



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA ANTİDİYABETİK
LİRAGLUTİDE VE EMPAGLİFLOZİNİN OKSİDATİF STRES,
İNFLAMATUAR YANIT VE KARDİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. CEMRE UÇAR EKİN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DİYARBAKIR-2023



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

**DENEYSEL DİYABETİK RATLARDA ANTİDİYABETİK
LİRAGLUTİDE VE EMPAGLİFLOZİNİN OKSİDATİF STRES,
İNFLAMATUAR YANIT VE KARDİYOPROTEKTİF
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DR. CEMRE UÇAR EKİN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman: PROF. DR. HÜDA OFLAZOĞLU DİKEN

DİYARBAKIR-2023

TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm, tezimin gerçekleşmesinde büyük yardım ve katkıları olan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Hüda OFLAZOĞLU DİKEN'e,

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Mustafa KELLE, Prof. Dr. Mukadder BAYLAN, Prof. Dr. Mehmet AYBAK, Prof. Dr. Basra DENİZ OBAY ve Prof. Dr. H. Murat BİLGİN'e,

Tez çalışmamda histolojik inceleme yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Engin DEVECİ'ye, biyokimyasal analizlerin yapımında her türlü desteği sağlayan Prof. Dr. İbrahim KAPLAN'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, anabilim dalı çalışanlarımıza,

Hayatım boyunca bana hep destek olan ve her kararında yanımda olan, karşılıksız sevgilerini her zaman hissettiğim canım aileme,

Varlığıyla bana güç veren, en büyük destekçim olan yol arkadaşım, canım eşim Aykut'a ve dünyamı renkten renge boyayan canım oğlum Deniz'e sonsuz teşekkürler.

ÖZET

TÜRKÇE ÖZET

Amaç: Antidiyabetik liraglutid ve empagliflozinin diyabetes mellitus'lu (DM) ratlarda oksidatif stres ve inflamasyonun bazı belirteçleri ile kardiyovasküler komplikasyonlar üzerine etkilerini araştırmayı ve bu etkiler bakımından iki ilacı karşılaştırmayı amaçladık.

Gereç ve yöntem: 37 adet erkek Wistar albino sıçan 4 gruba ayrıldı. 1) Sağlıklı kontrol (n=7), 2) DM kontrol (n=10), 3) DM + Liraglutid (n=10) bu gruptaki sıçanlara 0.6 mg/kg liraglutid subkutan olarak uygulandı, 4) DM+ Emapagliflozin(n=10) grubu, bu gruptaki ratlara 30 mg/kg dozunda empagliflozin oral gavaj yoluyla verildi. DM gruplarına, 110 mg/kg dozunda intraperitoneal (ip) nikotinamid (NA) enjekte edildi, 15 dk sonra 60 mg/kg dozunda i.p STZ enjeksiyonu yapılarak diyabet oluşturuldu. 8 hafta boyunca liraglutide ve empagliflozin tedavileri uygulandı ve deney sonunda son ağırlıkları ve açlık kan şekerleri ölçüldükten sonra ketamin ve ksilazin anestezisi altında vena caudalisten kan alınarak eksanguinasyon yoluyla sıçanlar feda edildi. Alınan kan örneklerinden TNF- α , IL-1, MDA, SOD, AGE, insülin seviyelerine bakıldı. Doku olarak ise kalp ve koroner arterler alındı ve histopatolojik olarak incelendi.

Bulgular: DM kontrol grubu sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında kanda diyabete bağlı beklenen değişikliklerin oluştuğu, AKŞ, AGE, IL-1, TNF- α ve MDA seviyelerinin anlamlı olarak arttığı, insülin ve SOD düzeylerinin ise azaldığı saptandı. Liraglutid ve empagliflozin tedavisinin kan glukoz seviyelerini sağlıklı kontrol ile yakın seviyelere düşürdüğü gözlemlendi. Her iki ilacın da TNF- α , IL-1, AGE, MDA seviyelerini önemli ölçüde düşürürken SOD ve insülin seviyelerini yükselttiği gözlemlendi. Histopatolojik olarak yapılan incelemede her iki ilacın da miyokard ve koroner arter dokusunda DM'nin meydana getirdiği yapısal değişiklikleri, fibrozisi, inflamasyonu önemli ölçüde iyileştirdiği, empagliflozinin miyokard üzerindeki iyileştirici etkisinin liraglutide göre daha fazla olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Liraglutid ve empagliflozin DM’nin neden olduğu ölümlerin başlıca sebebi olan kardiyovasküler komplikasyonlar üzerinde olumlu etki göstermiştir. Bu komplikasyonların patogenezinde önemli rol oynayan oksidatif stres ve inflamasyonu hafiflettiği, kardiyak ve koroner arter yapısını koruduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak her iki ilacın da DM hastalarında kardiyovasküler komplikasyon gelişmesini nleyebileceğini söyleyebiliriz.



ABSTRACT

Aim: We aimed to investigate the effects of antidiabetic liraglutid and evpagliflozine on some markers of oxidative stress and inflammation in diabetes mellitus (DM) and to compare two drugs in terms of these effects.

Materials and Methods: 37 male Wistar albino rats were divided into 4 groups. 1) Healthy control (n=7), 2) DM control (n=10), 3) DM + Liraglutide (n=10) 0.6 mg/kg liraglutide was administered subcutaneously to rats in this group, 4) DM + Empagliflozin (n=10)) group was given empagliflozin at a dose of 30 mg/kg to the rats in this group by oral gavage. In the DM groups, 110 mg/kg intraperitoneal (ip) nicotinamide (NA) was injected, and after 15 minutes, 60 mg/kg i.p STZ injection was made to induce diabetes. Liraglutide and empagliflozin treatments were applied for 8 weeks, and after the final weights and fasting blood glucose were measured at the end of the experiment, the rats were sacrificed by cardiac puncture under ketamine and xylazine anesthesia. TNF- α , IL-1, MDA, SOD, AGE and insulin levels were measured from the blood samples taken. The heart and coronary arteries were taken as tissue and examined histopathologically.

Results: When the DM Control Group was compared with healthy controls, it was found that the expected changes in the blood occurred in the blood, and the levels of the FBS, AGE, IL-1, TNF- α and MDA increased significantly and insulin and SOD levels decreased. Liraglutide and empagliflozin treatment decreased blood glucose levels to close levels with healthy control. It was observed that both drugs significantly reduce TNF- α , IL-1, AGE, MDA levels while increasing sod and insulin levels. Histopathological examination of both drugs in the myocardial and coronary artery tissue caused by DM's structural changes, fibrosis, inflammation significantly improved, empagliflozine on myocardial healing effect was observed to be more than liraglutide.

Conclusion: Liraglutid and Empagliflozin showed a positive effect on cardiovascular complications, the main cause of deaths caused by DM. It has been observed that these complications alleviate oxidative stress and inflammation that play an important role in pathogenesis and maintain the cardiac and coronary

artery structure. As a result, we can say that both drugs can prevent cardiovascular complications in DM patients.



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
TÜRKÇE ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
RESİMLER LİSTESİ.....	xii
TABLolar LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Diabetes Mellitus	4
2.1.1. Epidemiyoloji	5
2.1.2. Sınıflandırması	7
2.1.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus	7
2.1.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus	7
2.1.2.2.1.Fizyopatolojisi	8
2.1.2.2.2.Risk Faktörleri	10
2.1.2.3. Gestasyonel Diyabet (GDM).....	10
2.1.2.4. Diğer Spesifik Nedenlere Bağlı Diabetes Mellitus.....	11
2.1.2. Tanı Kriterleri.....	11
2.1.3. Klinik Bulgular	12
2.1.4. Komplikasyonları.....	12
2.1.4.2. Akut Komplikasyonları	12
2.1.4.2.2. Kronik Komplikasyonları.....	13
2.1.4.2.3. Makrovasküler Komplikasyonları	14
2.1.4.2.3.1. Kardiyovasküler Komplikasyonlar	14
2.1.4.2.3.2. Serebrovasküler Komplikasyonlar	17
2.1.4.2.3.3. Periferik Arter Hastalığı (PAH).....	17
2.1.4.2.4. Mikrovasküler Komplikasyonları.....	17
2.1.4.2.4.1. Diyabetik Retinopati	17
2.1.4.2.4.2. Diyabetik Nefropati	18
2.1.4.2.4.3. Diyabetik Nöropati	18
2.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE).....	19
2.2.1. AGE Oluşumu.....	20
2.2.2. AGE Reseptörleri.....	22
2.2.3. AGE'nin Doku ve Hücre Düzeyinde Etkileri	24
2.2.4. AGE Ölçüm Yöntemleri	25

2.3. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres.....	26
2.3.1. Diyabet ve Antioksidan savunma.....	30
2.4. Diabetes Mellitus ve İnflamatuvar Yanıt.....	32
2.5. Diyabetes Mellitusta Tedavi.....	34
2.5.1. Beslenme Tedavisi.....	34
2.5.2. Egzersiz Tedavisi.....	35
2.5.3. Medikal Tedavi.....	35
2.5.3.1. İnsülin Salgılatıcı (Sekretagog) İlaçlar (Sülfonilüreler ve Meglitinidler)	36
2.5.3.2. İnsülin Duyarlılaştırıcı (Sensitizer) İlaçlar	36
2.5.3.3. Alfa-Glukozidaz İnhibitörleri.....	37
2.5.3.4. Sodyum Glukoz Transporter-2 İnhibitörleri (SGLT-2 İnhibitörleri)	37
2.5.3.4.1. Empagliflozin	37
2.5.3.5. İncretinmimetik İlaçlar.....	40
2.5.3.5.1. Liraglutid (LİRA)	41
2.5.3.6. İnsülin Tedavisi	43
2.6. Deneysel Tip 2 Diabetes Mellitus Modelleri	44
2.6.1. Nikotinamid (STZ+NA) ve Streptozotosin Kullanılarak Meydana Getirilen Deneysel Tip 2 Diabetes Mellitus Modeli.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Deney Hayvanları	46
3.2. Tip-2 Diyabet Oluşturma	47
3.3. Deney Grupları	49
3.4. Deney Süreci ve ilaç uygulaması	49
3.5. Deneyin sonlandırılması	51
3.6. Kan Numunelerinde Ölçülen Biyokimyasal Parametreler	52
3.7. Doku Takibi	53
3.8. Hematoksilen-Eozin boyama	53
3.9. Masson Trikrom Boyama.....	54
3.10. İstatistiksel Analiz.....	54
4. BULGULAR	56
4.1. Ağırlık Değişimleri	56
4.2. Kan Şekeri Düzeyleri.....	57
4.3. İnsülin Düzeyleri.....	59
4.4. AGE Düzeyleri.....	61
4.5. IL-1 Düzeyleri.....	62
4.6. TNF- α Düzeyleri.....	64
4.7. SOD Düzeyleri.....	65
4.8. MDA Düzeyleri.....	66
4.9. Histopatolojik bulgular	68
4.9.1. Miyokard incelemesi	68

4.9.1.1. Sağlıklı Kontrol grubu.....	68
4.9.1.2. DM kontrol grubu	69
4.9.1.3. DM + Liraglutide grubu	70
4.9.1.4. DM + Empagliflozin grubu	71
4.9.2. Koroner Arter incelemesi.....	72
4.9.2.1. Sağlıklı Kontrol Grubu.....	72
4.9.2.2 DM kontrol Grubu.....	73
4.9.2.3 DM + Liraglutide tedavi grubu	74
4.9.2.4. DM + Empagliflozin tedavi grubu	76
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ.....	84
7. KAYNAKLAR.....	85
8. EKLER.....	106

KISALTMALAR LİSTESİ

- DM:** Diyabetes Mellitus
- T1DM:** Tip 1 diabetes mellitus
- T2DM:** Tip 2 diabetes mellitus
- GDM:** Gestasyonel diabetes mellitus
- LİRA:** Liraglutid
- EMPA:** Empagliflozin
- NA:** Nikotinamid
- STZ:** Streptozotosin
- KAH:** Koroner arter hastalığı
- DKM:** Diyabetik kardiyomiyopati
- TNF- α :** Tümör nekroz faktörü alfa
- SOD:** Süperoksit dismutaz
- MDA:** Malondialdehit
- IL:** İnterlökin
- AGE:** İleri glikasyon son ürünleri
- RAGE:** AGE reseptörleri
- PKC:** Protein kinaz C
- ROT:** Reaktif oksijen türleri
- RAS:** Renin anjiyotensin sisteminin
- IGF-1:** İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
- TGF- β 1:** Dönüştürücü büyüme faktörü beta 1
- SGLT2i:** Sodyum/glikoz kotransporter 2 inhibitörleri
- GLP-1:** Glukagon benzeri peptit 1
- GIP:** Gastrik inhibitör peptid
- IDF:** Uluslararası Diyabet Federasyonu
- IGT:** Açlık glukoz toleransı

GLUT-4: Glukoz taşıyıcı tip 4

HPL: İnsan plasental laktojen hormonu

DKA: Diyabetik ketoasidoz

HHD: Hiperozmolar hiperglisemik durum

LA: Laktik asidoz

MI: Miyokard enfarktüsü

KON: Kardiyak otonom nöropatidir

RAAS: Renin – anjiotensin – aldosteron sistemi

ACEi: Anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri

ARB: Anjiotensin reseptör- 2 blokörü

PAH: Periferik arter hastalığı

ADA: Amerikan Diyabet Derneği

sRAGE: Solubl RAGE

DNAGE: Dominant negatif RAGE

HbA1c: Hemoglobin-A1c

HPLC: Yüksek performanslı likit kromatografisi

ELISA: İmmüno blot enzim-bağlı immunosorbent ölçümü

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

GADPH: Gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz

PKC: Protein kinaz C

CAT: Katalaz

GSH-PX: Glutasyon peroksidaz

GSH-RD: Glutasyon redüktaz

IRS-1: İnsülin reseptör substrat

CRP: C reaktif protein

OAD: Oral antidiyabetik

ACAT1: Açıl-CoA: kolesterol açıltransferaz 1

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Ominous Octet (Uğursuz Sekizli): T2DM gelişimine yol açan 8 patofizyolojik defekt (47).....	10
Şekil 2. AGE Oluşum Yolları (107).	21
Şekil 3. Reseptör alanlarını gösteren RAGE-ligand etkileşimi (122).....	23
Şekil 4. NF- κ B aktivasyonu ve AGE-RAGE etkileşimi sonucu meydana gelen değişiklikler (120).	23
Şekil 5. Gliko oksidatif stres yolakları: yüksek kan glukozu durumunda glikolizin aktivitesi azalır. Glikolizin hız kısıtlayıcı enzimlerinden olan gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz (GADPH), reaktif türevlerin yükselişini takiben inhibe olur ve glikoz alternatif yollara yönelebilir. Bunlar; 1) polyol yolağı, 2) heksozamin yolağı, 3) PKC aktivasyonu, 4) AGE üretimi, 5) Enodiol yolağıdır. Bu yolakların aktivitesinin artması, hücrede reaktif türevlerin artışına sebebiyet verir (142). ...	29
Şekil 6. Hücre çoğalması ve sağkalımı ile insülin direncinin inflamasyonda eş dönemli indüklenmesi. Aktive edilmiş immün sistem hücreleri, NF- κ B yoluyla hücre çoğalması ile sağkalımını, JNK yoluyla ROT ile insülin direncini indükleyen sitokinlerin salınmasını sağlar. Önleyici etkiler biten çizgilerle ve pozitif etkiler oklarla belirtilmiştir (177).	34
Şekil 7. DM'nin medikal tedavisi	36
Şekil 8. Proksimal tübüler epitel hücresi aracılığıyla glomerüler filtrattan glukozun yeniden emilim işleyişi (ATPaz, Adenozin trifosfataz; SGLT, sodyum glukoz ortak taşıyıcı (SGLT2 genellikle S1 ile S3 segmentlerinde, SGLT1 ise S3 segmentinde bulunmaktadır); GLUT, Glukoz taşıyıcı;) (190).....	38
Şekil 4.1. Grupların İlk ve Son Ağırlık Değişimlerinin Grafiği	57
Şekil 4.2. Grupların İlk ve Son Hafta Kan Şekeri Değişimlerinin Grafiği	58
Şekil 4.3. Grupların İnsülin Düzeyi Grafiği	60
Şekil 4.4. Grupların AGEs Düzeyi Grafiği	62
Şekil 4.5. Grupların IL-1 Düzeyi Grafiği	63
Şekil 4.6. Grupların TNF- α Düzeyi Grafiği.....	65
Şekil 4.7. Grupların SOD Düzeyi Grafiği.....	66
Şekil 4.8. Grupların MDA Düzeyi Grafiği	68

