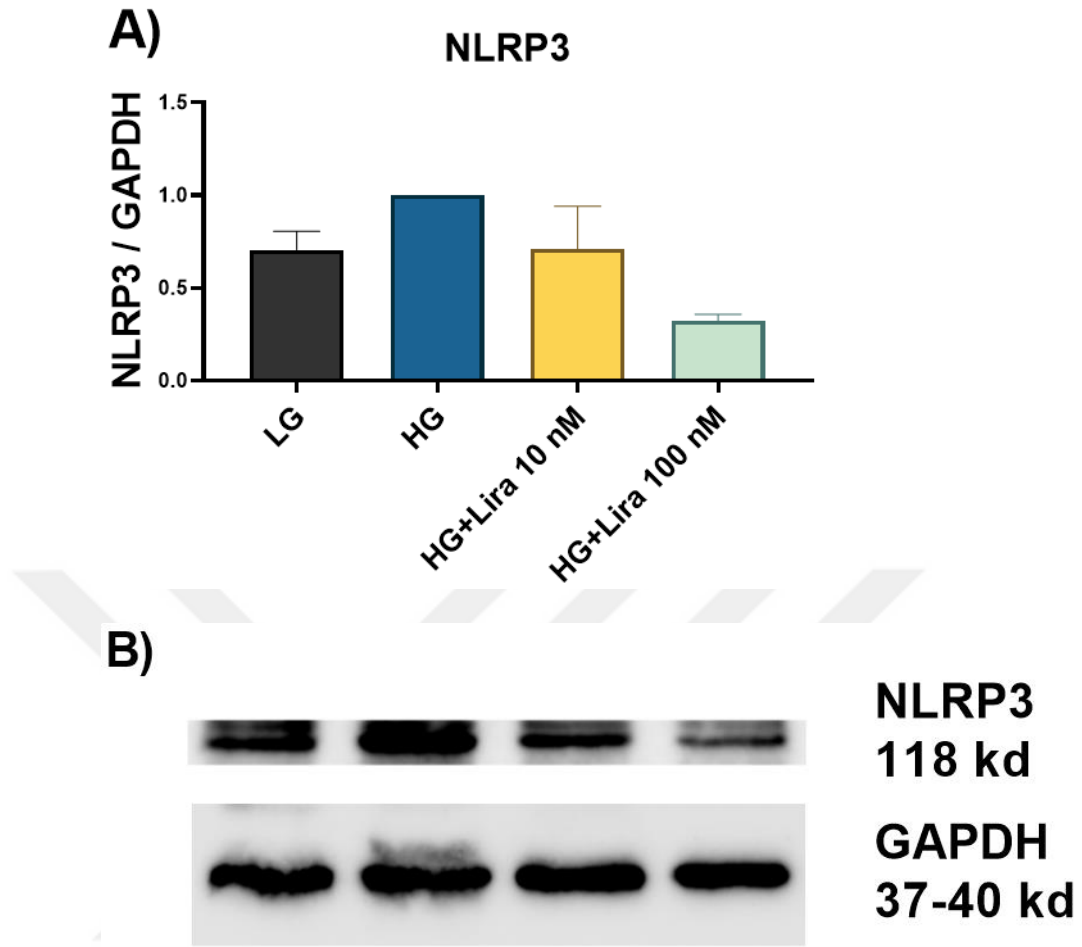
Şekil 4-13: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde NLRP3 protein ekspresyonları üzerine etkileri (n=3). Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği (A) ve Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak GAPDH'in örnek western blot görüntüsü (B). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid).

HCAEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın ASC protein ekspresyonunu artırdığı ($p<0,05$) gösterilmiştir. Liraglutid inkübasyonunun ise ASC protein ekspresyonu üzerinde bir etkisi bulunamamıştır (Şekil 4-14 A).



Şekil 4-14: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde ASC protein ekspresyonları üzerine etkileri (n=3). Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği (A) ve Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak GAPDH'in örnek western blot görüntüsü (B). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

Hiperglisemik ortam ve/veya Liraglutid uygulaması NLRP3 protein ekspresyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır (Şekil 4-15 A).



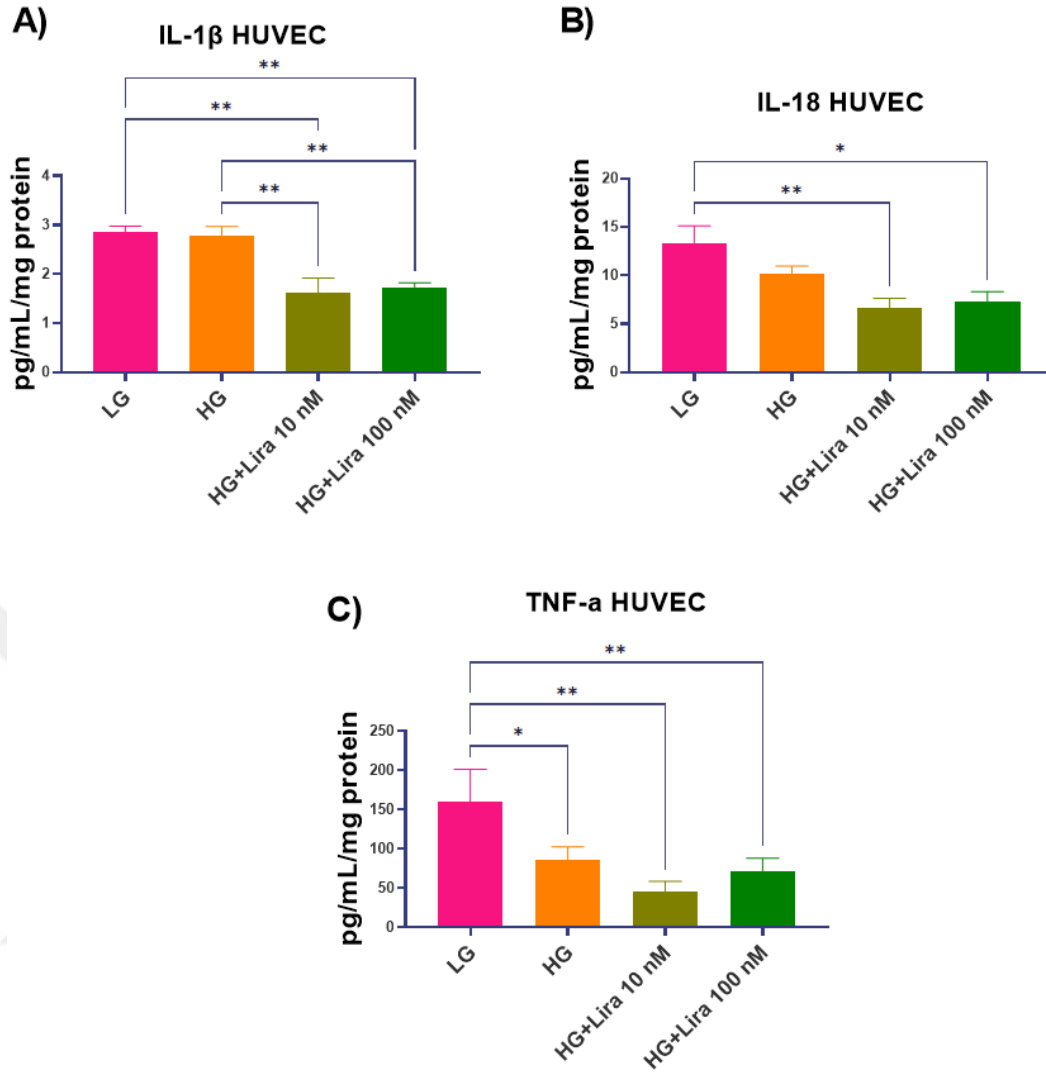
Şekil 4-15: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde NLRP3 protein ekspresyonları üzerine etkileri (n=3). Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin kontrole göre bar değişim grafiği (A) ve Liraglutid uygulaması sonrası proteinlerin ve yükleme kontrolü olarak GAPDH'in örnek western blot görüntüsü (B). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid).

4.9. Liraglutid'in Normoglisemik ve Hiperglisemik Koşullarda HUVEC ve HCAEC Hücrelerinde Hücre içi IL-1 β , IL-18 ve TNF- α Seviyelerine Olan Etkisi

HUVEC'de hiperglisemik ortamın IL-1 β seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. 10 nM ($p<0,001$) ve 100 nM ($p<0,001$) Liraglutid inkübasyonunun ise hiperglisemik ve normoglisemik ortama kıyasla IL-1 β seviyelerini

azalttığı gözlenmiştir. Hiperglisemik ortamın IL-18 seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. 10 nM ($p<0,01$) ve 100 nM ($p<0,05$) Liraglutid inkübasyonunun normoglisemik ortama kıyasla IL-18 seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Hiperglisemik ortamın TNF- α seviyelerini azalttığı ($p<0,05$) gözlenirken, 10 nM ($p<0,01$) ve 100 nM ($p<0,01$) Liraglutid inkübasyonunun normoglisemik ortama kıyasla TNF- α seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4-16).