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1. İntraperitoneal STZ ve NAD uygulaması.....	48
Resim 3.2. Kan şekeri ölçümü.....	48
Resim 3.3. Subkutan Liraglutid enjeksiyonu.....	50
Resim 3.4. Oral gavaj ile Empagliflozin uygulaması	50
Resim 3.5. Abdominal aortadan kan alınması	51
Resim 3.6. Kan ve doku örneklerinin toplanması.....	52
Resim 4.1. Sağlıklı kontrol grubuna ait miyokard dokusu. Merkezi yerleşimli nükleus (siyah ok) ve diskus interkalaris (kırmızı ok) (H&E boyama).....	69
Resim 4.2. Sağlıklı kontrol grubu miyokard dokusu. Nükleusu merkezi yerleşimli (siyah ok) normal kardiyomiyositler (Masson Trikrom boyama).....	69
Resim 4.3. DM kontrol grubu miyokard dokusu. Lökosit infiltrasyonu (yıldız), vasküler konjesyon (asteriks), ödem (kırmızı ok) (H&E boyama).....	70
Resim 4.4. DM kontrol grubu miyokard dokusu. Kardiyomiyositlerde dejenerasyon (siyah ok), damarların çevresinde fibrozis (kırmızı ok) (Masson Trikrom boyama).	70
Resim 4.5. DM + Liraglutide tedavi grubu miyokard dokusu kardiyomiyositlerde dejenerasyon (siyah ok), damarlarda konjesyon (asteriks) (H&E boyama).....	71
Resim 4.6. DM + Liraglutide tedavi grubu miyokard dokusu. İnflamasyon (siyah ok), fibrozis (kırmızı ok) (Masson trikrom boyama).....	71
Resim 4.7. DM + Empagliflozin tedavi grubu miyokard dokusu. Kardiyomiyositlerde necrosis (siyah ok), damar dilatasyonu ve konjesyonun (kırmızı ok) (H&E boyama).	72
Resim 4.8. DM + Empagliflozin tedavi grubu miyokard dokusu Fibrozis (kırmızı ok) (Masson trikrom boyama).	72
Resim 4.9. Sağlıklı kontrol grubu koroner arter Endotel tabakasının yassı olduğu (siyah ok), media tabakasının normal görünümde (asteriks) (H&E boyama).	73
Resim 4.10. Sağlıklı kontrol grubu koroner arter. Adventisya tabakası (asteriks) (Masson Trikrom boyama).	73
Resim 4.11. DM kontrol grubu koroner arter Endotel hücreleri (siyah ok) ve elastik liflerinin (kırmızı ok) dejenere olduğu, adventisya tabakasında lökosit infiltrasyonu (asteriks) (H&E boyama).	74
Resim 4.12. DM kontrol grubu koroner arter. İnflamasyon (siyah ok) ve fibrozis (asteriks) (Masson Trikrom boyama).	74
Resim 4.13. DM + Liraglutide tedavi grubu koroner arter. Endotel hücrelerinin normal olduğu (siyah ok), elastik lif (asteriks) (H&E boyama).	75
Resim 4.14. DM + Liraglutide tedavi grubu koroner arter Vaza vazorumlarda vasküler dilatasyon /konjesyon (asteriks) ve fibrozis (mavi ok) (Masson Trikrom boyama).	75
Resim 4.15. DM + Empagliflozin tedavi grubu koroner arter. Endotel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (siyah ok), tunika mediada elastik lif (asteriks) (H&E boyama).	76
Resim 4.16. DM + Empagliflozin tedavi grubu koroner arter. Adventisyal tabakada kollajen lifler (siyah ok) ve fibrozis (mavi ok) (Masson trikrom boyama).	77

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. DM Tanı Kriterleri (5).	11
Tablo 2. Grupların ilk ve son Ağırlıklarının Karşılaştırması	57
Tablo 3. Grupların İlk ve Son Hafta Kan Şekeri Değerleri (mg/dL)	58
Tablo 4. Son Hafta Ölçülen Kan Şekeri Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırması.....	59
Tablo 5. Gruplara Ait İnsülin Değerleri (mU/L).....	60
Tablo 6. Gruplara ait AGEs Değerleri (ng/L)	61
Tablo 7. Gruplar Arasında IL-1 Değerleri Karşılaştırması (ng/L).....	63
Tablo 8. Gruplar ait TNF- α Değerleri (ng/ml).....	64
Tablo 9. Gruplar Arasında SOD Değerleri Karşılaştırması (ng/ml)	66
Tablo 10. Gruplar Arasında MDA Değerleri Karşılaştırması (nmol/ml).....	67

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), vücutta insülinin eksikliği veya yokluğunda meydana gelen kronik hiperglisemi ile karakterize, vücudun insüline tam olarak yanıt veremediği metabolik bir hastalıktır. DM, artış hızı, sıklığı ve yol açtığı sorunlar nedeniyle ülkemizde ve dünyada önemli bir sağlık sorunudur. Yaygın olarak kabul edilen dört ana DM formu vardır. Bunlar Tip 1 diabetes mellitus (T1DM), tip 2 diabetes mellitus (T2DM), gestasyonel diabetes mellitus (GDM) ile öteki spesifik nedenlere bağlı DM'dir. Bunların arasında T2DM, tüm DM vakalarının yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır (1,2).

Diyabet; yüksek tedavi maliyetleri nedeniyle ülke ve birey ekonomilerini kötü etkileyen, çeşitli komplikasyonları olan küresel bir sağlık sorunudur. Hiperglisemi kontrol altına alınmadığında insan vücudundaki birden fazla organ ve sisteme zarar verebilir ve zamanla ciddi komplikasyonlara neden olabilir. DM'nin neden olduğu komplikasyonlar mikrovasküler ve makrovasküler olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Mikrovasküler komplikasyonlar içinde nefropati, nöropati ve retinopati bulunur. Makrovasküler komplikasyonlar içinde inme, kardiyovasküler hastalıklar ve periferik arter hastalığı bulunmaktadır (3). DM hastalarındaki tüm ölümlerin %65'ini oluşturan koroner arter hastalığı (KAH), inme ve diyabetik kardiyomiyopati (DKM) gibi çeşitli kardiyovasküler komplikasyonlarla yaygın olarak ilişkilidir (4). DM hastalarında mortalite ve morbiditenin başlıca sebebi kardiyovasküler sistem hastalıklarıdır (5). DM, kardiyovasküler hastalık riskini iki katına çıkarır. Bu sebeple, son yıllarda antidiyabetik ilaçlarda yapılan klinik çalışmalarda sadece hipoglisemik faydalara değil, kardiyovasküler güvenlik ve kardiyoprotektif etkilere de odaklanılmaktadır (7)

Diyabetin kardiyovasküler komplikasyonlara neden olduğu mekanizma yeterince açık değildir, fakat endotel disfonksiyonun etkisinin olduğu bilinmektedir (8). Endotel fonksiyonunun bozulması endotelin önemli bir görevi olan trombosit adezyonu, vasküler tonus, fibrinoliz, inflamasyon ve vasküler proliferasyonu düzenleyen lokal mediyatörlerin salgılanmasını engeller. Bu da

vasküler homeostazın bozulmasına yol açar ve kardiyovasküler risk oluşturur (9). DM hastalarında artan oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt, endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir (10).Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interlökin-1(IL-1) ve endotoksin dahil olmak üzere inflamatuvar mediatörler, endotelial hücre fonksiyonlarını değiştirir ve aktive eder. Bu, endotel hücrelerinin yüzeyinde adezyon molekülü ekspresyonuna, sitokin ve kemokin salgılanmasına ve subendotelial tabakada LDL kolesterol oksidasyonuna neden olan reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimine yol açar (11). DM hastalarında IL-1 ve TNF- α gibi sitokinlerin düzeyi yükselir ve inflamasyon tetiklenir. Artan inflamatuvar yanıt sonucunda yükselen lökosit sayısı da oksidatif stres düzeyinin artışına katkı sağlar. Ayrıca hiperglisemi; ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) üretiminde artış, AGE reseptörlerinin (RAGE) artan ekspresyonu, poliol, heksozamin ve protein kinaz C (PKC) yollarının aktivasyonunu içeren çeşitli hücresel mekanizmalarla da oksidatif stresi artırarak vasküler yatağa zarar vermektedir (12). DM’de antioksidan enzim seviyelerinde azalma, oksidatif stres parametrelerinde artış olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1,13). AGE’ler nonenzimatik olarak hiperglisemi sonucu artmış glukozun protein, lipid, nükleik asitlere bağlanmasıyla veya artmış oksidatif stres sonucu glukozun ve lipidlerin oksidasyonuyla AGE öncülü olan dikarbonil bileşiklerinin meydana gelmesiyle oluşabilir. AGE oluşumu diyabetik koşullarda artan oksidatif strese bağlı olarak artar ve artmış AGE seviyeleri de tekrar oksidatif stresin artmasına sebep olur. Yani oksidatif stres ve AGE oluşumu birbirini tetikler. AGE’ler; DM hastalarında aterosklerozun hızlanmasında etkili olan inflamasyon ve endotel fonksiyonu üzerinde önemli etkiye sahiptirler (14,15). Artmış inflamatuvar yanıt ve oksidatif stres; insülin direncine ve endotel disfonksiyonuna neden olur. İnflamasyondaki artış, antioksidan enzim aktivitesindeki yetersizlik ve oksidan uyarı devam ederse süreç süratle aterosklerotik plaktan KAH’a kadar ilerleyebilir (16-18).

Diyabetli bireylerde KAH, hipertansiyon ve önemli kapak hastalığı gibi diğer kardiyak risk faktörlerinin yokluğunda anormal miyokardiyal yapının ve fonksiyonun varlığı ile tanımlanan DKM diyabetin önemli bir kardiyovasküler komplikasyonudur (19,20). DKM’nin altında yatan patofizyolojik mekanizmalar arasında aşırı ROT üretimi, apoptoz, miyokardiyal renin anjiyotensin sisteminin

(RAS), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ile dönüştürücü büyüme faktörü beta 1 (TGF- β 1)'in aşırı aktivitesi, kollajen birikimi ve fibrozis yer alır (21,22). Yapılan bazı çalışmalar; hiperglisemiyle artan ROT diyabetik ratların sol ventrikülünde kontraktil fonksiyonu bozduğunu ve miyokardiyal fibroze neden olduğunu bildirmiştir (23,24). Bu nedenle, fibrozis, inflamasyon, apoptoz ve oksidatif stresi modüle etmeyi amaçlayan stratejiler, DKM yönetiminde etkili olabilir.

Günümüzde DM tedavisinde sodyum/glikoz kotransporter 2 inhibitörleri (SGLT2i) adı verilen yeni bir ilaç sınıfı kullanılmaktadır. Çeşitli deneysel çalışmalar, SGLT2i'nin antihiperglisemik etkilerinden bağımsız olarak faydalı kardiyovasküler etkileri olduğunu göstermiştir (25-27). Ayrıca, glukagon benzeri peptit 1 (GLP-1), insülini uyaran ve glukagon sekresyonunu baskılayan, mide boşalmasını engelleyen ve iştahı ve gıda alımını azaltan bağırsaktan türetilen bir inkretin hormonudur. Inkretin etkisini arttırmaya yönelik terapötik yaklaşımlar arasında, yarılanma ömrü daha uzun olan GLP-1 analogları (liraglutide) yer alır. Önceki çalışmalar, GLP-1'in hiperglisemiye iyileştirerek, kan basıncını düşürerek, makrofaj infiltrasyonunu azaltarak (28) ve vasküler inflamasyonu (29) ve endotel disfonksiyonunu iyileştirerek (30) aterosklerotik lezyonları koruyabildiğini ortaya koydu.

GLP-1 analogları ve SGLT-2İ diyabete bağlı kalp hastalıklarına karşı kardiyoprotektif etkileri olduğu ileri sürülen iki modern antidiyabetik ilaçtır (31).

Bu iki ilacın kardiyak etkileri çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda ayrı ayrı incelenmiştir. Ancak, bu ilaçların kardiyak etkilerinin yanı sıra kardiyovasküler olaylarda etkisi olan inflamasyon belirteçleri, oksidatif stres, kan glukozu ve kardiyak histopatoloji ile ilişkili parametrelerin birlikte incelendiği çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, streptozotosin (STZ) ve nikotinamid (NA) ile oluşturulacak deneysel diyabet modelinde; GLP-1 analogu olan liraglutid (LİRA) ile SGLT-2İ olan empagliflozinin (EMPA), oksidatif stres, inflamasyon yanıtı ve kardiyak histopatolojiye etkilerini incelemek, bu parametreler açısından iki ilacı karşılaştırarak olası kardiyoprotektif etkilerini değerlendirmek amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus

DM, insülin eksikliği ya da insülin aktivitesindeki bozukluklar sebebiyle organizmanın protein, yağ ve karbonhidratlardan yeteri düzeyde yarar sağlamadığı, kronik, sürekli tıbbi bakım ihtiyacı olan, geniş spektrumlu bir metabolizma bozukluğudur (5). DM gelişiminde farklı patojenik mekanizmalar rol oynar. Pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu insülin eksikliğinden, dokularda insülin etkisine dirence sebep olan bir dizi anormalliğe kadar uzanır. Temel anormallik insülinin hedef dokulardaki yetersiz etkinliğidir, bu insülin sekresyonundaki eksiklik veya hedef organlardaki insülin etkisine cevapsızlık nedeniyle olmaktadır (32). Tip 2 DM patofizyolojisinde periferik insülin direnci ve pankreas beta hücrelerinde yetersiz insülin sekresyonu yer alır. Aynı zamanda patofizyolojide glukagon fazlalığının yeri de göz ardı edilmemelidir. Tip 2 DM’de glukagon sekresyonu yapan alfa hücreleriyle insülin sekresyonu yapan beta hücreleri arasındaki denge bozulmuştur (33). Bu da hiperglukagonemiyle birlikte hiperglisemiye yol açar. Poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı gibi semptomlar hiperglisemiye işaret eden sık görülen semptomlardır. İnatçı enfeksiyonlar, büyüme gelişme bozuklukları gibi daha az görülen klinik durumlar da kronik hiperglisemiden kaynaklanabilir. Hiperozmolar hiperglisemik durum (HHD) ve Diyabetik ketoasidoz (DKA) DM’nin akut ve hayatı tehdit eden komplikasyonlarıdır. Uzun dönemde ise mikrovasküler (nefropati, nöropati, retinopati) ile makrovasküler (periferik damar hastalığı, serebrovasküler hastalık, aterosklerotik kalp hastalığı vs.) komplikasyonlar DM’ye eşlik eder (32).

T1DM’de insülinin üretimi defektlidir ve mutlak eksikliği vardır. Tüm DM hastalarının %5-10’unu oluşturmaktadır. Olguların %90’lık kısmında otoimmün, %10’unda non- otoimmün (idyopatik) β -hücre yıkımı görülmektedir. Genetik eğilimi bulunan bireylerde tetikleyici çevresel etkiler (virüsler, emosyonel stres, toksinler) sebebiyle otoimmünite uyarılır ve ilerleyen β -hücre yıkımı başlamış olur. β -hücre rezervinin %80 ila %90’ı yitirildiğinde DM semptomları görülmeye başlar. Otoimmünitenin başlangıcı olan evre 1 ile evre 2 çoğunlukla

asemptomatikken, 3. evrede ise klinik semptomlar ile hiperglisemi ortaya çıkar (5).

Gebelik haftası arttıkça artan östrojen ve kortizol seviyeleri özellikle 2 ve 3. trimesterde insülin direncine sebebiyet verebilmektedir. Genetik yatkınlığı ya da risk faktörleri bulunan gebelerde ilk prenatal ziyarette GDM ya da gestasyonel glukoz intoleransı varlığı araştırılmalıdır. Genellikle semptomsuzdur ve oral glukoz tolerans testi ile tespit edilir. Gebeliğin sonlanmasından sonra çoğunlukla düzelmekle birlikte sonraki gebeliklerde de genellikle tekrarlayan bir durumdur. Altta yatan bir β hücre fonksiyon bozukluğu olması olasıdır ve ilerleyen yıllarda T2DM görülmesi açısından ciddi bir risk faktörüdür (5).

β hücre disfonksiyonuna sebep olan monojenik defektler (neonatal diyabet, MODY) DM olgularının %5'ten daha azını oluşturmaktadır. %80-85 oranında monojenik defektlere bağlı hayatın ilk 6 ayından önce görülen bir DM tipidir. Kalıcı ve geçici formları vardır. Kalıcı formlar sıklıkla β hücrelerinde bulunan KATP kanallarındaki SUR1 subunit (ABCC8) ve Kir6.2 subunit (KCNJ11) mutasyonları veya İnsulin gen (INS) mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Gençlerde görülen ve erişkin başlangıçlı DM'ye benzer klinik seyir gösteren MODY olan olgular çoğunlukla 25 yaşın altında DM başlangıcı olan, ailesinde 2 ya da daha fazla nesilde DM hastalığı bulunan (otozomal dominant geçişli), kilosu normal olan, pankreas rezervi korunmuş olan ve insülin direnci bulunmayan olgulardır. Otoantikorlar negatif olarak tespit edilir ve esas sorun, insülin salınım mekanizmasındadır. Bu hastaların insülin tedavisine ihtiyacı yoktur ya da düşük doz insülin tedavisi yeterli olmaktadır (5).

2.1.1. Epidemiyoloji

Diyabet, 21. yy'ın en önemli küresel sağlık sorunlarından. Sosyal sınıflardan ve sınırlardan bağımsız olarak dünyanın tamamını tehdit altına alan bir salgın olmaya devam etmektedir. Prevalansının giderek artmasından dolayı pandemik hastalıklar arasında gösterilmektedir (34).

Ülkemizde TURDEP-I çalışmasına göre 1997-1998 yılları arasında T2DM prevalansı %7,2 olarak bulunmuş, 2010'da yapılan TURDEP-II çalışmasının

sonuçlarına göre 12 yıllık süreçte yaklaşık %90 oranında artış gözlenmiş olup DM prevalansının %13,7'ye yükseldiği görülmüştür. Bu kişilerin de %85-90'ının T2DM tanılı olgular olduğu gözlenmiştir (35).

2018'de yayınlanan ve Türkiye ayağının 8 farklı ilden 4056 katılımcının ortalama 7 yıllık takibi ile yapıldığı PURE (The Prospective Urban Rural Epidemiology) çalışmasının sonucuna göre 2008 ve 2015 yılları arasında DM sıklığı %13,7'den %21'e yükseldiği saptanmış (36).

Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) 2021 yayınlarına göre; tüm dünyada 20-79 yaş arasında yaklaşık 537 milyon yetişkinde DM mevcuttur. Yani ortalama dünyadaki her 10 kişiden 1'i DM hastasıdır. 541 milyon yetişkin ise Tip-2 DM riski oluşturan bozulmuş açlık glukoz toleransına (IGT) sahiptir. IDF verilerine göre bu sayının 2045 yılında 738 milyona yükseleceği tahmin edilmektedir (37).

Çocuklarda ve ergenlerde en sık görülen endokrin hastalık T1DM'dir ve tüm DM hastalarının %5-10'u oranındadır. Dünya'daki tüm 15 yaş altındaki çocuklardan her yıl ortalama 96.000'inin T1DM hastası olduğu tahmin edilmektedir (38). IDF, yaş aralığını 0-19 olarak genişleterek çocukluk ve ergenlik çağında olan 1,211,900 T1DM hastası olduğunun tahmin edildiğini ve yıllık olarak 149,500 çocuk ve ergene yeni tanı koyulduğunu bildirmiştir (37).

T1DM insidansı, bölgesel farklılıklar göstermekle beraber, dünya genelinde artmaktadır. Yaklaşık %3-4 oranında artış olduğu bildirilmiştir. En yüksek T1DM'li çocuk ve ergen sayısı %28,4 oranla Avrupa kıtasında, daha sonra ise %21,5 oranla Kuzey Amerika ve Karayiplerde saptanmıştır (39,37).

Türkiye genelinde T1DM sıklığının tespit edildiği bir çalışma olmamakla birlikte Sosyal Güvenlik Kurumu verilerine göre T1DM insidansı 10.8/100.000'dir. 2013'te 18.190 çocuğun DM'li olduğu saptanmıştır (40).

GDM prevalansı, popülasyonun özelliklerine ve kullanılan tanı kriterlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir. 2021 yılında 47 ülkeden 58 çalışmanın dahil edildiği bir araştırmaya göre; canlı doğumlarda kadınların %16,7'sinin (21,1 milyon) gebeliklerinde hiperglisemi yaşadığı tespit edilmiştir. Bunların %10,6'sı

gebelik öncesinde teşhis edilmiş DM'ye (tip 1 veya tip 2) sahipken %80,3'üne GDM tanısı konulmuştur. %9,1'inde ise ilk kez gebelik esnasında DM (tip 1 veya tip 2) saptanmıştır. Ülkemizde 2021 yılında GDM prevalansı %9,5; hiperglisemiden etkilenen canlı doğum sayısı ise 889,526 olarak yayımlanmıştır (37).

2.1.2. Sınıflandırması

DM'nin etiyoloji ve patogeneze göre farklı tipleri olup, araştırmalar ve yeni kanıtlar ile sürekli güncellenmektedir. 1999'da Amerikan Diyabet Derneği'nin organize ettiği, konu ile ilgili bilim adamlarının katıldığı "Expert Commite" tarafından hazırlanmış olan sınıflamaya göre DM; tip I, tip II, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik tipler olarak gruplara ayrılır (41, 42).

2.1.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

T1DM %90 insülin üretiminden sorumlu olan langerhans adacıklarındaki β hücrelerinin otoimmün yıkımı neticesinde oluşur. Buna Tip1A DM (otoimmün) denir. %10 oranında ise oto-immunite ile ilişki tespit edilemez buna Tip1B DM (idiyopatik) denir. Tip1A DM'lerde insülin antikorları ve anti islet hücre sitoplazmik antikorları olmak üzere iki ayrı antikor saptanmaktadır. Çoğu islet hücre antikorları ile T1DM arasında ilişki vardır ve bunlardan en önemlisi anti glutamik asit dekarboksilazdır (anti-GAD). İnsulin oto antikoru (IAA), islet hücre antikorları (ICA) ve IA-2 antikoru diğer önemli antikorlardandır. T1DM oluşumunda genetik, perinatal ve çevresel faktörlerin de etkisi olduğu söylenmektedir. T1DM çoğunlukla çocuk ve ergenlerde görülse de her yaşta görülebilen bir hastalıktır (43).

2.1.2.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus

T2DM hastalarında insülin üretimi olmakla birlikte kısmi eksiklik söz konusudur. DM olgularının %90-95'lik kısmı bu gruptadır. Bundan önce, sıklıkla >30 yaş kişilerde bulunduğu ve insülin tedavisi gerektirmediği için erişkin başlangıçlı DM veya insülin bağımlı olmayan DM olarak adlandırılmıştır (44).

Sık idrar yapma, çok susama, ağız kuruluğu, yaraların geç iyileşmesi gibi T1DM'ye benzeyen semptomları bulunmakla beraber, T2DM yavaş seyirli bir hastalıktır ve akut metabolik bir bozukluk oluşturmaz. Bu yüzden genellikle hastalık erken tespit edilemez (37).

T2DM'de hem metabolik hem de genetik faktörlerin rolü bulunmaktadır. Ailede DM hikayesi, ırk, GDM hikayesi, sigara, hareketsiz yaşam ve obezite T2DM risk faktörlerindendir (45). Obezite insülin direncini arttıran bir faktördür. T2DM'li hastaların çoğu obez veya karın bölgesinde artmış yağ dokusu olan kişilerdir (46).

T2DM; Karaciğerde glukoz üretiminde artış, glukozun iskelet kasında geri alımında düşüş, glukagon sekreyonunun pankreas alfa hücrelerinde artması, renal glukoz reabsorbsiyonundaki artış, hipotalamik insülin direncindeki yükselme ve yağ hücrelerinde lipoliz artışı gibi patofizyolojik mekanizmalar yoluyla pankreas, böbrek, kas ile yağ dokusu gibi pek çok organda hasar oluşturur (45).

2.1.2.2.1. Fiziopatolojisi

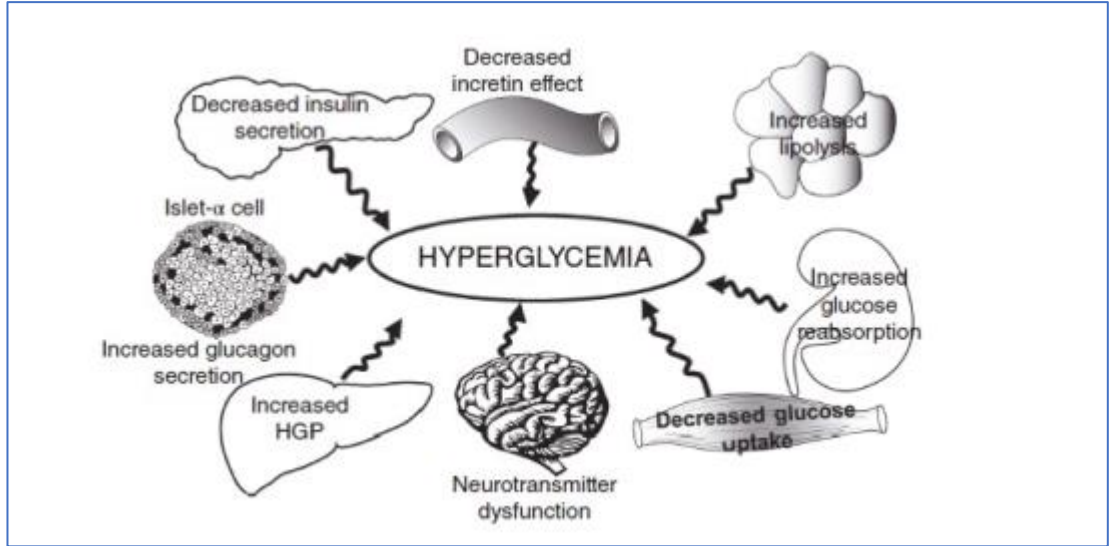
T2DM, temelinde insülin direnci olan birçok patofizyolojik mekanizmanın rol oynadığı metabolik ve kardiyovasküler komplike bir hastalıktır. Özellikle karaciğer, santral sinir sistemi, kas ve yağ dokusundaki insülin direncini yenmek için pankreas insülin üretimini arttırarak kompensatuar hiperinsülinemik bir cevap verir. Bu hiperinsülinemik cevap yıllarca sürmektedir. Pankreas β hücreleri zamanla hiperinsülinemik cevabı devam ettirmede yetersiz kalır ve sonuçta aşikâr DM görülmeye başlar. Aşikâr DM oluştuğunda β hücre kapasitesi %80 oranında düşmektedir. Bu durum ilerledikçe kalan β hücre rezervi de düşmektedir. Tüm bu süreç T2DM'nin progresif bir hastalık olduğunu göstermektedir. β hücre rezervi düştükçe kan şekeri kontrolü bozulmakta ve ek ilaç ihtiyacı oluşmaktadır. İnsülin direnci ve β hücre fonksiyon bozukluğunun yanında, inkretin defekti/direnci (GLP1; glukagon benzeri peptid-1, GIP; glukozu bağımlı insülinotropik polipeptid), artan glukagon düzeyi, böbreklerin daha fazla glukoz tutması da T2DM oluşumunda glukoz intoleransına katkı sağlayan unsurlardır. Bu major patofizyolojik süreçlerin tamamı (karaciğer, santral sinir sistemi, kas ve yağ dokusundaki insülin direnci, inkretin defekti, glukagon artışı, β hücre fonksiyon

bozukluğu ve böbreklerdeki glukoz tutulumunda artış) uğursuz sekizli manasına gelen “Ominous Octet” olarak adlandırılmaktadır (Şekil 1) (47-49).

İnsülin direnci, organizmadaki glukozun belirli bir seviyede tutulması için salgılanan insülinin etkisine karşı direnç gelişmesi olarak tanımlanabilir. İnsülin dolaşımında bulunmasına karşın karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasındaki etkisini gösteremez. Sağlıklı bireylerde vücut glukozu 1 ünite insülin ile kontrol altında tutabiliyorken, insülin dirençli kişilerde pankreas 2-3 ünite insülin salgılamak zorunda kalır. İnsüline karşı direnç arttıkça, şeker regülasyonu için insülin salgısı da artmaktadır. T2DM’de insülin direncinin birincil nedeni reseptör sonrası bir kusur gibi görünmektedir. T2DM’de insülin direnci, birincil kusur muhtemelen insülin sinyal yolağında, muhtemelen fosfatidilinositol-3-kinaz, insülin alıcısı substratları-1 veya insülin alıcısı substratları-2 ya da glukoz taşıyıcı tip 4 (GLUT-4)’ten kaynaklanıyor olabilir. İnsülin direnci zamanla pankreas yetmezliği ve DM’ye yol açar (50,51). Genetik faktörler, sedanter yaşam, yüksek kalorili beslenme gibi etkenler de insülin direnci gelişiminde rol oynamaktadır (52). İnsülin direncini kırmak için ilk yapılması gereken, yaşam tarzını değiştirmektir. Uygun beslenme, fiziksel aktiviteyi artırma, düzenli ve yeterli uyumak önemlidir. İnsülin direnci tedavisi ile insülin salınımının yeterli düzeyde artırılması kan glukoz seviyelerini normale getirebilir (53).

Glukoz taşıyıcıları, glukozun kan dolaşımından, insülin sinyallemesine veya egzersizine cevap olarak kas hücreleri ve adipositler gibi hücrelere taşınmasını uyarır. İskelet kası ve yağ dokusu, glukoz alımı için ana bölgelerdir ve insüline bağlı bağımlı yolla hücre içine alınır (54).

GLUT-4, T2DM'nin patofizyolojisinde önemli bir rol oynar. T2DM hastalarında kusurlu ekspresyonu veya periferik hücre plazma membranına translokasyonu, enerji üretimi için glukozun hücreye girişini engeller (55). İnsülin yokluğunda ya da yetersizliğinde, GLUT-4 depolama vezikülleri plazma zarından uzak durur, bu nedenle GLUT-4 translokasyonu veya GLUT-4 aracılı glukoz alımı yoktur (54).



Şekil 2.1. Ominous Octet (Uğursuz Sekizli): T2DM gelişimine yol açan 8 patofizyolojik defekt (47).

2.1.2.2.2. Risk Faktörleri

T2DM oluşumu için risk oluşturan birtakım faktörler vardır. 8 Avrupa ülkesinin dahil olduğu InterAct araştırmasında, 1.derece akrabalarının biri T2DM olan kişilerin DM olma ihtimali olmayanlara göre 2,5 katlık bir artış görüldüğü bulunmuştur. Aile bireylerinin 2 ya da 3'ü T2DM hastası olanlarda ise bu risk çok daha yüksek saptanmıştır. Yaşla birlikte T2DM görülme riski de artış göstermektedir. Bununla birlikte T2DM hastası olma riski hafif şişmanlarda normal kilolulara kıyasla 2 kat, 1. ve 2. Derece obez kişilerde 5 kat daha fazla risk bulunurken bu risk morbid obezlerde 10 kata kadar çıkmaktadır. Beden kitle indeksi 35 kg/m² üstü olan kişilerde BKİ'leri 23 kg/m² altı olanlarla karşılaştırıldığında T2DM riski 42,1 kat daha fazla olduğu görülmektedir. Etnik olarak da yerli Amerikalılar, Afrikan Amerikalılar, Latin Amerikalılar, Asyalı Amerikalılar ve Pasifik Adalılarında da bu risk daha fazla saptanmıştır (56).

2.1.2.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)

GDM, gebelikten önce DM tanısı olmayan ve gebeliğin 2. ya da 3. trimesterinde görülen karbonhidrat intoleransıdır (5). Gebelikte yükselen östrojen ve progesteron seviyeleri, kortizol ve büyüme hormonunda artış, insan plasental laktojen hormonunun (HPL) salgılanması, plasentadan insülinaz salınımından

dolayı insülin direnci gelişme ihtimali yükselir. Gebede adipoz depolarındaki artış, fiziksel aktivite azalması ve kalori alımı artışı da glukoz intoleransına sebebiyet vermektedir (57). Bu şekilde gelişen insülin direncini aşmak için pankreastan insülin salınımı yükselir ve kan insülin düzeyi artar. Bu kompensasyon mekanizmasıyla insülin direnci aşılar ve glukoz toleransı korunur. DM için risk faktörleri bulunan kadınlarda ise pankreas fonksiyonlarının yetersiz olmasından dolayı, gebelikte meydana gelen insülin direncini kompanse edilemez ve GDM tablosu gelişir (5). GDM hastalığı çoğunlukla asemptomatiktir ve 24-28. haftalar arasında uygulanan OGTT tarama testi ile teşhis edilmektedir. İki saatlik 75 g OGTT’de açlık plazma glukozu >92 mg/dL veya 1. saat plazma glukozu >180 mg/dL veya 2. saat plazma glukozu >153 mg/dL değerlerinden bir veya birden fazlasının saptanması durumunda GDM tanısı konur (44).

2.1.2.4. Diğer Spesifik Nedenlere Bağlı Diabetes Mellitus

T1DM ve T2DM ile ilişkisi bulunmayan ve etyolojileri bilinen DM tipleri bu gruba girmektedir. (58). β hücre ve insülin fonksiyonundaki genetik bozukluklar, pankreasın egzokrin hastalıkları, endokrinopati durumları (feokromasitoma, hipertroidi, cushing sendromu, akromegali), ilaç ve kimyasal maddeler, enfeksiyonlar, down, turner sendromu gibi DM’yle beraber olan genetik durumlara bağlı olarak gelişebileceği bildirilmiştir (59; 60).

2.1.2. Tanı Kriterleri

Tablo 1. DM Tanı Kriterleri (5).

1. Açlık kan şekeri (AKŞ) ≥ 126 mg/dl (7.0 mmol/L) olması
2. Oral glukoz tolerans testi (OGTT) (75 gram kuru şeker eşdeğer glukoz) verilen hastada 2. saatteki açlık kan şekerinin ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) bulunması
3. HbA1c düzeyinin $\geq 6,5$ (48.0 mmol/mol) bulunması
4. Hiperglisemi veya hiperglisemik krizin belirtileri bulunan bir hastada açlık tokluk fark etmeden herhangi bir anda plazma glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl (11.1 mmol/L) saptanması

Yukarıdaki kriterlerden bir veya birkaçının görülmesi DM tanısı koyulması için yeterlidir. Bu tetkik sonuçlarına göre arada kalan değerler olduğunda ise bozulmuş glukoz toleransı ve bozulmuş açlık glukozu şeklindeki glukoz metabolizmasının öteki bozukluklarının tespit edilmesi, prediyabetik kişilerin bulunması mümkündür (5).

2.1.3. Klinik Bulgular

DM belirtileri, insülin azlığı veya etkinliğinin düşmesi sonucu oluşan metabolik değişimlerin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Ağızda kuruluk hissi, halsizlik, çok su içme, çok ve sık idrar yapma, aşırı yeme veya iştah kaybı, kilo kaybı, ayaklarda yanma hissi, karıncalanma ve bulanık görme başlıca görülen DM belirtileridir (61). Santral obezite çoğu hastada bulunur. Hipertansiyon ve dislipidemi beraber görülebilecek diğer hastalıklardandır. T2DM hastalarının yaklaşık %70'i kardiyovasküler hastalıklar nedeniyle yaşamını yitirmektedir (62).

2.1.4. Komplikasyonları

DKA, HHD, laktik asidoz (LA) ve hipoglisemi DM'nin akut komplikasyonlarıdır. DM'nin kronik komplikasyonları 2'ye ayrılır: (63,64).

- 1- Mikrovasküler komplikasyonlar: Nöropati, nefropati ve retinopati
- 2- Makrovasküler komplikasyonlar: Genellikle aterosklerozdan dolayı gelişir. Serebrovasküler olaylar, kardiyovasküler patolojiler (Miyokard enfarktüsü, DKM) ve periferik damar hastalıkları makrovasküler komplikasyonların başında gelir. Depresyon, diyabetik ayak, demans gibi hastalıklarda DM'nin komplikasyonlarındandır (65,66).

2.1.4.2. Akut Komplikasyonları

DM'nin acil komplikasyonları 4 şekilde görülebilir: DKA, HHD, LA ve Hipoglisemi (64).

KontROLSÜZ DM'li hastalarda DKA ve HHD en ciddi akut komplikasyonlardan ikisidir. Gelişimlerinden sorumlu olan iki hormonal anormallik insülin eksikliği ve/veya direnci ile insülinin normal baskılayıcı

etkisinin ortadan kalkmasından kaynaklanabilecek glukagon fazlalığıdır (66,67). En yaygın tetikleyici olaylar ise enfeksiyon (sıklıkla pnömoni veya idrar yolu enfeksiyonu) ve insülin tedavisinin kesilmesi veya yetersiz olmasıdır (68,69).