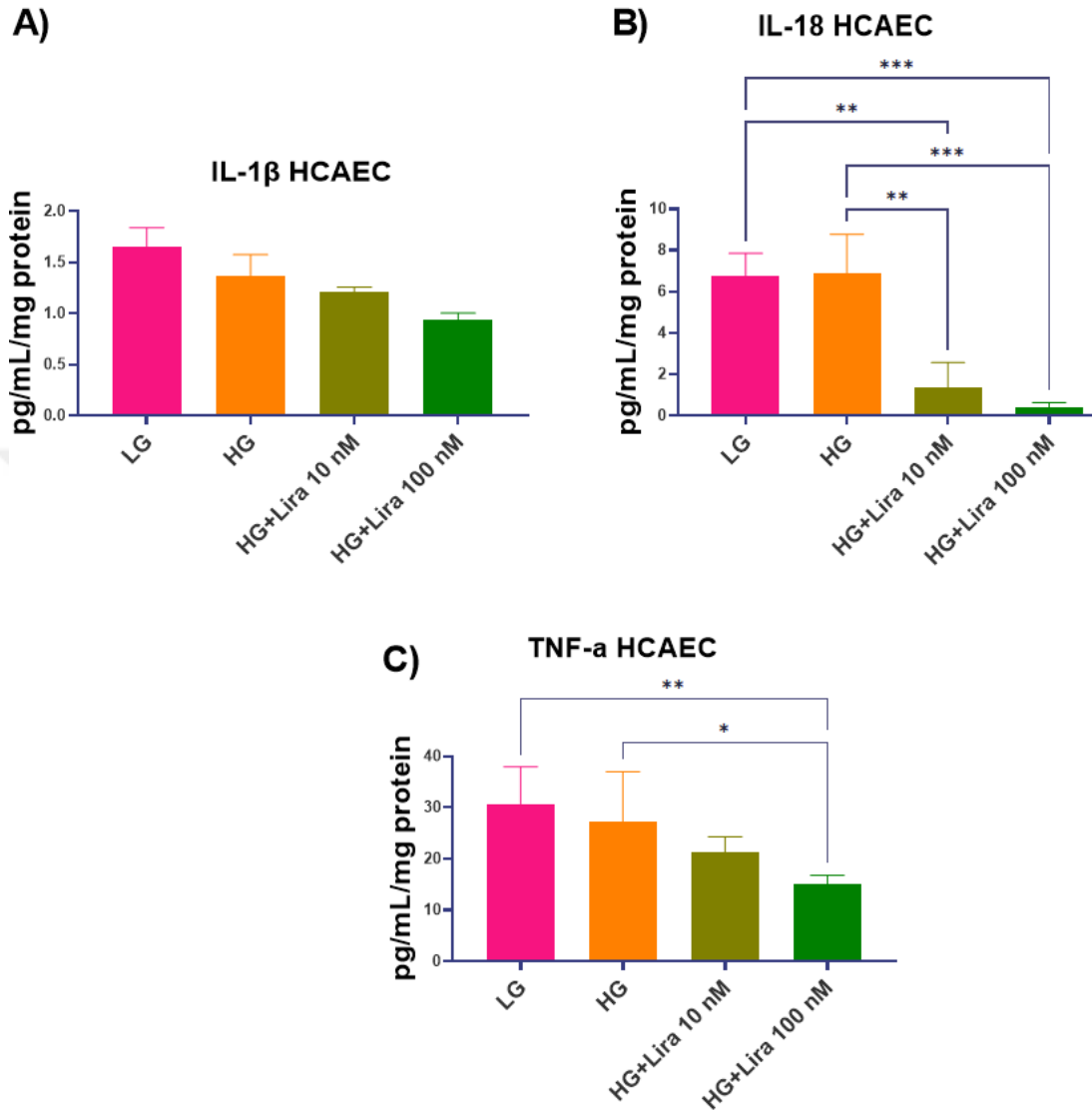




Şekil 4-16: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HUVEC hücrelerinde hücre içi IL-1 β (A), IL-18 (B) ve TNF- α (C) seviyelerine olan etkisi (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). *p<0,05, **p<0,01, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

HCAEC'de hiperglisemik ortamın ve/veya Liraglutid'in IL-1 β seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Hiperglisemik ortamın IL-18 seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı gözlenirken, öte yandan 10 nM (p<0,01) ve 100 nM (p<0,05) Liraglutid inkübasyonunun ise hiperglisemik ve normoglisemik ortama göre IL-18 seviyelerini azalttığı bulunmuştur. Hiperglisemik ortamın TNF- α seviyelerinde bir değişikliğe neden olmadığı, 100 nM (p<0,01) Liraglutid inkübasyonunun normoglisemik

($p<0,01$) ve hiperglisemik ($p<0,05$) ortama kıyasla TNF- α seviyelerini azalttığı gözlenmiştir (Şekil 4-17).



Şekil 4-17: Liraglutid'in normoglisemik ve hiperglisemik koşullarda HCAEC hücrelerinde hücre içi IL-1 β (A), IL-18 (B) ve TNF- α (C) seviyelerine olan etkisi (n=3). LG (Normoglisemik ortam), HG (Hiperglisemik ortam), HG+Lira 10 nM (Hiperglisemik ortam+10 nM Liraglutid), HG+Lira 100 nM (Hiperglisemik ortam+100 nM Liraglutid). * $p<0,05$, ** $p<0,01$, * $p<0,001$, çoklu kıyaslamalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.**

4.10. Sonuçlar Tablosu

Deney boyunca elde edilen veriler tablo 4-1'de özetlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Hiperglisemi, diyabetin aracılık ettiği vasküler komplikasyonların gelişmesinin ana nedenlerinden biridir. Yüksek glukoz, koroner kalp hastalığı, ateroskleroz ve restenoz dahil olmak üzere birçok kardiyovasküler hastalığın patolojik gelişimi ile ilişkilendirilmiştir [171]. Uzun süreli yüksek glukoz maruziyeti, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların erken bir sonucu olan endotel disfonksiyonuna sebep olmaktadır. Hiperglisemi sonucu hasar gören endotel dokuyu iyileştirme, T2DM hastalarında görülen kardiyovasküler patolojilerin tedavisi için önemli bir strateji haline gelmiştir [172]. T2DM yönetimi, hasta eğitimi, yaşam tarzı değişikliklerini ve akılcı farmakoterapi yaklaşımlarını bir araya getirerek kan glukozu düzeylerini stabilize etmeyi, diyabet ile ilişkili komplikasyonların izlemine içermektedir. Bu yaklaşımlara rağmen, birçok hastada ciddi komplikasyonlar gelişmekte, bu da hem diyabetik bireyler hem de sağlık sistemi üzerinde büyük bir yüke neden olmaktadır [173]. Mevcut bilimsel araştırmaların odak noktası T2DM'nin vasküler komplikasyonlarının altında yatan karmaşık moleküler mekanizmaların aydınlatılmasıdır. T2DM'de vasküler komplikasyonların patogenezi tam olarak anlaşılamamıştır, ancak bu, hiperlipidemi ve glukotoksositeye bağlı olarak oluşan toksik etkilerle yakından ilişkili gibi görünmektedir. Hipergliseminin, mitokondriyal disfonksiyon ve artan ROS düzeyleri nedeniyle oksidatif strese neden olduğu, makrofajlarda NLRP3 inflamazom aktivasyonuna neden olduğu ve inflamatuvar sitokinlerin salınımını tetiklediği düşünülmektedir [174]. Çalışmamızda insan umbilikal ven endotel hücreleri (HUVEC) ve insan koroner arter endotel hücreleri (HCAEC) kültürlerinde, yüksek glukozla tetiklenen inflamasyon, oksidatif stres ve NLRP3 ile ilişkili sinyal yolları üzerinde GLP-1 reseptör agonisti Liraglutid'in etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir.

Çalışmamızın ilk kısmında hücre hasarının değerlendirilmesi için bir ölçüt olarak, kabul edilen LDH seviyeleri incelenmiştir. HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortamda normoglisemik ortama göre LDH seviyelerinde anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. HCAEC hücrelerinde ise hiperglisemik ortamda normoglisemik ortama göre LDH seviyelerinde artış olduğu, hem düşük (10 nM) hem de yüksek konsantrasyonda (100 nM) Liraglutid uygulamasının artan LDH seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. LDH, tüm hücrelerde bulunan stabil bir sitoplazmik enzimdir. Apoptoz, nekroz ve diğer hücresel hasar biçimlerine maruz kalan hücrelerin plazma zarı hasar gördüğünde, LDH hızla hücre

kültürü süpernatantına salınmaktadır [175]. Doku hasarı, nekroz, hipoksi, hemoliz ve ciddi inflamasyon gibi durumlarda yüksek LDH seviyeleri gözlenir. Domuz aortik endotel hücrelerinin, yedi gün boyunca 30 mM glukoz içeren hiperglisemik ortama maruz kalmasının LDH seviyelerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [176]. Luo ve arkadaşları, HUVEC hücre kültüründe 25 mM glukoz içeren hiperglisemik ortamda artan LDH seviyelerininin GLP-1 reseptör agonisti olan Dulaglutid (50 nM ve 100 nM) inkübasyonu ile (48 saat) azaldığını göstermiştir [40]. Bu bulgulardan farklı olarak çalışmamızda 25 mM glukoz ile sağlanan hiperglisemik ortam, HUVEC hücrelerinde LDH düzeylerinde anlamlı bir artışa neden olmamıştır. Öte yandan, hiperglisemik ortamda 100 nM Liraglutid inkübasyonu LDH seviyelerini hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortama göre azaltmış görünmektedir. Söz konusu etkinin Liraglutid'in bazal LDH düzeylerindeki etkisine bağlı olup olmadığının netleştirilmesi için çalışmaya normoglisemik ortamda Liraglutid etkisini değerlendiren bir deney grubu ilavesi planlanmaktadır. Çalışmamızda, arteriyel endotel hücre kültürü olan HCAEC hücrelerinde, venöz endotel hücre kültürü olan HUVEC hücrelerine göre hiperglisemi kaynaklı hücre hasarının daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Söz konusu bulgumuz literatürde HCAEC hücrelerin hiperglisemi kaynaklı hasara HUVEC hücrelerine göre daha duyarlı olduğunu gösteren çalışma ile paralellik göstermektedir [175].

Çalışmamızda, HUVEC ve HCAEC hücrelerinde hiperglisemik ortamın hücre proliferasyonunu azalttığı, Liraglutid inkübasyonunun hem normoglisemik hem de hiperglisemik ortama kıyasla bu azalmayı şiddetlendirdiği gözlenmiştir. Benzer şekilde, gestasyonel diyabetik kadınlardan izole edilen HUVEC hücrelerinin yedi gün boyunca yüksek glukozla inkübe edilmesi sonrasında, erken hücre hasarının ve proliferasyonun azaldığı gösterilmiştir [177]. HUVEC dışındaki diğer hücre kültürlerinde de (domuz aortik endotel hücre kültürü, fare endotel hücre kültürü) hiperglisemik koşullarda hücre proliferasyonunun azaldığını gösteren çalışmalar mevcuttur [178,179]. HUVEC hücrelerinin hiperglisemik koşullarda (30 mM) 10-12 gün süreyle inkübe edildiği bir çalışmada ise, hücre proliferasyonunda artış olduğu gözlenmiştir [180]. Öte yandan, HUVEC ve HMEC-1 (İnsan mikrovasküler endotel hücreleri) ile yapılan bir çalışmada ise her iki hücre tipinde de hiperglisemik ortamın (25 mM glukoz) normoglisemik (5.5 mM glukoz) ortama göre proliferasyonu değiştirmedeği gösterilmiştir [181]. Sonuç olarak hücre tipine göre, besiyerindeki farklılıklara göre, inkübasyon koşullarına göre ve glukoz ile inkübasyon süresine göre proliferasyon ile ilgili değişiklikler farklılık göstermektedir.