DKA genellikle gençlerde görülmektedir. Labaratuvar bulgularında kan şekeri 300 mg/dL'nin üzerinde, ketonemi, ketozis, asit-baz dengesinde bozukluk, anyon açığı, dehidratasyon ve lökositoz tespit edilmektedir. HHD ise yaşlı (>65 yaş) hastalarda daha sık görülür. Mutlak bir insülin eksikliği söz konusu olmadığı için keton cisimleri oluşmaz. Laboratuvar bulgularında kan şekeri 600 mg/dL'nin üzerinde, osmolarite ≥ 320 mOsm/kg, plazma ya da idrarda keton bileşiklerinin negatif olması DKA'dan ayırt edici bariz özellikleridir (70). Her iki klinik tablodaki tedavinin hedefleri serum glukoz ve osmolaritesini normal sınırlara getirmek, yeterli dolaşım hacmi sağlamak, yeterli doku perfüzyonunu oluşturmak, keton cisimlerinin vüvuttan atılımını sağlamak, elektrolit dengesini düzeltmek ve hastanın metabolik kompanse duruma gelmesini sağlamaktır (70).

Laktik asidoz, serum laktat düzeyinin 5 mmol/L düzeyinin üzerinde olduğu (Normal değeri 0.5-1 mmol/L olup >2 mmol/L hiperlaktemidir), oksijen dağılımı ve kullanımının yetersiz kaldığı ağır metabolik asidoz tablosudur. Çoğunlukla altta yatan ciddi bir duruma bağlı olarak görülür (70).

Hipoglisemi, en sık görülen akut komplikasyondur. Kan glukozunun 70 mg/dl'den düşük olmasına hipoglisemi denmektedir. Hipoglisemi oluşumunda; insülinin uygulama hataları ya da dozunun gereğinden daha yüksek alınması, oral antidiyabetik (OAD) ilaçların gerekenden daha yüksek dozda alınması, çok fazla egzersiz yapılması, karbonhidrat alım yetersizliği gibi pek çok sebep etkili olabilmektedir. Hipogliseminin semptomları içinde; çarpıntı, bulantı, soğuk terleme, titreme, acıkma, anksiyete, baş ağrısı, baş dönmesi, sersemleme, halsizlik, konuşmada zorluk, konfüzyon gibi durumlar bulunur (63,5).

2.1.4.2.2. Kronik Komplikasyonları

Kontrol altında tutulmayan DM'nin zamanla görülen ve ağır sağlık problemlerine yol açan komplikasyonlarıdır. Bu komplikasyonların engellenebilmesi ya da geciktirilebilmesi için DM sürekli kontrol altında tutulmalıdır (71).

2.1.4.2.3. Makrovasküler Komplikasyonları

Bu komplikasyonlar ana damarlarda gerçekleşen birtakım değişiklikler neticesinde oluşmaktadır (71).

2.1.4.2.3.1. Kardiyovasküler Komplikasyonlar

Diabetes Mellitus, kardiyovasküler hastalık için primer risk faktörlerinden biri arasında yer almakta olup, DM’li hastalarda kardiyovasküler hastalık görülme riski, daha önce miyokard enfarktüsü (MI) geçirmiş non – diyabetik hastalar ile aynıdır. Diabetes Mellitus hastalarında mortalitenin en sık nedeni kardiyovasküler hastalıklar olup, hastaların yaklaşık yarısında karşımıza çıkmaktadır. Tip 1 DM’de kardiyovasküler hastalık daha çok diyabetik nefropati sonrası görülmekte iken, Tip 2 DM’de dislipidemi, kötü glisemik kontrol ve hipertansiyona ek olarak renal fonksiyon bozukluğu majör risk faktörleridir (72-74)

Diyabette görülen kardiyovasküler komplikasyonlar; KAH, DKM, ve kardiyak otonom nöropatidir (KON). KON T1DM’li olguların %17'sinde ve T2DM’li olgularının % 22'sinde meydana gelir ve mortalite ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (75). Hiperglisemi zamanla, sempatik innervasyon bozulmasına neden olur ve hem adrenerjik reseptör ekspresyonunu hem de katekolamin seviyelerini artırır (76). KON’un en erken bulgusu dinlenme sırasında meydana gelen taşikardidir. Dinlenme taşikardisi, miyokard çalışmasında bir artışa, oksijen talebinin artmasına, ventriküler doluş süresinin azalmasına ve kardiyak verimliliğin azalmasına neden olur. Bu etkiler toplu olarak miyosit apoptozuna ve miyokard fibrozuna yol açar, ventriküler hipertrofi ve disfonksiyon ile sonuçlanır. Bu patolojik süreçler yaş, yüksek glikoz seviyeleri ve hastalık süresi ile artmaktadır (77).

Hiperglisemi, kompleks aterom plağı oluşumuna katkıda bulunan bir durumdur. Diabetes Mellitus’ta oluşan aterom plakları, destabilizasyona yatkın plaklar olup bu plakların kopmasının sonucunda unstabil anjina pectoris, MI ve serebrovasküler olay gibi durumlar ile karşılaşılabilir. Başta türbülans akım ve damar dallanmalarının olduğu bölgelerde endotelial disfonksiyon gerçekleşir. Endotel hasarı sonucunda damar duvarına makrofajlar ve T lenfositlerin yapışır ve bunun sonucunda subendotelial bölgede LDL birikerek köpük hücre oluşumuna

sebepler olur (78-80). Bu duruma aterogenez adı verilmektedir. Aterogenez sonucunda subendotelde ekstrasellüler matriks birikimi ve düz kas hücre proliferasyonu görülmekte, sonuç olarak da nekroz meydana gelmektedir. Aterom plaklarındaki nekroz sonucunda kopan parçaların yol açtığı mikro ve makroembolilere bağlı olarak kan akımı bozulmakta, bu durumun sonucu klinik olarak karşımıza MI ve inme olarak çıkmaktadır. Bu embolileri önlemeye yönelik olarak plak stabilizasyonu hedeflenmekte olup bu açıdan glisemik kontrol, renin – anjiotensin – aldosteron sistemi (RAAS) blokörü ajanlar olan anjiotensin korverting enzim inhibitörleri (ACEi) ile anjiotensin reseptör- 2 blokörü (ARB) grubu antihipertansifler, LDL'nin düşürülmesini hedefleyen statin ve fibrat grubu antilipemik ajanlar ve antiplatelet ajanlar kullanılmaktadır (81,82).

Diyabetik hastalardaki aterosklerozda, inflamasyon, insülin direnci, AGE, RAAS, ve genetik faktörlerin katkısı vardır. İnsülin direnci olan kişilerde insülin sinyal iletim yolağındaki antiaterojenik etki gösteren PI3K yolu aktifleşmez. Buna ek olarak Erk MAP kinaz yolunun artan aktivitesi, büyüme faktörlerinin aktive olmasına ve damar düz kas hücresinde proliferasyona sebebiyet vererek proaterojenik etki göstermektedir. AGE ürünleri lenfositlere, makrofajlara, vasküler matriks hücrelerine ve nöronlardaki RAGE' lere bağlanmaktadır. Bu bağlanma sonucunda TNF- α ve IL-1 gibi sitokinler, endotelin-1, birtakım prokoagülan faktörler sentezlenir ve büyüme faktörleri aktive olur. Bu bileşikler ek olarak oksidatif stres artışına sebebiyet vererek ateroskleroz gelişiminde rol oynar (83).

AGE-RAGE stresi, çok sayıda aterojenik faktörün oluşumu yoluyla ateroskleroza indükleyebilir. KAH'ı olan kişilerde serum AGE seviyesi ve AGE-RAGE stresi yükselirken, sRAGE seviyeleri düşer. Hayvanlarda da aterosklerotik lezyonda RAGE ekspresyonu artar. AGE-RAGE stresinin neden olduğu aterosklerozun tedavisi; AGE alımının azaltılmasını, AGE oluşumunun önlenmesini, AGE'nin in vivo bozunmasını, RAGE ekspresyonunun baskılanmasını, AGE-RAGE bağlanmasının bloke edilmesini, sRAGE'nin yükselmesini ve antioksidanların kullanımını içerir. Tedavi modaliteleri KAH'ı önleyebilir, geriletebilir ve ilerlemesini yavaşlatabilir (84).

DKM, koroner arter hastalıkları ve hipertansiyondan bağımsız gelişen, DM'nin kardiyovasküler komplikasyonlarından biri olan bozulmuş ventriküler fonksiyondur. Patogenezi net bir şekilde gösterilememiştir. Metabolik dengesizlik, diyabetik otonomik fonksiyon bozukluğu, iyon dengesindeki düzensizlik, insülin direnci, yapısal protein azlığı ve miyokardiyal fibrozis'in DKM oluşumunda rol olabileceği belirtilmiştir (85). DKM kardiyak kontraktilite gücünde zayıflama ve aksiyon potansiyelinde uzama gibi elektriksel ve mekaniksel aktivitesinde görülen değişikliklerle karakterize bir hastalıktır. Bu bozuklukların özellikle Ca^{2+} dengesinde görevli proteinlerin seviyelerinde ve işlevlerinde meydana gelen değişikliklerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir. Miyosit hipertrofisi ile miyokardiyal fibrozis DKM'deki yapısal değişimleri açıklamakta sık tercih edilen mekanizmalardır (86,87). Sistolik disfonksiyon, miyosit kaybı/hasarı düzeyine bağlı olabilir. Miyosit hasarı miyokardın kasılabilme gücüne etki eder. Bu olay zayıflamış kasılma gücü, pompa fonksiyonunda azalma ve düşük ejeksiyon fraksiyonunu açıklar (88). Diyastolik işlev bozukluğu çoğunlukla kardiyak kollajen birikimi ile miyosit hasarının neticesidir. DM süresi ile çoğalan glikolize protein ve yağlar, elastin ve kollojen gibi proteinlere bağlanarak doku elastisitesinde zayıflama ve protein metabolizmasında yavaşlamaya sebep olur; bu şekilde kollajen aşıkâr kollajen birikimi olur ve diyastolik işlev bozukluğuna sebebiyet verir (89). Erken evre DKM'de hafif miyosit değişiklikleri görülür. Kalpteki fonksiyon bozukluğu sadece miyokardiyal doku doppleri gibi sensitif yöntemlerle saptanabilir. Zamanla miyokardiyal hipertrofi olur. Bu evrede duvar kalınlığı, sol ventrikül çapları gibi yapısal küçük bazalmalar ve konvansiyonel ekokardiyografiyle saptanabilen diyastoldeki önemli değişimler görülür. Geç evrede ise miyokardiyal fibrozisin oluşumuna sebep olan yapı ve fonksiyon değişimleri izlenebilmektedir (90). DM'li hastalarda oksidatif stres ve gen ekspresyonundaki değişim neticesinde damar onarım mekanizmalarında bozulma ve endotel progenitör hücrelerinde azalma meydana gelir. Kardiyak çapraz bağların oluşumu ve ekstrasellüler matriks birikimine bağlı olarak stiffness ve hipertrofi ortaya çıkar. Stiffness ve hipertrofi sonucunda da diyastolik disfonksiyon görülür (91,92).

2.1.4.2.3.2. Serebrovasküler Komplikasyonlar

Serebrovasküler hastalıklar, beyini besleyen damarların sertleşmesi, daralması ya da tıkanmasından dolayı kan akışının bloke olmasıyla gelişmektedir. T2DM'li hastaların önde gelen mortalite sebepleri içinde kardiyovasküler ve serebrovasküler komplikasyonlar bulunmaktadır. Hipertansiyon, santral obezite, sigara kullanımı, yüksek kolesterol varlığı kişiyi riskli gruba sokmaktadır. Kan glukozunun ve kan basıncının düzenlenmesi, egzersiz ve tavsiye edilen diyet programına uymak serebrovasküler hastalık geçirme ihtimalini önemli oranda düşürmektedir (63).

2.1.4.2.3.3. Periferik Arter Hastalığı (PAH)

PAH; alt ekstremitedeki damarların lipitlerle daralması ya da tıkanmasından dolayı bacağın yeterince beslenememesine neden olarak amputasyon riskini arttıran bir durumdur. PAH, inme ve MI için ciddi bir risk faktörüdür. Yürüyüş esnasında bacaklarda ağrı duyulması ve istirahatle bu ağrının geçmesi PAH belirtisidir (63). Topallayan kişilerin periferik nabızlarının detaylı kontrol edilmesi gerekmektedir (44).

2.1.4.2.4. Mikrovasküler Komplikasyonları

2.1.4.2.4.1. Diyabetik Retinopati

Diyabet, 18-64 yaş arası hastalar arasında yeni körlük vakalarının başta gelen nedenidir (93). Diyabetik göz hastalığı diyabetik retinopati, makula ödemi, katarakt ve glokomu kapsar (94). Diyabetik retinopati, DM'nin mikrovasküler bir komplikasyonudur ve hafif-orta derecede proliferatif olmayan, şiddetli proliferatif olmayan ve proliferatif olarak sınıflandırılır. Şiddetli nonproliferatif ve proliferatif hastalık görmeyi tehdit eder (95). Hafif ila orta derecede nonproliferatif retinopati, retinal kanamalar, mikroanevrizmalar, iskemi ve mikro enfarktüs (pamuk yünü lekeleri), protein ve lipit sızıntısı (sert eksüdalar), intraretinal mikrovasküler anormallikler ve venüler genişleme ve kıvrım ile karakterizedir. Vasküler obstrüksiyon, artan sayıda retina kanaması ve belirgin venöz anormallikleri olan mikroanevrizmalar olduğunda, bu ciddi proliferatif olmayan retinopati olarak kabul edilir. Proliferatif retinopati, retinada veya arka vitreus boşluğunda neovaskülarizasyon ile karakterizedir (96).

Lens, kornea, bruch zarı, retina, sklera ve nervus opticus dahil gözün değişik kısımlarında AGE birikimi olabileceği görülmüştür. Bu AGE birikimi; diyabetik retinopati, katarakt, diyabetik keratopati gibi DM'yle bağlantılı göz hastalıklarında AGE'lerin rolü olabileceğini göstermektedir (97). Bir araştırmada, diyabetik sıçanlar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında daha fazla AGE birikimine ve korneada daha fazla nükleer faktör kappa-B ve 8-hidroksiguanozin ekspresyonuna sahip olduğu bulunmuş, diyabetik keratopatinin patogenezinin kısmi olarak AGE birikimiyle bağlantılı olabileceği belirtilmiştir (98). Ayrıca lens kristalleri, miyelin ve tübülün gibi yapısal proteinlerin glikasyonu ve lensin epitel hücrelerinde AGE birikiminin katarakt gelişiminde rolü olabileceği tespit edilmiştir (97).

2.1.4.2.4.2. Diyabetik Nefropati

DM'li kişilerde afferent ve efferent arteriyoldeki düşük direnç sebebiyle artmış glomerüler perfüzyon ve plazma filtrasyonu görülür (99). Gelişmiş ülkelerde kronik renal hastalıkların ve son evre böbrek yetmezliğinin başlıca sebebi diyabetik nefropatidir (100,101). T1DM'lilerin ortalama %30'u ve T2DM'lilerin ortalama %40'ında bu mikrovasküler komplikasyon görülür (100). Diyabetik renal hastalıkların kontrol altına alınma aşamaları; glisemik kontrol, antilipidemi tedavisi, tansiyon kontrolü, obezite tedavisi, uygun diyeti içermektedir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda diyabetik nefropati oluşumunda ve son evre böbrek yetmezliğine ilerlemesinde immun ve inflamatuvar mekanizmaların yeri olduğu ispatlanmıştır (99,102).

AGE'nin, bir takım hücre içi sinyal yolağını aktive eden RAGE birleşerek diyabetik renal hastalığın patogenezinde önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir. Ayrıca AGE'lerin, kısmi olarak anjiyotensin II tip 1 reseptörünü (AT1R) uyarması ile podosit DNA hasarına ve ayrılmasına sebebiyet verebileceği gösterilmiştir (103,104).

2.1.4.2.4.3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati diğer sebepler dışlandıktan sonra DM'li kişilerde periferik sinir disfonksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Diyabetik nöropati oluşma ihtimali diğer mikrovasküler komplikasyonlara benzer olarak, hipergliseminin

derecesi ve süresiyle ilişkilidir ve bazı bireyler bu komplikasyonları geliştirmeye genetik olarak daha yatkındırlar (105).

Hipergliseminin periferik sinirlerde oluşturduğu yaralanmanın kesin patofizyolojisi bilinmemektedir, ancak muhtemelen polyol birikimi, oksidatif stres ve AGE'den kaynaklanan yaralanma gibi mekanizmalarla ilişkilidir. DM'de periferik nöropati kendini fokal/multifokal, otonomik ile duyuşal nöropatiler de dahil çeşitli biçimlerde gösterebilir. Amputasyonların %80'den çoğu, diyabetik nöropatinin sebep olabileceği ayak yaraları ya da ayak ülserasyonunda sonra yapılır. Diyabetik nöropatinin sebep olabileceği morbidite ve mortalitenin engellenebilmesi için klinik doktorlarının bulgularını tanıyabilmesi ve tedavi yönetimini iyi yapabilmesi önemlidir (106).

Kronik sensorimotor distal simetrik polinöropati, diyabetik nöropatinin en çok görülen biçimidir. Yanma, karıncalanma ve elektriksel ağrı tipik semptomlarıdır. Bazen de hafif uyuşukluk yaşayabilirler. Ağrı yaşayan kişilerde, geceleri daha da şiddetlenebilir. Hafif uyuşukluğu olan kişilerde ağrısız bir ayak ülserasyonu oluşabilir, bundan dolayı hafif semptomlu hastalarda diyabetik nöropati hemen dışlanmamalıdır. Fizik muayene ile hafif dokunma, titreşim, sıcaklık gibi duyu kayıpları tespit edilebilir. Birkaç periferik duyu testinde bozukluk tespit edilmesi nöropatiyi tespit etmede duyarlılığı %87'dir. Aynı zamanda ayak bileği refleksi kaybı da bu hastalarda karakteristiktir. Monofilament hissinin kaybedilmesi, ayak ülserasyonu gelişimi açısından önemli bir risk faktörüdür (105).

2.2. İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE)

DM'nin komplikasyonlarında Hipergliseminin yeri pek çok araştırmada gösterilmiştir. Kandaki yüksek glukoz seviyeleri nedeniyle oluşan AGE'nin bu komplikasyonlarda rolü olduğu düşünülmektedir. AGE, DM'nin kronik komplikasyonlarının yanında alzheimer, son dönem böbrek yetmezliği, romatoid artrit gibi pek çok hastalıkta görülmektedir (107).

Artan AGE oluşumu 3 temel mekanizmayla hücre hasarını uyarır:

1. Hücre içi proteinleri farklılaştırarak işlevlerini değiştirir.

2. AGE'nin değiştirdiği hücre dışı matriks bileşenleriyle öteki matriks komponentlerinin ve hücre yüzeyindeki matriks reseptörlerinin normalden farklı biçimde etkileşimiyle meydana gelir.

3. AGE'nin farklılaştırdığı plazma proteinlerinin vasküler düz kas, endotel ve makrofaj gibi hücrelerde var olan AGE reseptörleri ile birleşmesi sonucu oluşur (108).

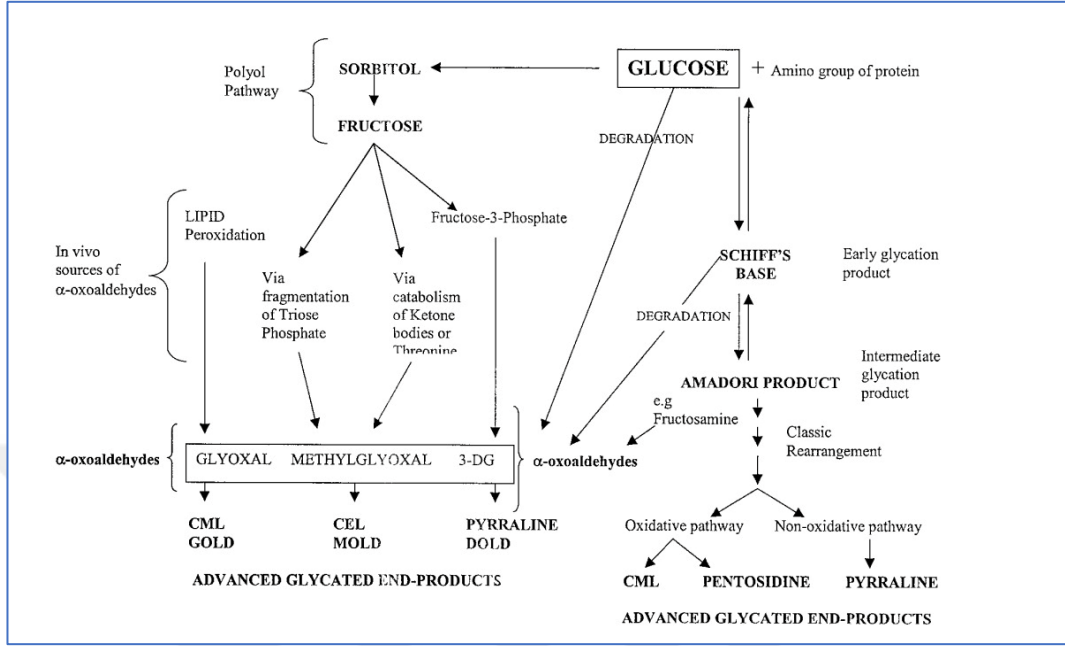
AGE reseptörlerinin tetiklenmesi; NADPH oksidasyonu ile ardından redoks sensitif transkripsiyon faktörlerinin aktive edilmesi ve inflamatuvar mediatörlerin salgılanması ile ROT yapımını artırarak ateroskleroz da dahil DM birçok komplikasyonlarında rol alır (109,110).

2.2.1. AGE Oluşumu

AGE ilk olarak pişmiş gıdalarda, Maillard reaksiyonu adı verilen şekerler ve proteinler arasında enzimatik olmayan bir reaksiyonun son ürünleri olarak tanımlandı (111). Endojen üretilbildiği gibi besinlerle ya da sigarayla ekzojen olarak da oluşabilmektedir. Gıdalardaki Maillard reaksiyonu (enzimatik olmayan glikasyon veya esmerleşme), gıda kalitesini kontrol etmek için gıda endüstrisi tarafından iyi bir şekilde incelenmiştir (112). İnsan vücudunda benzer bir glikasyon sürecinin diyabetik hastalarda artan glikozile hemoglobin oluşumunun gözlemlenmesiyle sadece 40 yıl önce fark edildi (113). Vücut ayrıca şekerleri işlerken doğal olarak AGE retir. Normal metabolizmada AGE'lerin üretimi olur ancak kanda ve dokularda AGE düzeyleri aşırı yükselirse bu durum patolojik bir hal alabilir (114). AGE'ler, Maillard reaksiyonu ile çeşitli öncülerden oluşturulabilir. AGE oluşumu genellikle endojendir ancak tütün dumanı veya gıda gibi eksojen kaynaklardan da elde edilebilir (115-117).

Proteinin serbest amino grubuyla şekerin karbonil grubunun Schiff bazı meydana getirmesiyle protein glikasyonu başlamış olur. Saatler içinde Schiff bazı oluşmakta, ardından birak günde erken glikasyon ürünlerine (Amadori rnleri) transforme olmaktadır. Amadori rnleri de dikarbonil bileşiklerine ardından haftalar içinde AGE'lere transforme olmaktadır. Amadori rnlerinin meydana gelmesine kadarki kısım geri dnşmlyken, bundan sonra olan basamaklar geri

dönüşümsüzdür. Glikasyon, erken evrelerde daha çok olmak üzere konsantrasyon bağımlıdır, bundan dolayı DM’de AGE üretimi artar (107,118).



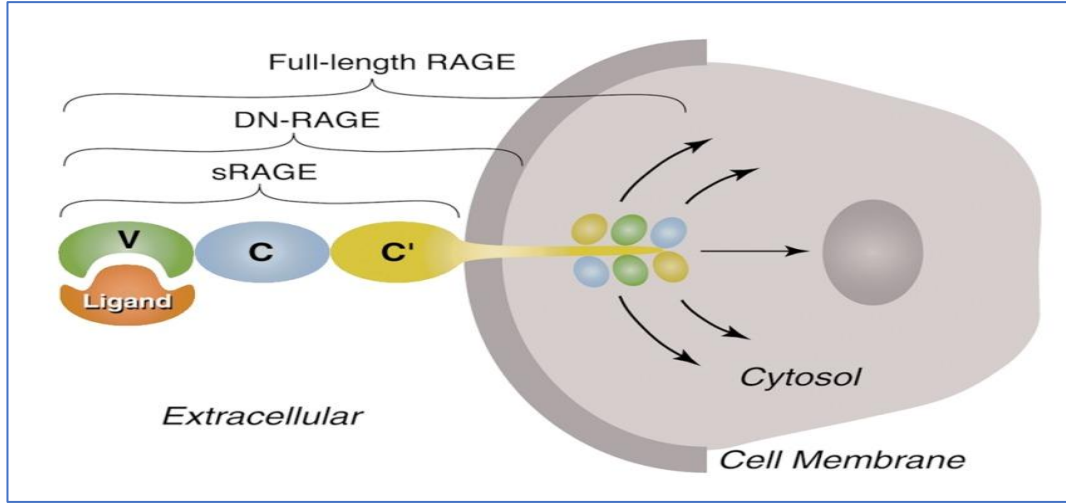
Şekil 2.2. AGE Oluşum Yolları (107).

AGE üretiminde bir diğer mekanizma da DM’de artan oksidatif strese nedeniyle glukoz ya da yağların oksidasyonu neticesinde, ara ürün olarak yüksek reaktiviteye sahip metilglioksal, glioksal, 3-deoksiglukozon gibi düşük molekül ağırlıklı dikarbonil bileşiklerinin üretimidir. Dikarbonil bileşikler genellikle glikasyona uğramış proteinlerin degradasyonundan, yağların peroksidasyonundan ve glikoliz ara ürünlerinden meydana gelebilmektedir. Bu yolların haricinde keton cisimlerinin metabolizması, treonin katabolizması ve metilglioksal yollarıyla da az bir miktar üretilmektedir. Dikarbonil bileşiklerin kimyasal aktivitesi yüksektir, çok küçük miktarlarda bile doğrudan proteinlerin uç aminoasit rezidüsüyle etkileşime girerek AGE yapımına yol sebep olabilmektedir. AGE yapımında bir diğer önemli mekanizma da polyol yolağıdır. DM nedeniyle yüksek olan kan şekerinin bir miktarı önce sorbitole, ardından da bir AGE ara ürünü olan 3-deoksi- glukozon’a transforme olup AGE yapımına dahil olmaktadır (119). Fakat bu reaksiyonlar da glutatyon ve NADPH kullanımına neden olduğundan, dolaylı şekilde oksidatif stresin artışına sebep olmaktadır. AGE yapımında birçok mekanizmanın devrede olması AGE’lerin heterojen yapıya sahip olmasına neden

olmaktadır. Bu heterojen AGE'ler kimyasal yapıları açısından üç başlıkta toplanır; Birincisi Floresans çapraz bağlı AGE'ler (crossline, pentosidine). İkincisi Non-floresans çapraz bağlı AGE'ler (MOLD, glucosepane). Üçüncüsü ise Çapraz bağ yapmayan AGE'ler (Pyrraline, N- Karboksimetil lizin) (118).

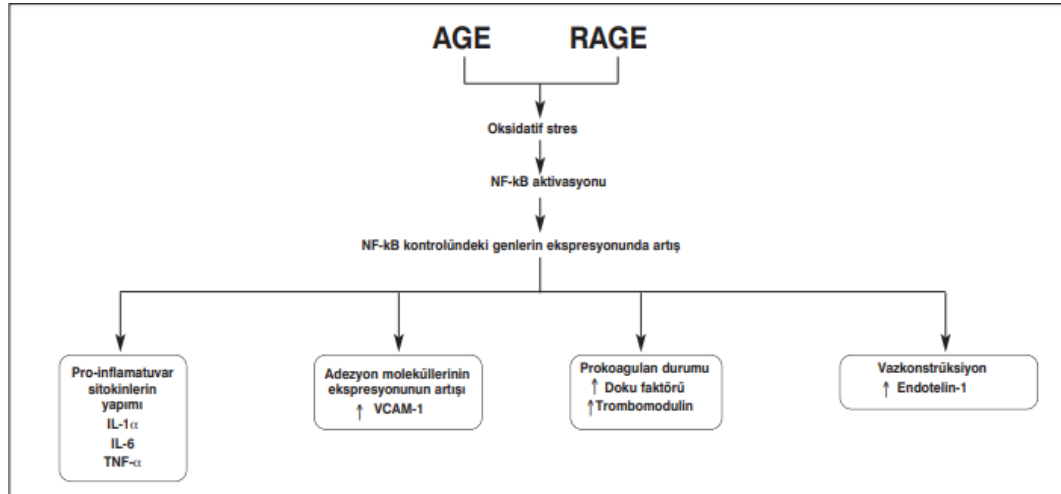
2.2.2. AGE Reseptörleri

AGE'ler; RAGE, çöpçü reseptörler (FEEL-1, FEEL-2, Class A, LOX-1, class B tip1, CD36), AGE-R1 (oligosakkaril transferaz-48), AGE-R2, AGE-R3 (Galektin-3) adlı reseptörlerle bağ kurmaktadır. Bu reseptörler arasında en fazla araştırılanı IgG süperaillesinden olan RAGE'dir. Özellikle astrositler, mononükleer fagositler, düz kas hücresi ve endotel hücresinde bulunur, fakat sağlıklı doku ve damarlarda çok az eksprese edilirler (121). RAGE, AGE'ler haricinde amiloid- β , amfoterin, inflamatuvar sitokinler ve öteki fibriler proteinlerle tetiklenebilir. RAGE ekspresyonu DM ile inflamasyonda artış gösterir. RAGE'nin hücre dışı komponenti C ile V tipi olarak iki bölgeden meydana gelir. Ligand bağlanmasını V tipi bölge sağlarken; C tipi, V tipinin kararlılığında rol alır. Bunu izleyen transmembran bölge de reseptörün membrana çapalanmasında görevlidir. Hücre içi sinyalizasyonu, transmembran bölgenin uç kısmında bulunan küçük intrasitoplazmik kuyruk sağlar (122). 3 adet RAGE izoformu bulunur (Full-length RAGE, dominant negatif RAGE (DNRAGE) ve solubl RAGE (sRAGE)). Bu reseptörlerin esas farkı full-length RAGE haricindekilerde intrasitoplazmik kuyruğun bulunmamasıdır. Bundan dolayı yalnızca full-length RAGE hücre içi sinyalizasyonu oluşturabilir. Bu özellik nedeniyle sRAGE ile DNRAGE AGE etkilerini baskılar (Şekil 3) (120,123).



Şekil 2.3. Reseptör alanlarını gösteren RAGE-ligand etkileşimi (122).

AGE'nin RAGE'yle birleşmesiyle hücre içi sinyal yollarını; mitojen ile aktive edilen protein kinaz (MAPKs), p21ras, p38, NAD(P)H oksidaz, Rac, Cdc42 ve hücre dışı sinyalle regüle edilen kinaz 1/2 gibi GTPazların tetiklemesi NF κ B'yi etkinleştirir. NF κ B'nin etkinleşmesi adezyon moleküllerinin, inflamatuvar sitokinlerin ve bazı mediyatörlerin ekspresyonuna yol açar. NF κ B'nin etkinleşmesiyle çöpçü reseptörler, AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 reseptörleri de AGE'yle birleşir fakat RAGE gibi sinyalizasyon oluşmaz. AGE'lerin klirensi ile detoksifikasyonu sağlar (118,124).



Şekil 2.4. NF- κ B aktivasyonu ve AGE-RAGE etkileşimi sonucu meydana gelen değişiklikler (120).

2.2.3. AGE'nin Doku ve Hücre Düzeyinde Etkileri

AGE'lerin oksidatif yıkımı ile AGE reseptörlerinin aktivasyonunun uyardığı oksidatif stres, artmış oksijen radikalleri üretimine sebebiyet verir. Süperoksit dismutaz (SOD), başlıca antioksidan enzimlerdendir ve glikasyon neticesinde inhibe edilir. Ortaya çıkan reaktif oksijen radikalleri nitrik oksidin düzeyini düşürüp, endotelin-1 üretimini arttırır. Bunlar, hücre ve dokularda yağ peroksidasyonu ile vazokonstrüksiyonda artışa sebebiyet verir (107).

AGE reseptörlerinin bu proteinlerle aktifleşmesi ve proteinlerin glikasyonu neticesinde TNF- α , VCAM-1, IGF-1A, IL-1 gibi sitokinlerin üretimi ve salınımı artar. İnflamatuar sitokinlerin artması sonucu T-hücrelerin aktivasyonu, mitogenez, gama-interferon sentezi ve mononükleer hücrelerin kemotaksisi artar. Bu yolla hücrelerin indüklenmesi, bazal membran kalınlığında artmaya ve dokularda yeniden şekillenmeye yol açar (107).

Proteinlerin glikasyonu, proteinlerin konformasyonları ve net yükleri değiştirir. Çapraz bağlanmalar ile ortaya çıkan protein agregatları proteazlara dayanıklı duruma geldikleri için yenilenmezler. Hücre dışındaki ile hücre zarındaki matriks proteinlerinin glikasyonunun hücre matriks etkileşimlerini değiştirmesiyle hücrelerin yayılma ile adezyon özellikleri etkilenir (107).

Protein glikasyonu dokuyla ilişkili tromboz faktörlerini arttırmak suretiyle trombomodülin yapımını azaltır, serin proteaz inhibitörü PAI-1 üretimini arttırır, trombosit agregasyonunu arttırır ve fibrin stabilizasyonuna sebebiyet verir. Bu şekilde trombositlerin ömrü azalır, yapışkan olma durumları artar. Fibrinojen ile fibrinin plazmine sensitiveleri düşer, antitrombin III'ün işlevleri engellenir (125).

Diyastolik disfonksiyon, HbA1c düzeylerinden etkilenir. Bunun en olası sebebi de AGE'lerin miyokardda birikmesidir. Metilglükoksal türevi AGE'ler, kardiyomiyosit kontraktıl disfonksiyonunu uyarmak için kalpteki RAGE mRNA'sının up regülasyonunu sağlamaktadır. Bu olay kardiyomiyositlerde azalmış GSK-3-beta inaktivasyonu ve mitokondriyal membran potansiyeli depolarizasyonu ile bağlantılıdır (126).

AGE'ler iki şekilde kardiyak yetmezlik oluşumuna katkı sağlayabilmektedir. Çapraz bağların yapımını uyararak ekstrasellüler matriksteki proteinlerin fizyolojik özelliklerine etki edebilmektedir. Ek olarak, AGE reseptörleriyle etkileşim; miyokardiyal ve vasküler dokuda hücre içi değişikliklere sebebiyet verebilir, hem proinflamatuvar ve pro-fibrotik uyarıları hem de oksidatif stres faktörlerinin ekspresyonunu arttırabilir (127).

2.2.4. AGE Ölçüm Yöntemleri

Amadori ürünlerinin ölçümü, DM'li kişilerde metabolik kontrolü değerlendirmek amacıyla yapılmaktadır. Bunun için en fazla tercih edilen değişken HbA1C'dir. HbA1C 1-2 aylık sürede ortaya çıkan glikasyonu göstermektedir. Bu değişkeni ölçmek amacıyla önerilen metot yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC)'dir. Amadori ürünlerinden biri olan fruktozamin düzeyinin ölçümü, son iki haftadaki glisemi derecesini gösterebilmektedir (128).

3-deoksiglukozon, metilglioksal ve glioksal ara evre glikasyon ürünlerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Glioksal ve metilglioksalı ölçmek için gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi ve HPLC kullanılmaktadır (129).

AGE miktarının ölçmek amacıyla kalorimetrik ve florometrik yöntemler kullanılmaktadır. CML ve Pentosidin ölçümünde; kütle spektroskopisi, immüno blot enzim-bağılı immunosorbent ölçümü [ELISA] ve HPLC kullanılmaktadır. Pyralin ELISA ile, konsantrasyonu yüksekse HPLC'yle ölçülebilir (124). sRAGE miktarının ELISA ile ölçülmektedir. Aterosklerotik plaklardaki köpük hücrelerinde artmış olan AGEs birikimi İmmunohistokimyasal olarak ölçülebilmektedir (130).