Çalışmamızda Liraglutid'in HUVEC ve HCAEC kültüründe hücre canlılığı üzerindeki etkisini değerlendirmek için MTT testi yapılmıştır. Hiperglisemik ortamın hücre canlılığını her iki hücre tipinde de değiştirmedığı ve Liraglutid'in düşük ve yüksek konsantrasyonlarının (10 nM ve 100 nM) HUVEC hücrelerinde canlılığı azalttığı, HCAEC hücrelerinde ise Liraglutid'in sadece yüksek konsantrasyonunun (100 nM) hücre canlılığını azalttığı gözlenmiştir. Bulgularımız, Liraglutid'in 10 nM konsantrasyonunun normoglisemik koşullarda HUVEC hücre kültüründe hücre canlılığını azalttığını ortaya koyan çalışma ile paralellik göstermektedir [182]. Bir başka çalışmada ise, gestasyonel diyabetik kadınlardan izole edilen HUVEC hücrelerinde sağlıklı gebelerden elde edilen HUVEC hücrelerine kıyasla hücre canlılığı ve proliferasyonunun azaldığı gösterilmiştir [183]. Çalışmamızda, mitokondriyel disfonksiyonun bir göstergesi olan MTT testinde hipergliseminin hücre canlılığına etkisinin bulunmadığı gözlenmiştir. Öte yandan, hücre hasarının bir göstergesi olan LDH seviyelerinin hiperglisemik ortamda arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, plazma membran hasarının mitokondriyal disfonksiyondan önce gelmiş olabileceğini düşündürmektedir. MTT'nin ortaya koyduğu canlılık değerlerindeki azalma, hiperglisemik ortamın ya da Liraglutid'in 'sitotoksik etkisi' olduğuna dair net bir bilgi vermemektedir. Kolorimetrik bir yöntem olan MTT yöntemi ile ölçüm sırasında ilaç uygulanan hücre popülasyonu, kontrol grubuna oranlanarak 'göreceli büyüme inhibisyonu' bilgisini vermektedir. Bu etkinin sitotoksik, sitostatik ya da antiproliferatif bir etki olup olmadığı MTT testinin yanında ek bir test ile doğrulanmalıdır. Bu bağlamda çalışmamızda, LDH testi sonuçları hiperglisemi ile sitotoksik bir etki oluştuğunu, Liraglutid uygulamasının ise bu sitotoksik etkiyi azalttığını göstermiştir. Sonuç olarak, MTT testi ile Liraglutid varlığında hücre canlılığında gözlenen ilave azalma Liraglutid'in antiproliferatif etkisi ile ilişkilendirilebilir. Shadboorestan ve arkadaşları tarafından yürütülen ve Liraglutid'in normoglisemik koşullarda HUVEC hücre kültüründe antiproliferatif etkisi olduğunu gösteren çalışma bulgularımızı destekler niteliktedir [182].

Çalışmamızda, hiperglisemik koşulların ve/veya Liraglutid inkübasyonunun gerek HUVEC gerekse de HCAEC hücrelerinde geç apoptotik süreçler üzerinde anlamlı bir farklılığa yol açmadığı gözlenmiştir. Benzer şekilde, hiperglisemik koşullar HUVEC ve HCAEC hücre kültüründe erken apoptotik süreçler üzerinde de anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Ancak, Liraglutid'in düşük konsantrasyonlarının (10 nM) HCAEC hücre kültüründe erken apoptotik hücre popülasyonunu azalttığı gözlenmiştir. Öte yandan,

Liraglutid'in yüksek konsantrasyonlarının (100 nM) ise hem HUVEC hem de HCAEC'de erken apoptotik hücre popülasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Erken apoptotik hücrelerin (membran bütünlüğünü koruyan) aksine, geç apoptotik hücrelerin (hasarlı membranlara sahip) muhtemelen proinflamatuvar hücre içi içeriklerinin hücre dışına salınmasından dolayı nekrotik hücreler gibi davrandığı varsayılmaktadır [184]. NLRP3 inflamazomu aktivasyonu ile ortaya çıkan propitoz, gasdermin aracılı programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Propitotik hücreler apoptotik hücreler ile fosfatidilserin (PS) transferi, Anneksin V boyaması gibi ortak özelliklere sahipken, propidyum iyodür (PI) boyaması, inflamasyon gibi propitoza has özellikler ile apoptozdan ayrılmaktadır. Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bir membran lipidi olan fosfatidilserin bulunmaktadır. Eğer hücre apoptoza giderse, normalde iç yüze yerleşmiş olan bu fosfatidilserin molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu translokasyon, hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptozda meydana gelen bir durumdur. [184]. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücreleri görünür hale getirir. FITC-Anneksin-V kompleksinin hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı akış sitometrisi ile ölçülebilmektedir. Nekrotik hücrelerin yüzeylerinde de Anneksin-V bağlanması görülebildiği için, çalışmamızda nekrotik ve apoptotik hücreleri ayırt edebilmek için, sadece nekrotik hücrelere ve nekroza giden geç apoptotik hücrelere bağlanan bir boya olan PI ile boyama yöntemi eklenmiştir. Propitozda gasdermin aracılı meydana gelen hasar nedeni ile membranda oluşan porlardan, düşük molekül ağırlıklı olan PI boyası geçebilirken, erken apoptotik hücrelerde ise hücre hasarı henüz oluşmadığı için PI boyası hücre içine geçememektedir. Geç apoptotik veya nekrotik hücreler, propitotik hücreler olarak kabul edilmektedir [185]. Dolayısıyla PI boyama Anneksin-V boyamadan farklı olarak propitotik hücrelere özgü bir bağlanma göstermektedir. Araştırmamızda, hiperglisemik koşulların ve/veya Liraglutid inkübasyonunun, hem HUVEC hem de HCAEC hücrelerinde geç apoptotik süreçler üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı gözlenmiştir. HUVEC hücrelerinin hiperglisemik ortamda (20 mM) 48 saat, 7 gün ve 14 gün boyunca inkübasyonu geç apoptotik hücre popülasyonunda bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir [186,187].

Her canlı organizma için hayati önem taşıyan hücresel işlevlerden biri, hücre döngüsünün düzenlenmesidir. Proliferasyon hücre büyümesi ile hücre bölünmesinin eş

zamanlı gerçekleşmesini ifade etmektedir. Hücre proliferasyonu, hücre döngüsüne giriş ile başlamaktadır. Hücreler tipik olarak proliferasyon sinyallerini alana kadar G0 evresinde kalır. Uyarı ile beraber, hücre döngüsünün G1 evresine geçilir; bu durum hücre büyümesi ve bölünmesine hazırlığın başladığını gösterir. Metabolik olarak zorlu koşulların hücre proliferasyonunu etkilediği uzun süredir bilinmesine rağmen, diyabetin hücre döngüsünü düzenleyici unsurlar üzerindeki direkt etkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [177]. Çalışmamızda, hiperglisemik ortamın ve/veya Liraglutid inkübasyonunun HCAEC hücre döngüsü üzerinde bir etkisi gözlenmemiştir. Öte yandan hiperglisemik ortam, HUVEC hücrelerinde Sub G1 evresindeki hücre sayısını azaltmış, Liraglutid inkübasyonu ise (10 nM ve 100 nM) hiperglisemi ile azalan Sub G1 hücre sayısında artışa neden olmuştur. Bununla birlikte HUVEC hücrelerinde hiperglisemik ortam, G0/G1 evresinde değişikliğe neden olmamış, Liraglutid inkübasyonu (10 nM ve 100 nM) ise G0/G1 evresindeki hücre sayısında artışa neden olmuştur. HUVEC hücrelerinin hiperglisemik ortamda (20 mM) 14 günlük inkübasyonunu Sub G1 hücre evresinde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir, aynı çalışmada 24 saatlik döngülerle normoglisemik ve hiperglisemik ortam ie inkübasyonun 14 günün sonunda sadece hiperglisemik ortama maruz kalan hücrelere göre daha fazla Sub G1 evresindeki hücre sayısında daha fazla olduğu gösterilmiştir. Bu bulgu, glisemik kontroldeki dalgalanmaların, sabit yüksek glukoz konsantrasyonundan daha zararlı olabileceği şeklinde yorumlanmıştır [188]. Öte yandan, HUVEC hücrelerinin hiperglisemik ortamda (30 mM) 48 saatlik inkübasyonun Sub G1 evresindeki hücre sayısının değiştirmedeği gösterilmiştir [189]. Çalışmamızda HUVEC hücrelerinde, hipergliseminin Sub G1 fazında, Liraglutidin inkübasyonunun ise hem Sub G1 ile hem de G0/G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu gözlenmiştir. Sub G1 hücre evresi, hücre ölümü için bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu durum yalnızca apoptotik hücrelere özgü olmayabilir. Sub-G1 evresine giren hücreler arasında, nekroz ve propitoz süreçlerine giren hücreler de bulunabilir. Bu nedenle, Sub G1 hücre evresindeki DNA içeriğinin analizi, propitozu ortaya koyma açısından tek başına yeterli değildir. Bu sebeple morfolojik değerlendirme veya TUNEL analizi gibi diğer yöntemler ile doğrulanması gerekir [190].

G0/G1 fazında hücreler yapısal olarak büyümekte ve DNA sentezi için gerekli olan mRNA ve proteini sentezlemektedir. Gerekli proteinler ve büyüme tamamlandıktan sonra hücre, hücre döngüsünün bir sonraki aşaması olan S fazına girmektedir [191].

Çalışmamızda Liraglutid ile HUVEC hücrelerinde G0/G1 evresinde gözlenen bu duraklamanın mitoz bölünme evresine geçişini geciktirdiği gözlenmiştir. Liraglutid hiperglisemi ile hücre proliferasyonunda gözlenen azalmayı daha da şiddetlendirmiştir. Jojima ve arkadaşları, Liraglutid'in vasküler düz kas hücrelerinde cAMP aracılığıyla hücre döngüsünde G0/G1 evresinde bir artışa neden olduğu gösterilmiştir [192]. Literatürde Liraglutid'in veya başka bir GLP-1 reseptör agonistinin endotel hücrelerindeki hücre döngüsüne olan etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu anlamda çalışmamız ilk olma özelliğini taşımaktadır.