Bunların haricinde dokudaki pentosidin ve CML miktarlarının ölçümünde kullanılan, uzun süreli glisemik seviyeleri gösteren non-invaziv bir metot olan cilt otofloresans yöntemi geliştirilmiştir. Cilt otofloresans yöntemi son evre böbrek yetmezliği ve DM için kardiyovasküler mortalitenin belirtecidir. Son araştırmalarda cilt otofloresansı ile diyabetik retinopati hariç DM'nin

mikrovasküler komplikasyonları arasında anlamlı bir ilişki olduğu bulunmuştur (131-134).

2.3. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Hayatın devamlılığı için moleküler oksijene ihtiyaç vardır. Organizmanın kullandığı oksijenin %1 ila %3 arasındaki miktarı ROT'a dönüşür. ROT toksik olabilir (135). İnsanların maruz kaldığı birçok karsinojen arasında en bariz olanlar nitrojen ve oksijen orjinli ROT ile Reaktif nitrojen türleri (RNT) olan reaktif maddelerdir. Organizmada RNT ve ROT yapımı birtakım makromoleküllerde bilhassa da plazma membranında oksidatif hasara neden olur. Bunun neticesinde de tümör, koroner hastalıklar, DM gibi oksidatif stres aracılı hastalıklar meydana gelir (136). Sağlıklı hücrelerde ROT seviyeleri enzimatik ile nonenzimatik antioksidanların sıkı kontrolü altındadır. Fakat DM'de, ROT'un oluşumu diyabetin başlıca komplikasyonu olan hiperglisemi oluşumuyla indüklenir. ROT ile antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengenin, ROT lehine bozulması durumu oksidatif stres olarak tanımlanabilir.

DM serbest radikal oluşumunun arttığı, antioksidan miktarının azaldığı, bunun sonucunda oluşan oksidatif stresin insülin direnci, hücre disfonksiyonu ve sonucunda diyabetik komplikasyonlara neden olduğu metabolik bir hastalıktır. Uzun süreli hiperglisemi ile artan hücre içi glukoz miktarı ROT oluşumunda artışa neden olur, normalde anti-oksidan sistemle ortadan kaldırılan ROT'ların miktarı hücrenin antioksidan kapasitesini aşar ve hücre hasarı başlar (137-140).

Hiperglisemik şartlarda glikolitik yolun artan aktivitesi sonucunda, mitokondride nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) birikimi gerçekleşir. NADH, mitokondriyal elektron transport sisteminin üstünde elektron basıncına neden olur ve mitokondri, yükselen NADH seviyelerini düşürme amacıyla NADH oksidasyonunu artırır. NADH'nin NAD'a yükseltgenmesi esnasında gerçekleşen elektron kaçakları neticesinde süperoksit radikallerinin yapımı gerçekleşir. Süperoksit, diğer reaktif oksijen türevlerinin tamamının öncüsüdür ve süperoksit düzeyinin yükselmesi oksidatif stres meydana gelmesinde rol alır (141). NADH düzeylerindeki değişim neticesinde oluşan ROT, oksidatif modifikasyonlara duyarlı olan gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz (GADPH) enziminin

fonksiyonunu da bozar. GADPH glikolitik yolakta, gliseraldehit 3 fosfatın, piruvata dönüşümünü gerçekleştirir, fonksiyonunda oluşan bozukluklar, krebs döngüsü ve glikolizin efektifliğini düşürür. Gliseraldehit 3 fosfat da dahil bir takım ara metabolitler birikir ve alternatif yollar aracılığıyla metabolize olur. Bu alternatif yolların metabolizmaya etkisi, kan glukozunun normal olduğu şartlarda minimal ve önemsizdir. Fakat, yüksek kan glukozu durumunda bu yollar, glukoz metabolizmasında öncülük yapar ve oksidatif stres, ROT yapımı, DM ve komplikasyonlarının gelişiminde aktif rol alır. Bu yollar; polyol yolağı, heksozamin yolağı, enediol yolağı, AGE oluşum yolağı ve PKC yolağıdır (şekil 5) (142).

AGE yolunun aktivasyonu, gen transkripsiyonuna, matriks ile diğer hücreler ve kan proteinleri (örneğin albümin) arasındaki sinyalleşmeyi düzenleyen hücrelere zarar vererek, bunların makrofajlar ve RAGE'ye bağlanmasına neden olur. Bunların sonucunda büyüme faktörleri ve pro-inflamatuvar sitokinlerin üretimi artar (138).

Polyol (sorbitol) yolunda, glukoz metabolizmasının artması, O_2^- radikallerinin artmasına neden olur. Glukoz metabolizmasının polyol yolağı, hücre içi glukoz düzeyleri arttığında aktifleşir. Yolakta ilk enzim kofaktörü NADPH olan aldoz redüktaz enzimidir. Aldo redüktaz aynı zamanda hız sınırlayıcı bir enzimdir ve glukozu sorbitole çevirir. Ardından kofaktörü NAD olan sorbitol dehidrogenaz sorbitolu fruktoza metabolize eder (143). Polyol yolağı, yüksek kan glukozu durumunda, glukozun ortalama %30'luk kısmının metabolize edilmesini sağlar. Yolağın, oksidatif strese etkisi 2 mekanizma ile ortaya konabilir (144). Başta yolakta meydana gelen metabolitlerin oksidatif stres ve hücre fonksiyonuna etkilerinden bahsedilebilir. Alkol türevlerinde biri olan sorbitol hidrofilik bir yapıdadır, bu sebeple hücre membranları üstünde rahatlıkla dağılmaz. Hücrenin osmolar dengesini, hücre içinde birikerek değiştirir. Fruktoz polyol yolağının son ürünüdür ve fruktoz-3-fosfata fosforile edilebilir. Ardından, Fruktoz-3-fosfat, 3-deoksiglukosona parçalanabilir. Bu iki bileşik AGE yapımına katılan güçlü glikosile edici bileşiklerdir (143). Yapılan hayvan deneyleri neticesinde, polyol yolağının oksidatif stres üzerine negatif etkileri bariz görülmektedir. Aldo redüktaz enzimi baskılanan hayvanlarla yapılan araştırmalarda; polyol yolağının

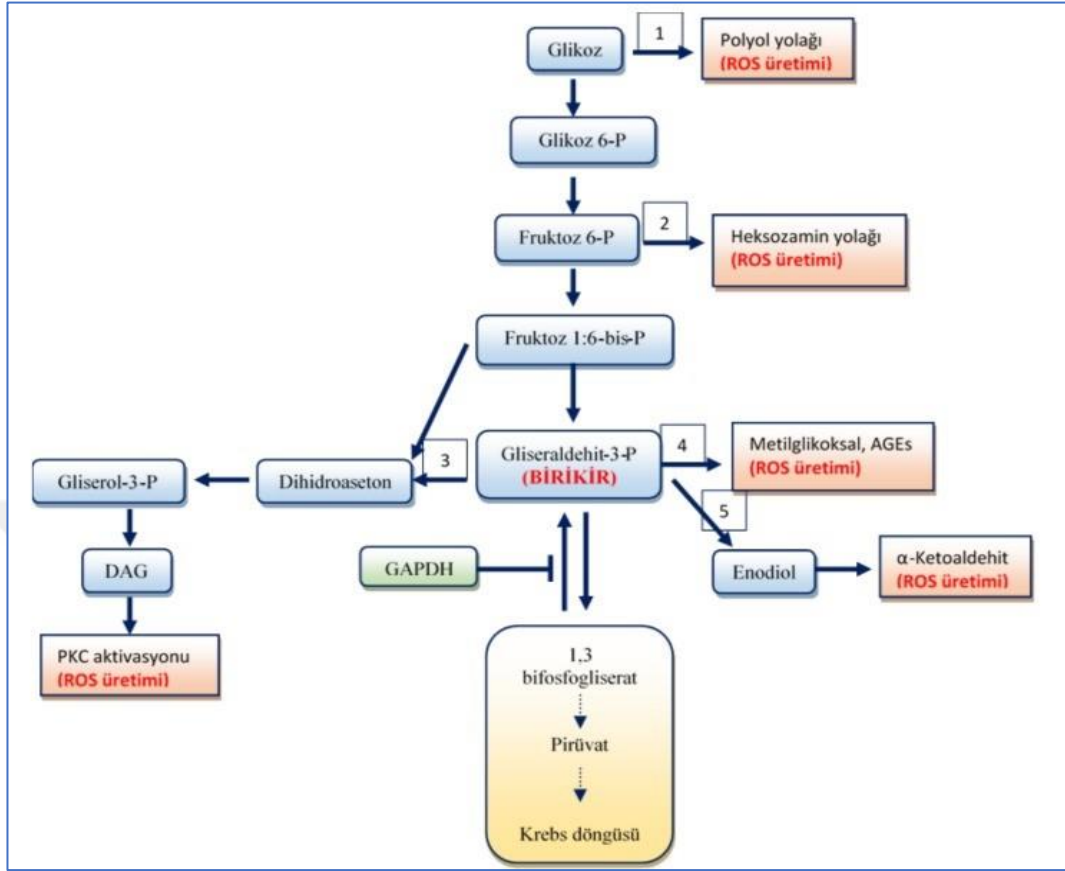
DM nedenli oksidatif stres için mühim bir kaynak olduğu görölmüştür (145,146). Aldoz redüktaz, glomerül, vasküler hücre dokuları, nervus, lens ve retinada yer alır, aktivitesindeki yükselme bu dokulardaki DM komplikasyonlarının patogeneğinde etkili olabilir (108). Bieçok hayvan deneyinde, aldoz redüktaz inhibitörlerinin DM komplikasyonlarının engellenmesini sağlayabileceğı gösterilmiştir (147-149)

Yüksek kan glukozu durumunda aktivitesi yükselen diğér bir yolak protein kinaz C (PKC)'dir. Hiperglisemide dokulara glukoz girişı arttığından dolayı, gliseraldehit-3-fosfat, transferazlar ve fosfatazlar ile gliserol fosfata çevrilir. Gliserol fosfat, DAG'ın prekürsörü olup hücrede DAG seviyesinin yükselmesi, PKC enzim grubunun indüklenmesiyle neticelenir (150). DM'de vasküler (kalp, retina, böbrek vb.) ve nonvasküler (iskelet kasları, karaciğér vb.) dokularda toplam DAG miktarı yükselir. Artan DAG düzeyleriyle aktive olan PKC, bazal membranın kalınlaşması, sitokin üretiminin artışı, vasküler geçirgenlik ve akışın regülasyonu gibi DM komplikasyonlarıyla ilgili birçok süreçte aktif rol alır.

Hiperglisemide etkinliğı artan ve oksidatif stres artışına katkıda bulunan diğér bir yolak da gliseraldehit oto-oksidasyon (enediol) yolağıdır. Glikoliz esnasında fruktoz 1,6 fosfattan meydana gelen bir ara ürün olan gliseraldehit 3 fosfat, yüksek kan glukozu durumunda GADPH enzim aktivitesinin baskılanmasından dolayı hücrede birikir. Biriken Gliseraldehit 3 fosfat, oto-oksidasyona maruz kalır. Bu yolak, potansiyel olarak toksik 2 metabolitin meydana gelmesiyle neticelenir. Bu toksik ürünlerden ilki olan α -ketoaldehitler, AGE yapımına; diğér toksik ürün olan hidrojen peroksit aktif redoks metalleri varlığında hidroksil radikallerinin yapımında rol oynayabilir (151).

Yüksek kan glukozu durumunda etkinliğı artan diğér bir yolak da heksozamin yolağıdır. Heksozamin yolağı; fizyolojik şartlarda amino grubu şekerlerin üretiminden sorumludur. Normoglisemik şartlarda heksozamin yolağının glukoz metabolizmasına etkisi %2 ila 5 arasındadır (152). Yüksek kan glukozu durumunda heksozamin yolağına glukoz girişı artar. Heksozamin yolağının artan aktivitesi neticesinde oluşán glikozamin-6-fosfat, pentoz fosfat yolağının hız kısıtlayıcı enzimi olan glukoz-6-fosfat dehidrogenazı inhibe eder (153). Biyokimyasal bir redüktan olan NADPH'ın esas oluştuğı yolak pentoz fosfat yoludur. Katalaz ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin kofaktörü olan

NADPH, antioksidanların üretiminde görev alır ve NADPH seviyesinin düşmesi, oksidan/antioksidan dengesinin bozulmasına sebebiyet verebilir.



Şekil 2.5. Gliko oksidatif stres yolları: yüksek kan glukozu durumunda glikolizin aktivitesi azalır. Glikolizin hız kısıtlayıcı enzimlerinden olan gliseraldehit-3 fosfat dehidrogenaz (GADPH), reaktif türevlerin yükselişini takiben inhibe olur ve glikoz alternatif yollara yönelebilir. Bunlar; 1) polyol yolağı, 2) heksozamin yolağı, 3) PKC aktivasyonu, 4) AGE üretimi, 5) Enodiol yolağıdır. Bu yolların aktivitesinin artması, hücrede reaktif türevlerin artışına sebebiyet verir (142).

Bu yolların aktivasyonunun ve ROT oluşumunun artması sonucunda ROT'lar membranda yer alan yağ asitleri ve kolesterol ile tepkimeye girip lipid peroksidasyonuna sebebiyet verebilir (154). Malondialdehit (MDA) bir lipid peroksidasyon ürünüdür ve sık kullanılan oksidatif stres belirteçlerinden biridir. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. DM'de, özellikle vasküler komplikasyonları olan hastalarda lipid metabolizması ve yapısında önemli değişiklikler bildirilmiştir (155).

Diyabetiklerde artan MDA seviyesi, peroksidatif hasarın diyabetik komplikasyonların gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Lipit peroksidasyonundaki artış aynı zamanda enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların savunma mekanizmalarındaki düşüşün bir göstergesidir (156). Birçok araştırma lipid peroksidasyonu ile diyabetik komplikasyonlar arasındaki bağlantıyı göstermiştir (157,158). 1991'de Baynes, ardından Ramesh ve ark. 2012 yılında, DM'de lipid peroksidasyonunun ateroskleroz ve nöral bozukluklar dahil olmak üzere birçok ikincil kronik komplikasyonu indüklediğini bildirdi (159,160). Hiperglisemik farelerde yapılan bir çalışmada artmış lipid peroksidasyonunun, NADPH oksidaz aktivitesini artırarak miyokard infarktüsünü şiddetlendirdiği öne sürülmüştür (161).

Artmış lipid peroksidasyonu ve anti-oksidan miktarındaki azalma, insüline bağımlı olmayan DM'de sekonder komplikasyonların ortaya çıkmasından önce başlar ve DKA, non-ketotik hiperozmolar koma, nefropati, nöropati, dermatolojik, gastrointestinal, genitoüriner, mikro ve makrovasküler komplikasyonların oluşmasına neden olur. Oksidatif stres, T2DM'de pro-trombotik reaksiyonları artırarak kardiyovasküler komplikasyonlara yol açar (138,140). Bu nedenle DM'de lipid peroksidasyonunun ve oksidatif stresin kontrolü çok önemlidir.

2.3.1. Diyabet ve Antioksidan savunma

ROT üretimini ve bunların neden olduğu hasarı engellemek için pek çok antioksidan savunma sistemi vardır (162). Antioksidan savunma sistemleri enzimatik ya da nonenzimatik şekilde bulunabilir. Enzimatik antioksidanlar glutatyon peroksidaz (GSH-PX), glutatyon redüktaz (GSH-RD), katalaz (CAT) ve SOD'dur. Çoğunlukla bulunan ise non-enzimatik antioksidanlar B1, B2, B6 ve B12 vitaminleri, antioksidan mineraller (mangan, selenyum, çinko ve bakır) ile folik asit, koenzim Q10, glutatyon, A, C ve E vitaminleri, karışık karotenoidler, alfa lipoik asit, çeşitli biyoflavanoidler, albümin ve ürik asit gibi kofaktörlerdir. Fizyolojik koşullarda antioksidanlar; sinyal aktarımını, bağışıklık yanıtını ve proliferasyonun düzenlenmesine etki ederler.

SOD antioksidan bir enzimdir ve süperoksit serbest radikalının moleküler oksijen ile hidrojen peroksit dönüşümünü katalizler. İnsanda SOD'un 2 izomeri

mevcuttur. Cu-Zn SOD sitoplazmada yer alır, dimerik yapıdadır, içeriğinde Zn ile Cu vardır, siyanidle inhibe olur. Mitokondride Mn SOD bulunur, tetramerik yapıdadır, içeriğinde Mn vardır, siyanidle inhibe edilemez. Çoğunlukla hücrede en fazla mevcut olan izomer sitoplazmik Cu-Zn SOD'dur. SOD'un fizyolojik işlevi; süperoksit serbest radikalının hücreye zarar veren etkilerinden, oksijeni metabolize eden hücreleri korumaktır. SOD, fagosit edilmiş bakterilerin hücre içinde yok edilmesinde de rol alır (162).

DM'de oksidatif stresin muhtemel kaynakları; redoks dengelerindeki değişimler, glukozun otooksidasyonu, E vitamini ile redükte glutatyon gibi düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların dokudaki miktarlarının düşmesi, CAT ve SOD gibi antioksidan enzimlerin işlevinin yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır. Tabei ve ark. deneysel diyabetik sıçanlardan bir gruba ω -3 yağ asiti diğer gruba da A, C ve E vitaminleri vermiş ve dört hafta sonunda kontrol diyabetiklerde kardiyak SOD enziminin dışında karaciğer ile kalpteki CAT enzimlerinin anlamlı düzeyde düştüğünü, A, C ve E vitamini verilen sıçanlarda kardiyak CAT enziminin anlamlı düzeyde arttığını, ω -3 yağ asiti verilen sıçanlarda enzim seviyelerinde herhangi bir değişim yaşanmadığını saptamışlardır (163). Diyabetik sıçanlara 200mg/kg dozda E vitamini desteği verildiğinde kan şekeri seviyesini düşmediği, fakat MDA seviyesinin düştüğü ve antioksidan enzimlerle (GSH-PX, GSHRD, CAT) antioksidan (eritrosit glutatyon, ürik asit, C vitamini, E vitamini) seviyelerinin normal olduğu saptanmıştır (164)

Deneysel ve klinik kalp yetmezliğindeki oksidatif stres, SOD aktivitesi, glutatyon peroksidaz aktivitesi, katalaz aktivitesi ve lipid peroksidlerin, tiyobarbitürik asit reaktif maddelerinin, MDA veya indirgenmiş tiollerin plazma seviyelerinin ölçülmesiyle dolaylı olarak değerlendirilmiştir. Birkaç klinik çalışma, kalp yetmezliğinde oksidatif stresin arttığını bildirmiş ve süperoksitin önemli bir katkı sağladığını öne sürmüştür (165-168). Sıçanlarda MI'ı takiben deneysel kalp yetmezliğinde benzer değişiklikler gözlenmiştir (169).