Kronik hiperglisemi, ROS üretimini arttırmakta ve bu da renal ve kardiyovasküler hasara katkıda bulunmaktadır [193]. Le ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, fare pankreas adacık hücrelerinde palmitik asit ile indüklenen oksidatif stresin ve mikrovasküler endotel hasarının Liraglutid inkübasyonu ile azaltıldığı gösterilmiştir [194]. Çalışmamızda HUVEC ve HCAEC hücrelerinde, hipergliseminin oksidatif stres indeksini (OSI) artırdığı, Liraglutid'in 10 nM inkübasyonunun ise OSI seviyelerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Batchuluun ve ark., insan aorta endotel hücrelerinde yürüttükleri çalışmada da benzer şekilde hipergliseminin (30 mM) indüklediği ROS seviyelerinin 30 nM Liraglutid inkübasyonu ile azaldığı belirtilmiştir [195]. H9C2 kardiyomiyosit hücrelerinde yürütülen bir başka çalışmada hiperglisemik ortamda artan ROS seviyelerinin Liraglutid inkübasyonu ile önemli ölçüde baskılandığı gösterilmiştir [196]. Okada ve ark., Liraglutid tedavisinin T2DM'li hastalarda reaktif oksijen belirteçlerinde bir azalmaya neden olduğunu göstermiş ve Liraglutid'in kardiyoprotektif etkisinin oksidatif stresin azaltılmasıyla ilişkili olabileceğini öne sürmüştür [197]. Ayrıca, gestasyonel diyabetli kadınlardan izole elde edilen HUVEC hücrelerinin 24 saat süre ile 100 nM Liraglutid inkübasyonunun oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir [177].

Hipergliseminin HUVEC hücrelerinde NLRP3 inflamazom bileşenleri olan NLRP3, Kaspaz-1 ve ASC gibi proteinlerin mRNA ekspresyon seviyelerini konsantrasyon ve zamana bağlı bir şekilde arttırdığı gösterilmiştir [198,199]. Çalışmamızda benzer şekilde hiperglisemi hem HUVEC hem de HCAEC hücre kültürlerinde, NLRP3 inflamazom aktivasyonunda rol oynayan Kaspaz-1, ASC ve NLRP3 gibi proteinlerin mRNA ekspresyonlarında artışa neden olmuştur. Söz konusu artış Liraglutid inkübasyonu ile azalmıştır. Çalışmamız Liraglutid'in NLRP3 inflamazom bileşenleri

üzerindeki etkisini gösteren ilk çalışmadır. Çalışmamızda inflamazom aktivasyon bileşenlerinin protein ekspresyonlarına bakıldığında ise her iki hücre tipinde de hiperglisemik ortamda ASC protein ekspresyonu normoglisemik ortama göre arttığı gösterilmiştir. NLRP3 protein ekspresyonunda ise hiperglisemik ortamda normoglisemik ortama kıyasla bir artış eğilimi gösterse de istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Çalışmamızda, hiperglisemik koşulların gerek HUVEC gerekse de HCAEC hücrelerinde IL-1 β ve IL-18 seviyelerinde anlamlı bir farklılığa yol açmadığı gözlenmiştir. Liraglutid inkübasyonunun ise HUVEC hücrelerinde IL-1 β , HCAEC’de ise IL-18 seviyelerini azalttığı gözlenmiştir. Literatürde HUVEC hücrelerinin hiperglisemik ortamda (25 mM ve 30 mM) farklı sürelerde (48 saat, 72 saat, 6 gün) inkübasyonunun IL-18 ve IL-1 β seviyesini artırdığı gösterilmiştir. [177,199,200] Çalışmamızda kullanılan ELISA kiti IL-18 ve IL-1 β ’nın düzeylerinin ölçüm aralığının altında kalması nedeni ile süpernatantta analizine olanak sağlamamıştır. Bu nedenle ölçümler hücre lizatında gerçekleştirilmiştir. Hipergliseminin IL-18 ve IL-1 β seviyelerini artırdığını ifade eden çalışmalar [177,199,200], süpernatantta gerçekleştirilmiştir. Dolayısıyla sonuçlarımızın farklı olması ölçülen ortamın farklılığı ile ilişkilendirilebilir. IL-18 ve IL-1 β gibi sitokinlerin endotel hücrelerdeki veziküllerden süpernatanta salınması daha uzun bir süreye ihtiyaç duyabilir. Dolayısı çalışmamızda kullandığımız inkübasyon süresi bu sürenin altında kalmış olabilir.

Sonuç olarak çalışmamızda hiperglisemik ortamın venöz ve arteriyal kaynaklı endotel hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı, oksidatif stresi artırdığı, NLRP3 inflamazom bileşenlerinin mRNA ekspresyonlarını artırdığı ve hücre membran bütünlüğünde bir hasara sebep olduğu gözlenmiştir. Liraglutid inkübasyonunun ise hiperglisemi ile azalan proliferasyonu daha da şiddetlendirdiği, artan oksidatif stresi azalttığı, artan NLRP3 inflamazom bileşenlerinin mRNA ekspresyonlarını normalize ettiği ve hücre membranındaki hasarı azalttığı gözlenmiştir.

Çalışmamız hiperglisemik ortamda Liraglutid’in venöz ve arteriyal kaynaklı endotel hücrelerindeki etkilerini kıyaslamalı olarak inceleyen ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Liraglutid diyabetin yanı sıra obezite tedavisinde de endikasyon almış bir GLP-1 reseptör agonstidir. Makrofaj aracılı NLRP3 inflamazom aktivasyonu sadece diyabette değil non-diyabetik obez hastalarda da gözlenen kardiyovasküler

komplasyonlarda yakından ilifkilidir. Liraglutid'in NLRP3 inflamazom aracılı etkileri hem diyabet hem de obezite endikasyonunda söz konusu ilaca pleiotropik etki değeri katacağını düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1] IDF Diabetes Atlas 9th edition. IDF Diabetes Atlas 10th edition 2021. 2021.
- [2] Tanrıverdi MH, Çelepkolu T, Aslanhan H. Diabetes mellitus and primary healthcare. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* 2015;4:562–7. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.01.2013.04.0347>.
- [3] Satman. I, B. O, Y. T, S. K, S. G, N. D, et al. Diabetes epidemic in Turkey: Results of the second population-based survey of diabetes and risk characteristics in Turkey (TURDEP-II). *Diabetologia* 2011;54.
- [4] Hotamisligil GS, Budavari A, Murray D, Spiegelman BM. Reduced tyrosine kinase activity of the insulin receptor in obesity- diabetes. Central role of tumor necrosis factor- α . *Journal of Clinical Investigation* 1994. <https://doi.org/10.1172/JCI117495>.
- [5] Pickup JC. Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2004. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.3.813>.
- [6] Ding S, Xu S, Ma Y, Liu G, Jang H, Fang J. Modulatory mechanisms of the NLRP3 inflammasomes in diabetes. *Biomolecules* 2019. <https://doi.org/10.3390/biom9120850>.
- [7] Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H. Interleukin-18 is a unique cytokine that stimulates both Th1 and Th2 responses depending on its cytokine milieu. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001. [https://doi.org/10.1016/S1359-6101\(00\)00015-0](https://doi.org/10.1016/S1359-6101(00)00015-0).
- [8] Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Tanimoto T, Torigoe K, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. *Nature* 1995. <https://doi.org/10.1038/378088a0>.
- [9] Yamanishi K, Maeda S, Kuwahara-Otani S, Watanabe Y, Yoshida M, Ikubo K, et al. Interleukin-18-deficient mice develop dyslipidemia resulting in nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *Translational Research* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.03.010>.
- [10] Lindegaard B, Matthews VB, Brandt C, Hojman P, Allen TL, Estevez E, et al. Interleukin-18 activates skeletal muscle AMPK and reduces weight gain and insulin resistance in mice. *Diabetes* 2013. <https://doi.org/10.2337/db12-1095>.

- [11] Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, et al. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 2010. <https://doi.org/10.1038/nature08900>.
- [12] Hemmer B, Kerschensteiner M, Korn T. Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70305-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70305-9).
- [13] Jin CY, Lee JD, Park C, Choi YH, Kim GY. Curcumin attenuates the release of pro-inflammatory cytokines in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:1645–51. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00651.x>.
- [14] Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* 2009;11:615–28. <https://doi.org/10.1593/neo.09284>.
- [15] Inoue M, Shinohara ML. The role of interferon- β in the treatment of multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis - in the perspective of inflammasomes. *Immunology* 2013. <https://doi.org/10.1111/imm.12081>.
- [16] Esser N, L'Homme L, de Roover A, Kohnen L, Scheen AJ, Moutschen M, et al. Obesity phenotype is related to NLRP3 inflammasome activity and immunological profile of visceral adipose tissue. *Diabetologia* 2013. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3023-9>.
- [17] Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011. <https://doi.org/10.1038/nm.2279>.
- [18] Reynolds CM, McGillicuddy FC, Harford KA, Finucane OM, Mills KHG, Roche HM. Dietary saturated fatty acids prime the NLRP3 inflammasome via TLR4 in dendritic cells-implications for diet-induced insulin resistance. *Mol Nutr Food Res* 2012. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200058>.
- [19] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol* 2010. <https://doi.org/10.1038/ni.1831>.
- [20] Sepehri Z, Kiani Z, Afshari M, Kohan F, Dalvand A, Ghavami S. Inflammasomes and type 2 diabetes: An updated systematic review. *Immunol Lett* 2017;192:97–103. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2017.10.010>.

- [21] Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002. <https://doi.org/10.1007/s125-002-8248-z>.
- [22] Demircan N, Gürel A, Armutcu F, Ünalacak M, Aktunç E, Atmaca H. The evaluation of serum cystatin C, malondialdehyde, and total antioxidant status in patients with metabolic syndrome. *Medical Science Monitor* 2008.
- [23] Ford ES, Mokdad AH, Giles WH, Brown DW. The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: Findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes* 2003. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.9.2346>.
- [24] Sivitz WI, Yorek MA. Mitochondrial dysfunction in diabetes: From molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 2010. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2531>.
- [25] Dan Dunn J, Alvarez LAJ, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol* 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.09.005>.
- [26] Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VAK, Lee SJ, Dolinay T, Lam HC, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2011. <https://doi.org/10.1038/ni.1980>.
- [27] Cruz CM, Rinna A, Forman HJ, Ventura ALM, Persechini PM, Ojcius DM. ATP activates a reactive oxygen species-dependent oxidative stress response and secretion of proinflammatory cytokines in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* 2007. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608083200>.
- [28] Sasaki N, Ozono R, Higashi Y, Maeda R, Kihara Y. Association of Insulin Resistance, Plasma Glucose Level, and Serum Insulin Level With Hypertension in a Population With Different Stages of Impaired Glucose Metabolism. *J Am Heart Assoc* 2020. <https://doi.org/10.1161/JAHA.119.015546>.
- [29] Smolders VF, Zodda E, Quax PHA, Carini M, Barberà JA, Thomson TM, et al. Metabolic alterations in cardiopulmonary vascular dysfunction. *Front Mol Biosci* 2019. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00120>.

- [30] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers* 2015. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.19>.
- [31] Forouhi NG, Misra A, Mohan V, Taylor R, Yancy W. Dietary and nutritional approaches for prevention and management of type 2 diabetes. *BMJ (Online)* 2018. <https://doi.org/10.1136/bmj.k2234>.
- [32] Bouchard P, Ghitescu L, Bendayan M. Morpho-functional studies of the blood-brain barrier in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia* 2002. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0853-2>.
- [33] Junker U, Jaggi C, Bestetti G, Rossi GL. Basement membrane of hypothalamus and cortex capillaries from normotensive and spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* 1985. <https://doi.org/10.1007/BF00686999>.
- [34] McCuskey PA, McCuskey RS. In vivo and electron microscopic study of the development of cerebral diabetic microangiopathy. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1984.
- [35] Sharma A, Tate M, Mathew G, Vince JE, Ritchie RH, De Haan JB. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: Therapeutic implications. *Front Physiol* 2018;9:331431. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2018.00114/BIBTEX>.
- [36] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi SI, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000;404:787–90. <https://doi.org/10.1038/35008121>.
- [37] Chen A, Chen Z, Xia Y, Lu D, Yang X, Sun A, et al. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.142>.
- [38] Yu X, Hao M, Liu Y, Ma X, Lin W, Xu Q, et al. Liraglutide ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting NLRP3 inflammasome and pyroptosis activation via mitophagy. *Eur J Pharmacol* 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172715>.

- [39] Gordon M, Meagher P, Connelly KA. Effect of Empagliflozin and Liraglutide on the Nucleotide-Binding and Oligomerization Domain-Like Receptor Family Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome in a Rodent Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Can J Diabetes* 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jcjd.2020.11.003>.
- [40] Luo X, Hu Y, He S, Ye Q, Lv Z, Liu J, et al. Dulaglutide inhibits high glucose-induced endothelial dysfunction and NLRP3 inflammasome activation. *Arch Biochem Biophys* 2019;671:203–9. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2019.07.008>.
- [41] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013;127. <https://doi.org/10.1161/CIR.0B013E31828124AD>.
- [42] Association AD. Economic costs of diabetes in the U.S. in 2012. *Diabetes Care* 2013;36:1033–1046. *Diabetes Care* 2013;36:1797. <https://doi.org/10.2337/DC13-ER06>.
- [43] Yalçın M. M., Yetkin İ. DİABETES MELLİTUS VE KOMPLİKASYONLARININ TANI, TEDAVİ VE İZLEM KILAVUZU-2022. 2022.
- [44] Lerario AC. Diabetes mellitus: A risk factor for Alzheimer's Disease. vol. 62. 2019.
- [45] Greeley SAW, Naylor RN, Philipson LH, Bell GI. Neonatal Diabetes: An Expanding List of Genes Allows for Improved Diagnosis and Treatment. *Curr Diab Rep* 2011;11:519. <https://doi.org/10.1007/S11892-011-0234-7>.
- [46] Magliano DJ, Zimmet P, Shaw JE. Classification of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *International Textbook of Diabetes Mellitus* 2015:1–16. <https://doi.org/10.1002/9781118387658.CH1>.
- [47] Fajans SS, Bell GI. MODY: history, genetics, pathophysiology, and clinical decision making. *Diabetes Care* 2011;34:1878–84. <https://doi.org/10.2337/DC11-0035>.
- [48] Pearson ER, Flechtner I, Njølstad PR, Malecki MT, Flanagan SE, Larkin B, et al. Switching from insulin to oral sulfonylureas in patients with diabetes due to Kir6.2 mutations. *N Engl J Med* 2006;355:467–77. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA061759>.

- [49] Gloyn AL, Pearson ER, Antcliff JF, Proks P, Bruining GJ, Slingerland AS, et al. Activating mutations in the gene encoding the ATP-sensitive potassium-channel subunit Kir6.2 and permanent neonatal diabetes. *N Engl J Med* 2004;350:1838–49. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA032922>.
- [50] di Angelantonio E, Gao P, Khan H, Butterworth AS, Wormser D, Kaptoge S, et al. Glycated hemoglobin measurement and prediction of cardiovascular disease. *JAMA* 2014;311:1225–33. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2014.1873>.
- [51] Association AD. Standards of Medical Care in Diabetes—2015 Abridged for Primary Care Providers. *Clin Diabetes* 2015;33:97. <https://doi.org/10.2337/DIACLIN.33.2.97>.
- [52] NIH consensus development conference: diagnosing gestational diabetes mellitus - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23748438/> (accessed January 26, 2023).
- [53] Rizza RA, Gerich JE, Haymond MW, Westland RE, Hall LD, Clemens AH, et al. Control of blood sugar in insulin-dependent diabetes: comparison of an artificial endocrine pancreas, continuous subcutaneous insulin infusion, and intensified conventional insulin therapy. *N Engl J Med* 1980;303:1313–8. <https://doi.org/10.1056/NEJM198012043032301>.
- [54] Gerich JE. Control of glycaemia. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1993;7:551–86. [https://doi.org/10.1016/S0950-351X\(05\)80207-1](https://doi.org/10.1016/S0950-351X(05)80207-1).
- [55] Gerich JE. Lilly lecture 1988. Glucose counterregulation and its impact on diabetes mellitus. *Diabetes* 1988;37:1608–17. <https://doi.org/10.2337/DIAB.37.12.1608>.
- [56] Siesjo BK. Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes Metab Rev* 1988;4:113–44. <https://doi.org/10.1002/DMR.5610040203>.
- [57] Owen OE, Morgan AP, Kemp HG, Sullivan JM, Herrera MG, Cahill GF. Brain metabolism during fasting. *J Clin Invest* 1967;46:1589–95. <https://doi.org/10.1172/JCI105650>.
- [58] Mitrakou A, Ryan C, Veneman T, Mookan M, Jenssen T, Kiss I, et al. Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *Am J Physiol* 1991;260. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.1991.260.1.E67>.
- [59] Jarrett RJ, Keen H. Hyperglycaemia and diabetes mellitus. *Lancet* 1976;2:1009–12. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(76\)90844-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(76)90844-8).

- [60] Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22:920–4. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.22.6.920>.
- [61] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131–57. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2007.03.054>.
- [62] Moore B, Edie ES, Abram JH. On the treatment of Diabetes mellitus by acid extract of Duodenal Mucous Membrane. *Biochemical Journal* 1906;1:28. <https://doi.org/10.1042/BJ0010028>.
- [63] Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R, et al. Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses. *J Clin Endocrinol Metab* 1986;63:492–8. <https://doi.org/10.1210/JCEM-63-2-492>.
- [64] Alsalim W, Omar B, Pacini G, Bizzotto R, Mari A, Ahrén B. Incretin and islet hormone responses to meals of increasing size in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2015;100:561–8. <https://doi.org/10.1210/JC.2014-2865>.
- [65] Alsalim W, Tura A, Pacini G, Omar B, Bizzotto R, Mari A, et al. Mixed meal ingestion diminishes glucose excursion in comparison with glucose ingestion via several adaptive mechanisms in people with and without type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2016;18:24–33. <https://doi.org/10.1111/DOM.12570>.
- [66] Vahl TP, Paty BW, Fuller BD, Prigeon RL, D'Alessio DA. Effects of GLP-1-(7-36)NH₂, GLP-1-(7-37), and GLP-1-(9-36)NH₂ on intravenous glucose tolerance and glucose-induced insulin secretion in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88:1772–9. <https://doi.org/10.1210/JC.2002-021479>.
- [67] Salehi M, Aulinger BA, D'Alessio DA. Targeting beta-cell mass in type 2 diabetes: promise and limitations of new drugs based on incretins. *Endocr Rev* 2008;29:367–79. <https://doi.org/10.1210/ER.2007-0031>.
- [68] de León DD, Deng S, Madani R, Ahima RS, Drucker DJ, Stoffers DA. Role of endogenous glucagon-like peptide-1 in islet regeneration after partial pancreatectomy. *Diabetes* 2003;52:365–71. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.52.2.365>.

- [69] Wang Q, Brubaker P. Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice. *Diabetologia* 2002;45:1263–73. <https://doi.org/10.1007/S00125-002-0828-3>.
- [70] Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, et al. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. *Gut* 2006;55:243–51. <https://doi.org/10.1136/GUT.2004.059741>.
- [71] Imeryüz N, Yeğen BÇ, Bozkurt A, Coşkun T, Villanueva-Penacarrillo ML, Ulusoy NB. Glucagon-like peptide-1 inhibits gastric emptying via vagal afferent-mediated central mechanisms. *Am J Physiol* 1997;273. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.1997.273.4.G920>.
- [72] Salehi M, Aulinger B, Pigeon RL, D'Alessio DA. Effect of Endogenous GLP-1 on Insulin Secretion in Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2010;59:1330. <https://doi.org/10.2337/DB09-1253>.
- [73] Nicolaus M, Brödl J, Linke R, Woerle HJ, Göke B, Schirra J. Endogenous GLP-1 regulates postprandial glycemia in humans: relative contributions of insulin, glucagon, and gastric emptying. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:229–36. <https://doi.org/10.1210/JC.2010-0841>.
- [74] Salehi M, Vahl TP, D'Alessio DA. Regulation of islet hormone release and gastric emptying by endogenous glucagon-like peptide 1 after glucose ingestion. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:4909–16. <https://doi.org/10.1210/JC.2008-0605>.
- [75] Vatandoust N, Rami F, Salehi A, Khosravi S, Dashti G, Eslami G, et al. Novel High-Fat Diet Formulation and Streptozotocin Treatment for Induction of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Rats. *Adv Biomed Res* 2018. https://doi.org/10.4103/abr.abr_8_17.
- [76] Miyawaki K, Yamada Y, Yano H, Niwa H, Ban N, Ihara Y, et al. Glucose intolerance caused by a defect in the entero-insular axis: a study in gastric inhibitory polypeptide receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:14843–7. <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.26.14843>.
- [77] Miyawaki K, Yamada Y, Ban N, Ihara Y, Tsukiyama K, Zhou H, et al. Inhibition of gastric inhibitory polypeptide signaling prevents obesity. *Nat Med* 2002;8:738–42. <https://doi.org/10.1038/NM727>.