Birçok araştırmada DM'de gelişen makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlarda oksidatif stres incelenmiştir. Hiperglisemi, dislipidemi ve hiperinsülinemi oksidatif stresi uyarıp, ateroskleroza ve endotel disfonksiyona sebep olmaktadır. Bu sebeple ROT'un neden olduğu DM komplikasyonları ve

kardiyovasküler hastalıkların engellenmesi ve tedavisinde antioksidan seviyelerinin yükseltilmesi muhtemel bir tedavi metodu olabilir (170).

2.4. Diabetes Mellitus ve İnflamatuvar Yanıt

Kronik düşük dereceli inflamasyonun kardiyovasküler hastalıklar, obezite ve Tip 2 DM gibi bulaşıcı olmayan kronik hastalıkların gelişimi ile ilerlemesinde mühim bir rol almaktadır (171). İspatlar kronik inflamasyonun, T2DM komplikasyonlarının patogenezinde kilit bir komponent olarak bulunduğunu, β hücre disfonksiyonu ve insülin direnciyle bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır. İnflamatuvar süreçler; pankreas, karaciğer ile kas dokusunda yağ artışı, serbest radikal seviyesinin vücutta yükselmesi (oksidatif stres) ve kan glukoz düzeyinin artışı gibi patolojik mekanizmaları bulundurmaktadır. Ayrıca inflamatuvar süreç, fiziksel inaktivite, alkol tüketimi, beslenme alışkanlıkları, sigara ve öteki yaşam tarzı değişiklikleri gibi faktörlerden etkilenebilmektedir (172).

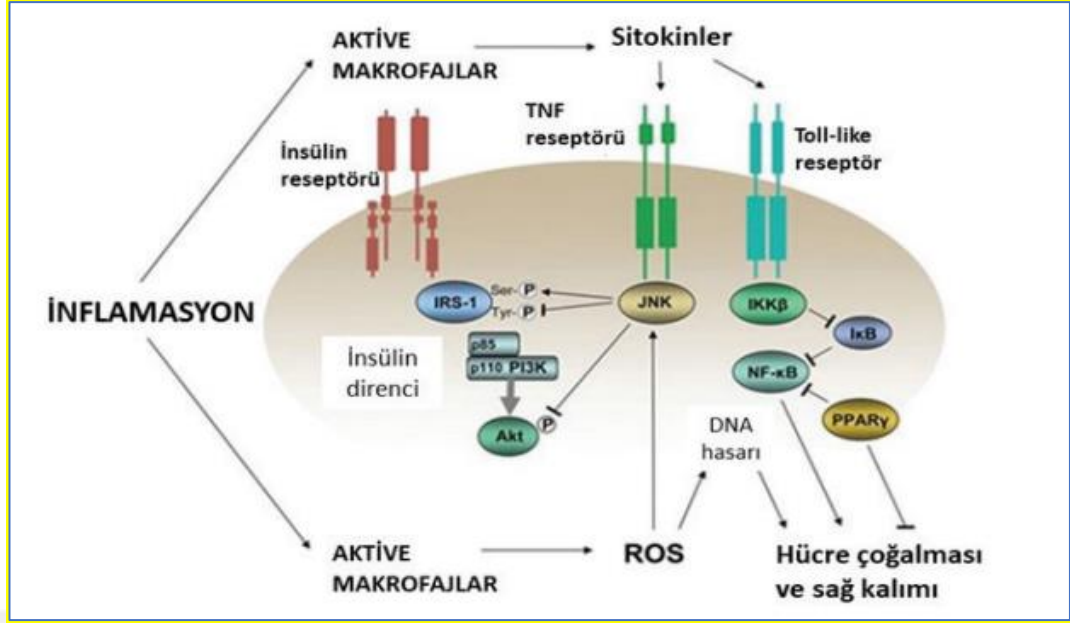
Elde edilen bazı klinik ve deneysel veriler, tip 2 DM ve obezitede pankreas, kas, karaciğer ve adipoz dokunun karakteristik inflamasyon bölgeleri olduğunu net biçimde göstermiştir. Makrofajların bu dokulara sızması, obez ve tip 2 DM'li kişilerin bulunduğu araştırmalarda ya da deney hayvanlarında gerçekleştirilen DM ve obezite modeli çalışmalarında ortaya koyulmuştur (173). Adipoz doku kaynaklı salınımı artmış interlökin-6 (IL-6), interlökin1- β (IL-1 β) ve TNF- α seviyeleri, obeziteye bağlı insülin direnci ve proinflamatuvar sitokin üretimi arasındaki bağlantıyı ortaya koyan en tutarlı göstergelerdir (174).

Proinflamatuvar sitokinlerin artması insülin salınımını inhibasyona uğratarak iskelet kası, karaciğer ve adipoz dokuda insülin direncine neden olurlar. Dolaşımda bulunan sitokinler artan oksidatif stres sebebiyle insülin hormon sekresyonunda hücre ölümleri ile disfonksiyona sebep olarak doğrudan etkileyebilirler. Ayrıca beta hücre fonksiyonlarını, artmış adipoz doku inflamasyonu ile dolaylı yoldan etkileyebilirler. İnsülin direnci olması durumunda, karaciğer ile lipid metabolizmasında meydana gelen serbest yağ asit düzeyindeki yükselişin, inflamasyona sebep olan esas etkenler içinde bulunan adipokinlerin (bilhassa sitokinlerin) sentezinde mühim bir yeri olduğu dile getirilmektedir (175).

İnsülin, normalde insülin reseptörünü insülin sinyal yolağında aktifleştirerek etkisini gösterir. Tirozin kinaz reseptör familyasından olan insülin reseptörü, insülinin bağlanması ile beraber ilk olarak otofosforilasyona maruz kalır, ardından insülin reseptör substrat (IRS)-1 isimli proteinine tirozinler üstünden fosforilleme işlemini yapar. Bu sayede aktif edilen IRS-1 insüline spesifik sinyal yollarını stimüle ederek hücresel cevapların meydana gelmesinde etkili olur. Kronik inflamasyon oluştuğunda, çok fazla düzeyde TNF- α dokulardan salgılır, böylece hedef dokulardaki MAPK ve NF-kB vb. inflamatuvar kinazları aktifleştirilmesi sağlanmış olur. Bu kinazlar, tirozin fosforilasyonunu IRS-1'in serin fosforilasyonuna sebep olarak önler. Tirozinler üstünden değil de serinler üstünden fosforillenen IRS-1 aktif edilemez, böylece sinyal iletimi baskılanmış olur. Sonuç olarak dolaşımda normal düzeyde insülin olmasına karşın, insülin reseptörlerinde yanıtızsızlık oluşacağı için insülin direnci meydana gelir (Şekil 6) (176,177).

İnsülinin, insanlarda TNF- α , C reaktif protein (CRP), IL-6 ve MCP-1 gibi önemli inflamatuvar düzenleyici düzeylerini önemli seviyede düşürdüğü, insülinin anti-inflamatuvar etki oluşturduğu araştırmalar bulunmaktadır. Bu araştırmalar, anti-inflamatuvar işleyişin, antidiyabetik süreçte görev alabileceğini, aynı zamanda T2DM'nin inflamatuvar bir hastalık olarak ifade edilebileceğini ortaya koymuştur (178,179).

DKM, kardiyomiyosit ölümü, hipertrofi ve fibroz ile karakterize edilir ve bu anormal olaylar, farklı kardiyak hücre tiplerinde meydana gelen proinflamatuvar kaskadların bir sonucudur. Endotel ve kalp kası hücrelerinde DM'nin neden olduğu değişikliklerin, DCM'nin başlangıcında ve ilerlemesinde ana nedensel unsurlardan biri olduğu bildirilmektedir. Lökositlerin, sitokinlerin ve kemokinlerin zararlı rolü diyabetik kalpte belirgindir, ancak DCM'nin bir nedeni veya sonucu olarak enflamasyonun kesin rolü tam olarak anlaşılamamıştır (180).



Şekil 2.6. Hücre çoğalması ve sağkalımı ile insülin direncinin inflamasyonda eş dönemli indüklenmesi. Aktive edilmiş immün sistem hücreleri, NF-κB yoluyla hücre çoğalması ile sağkalımını, JNK yoluyla ROS ile insülin direncini indükleyen sitokinlerin salınmasını sağlar. Önleyici etkiler biten çizgilerle ve pozitif etkiler oklarla belirtilmiştir (177).

2.5. Diyabetes Mellitusta Tedavi

Diyabet tedavisinde hedef; gün içinde glisemik kontrolün sağlanması, mikrovasküler ile makrovasküler kronik komplikasyonların engellenmesi, akut komplikasyon ortaya çıkma riskinin düşürülmesi, beraber seyreden diğer problemlerin düzeltilmesi ve bu sayede DM'li bireyde yaşam kalitesinin artırılmasıdır. Tedavinin ana etmenleri medikal tedavi, eğitim, egzersiz ve tıbbi beslenme tedavisidir (181).

2.5.1. Beslenme Tedavisi

Tıbbi beslenme tedavisi DM seyri boyunca metabolik kontrolü sağlamak için önemlidir (182). Beslenme ile metabolik dengeyi kurmak için kan glukoz ve lipid düzeylerini kontrol altında tutulması, gerekli besinlerden faydalanılması, akut ve kronik komplikasyonların riskinin azaltılması hedeflenmektedir (183).

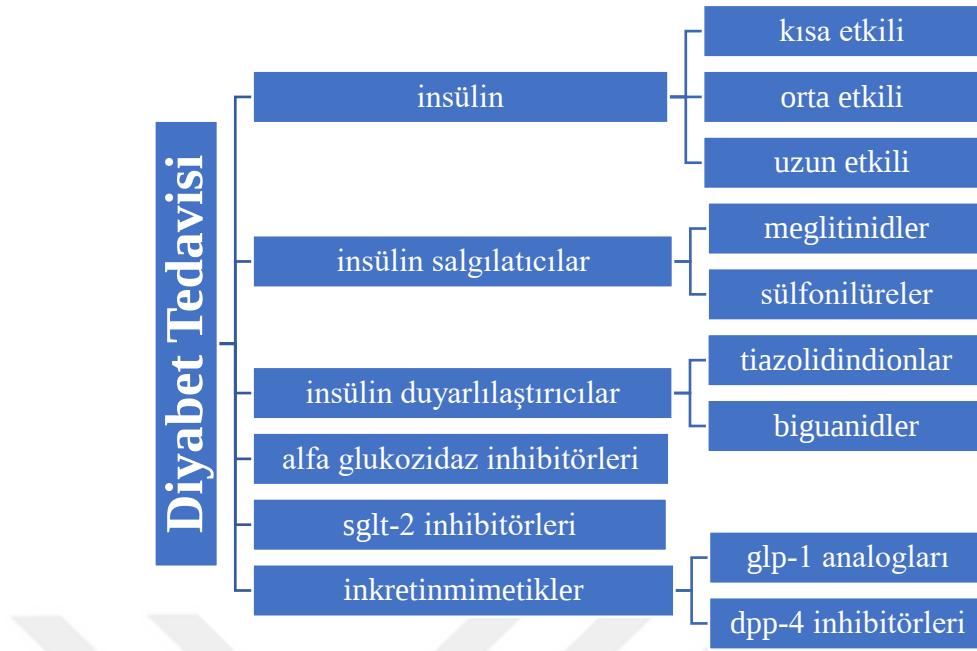
T2DM hastalarının metabolik durumu da göz önünde bulundurularak, beslenme tedavisi ile HbA1c düzeylerinde %1-2'ye varan düşüşler sağlanabilmektedir (182). Tıbbi beslenme tedavisi ile kan şekerinin normal seviyelerde tutularak uygun metabolik sonuçları elde etmek ve sürdürmek, DM komplikasyonlarını önlemek, sağlığın iyileştirilmesi, bireyin yaşam tarzı dikkate alınarak bireysel beslenme gereksinimlerinin sağlanması hedeflenir (182).

2.5.2. Egzersiz Tedavisi

Egzersiz DM tedavisinde etkili bir tedavi olup kısa vadede plazma glukoz konantrasyonunun stabilizasyonu, kronik dönemde ise vücut kompozisyonu, insülin direnci ve glikolize hemoglobinde iyileşmeye neden olur. Kılavuzların egzersiz tedavisi yaklaşımları farklılık göstermekle birlikte çoğunlukla tip 2 DM li bireylere haftalık 150 dakika orta ve şiddetli aerobik egzersiz önerilmekte ve bu genel popülasyonda kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde yapılan kılavuz önerileriyle benzer olduğu görülmektedir (184).

2.5.3. Medikal Tedavi

T1DM'li hastaların tedavisinde yalnızca insülin kullanılmaktadır. T2DM'de ise insülin tedavisi ile oral OAD ilaçlar ve enjektabl antidiyabetik ilaçlar da kullanılabilmektedir. Beş grup OAD ilacın ülkemizde kullanım izni bulunmaktadır; İnsülin salgılatıcı (sekretogog), insülin duyarlılaştırıcı (sensitizer), insülin direncini azaltmaya yönelik insülinomimetik (inkretin-bazlı) ilaçlar, alfa-glukozidaz inhibitörleri ve SGLT- 2İ İnhibitörleri (185,186).



Şekil 2.7. DM'nin medikal tedavisi

2.5.3.1. İnsülin Salgılatıcı (Sekretagog) İlaçlar (Sülfonilüreler ve Meglitinidler)

İnsülin sekresyonunu pankreas β -hücrelerinden artırarak etki ederler. Sülfonilüre (Glipizid, Glibenklamid (gliburid), Glimepirid, Glizlazid) ve glinid (Repaglinid, Nateglinid) grubu ilaçlar bu özelliكتedir. Öğün öncesi kullanım ile doz esnekliği sağlaması ve ucuz olma avantajı vardır. Yan etki olarak hipoglisemi, kilo artışı, alerji ve döküntü, hepatotoksisite ve hematolojik toksisite görülebilir (5,187).

2.5.3.2. İnsülin Duyarlılaştırıcı (Sensitizer) İlaçlar

Biguanid ilaçlardan metformin hepatik glukoz üretimini baskılayarak etki gösterir ve T2DM'de genellikle ilk tercihtir. Hipoglisemi riski azdır, kilo bakımından etkisiz veya hafif bir kilo kaybı etkisi gösterir ve kardiyovasküler hastalık riskini azaltması nedeniyle avantajlıdır. Gastrointestinal irritasyon, vitamin B12 eksikliği, ağızda metalik tat ve nadiren laktik asidoz yan etkileri gösterebilir (5,187).

Glitazon grubu ilaçlar ise daha çok periferik dokularda insülin duyarlılığı artışı yapar. Hipoglisemi olmaması, HDL-kolesterolü yükseltmesi ve trigliserid düzeylerini düşürmesi gibi avantajları vardır. Konjestif kalp yetmezliği, ödem,

kilo artışı, osteoporotik kırık riskinde artış gibi yan etkiler görülebilir. Ülkemizde yalnızca pioglitazon preparatı mevcuttur (5,187).

2.5.3.3. Alfa-Glukozidaz İnhibitörleri

Kompleks karbohidratların emiliminde gecikme yaparak etki eder. Kan glukozunda 2.2–2.8 mmol / L ; 40–50 mg / dL düşüş meydana getirirler. Ortalama %0,3-1 A1C düşüşü sağlarlar. Sistemik etkilerinin bulunmaması ve tokluk şekerine etkili olması avantajları olsa da şişkinlik ve gaz gibi gastrointestinal yan etkiler nedeniyle uzun süreli kullanımı zorlaşmaktadır. Ülkemizde yalnızca akarboz preparatı mevcuttur (5,187).

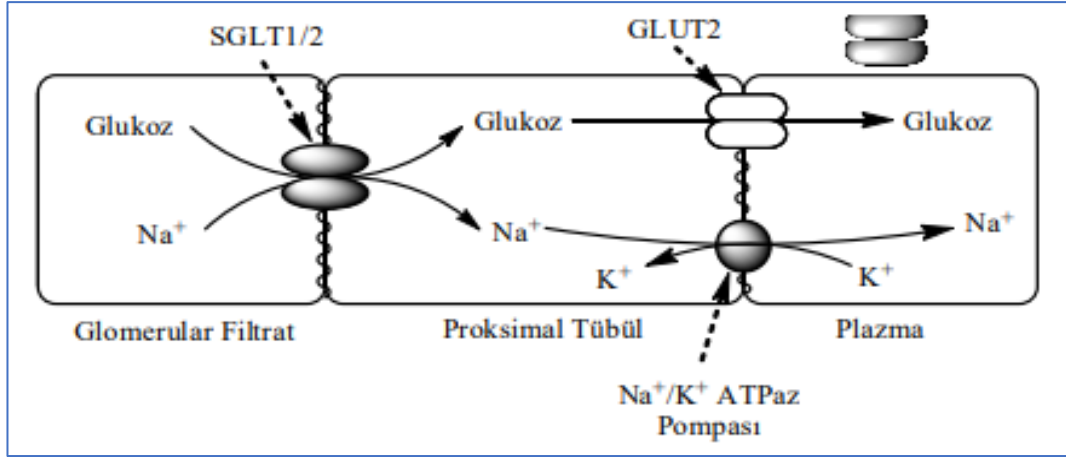
2.5.3.4. Sodyum Glukoz Transporter-2 İnhibitörleri (SGLT-2 İnhibitörleri)

SGLT2 inhibitörleri (dapagliflozin, canagliflozin ve empagliflozin), SGLT2'yi inhibe ederek proksimal tübülde glukoz absorpsiyonunu engelleyerek insüliniden ayrı olarak glukozu azaltırlar. Etkileri insüliniden ayrı bir şekilde olduğundan metforminin ardından DM'nin herhangi bir döneminde kullanılabilirler (188).