- [78] Gault VA, McClean PL, Cassidy RS, Irwin N, Flatt PR. Chemical gastric inhibitory polypeptide receptor antagonism protects against obesity, insulin resistance, glucose intolerance and associated disturbances in mice fed high-fat and cafeteria diets. *Diabetologia* 2007;50:1752–62. <https://doi.org/10.1007/S00125-007-0710-4>.
- [79] Lund A, Vilsboll T, Bagger JJ, Holst JJ, Knop FK. The separate and combined impact of the intestinal hormones, GIP, GLP-1, and GLP-2, on glucagon secretion in type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00665.2010>.
- [80] Nielsen ST, Janum S, Krogh-Madsen R, Solomon TP, Møller K. The incretin effect in critically ill patients: a case–control study. *Crit Care* 2015;19. <https://doi.org/10.1186/S13054-015-1118-Z>.
- [81] Mari A, Bagger JJ, Ferrannini E, Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T. Mechanisms of the Incretin Effect in Subjects with Normal Glucose Tolerance and Patients with Type 2 Diabetes. *PLoS One* 2013;8:e73154. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0073154>.
- [82] Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:46–52. <https://doi.org/10.1007/BF02427280>.
- [83] Fukase N, Manaka H, Sugiyama K, Takahashi H, Igarashi M, Daimon M, et al. Response of truncated glucagon-like peptide-1 and gastric inhibitory polypeptide to glucose ingestion in non-insulin dependent diabetes mellitus - Effect of sulfonylurea therapy. *Acta Diabetol* 1995;32:165–9. <https://doi.org/10.1007/BF00838486/METRICS>.
- [84] Vaag AA, Holst JJ, Vølund A, Beck-Nielsen H. Gut incretin hormones in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM)--evidence for decreased glucagon-like peptide 1 secretion during oral glucose ingestion in NIDDM twins. *Eur J Endocrinol* 1996;135:425–32. <https://doi.org/10.1530/EJE.0.1350425>.
- [85] Vollmer K, Hoist JJ, Bailer B, Ellrlichmann M, Nauck MA, Schmidt WE, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008;57:678–87. <https://doi.org/10.2337/DB07-1124>.

- [86] Kjems LL, Holst JJ, Vølund A, Madsbad S. The influence of GLP-1 on glucose-stimulated insulin secretion: effects on beta-cell sensitivity in type 2 and nondiabetic subjects. *Diabetes* 2003;52:380–6. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.52.2.380>.
- [87] Højberg P v., Vilsbøll T, Rabøl R, Knop FK, Bache M, Krarup T, et al. Four weeks of near-normalisation of blood glucose improves the insulin response to glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide in patients with type 2 diabetes. *Diabetologia* 2009;52:199–207. <https://doi.org/10.1007/S00125-008-1195-5>.
- [88] Ahrén B, Schmitz O. GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. *Horm Metab Res* 2004;36:867–76. <https://doi.org/10.1055/S-2004-826178>.
- [89] Creutzfeldt WOC, Kleine N, Willms B, Ørskov C, Holst JJ, Nauck MA. Glucagonostatic actions and reduction of fasting hyperglycemia by exogenous glucagon-like peptide I(7-36) amide in type I diabetic patients. *Diabetes Care* 1996;19:580–6. <https://doi.org/10.2337/DIACARE.19.6.580>.
- [90] Delgado-Aros S, Kim DY, Burton DD, Thomforde GM, Stephens D, Brinkmann BH, et al. Effect of GLP-1 on gastric volume, emptying, maximum volume ingested, and postprandial symptoms in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;282. <https://doi.org/10.1152/AJPGI.2002.282.3.G424>.
- [91] Dardevet D, Moore MC, Neal D, DiCostanzo CA, Snead W, Cherrington AD. Insulin-independent effects of GLP-1 on canine liver glucose metabolism: duration of infusion and involvement of hepatportal region. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00035.2004>.
- [92] Aroda VR, Henry RR, Han J, Huang W, DeYoung MB, Darsow T, et al. Efficacy of GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors: meta-analysis and systematic review. *Clin Ther* 2012;34. <https://doi.org/10.1016/J.CLINTHERA.2012.04.013>.
- [93] Müller TD, Clemmensen C, Finan B, Dimarchi RD, Tschöp MH. Anti-Obesity Therapy: from Rainbow Pills to Polyagonists. *Pharmacol Rev* 2018;70:712–46. <https://doi.org/10.1124/PR.117.014803>.
- [94] Seino Y, Fukushima M, Yabe D. GIP and GLP-1, the two incretin hormones: Similarities and differences. *J Diabetes Investig* 2010;1:8. <https://doi.org/10.1111/J.2040-1124.2010.00022.X>.

- [95] Ratner RE, Maggs D, Nielsen LL, Stonehouse AH, Poon T, Zhang B, et al. Long-term effects of exenatide therapy over 82 weeks on glycaemic control and weight in over-weight metformin-treated patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:419–28. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2006.00589.X>.
- [96] Aroda VR, de young MB. Clinical implications of exenatide as a twice-daily or once-weekly therapy for type 2 diabetes. *Postgrad Med* 2011;123:228–38. <https://doi.org/10.3810/PGM.2011.09.2479>.
- [97] Men P, Qu S, Song Z, Liu Y, Li C, Zhai S. Lixisenatide for Type 2 Diabetes Mellitus Patients Inadequately Controlled on Oral Antidiabetic Drugs: A Mixed-Treatment Comparison Meta-analysis and Cost–Utility Analysis. *Diabetes Therapy* 2020;11:1745. <https://doi.org/10.1007/S13300-020-00857-3>.
- [98] O’Neil PM, Birkenfeld AL, McGowan B, Mosenzon O, Pedersen SD, Wharton S, et al. Efficacy and safety of semaglutide compared with liraglutide and placebo for weight loss in patients with obesity: a randomised, double-blind, placebo and active controlled, dose-ranging, phase 2 trial. *Lancet* 2018;392:637–49. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31773-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31773-2).
- [99] Agersø H, Jensen LB, Elbrønd B, Rolan P, Zdravkovic M. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, safety and tolerability of NN2211, a new long-acting GLP-1 derivative, in healthy men. *Diabetologia* 2002;45:195–202. <https://doi.org/10.1007/S00125-001-0719-Z>.
- [100] Jacobsen L v., Flint A, Olsen AK, Ingwersen SH. Liraglutide in Type 2 Diabetes Mellitus: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacokinet* 2016;55:657–72. <https://doi.org/10.1007/S40262-015-0343-6>.
- [101] Ratner RE, Rosenstock J, Boka G. Dose-dependent effects of the once-daily GLP-1 receptor agonist lixisenatide in patients with Type 2 diabetes inadequately controlled with metformin: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabet Med* 2010;27:1024–32. <https://doi.org/10.1111/J.1464-5491.2010.03020.X>.
- [102] Novo Nordisk announces FDA approval of label update for Rybelsus® (semaglutide) allowing use as a first-line option for adults with type 2 diabetes n.d. <https://www.prnewswire.com/news-releases/novo-nordisk-announces-fda-approval-of-label-update-for-rybelsus-semaglutide-allowing-use-as-a-first-line->

- option-for-adults-with-type-2-diabetes-301720965.html (accessed February 1, 2023).
- [103] Dungan KM, Povedano ST, Forst T, González JGG, Atisso C, Sealls W, et al. Once-weekly dulaglutide versus once-daily liraglutide in metformin-treated patients with type 2 diabetes (AWARD-6): a randomised, open-label, phase 3, non-inferiority trial. *Lancet* 2014;384:1349–57. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60976-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60976-4).
 - [104] Bush MA, Matthews JE, de Boever EH, Dobbins RL, Hodge RJ, Walker SE, et al. Safety, tolerability, pharmacodynamics and pharmacokinetics of albiglutide, a long-acting glucagon-like peptide-1 mimetic, in healthy subjects. *Diabetes Obes Metab* 2009;11:498–505. <https://doi.org/10.1111/J.1463-1326.2008.00992.X>.
 - [105] Bettge K, Kahle M, Abd El Aziz MS, Meier JJ, Nauck MA. Occurrence of nausea, vomiting and diarrhoea reported as adverse events in clinical trials studying glucagon-like peptide-1 receptor agonists: A systematic analysis of published clinical trials. *Diabetes Obes Metab* 2017;19:336–47. <https://doi.org/10.1111/DOM.12824>.
 - [106] Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. Diabetes and the brain: Oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/102158>.
 - [107] Rosin DL, Okusa MD. Dangers within: DAMP responses to damage and cell death in kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:416–25. <https://doi.org/10.1681/ASN.2010040430>.
 - [108] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 2007;87:315–424. <https://doi.org/10.1152/PHYSREV.00029.2006>.
 - [109] Okin D, Medzhitov R. Evolution of Inflammatory Diseases. *Current Biology* 2012;22:R733–40. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2012.07.029>.
 - [110] Jiang D, Chen S, Sun R, Zhang X, Wang D. The NLRP3 inflammasome: Role in metabolic disorders and regulation by metabolic pathways. *Cancer Lett* 2018;419:8–19. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2018.01.034>.
 - [111] Seok JK, Kang HC, Cho YY, Lee HS, Lee JY. Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. *Arch Pharm Res* 2021;44:16–35. <https://doi.org/10.1007/S12272-021-01307-9>.

- [112] Schroder K, Tschopp J. The Inflammasomes. *Cell* 2010;140:821–32. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.040>.
- [113] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nature Reviews Immunology* 2010 10:3 2010;10:210–5. <https://doi.org/10.1038/nri2725>.
- [114] McIlwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;5:1–28. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A008656>.
- [115] Martin SJ, Henry CM, Cullen SP. A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. *Mol Cell* 2012;46:387–97. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.04.026>.
- [116] Platnich JM, Muruve DA. NOD-like receptors and inflammasomes: A review of their canonical and non-canonical signaling pathways. *Arch Biochem Biophys* 2019;670:4–14. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2019.02.008>.
- [117] Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer HD, Johansen P, Senti G, et al. Inflammasome activation and IL-1 β target IL-1 α for secretion as opposed to surface expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:18055–60. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1109176108>.
- [118] Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta* 2014;1843:2563–82. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.05.014>.
- [119] Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16–34. <https://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976>.
- [120] Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev* 2018;281:8–27. <https://doi.org/10.1111/IMR.12621>.
- [121] Menu P, Vince JE. The NLRP3 inflammasome in health and disease: the good, the bad and the ugly. *Clin Exp Immunol* 2011;166:1–15. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2249.2011.04440.X>.
- [122] Kwon H, Pessin JE. Adipokines mediate inflammation and insulin resistance. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2013;4. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2013.00071>.
- [123] McGillicuddy FC, Harford KA, Reynolds CM, Oliver E, Claessens M, Mills KHG, et al. Lack of interleukin-1 receptor I (IL-1RI) protects mice from high-fat diet-

- induced adipose tissue inflammation coincident with improved glucose homeostasis. *Diabetes* 2011;60:1688–98. <https://doi.org/10.2337/DB10-1278>.
- [124] Eizirik DL, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure. *Nat Rev Endocrinol* 2020;16:349–62. <https://doi.org/10.1038/S41574-020-0355-7>.
- [125] Maedler K, Sergeev P, Ris F, Oberholzer J, Joller-Jemelka HI, Spinas GA, et al. Glucose-induced beta cell production of IL-1 β contributes to glucotoxicity in human pancreatic islets. *J Clin Invest* 2002;110:851–60. <https://doi.org/10.1172/JCI15318>.
- [126] Jiang N, Li Y, Shu T, Wang J. Cytokines and inflammation in adipogenesis: an updated review. *Front Med* 2019;13:314–29. <https://doi.org/10.1007/S11684-018-0625-0>.
- [127] Lee JH, Cho DH, Park HJ. IL-18 and cutaneous inflammatory diseases. *Int J Mol Sci* 2015;16:29357–69. <https://doi.org/10.3390/ijms161226172>.
- [128] Bellora F, Castriconi R, Doni A, Cantoni C, Moretta L, Mantovani A, et al. M-CSF induces the expression of a membrane-bound form of IL-18 in a subset of human monocytes differentiating in vitro toward macrophages. *Eur J Immunol* 2012;42:1618–26. <https://doi.org/10.1002/EJI.201142173>.
- [129] Yamaoka-Tojo M, Tojo T, Wakaume K, Kameda R, Nemoto S, Takahira N, et al. Circulating interleukin-18: A specific biomarker for atherosclerosis-prone patients with metabolic syndrome. *Nutr Metab (Lond)* 2011;8:3. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-8-3>.
- [130] Thorand B, Kolb H, Baumert J, Koenig W, Chambless L, Meisinger C, et al. Elevated levels of interleukin-18 predict the development of type 2 diabetes: results from the MONICA/KORA Augsburg Study, 1984-2002. *Diabetes* 2005;54:2932–8. <https://doi.org/10.2337/DIABETES.54.10.2932>.
- [131] Esposito K, Nappo F, Giugliano F, di Palo C, Ciotola M, Barbieri M, et al. Meal modulation of circulating interleukin 18 and adiponectin concentrations in healthy subjects and in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1135–40. <https://doi.org/10.1093/AJCN/78.6.1135>.
- [132] Krogh-Madsen R, Plomgaard P, Møller K, Mittendorfer B, Pedersen BK. Influence of TNF- α and IL-6 infusions on insulin sensitivity and expression of IL-18 in

- humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00471.2005>.
- [133] Yang Y, Wang H, Kouadir M, Song H, Shi F. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors. *Cell Death & Disease* 2019 10:2 2019;10:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1413-8>.
- [134] Campden RI, Zhang Y. The role of lysosomal cysteine cathepsins in NLRP3 inflammasome activation. *Arch Biochem Biophys* 2019;670:32–42. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2019.02.015>.
- [135] Li F, Xu M, Wang M, Wang L, Wang H, Zhang H, et al. Roles of mitochondrial ROS and NLRP3 inflammasome in multiple ozone-induced lung inflammation and emphysema. *Respir Res* 2018;19. <https://doi.org/10.1186/S12931-018-0931-8>.
- [136] Chen Y, Wang L, Pitzer AL, Li X, Li PL, Zhang Y. Contribution of redox-dependent activation of endothelial Nlrp3 inflammasomes to hyperglycemia-induced endothelial dysfunction. *J Mol Med (Berl)* 2016;94:1335–47. <https://doi.org/10.1007/S00109-016-1481-5>.
- [137] Hu Z, Chai J. Structural Mechanisms in NLR Inflammasome Assembly and Signaling. *Curr Top Microbiol Immunol* 2016;397:23–42. https://doi.org/10.1007/978-3-319-41171-2_2.
- [138] Abais JM, Xia M, Zhang Y, Boini KM, Li PL. Redox regulation of NLRP3 inflammasomes: ROS as trigger or effector? *Antioxid Redox Signal* 2015;22:1111–29. <https://doi.org/10.1089/ARS.2014.5994>.
- [139] He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci* 2016;41:1012–21. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2016.09.002>.
- [140] Shim DW, Lee KH. Posttranslational regulation of the NLR family pyrin domain-containing 3 inflammasome. *Front Immunol* 2018;9:1054. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01054/BIBTEX>.
- [141] Ren G, Zhang X, Xiao Y, Zhang W, Wang Y, Ma W, et al. ABRO1 promotes NLRP3 inflammasome activation through regulation of NLRP3 deubiquitination. *EMBO J* 2019;38. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2018100376>.
- [142] Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, et al. The vascular endothelium and human diseases. *Int J Biol Sci* 2013;9:1057–69. <https://doi.org/10.7150/IJBS.7502>.

- [143] A A, M A, L M, S de K, GP F. Endothelial dysfunction in diabetes: the role of reparatory mechanisms. *Diabetes Care* 2011;34 Suppl 2:823–6. <https://doi.org/10.2337/DC11-S239>.
- [144] Meza CA, la Favor JD, Kim DH, Hickner RC. Endothelial Dysfunction: Is There a Hyperglycemia-Induced Imbalance of NOX and NOS? *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/IJMS20153775>.
- [145] Henning RJ. Type-2 diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Future Cardiol* 2018;14:491–509. <https://doi.org/10.2217/FCA-2018-0045>.
- [146] Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013;34:2436–46. <https://doi.org/10.1093/EURHEARTJ/EHT149>.
- [147] Forouhi NG, Misra A, Mohan V, Taylor R, Yancy W. Dietary and nutritional approaches for prevention and management of type 2 diabetes. *BMJ* 2018;361. <https://doi.org/10.1136/BMJ.K2234>.
- [148] Lteif A, Vaishnav P, Baron AD, Mather KJ. Endothelin limits insulin action in obese/insulin-resistant humans. *Diabetes* 2007;56:728–34. <https://doi.org/10.2337/DB06-1406>.
- [149] Muniyappa R, Sowers JR. Role of insulin resistance in endothelial dysfunction. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14:5–12. <https://doi.org/10.1007/S11154-012-9229-1>.
- [150] Janus A, Szahidewicz-Krupska E, Mazur G, Doroszko A. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Constitute a Common Therapeutic Target in Cardiometabolic Disorders. *Mediators Inflamm* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/3634948>.
- [151] Son SM. Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Pathogenesis of Vascular Complications of Diabetes. *Diabetes Metab J* 2012;36:190. <https://doi.org/10.4093/DMJ.2012.36.3.190>.
- [152] Beyer AM, Weihrauch D. Hexosamine pathway activation and O-linked-N-acetylglucosamine - Novel mediators of endothelial dysfunction in hyperglycemia and diabetes. *Vascul Pharmacol* 2012;56:113–4. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2012.01.005>.

- [153] Beleznai T, Bagi Z. Activation of hexosamine pathway impairs nitric oxide (NO)-dependent arteriolar dilations by increased protein O-GlcNAcylation. *Vascul Pharmacol* 2012;56:115–21. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2011.11.003>.
- [154] Primer KR, Psaltis PJ, Tan JTM, Bursill CA. The Role of High-Density Lipoproteins in Endothelial Cell Metabolism and Diabetes-Impaired Angiogenesis. *Int J Mol Sci* 2020;21. <https://doi.org/10.3390/IJMS21103633>.
- [155] Villalobos-Labra R, Subiabre M, Toledo F, Pardo F, Sobrevia L. Endoplasmic reticulum stress and development of insulin resistance in adipose, skeletal, liver, and foetoplacental tissue in diabetes. *Mol Aspects Med* 2019;66:49–61. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2018.11.001>.
- [156] Dong Y, Fernandes C, Liu Y, Wu Y, Wu H, Brophy ML, et al. Role of endoplasmic reticulum stress signalling in diabetic endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Diab Vasc Dis Res* 2017;14:14–23. <https://doi.org/10.1177/1479164116666762>.
- [157] Gora IM, Ciechanowska A, Ladyzynski P. NLRP3 Inflammasome at the Interface of Inflammation, Endothelial Dysfunction, and Type 2 Diabetes. *Cells* 2021;10:1–29. <https://doi.org/10.3390/CELLS10020314>.
- [158] Wan Z, Fan Y, Liu X, Xue J, Han Z, Zhu C, et al. NLRP3 inflammasome promotes diabetes-induced endothelial inflammation and atherosclerosis. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2019;12:1931–42. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S222053>.
- [159] Wang L, Chen Y, Li X, Zhang Y, Gulbins E, Zhang Y, et al. Enhancement of endothelial permeability by free fatty acid through lysosomal cathepsin B-mediated Nlrp3 inflammasome activation. *Oncotarget* 2016;7:73229–41. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.12302>.
- [160] Chen Y, Li X, Boini KM, Pitzer AL, Gulbins E, Zhang Y, et al. Endothelial Nlrp3 inflammasome activation associated with lysosomal destabilization during coronary arteritis. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:396–408. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2014.11.012>.
- [161] Liu Y, Li C, Yin H, Zhang X, Li Y, Yi Y-S. NLRP3 Inflammasome: A Potential Alternative Therapy Target for Atherosclerosis 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1561342>.
- [162] Arend WP, Palmer G, Gabay C. IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev* 2008;223:20–38. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2008.00624.X>.

- [163] Banerjee M, Saxena M. Interleukin-1 (IL-1) family of cytokines: role in type 2 diabetes. Clin Chim Acta 2012;413:1163–70. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2012.03.021>.
- [164] Bitto A, Altavilla D, Pizzino G, Irrera N, Pallio G, Colonna MR, et al. Inhibition of inflammasome activation improves the impaired pattern of healing in genetically diabetic mice. Br J Pharmacol 2014;171:2300. <https://doi.org/10.1111/BPH.12557>.
- [165] Coll RC, Hill JR, Day CJ, Zamoshnikova A, Boucher D, Massey NL, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition. Nat Chem Biol 2019;15:556–9. <https://doi.org/10.1038/S41589-019-0277-7>.
- [166] Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, et al. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. J Cell Biol 2009;187:61–70. <https://doi.org/10.1083/JCB.200903124>.
- [167] Lee HM, Kim JJ, Kim HJ, Shong M, Ku BJ, Jo EK. Upregulated NLRP3 inflammasome activation in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2013;62:194–204. <https://doi.org/10.2337/DB12-0420>.
- [168] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983;65:55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [169] Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. Clin Biochem 2004;37:112–9. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2003.10.014>.
- [170] Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005;38:1103–11. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2005.08.008>.
- [171] Rajaraman B, Ramadas N, Krishnasamy S, Ravi V, Pathak A, Devasena CS, et al. Hyperglycaemia cause vascular inflammation through advanced glycation end products/early growth response-1 axis in gestational diabetes mellitus. Mol Cell Biochem 2019;456:179–90. <https://doi.org/10.1007/S11010-019-03503-0>.
- [172] Eriksson L, Nyström T. Antidiabetic agents and endothelial dysfunction - beyond glucose control. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2015;117:15–25. <https://doi.org/10.1111/BCPT.12402>.

- [173] Charlton A, Garzarella J, Jandeleit-Dahm KAM, Jha JC. Oxidative Stress and Inflammation in Renal and Cardiovascular Complications of Diabetes. *Biology (Basel)* 2021;10:1–18. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10010018>.
- [174] Santilli F, D'Ardes D, Davì G. Oxidative stress in chronic vascular disease: From prediction to prevention. *Vascul Pharmacol* 2015;74:23–37. <https://doi.org/10.1016/J.VPH.2015.09.003>.
- [175] Lakota K, Mrak-Poljšak K, Rozman B, Kveder T, Tomšič M, Sodin-Semrl S. Serum Amyloid A Activation of Inflammatory and Adhesion Molecules in Human Coronary Artery and Umbilical Vein Endothelial Cells. <Http://DxDoiOrg/101177/1721727X0700500203> 2007;5:73–81. <https://doi.org/10.1177/1721727X0700500203>.
- [176] Han J, Mandal AK, Hiebert LM. Endothelial cell injury by high glucose and heparanase is prevented by insulin, heparin and basic fibroblast growth factor. *Cardiovasc Diabetol* 2005;4. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-4-12>.
- [177] Di Tomo P, Lanuti P, Di Pietro N, Baldassarre MPA, Marchisio M, Pandolfi A, et al. Liraglutide mitigates TNF- α induced pro-atherogenic changes and microvesicle release in HUVEC from diabetic women. *Diabetes Metab Res Rev* 2017;33. <https://doi.org/10.1002/DMRR.2925>.
- [178] Han J, Mandal AK, Hiebert LM. Cardiovascular Diabetology Endothelial cell injury by high glucose and heparanase is prevented by insulin, heparin and basic fibroblast growth factor 2005. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-4-12>.
- [179] Qiu D, Zhang L, Zhan J, Yang Q, Xiong H, Hu W, et al. Hyperglycemia Decreases Epithelial Cell Proliferation and Attenuates Neutrophil Activity by Reducing ICAM-1 and LFA-1 Expression Levels. *Front Genet* 2020;11:616988. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.616988/BIBTEX>.
- [180] Sank A, Wei D, Reid J, Ertl D, Nimni M, Weaver F, et al. Human endothelial cells are defective in diabetic vascular disease. *J Surg Res* 1994;57:647–53. <https://doi.org/10.1006/JSRE.1994.1195>.
- [181] Abu-Saleh N, Yaseen H, Kinaneh S, Khamaisi M, Abassi Z. Combination of hyperglycaemia and hyperlipidaemia induces endothelial dysfunction: Role of the endothelin and nitric oxide systems. 1884 | *J Cell Mol Med* 2021;25:1884–95. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15787>.

- [182] Shadboorestan A, Eftekhari S, Mottaghi-Dastjerdi N, Shahparvari R, Tarighi P, Jahandar H, et al. Metformin exerts synergistic anti-proliferative effects with liraglutide in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Iran J Basic Med Sci* 2022;25:506. <https://doi.org/10.22038/IJBMS.2022.64117.14117>.
- [183] Di Tomo P, Alessio N, Falone S, Pietrangelo L, Lanuti P, Cordone V, et al. Endothelial cells from umbilical cord of women affected by gestational diabetes: A suitable in vitro model to study mechanisms of early vascular senescence in diabetes. *The FASEB Journal* 2021;35:e21662. <https://doi.org/10.1096/FJ.202002072RR>.
- [184] Patel VA, Longacre A, Hsiao K, Fan H, Meng F, Mitchell JE, et al. Apoptotic cells, at all stages of the death process, trigger characteristic signaling events that are divergent from and dominant over those triggered by necrotic cells: Implications for the delayed clearance model of autoimmunity. *J Biol Chem* 2006;281:4663–70. <https://doi.org/10.1074/JBC.M508342200>.
- [185] Sagulenko V, Thygesen SJ, Sester DP, Idris A, Cridland JA, Vajjhala PR, et al. AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC. *Cell Death Differ* 2013;20:1149. <https://doi.org/10.1038/CDD.2013.37>.
- [186] Pal PB, Sonowal H, Shukla K, Srivastava SK, Ramana K V. Aldose reductase regulates hyperglycemia-induced HUVEC death via SIRT1/AMPK- α 1/mTOR pathway. *J Mol Endocrinol* 2019;63:11. <https://doi.org/10.1530/JME-19-0080>.
- [187] Ciechanowska A, Gora IM, Sabalinska S, Ladyzynski P. The Effect of High and Variable Glucose on the Viability of Endothelial Cells Co-Cultured with Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci* 2022;23. <https://doi.org/10.3390/IJMS23126704>.
- [188] Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.2001.281.5.E924/ASSET/IMAGES/LARGE/H11110562008.JPEG>.
- [189] Cao J, Jiang X, Peng X. Forkhead box M1 inhibits endothelial cell apoptosis and cell-cycle arrest through ROS generation. *Int J Clin Exp Pathol* 2018;11:4899.
- [190] Demidenko ZN, Kalurupalle S, Hanko C, Lim CU, Broude E, Blagosklonny M V. Mechanism of G1-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle

- p53-dependent arrest with sub G1 DNA content mediated by prolonged mitosis. *Oncogene* 2008 27:32 2008;27:4402–10. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.82>.
- [191] Crosby ME. *Cell Cycle: Principles of Control*. Yale J Biol Med 2007;80:141.
- [192] Jojima T, Uchida K, Akimoto K, Tomotsune T, Yanagi K, Iijima T, et al. Liraglutide, a GLP-1 receptor agonist, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation by enhancing AMP-activated protein kinase and cell cycle regulation, and delays atherosclerosis in ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 2017;261:44–51. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2017.04.001>.
- [193] Role of Oxidative Stress and Inflammatory Factors in Diabetic Kidney Disease - PubMed n.d. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27903991/> (accessed November 16, 2023).
- [194] Le Y, Wei R, Yang K, Lang S, Gu L, Liu J, et al. Liraglutide ameliorates palmitate-induced oxidative injury in islet microvascular endothelial cells through GLP-1 receptor/PKA and GTPCH1/eNOS signaling pathways. *Peptides (NY)* 2020;124. <https://doi.org/10.1016/J.PEPTIDES.2019.170212>.
- [195] Batchuluun B, Inoguchi T, Sonoda N, Sasaki S, Inoue T, Fujimura Y, et al. Metformin and liraglutide ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKC-NAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 2014;232:156–64. <https://doi.org/10.1016/J.ATHEROSCLEROSIS.2013.10.025>.
- [196] Ma G, Liu Y, Wang Y, Wen Z, Li X, Zhai H, et al. Liraglutide reduces hyperglycemia-induced cardiomyocyte death through activating glucagon-like peptide 1 receptor and targeting AMPK pathway. *J Recept Signal Transduct Res* 2020;40:133–40. <https://doi.org/10.1080/10799893.2020.1719517>.
- [197] Okada K, Kotani K, Yagyu H, Ando A, Osuga J ichi, Ishibashi S. Effects of treatment with liraglutide on oxidative stress and cardiac natriuretic peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine* 2014;47:962. <https://doi.org/10.1007/S12020-014-0246-6>.
- [198] Wan Z, Fan Y, Liu X, Xue J, Han Z, Zhu C, et al. NLRP3 inflammasome promotes diabetes-induced endothelial inflammation and atherosclerosis 2019. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S222053>.

- [199] Wang J, Shen X, Liu J, Chen W, Wu F, Wu W, et al. High glucose mediates NLRP3 inflammasome activation via upregulation of ELF3 expression. *Cell Death & Disease* 2020 11:5 2020;11:1–14. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-2598-6>.
- [200] Wang X, Wang W, Zhang R, Ma B, Ni L, Feng H, et al. Melatonin attenuates high glucose-induced endothelial cell pyroptosis by activating the Nrf2 pathway to inhibit NLRP3 inflammasome activation. *Mol Med Rep* 2023;27. <https://doi.org/10.3892/MMR.2023.12958>.



HAM VERİLER

FORMLAR



İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

GLP-1 AGONİSTİ LİRAGLUTİD'İN YÜKSEK GLUKOZ İLE İNDÜKLENEN İNFLAMASYON, OKSİDATİF STRES VE NLRP3 İLE İLİŞKİLİ SİNYAL YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 18	% 17	% 4	% 6
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 11
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	fullsepp.com İnternet Kaynağı	<% 1
6	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<% 1
8	tez.sdu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1