Kardiyovasküler araştırmalardan elde edilen son ispatlar, 2 yeni antidiyabetik ajan sınıfının, SGLT-2İ ve Glukagon benzeri peptid (GLP-1) reseptör agonistlerinin, diyabetik bireyler için glukoz azaltıcı etkilerinin haricinde kalbi koruduklarını ve ölümleri düşürdüğünü ortaya koymuştur (189).

2.5.3.4.1. Empagliflozin

GLUT2 ile SGLT2, proksimal renal tübüldeki glukozun yeniden emiliminde mühim bir görev görmektedir (Şekil 8). Kapasitesi yüksek fakat afinitesi düşük bir taşıyıcı olan SGLT2 proksimal tübülde renal glukoz yeniden emiliminin büyük bir kısmından sorumlu olup, sodyum glukoz aktif transportunu 1:1 seviyesinde yapmaktadır. Ardından GLUT 2 aracılığıyla glukoz, kan dolaşımına yeniden emilmektedir. Glukozun geriye kalanı distal proksimal tübülde afinitesi yüksek bir taşıyıcı olan SGLT2 ile yeniden emilimi sağlanmakta ve GLUT1 aracılığıyla dolaşıma geri konulmaktadır. Bu sayede glukoz, diyabetik olmayan kişilerde idrarda bulunmamaktadır (190)



Şekil 2.8. Proksimal tübüler epitel hücresi aracılığıyla glomerüler filtrattan glukozun yeniden emilim işleyişi (ATPaz, Adenozin trifosfat; SGLT, sodyum glukoz ortak taşıyıcı (SGLT2 genellikle S1 ile S3 segmentlerinde, SGLT1 ise S3 segmentinde bulunmaktadır); GLUT, Glukoz taşıyıcı;) (190).

SGLT-2'nin en seçici inhibitörü olan EMPA, T2DM tedavisinde uygulanır (191). Antidiyabetik etkilerini SGLT-2 inhibisyonu yoluyla proksimal tübülden glukoz emilimini inhibe ederek ortaya koymaktadır (192).

EMPA; aktif metaboliti olmayan ve biyoyararlanımı %78 düzeyinde olan bir ajandır. Maksimal etki düzeyine barsaklardan emiliminin 1,5 saat ardından kavuşur ($t_{max}=1,5$ saat). Yağ içerikli ve yüksek kalorili besinlerle alındığı zaman emilimi azalmaktadır. Esas olarak konjugasyon ve glukouronidasyon ile metabolize olur. Feçes ile %41'i atılırken, idrar ile atılan kısmı %54,4'tür ve 12.4 saat yarılanma ömrü vardır (193).

EMPA'nın antidiyabetik özelliklerini araştıran ilk faz 3 araştırma "Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial" (EMPA REG MONO) adlı araştırmadır. Araştırmada yer alan bireyler plasebo, sitagliptin, EMPA 25 mg ve EMPA 10 mg gruplarından oluşmaktadır. Bu araştırmada EMPA; 24 hafta süren takip döneminde plaseboyla kıyaslandığında; HbA1c'yi 25 mg dozunda %0,85 düzeyinde, 10 mg dozunda ise %0,74 düzeyinde azalttığı ispatlanmıştır. Aynı zamanda daha evvel antidiyabetik etkileri ispatlanmış ve piyasada var olan sitagliptinle kıyaslandığında 2 EMPA dozunun da birbirine

yakın etkinliği tespit edilmiştir. Yan etkiler bakımından kıyaslandığında bütün gruplar benzer biçimde tespit edilmiştir (194).

Metformin ve insülinin kalp yetersizliği seyrinde çok fazla etkileri bulunmamasına karşın, tiazolodindionların kalp yetersizliği ve ödem riskini yükselttiği belirtilmiştir (195). Bu sebeple kardiyovasküler açıdan yeni antidiyabetik ilaçların güvenli olması şartı ortaya koyulmuştur. “Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes” (EMPA-REG OUTCOME) adlı araştırma EMPA’nın kardiyovasküler güvenliğini araştırmak amacıyla yapılmış, kardiyovasküler hastalığı bulunan 7020 Tip 2 DM vakası EMPA ile plasebo gruplarına ayrılarak ortalama 3,2 sene süresince izlenmiştir. Araştırmanın primer sonlanım noktası ölümcül olmayan inme, ölümcül olmayan myokard enfarktüsü ile kardiyovasküler ölüm kombinasyonu şeklinde kabul görmüştür. Primer sonlanım noktasında kardiyovasküler ölümde %38 düzeyinde daha az seyredilirken, EMPA grubunda %14 düzeyinde, bütün sebepler kaynaklı ölümde %32 düzeyinde, kalp yetersizliği sebebiyle hastaneye yatışlarda %35 düzeyinde rölatif risk düşüşüne neden olmuştur (196). Ölümcül olmayan inme ile ölümcül olmayan myokard enfarktüsü bakımından kıyaslandığında 2 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu kardiyovasküler faydalarının patofizyolojik işleyişi henüz net olarak belirtilmemiş olsa bile EMPA’nın; albuminüriyi, kardiyak oksijen ihtiyacını ve arteriyel sertliği azaltma yolu ile olguları kardiyorenal sendromdan koruyup bu pozitif etkilere neden olduğu söylenmiştir (197-200). Ölümcül olmayan inme ile MI için plaseboya üstünlük sağlayamaması EMPA’nın pozitif etkilerinin antiaterojenik ile antidiyabetik etkilerinden ayrı olduğunu göstermektedir. DM tedavisi amacıyla uygulanan ajanlardan birçoğunun aterogenezi engellemesine rağmen kardiyovasküler mortaliteyi engellemediği halihazırda bilinmektedir (195). Aynı zamanda bu araştırmanın popülasyonu kardiyovasküler hastalığı bulunan Tip 2 DM vakalarından meydana gelmiştir ve popülasyonun sadece %10’unu kalp yetersizliği vakaları temsil etmektedir. Bu araştırmada EMPA’nın bilhassa kalp yetersizliği sebebiyle hastaneye yatışı ve ayrıca ölümü engellediği düşünülürse riski yüksek olan kişilerde EMPA’nın kalp yetersizliğine giden süreci önleyerek klinik yararı olacağı neticesine ulaşılmaktadır (201).

EMPA'nın özellikle kalp yetersizliği vakaları üstündeki etkilerinin anlaşılması amacıyla "Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure EMPEROR- Reduced" isimli araştırma yapılmıştır (202). T2DM tanılı ya da tanısı bulunmayan kalp yetersizliği vakalarının bulunduğu bu araştırmada plaseboyla kıyaslandığında EMPA'nın kalp yetersizliği ile kardiyovasküler ölüm sebebiyle hastaneye yatışları bulunduran primer sonlanım noktasında risk düşüşünü %25 seviyesinde sağladığı belirtilmiştir. "Randomized Trial of Empagliflozin in Nondiabetic Patients With Heart Failure and Reduced Ejection Fraction (EMPA- TROPISM)" isimli araştırmada da ejeksiyon fraksiyonu düşük olan ve kalp yetersizliği bulunan diyabetik olmayan vakalarda EMPA'nın plaseboya kıyasla sol ventrikül diyastol sonu ile sistol çapları düşürdüğü, sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunu yükselttiği ve egzersiz kapasitesini altı dakikalık yürüme testinde yükselttiği belirtilmiştir (203). Ancak bugüne kadar yapılan araştırmalarda sol ventrikül strain parametrelerine EMPA'nın pozitif bir etkisi hala tespit edilmemiştir (204).

SGLT-2 kanallarının yetişkin insan miyosit hücrelerinde var olmaması, SGLT-2 inhibitörlerinin başka yollar üstünden bu pozitif kardiyovasküler etkilerini gösterebileceğini akla getirmektedir. EMPA'nın kardiyovasküler pozitif etkilerinin fizyopatolojisini ortaya koyabilmek amacıyla yapılan çeşitli araştırmalar vardır. EMPA'nın, Baartscheer ile arkadaşlarının yaptığı araştırmada SGLT inhibisyonu dışında, sitozolik kalsiyum ve sodyum düzeylerini kardiyak sodyum-hidrojen değiştirici aktivitesini inhibe ederek düşürdüğünü, mitokondriyal kalsiyum düzeyini yükselttiğini ortaya koymuştur (205). Yalnızca kardiyak sodyum – hidrojen değiştirici pompa aktivite durumunun artması bile deneysel kalp yetersizliğine sebep olduğu düşünülürse EMPA'nın antidiyabetik etkisinin haricinde kardiyoprotektif olabileceği söylenebilir (206).

2.5.3.5. İncretinmimetik İlaçlar

DPP-4, gastrik inhibitör peptid (GIP) ile glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) gibi biyoaktif peptitlerin birçoğunu parçalayan enzimdir. Bu biyoaktif peptitlerin parçalanmasını DPP-4 inhibitörleri inhibe eder. GLP-1 düzeyindeki yükseliş özellikle hipoglisemi yaratmadan insülin salgılanmasında artışa sebep olur. Hipoglisemiye sebep olmazlar çünkü glukozu bağımlı bir şekilde etki

gösterirler (207). Kullanıldıktan sonra kontrollü şekilde postprandiyal glukoz seviyesini azaltırlar, glukagon sekresyonunu baskılamış olurlar. Bu grupta yer alan alogliptin, linagliptin, sitagliptin, saksagliptin ve vildagliptin ağız yoluyla alınırlar. En önemli avantajları, hipoglisemiye sebep olmamaları ile kiloya herhangi bir etkilerinin bulunmamasıdır. Kalp, böbrek ve karaciğer yetmezliği, pankreatit, emzirme ve gebelik hikayesi olan bireylerde uygulanması risklidir (5).

Glukagon benzeri peptid reseptör (GLP-1R) agonistleri ilaçlar albiglutid, dulaglutid, eksenatid, eksenatid XR, LİRA, liksisenatid, semaglutid gibi ajanlardan oluşur. GLP-1 ve GİP, postprandiyal bağırsaktan salınan inkretin hormonlarıdır. GLP-1 reseptörünün uyarılması, pankreastan insülin salınımını artırır ve glukagon salgılanmasını azaltır. Mide boşalmasını geciktirebilir ve bu durum iştahın bastırılmasına yol açabilir. GLP-1 reseptör agonistleri gelişmiş farmakokinetik özelliklere ve GLP-1'e göre daha stabil farmakodinamik profile sahip insan GLP-1'in sentetik analoglarıdır. Eksenatid ve liksisenatid, GLP-1 molekülü ile yaklaşık %50 benzerken, albiglutid, dulaglutid ve LİRA, GLP-1 ile yaklaşık %90 benzerlik gösterir. Günde iki kez uygulanan eksenatid ve günde bir kez uygulanan liksisenatid devamlı reseptör aktivasyonu sağlayamazlar ve kısa etkili bileşiklerdir. Günde bir kez uygulanan LİRA ve haftada bir kez uygulanan albiglutid, dulaglutid, semaglutid ve eksenatid ise devamlı reseptör aktivasyonu sağlarlar ve uzun etkili bileşiklerdir. GLP-1 reseptör agonistleri etkinliği ve güvenliği daha önce değerlendiren çalışmalar yayınlanmıştır; bu çalışmalara 2 kısa etkili ajan (eksenatid ve liksisenatid) ve 5 uzun etkili ajan (LİRA, eksenatid, albiglutid, dulaglutid, semaglutid) dahil edilmiştir. Tüm çalışmalarda, hastalara rutin olarak GLP-1 RA'lar uygulanmış ve HbA1C'de %0.3 ile %1.9 arasında değişen oranlarda azalma görülmüştür (208).

2.5.3.5.1. Liraglutid (LİRA)

İnkretin familyasında bulunan bir peptid hormon olan Glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) 30 aminoasit içerir (209). GLP-1, karbonhidratlar, proteinler ve yağlar gibi besinlerin alınması üzerine bağırsak enteroendokrin L hücrelerinden ve beyin sapındaki soliter yolun çekirdeğindeki bazı nöronlardan sentezlenen ve salgılanan bir gastrointestinal peptittir (210).

GLP-1 geniş farmakolojik potansiyeli olan çok yönlü bir hormondur. GLP-1'in çok sayıdaki metabolik etkileri arasında, insülin sekresyonunun glukoza bağımlı uyarılması, gastrik boşalmanın azalması, gıda alımının inhibisyonu, natriürez ve diürezin artması ve kemirgen β -hücresi proliferasyonunun modülasyonu yer alır. GLP-1 ayrıca kardiyο ve nöroprotektif etkilere sahiptir. İnflamasyonu ve apoptozu azaltır, öğrenme ve hafıza, ödül davranışı ve lezzetlilik üzerinde etkileri vardır. Arttırılmış etki ve sürekli etki için biyokimyasal olarak değiştirilmiş GLP-1 reseptörü agonistleri, T2DM tedavisi için klinik kullanımda başarılıdır ve birkaç GLP-1 bazlı farmakoterapi, obezite tedavisi için klinik değerlendirmededir (211).

Açillenmiş bir GLP-1R agonisti olan LİRA insan GLP-1 ile %97 homolojiye sahiptir, günde bir kez subkutan enjeksiyona izin veren 10-14 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve T2DM için yeni bir tedavi olarak onaylanmıştır. T2DM'li hastalarda LİRA'nın klinik deneyleri hem açlık hem de tokluk glukoz düzeylerinde iyileşme, β -hücre fonksiyonunda iyileşme, plazma glukagon konsantrasyonunda azalma, kilo kaybı, kan basıncında azalma ve kardiyovasküler risk biyobelirteçlerinde iyileşme olduğunu göstermektedir. Son zamanlarda yapılan in vivo çalışmalar, LİRA'nın prediyabetten diyabete ilerlemesini de etkileyebileceğini göstermektedir.

LİRA, vasküler adezyon moleküllerinin in vivo ekspresyonu ile kardiyovasküler olayların bilinen bir belirteci olan endotel hücre disfonksiyonunu ve TNF- α kaynaklı oksidatif stresi, inflamasyonu azaltır (212,213).

ApoE (-/-) farelere LİRA'nın infüzyonu, aort duvarında monosit/makrofaj infiltrasyonu ve makrofajlarda baskılanmış köpük hücre oluşumu ve Açıl-CoA: kolesterol açıltransferaz 1 (ACAT1) ekspresyonu ile aterosklerotik lezyonları önemli ölçüde geciktirdi. Bu bulgular, LİRA'nın, esas olarak ACAT1 aşağı regülasyonu ile ilişkili makrofaj köpük hücre oluşumunu baskılayarak aterosklerotik lezyonların gelişimini önleyebileceğini göstermektedir (213).

LİRA 'nın kardiyovasküler sonuçlar ve diğer klinik açıdan önemli olaylar üzerindeki uzun vadeli etkilerini değerlendirmek için 2010'da başlatılan, toplam 9340 hastanın dahil olduğu ve ortalama 3,8 yıl süren, DM'de LİRA etkisinin ve

eyleminin tasarımı: Kardiyovasküler sonuçlarının değerlendirilmesi (LEADER) çalışmasında uzun etkili GLP-1R, LİRA ile kardiyovasküler mortalitenin azaldığı raporlanmıştır. Plasebo grubuna göre kardiyovasküler ölümden %22 seviyesinde anlamlı bir düşüş, ölümcül olmayan MI'da %12 seviyesinde anlamlı olmayan bir düşüş ve ölümcül olmayan inme seviyesinde %11 düşüş tespit edilmiştir. Herhangi bir nedenden ölüm seviyesinde %15 düşüş saptanmıştır. LİRA grubunda kalp yetmezliği sebebiyle hospitalizasyon %13 seviyesinde daha az sıklıkta tespit edilmiştir. LİRA'nın ayrıca hipoglisemi, vücut ağırlığı ve HbA1c'yi de azalttığı raporlanmıştır (214).

2.5.3.6. İnsülin Tedavisi

T1DM'lilerde veya insülin rezervi azalmış T2DM hastalarında fizyolojik sekresyonu taklit edecek şekilde bazal-bolus şeklinde verilir. Ancak birçok hastada insülin üretimi normal düzeyde olup insülin direnci ya da eşlik eden diğer sorunlar nedeniyle insülin desteği yapılması gerekebilir (5,187).

T1DM, diyet ile kontrol altına alınamayan GDM ve başlangıçta yavaş seyirli yetişkinin otoimmün diyabeti (LADA) olguları klasik olarak insülin kullanımı gerektirir. Bunun yanında Tip 2 DM vakalarında da bazı durumlarda insülin tedavisinin kullanılması önerilmektedir: İnsülin harici tedavilerle amaçlanan glisemik kontrolün elde edilememesi (örn. glisemi ≥ 300 mg/dl ve/veya HbA1c ≥ 10), insülin eksikliği akla getiren durumlar (aşırı kilo kaybı ile ketozis), polidipsi ve poliüri gibi ağır hiperglisemik semptomlar, HHD ve DKA gibi hiperglisemik aciller, pankreas yetersizliği (kronik pankreatit, pankreatektomi gibi), ağır ve böbrek karaciğer yetersizliği, gebelik ve laktasyon, major cerrahi operasyonlar, akut ateşli ve sistemik hastalıklar, akut MI, insülin harici tedavilere tolerasyon gösterememek, klinik açıdan ciddi insülin direnci, yüksek doz kortikosteroidin uzun süreli kullanımı, diyetle kontrol edilemeyen GDM (5,187).

Etki profillerine göre hızlı etkili (glulisin-lispro-aspart), kısa etkili (kristalize insan insülin), orta etkili (NPH insan insülin), uzun etkili (glargin-detemir-degludec) ve inhaler insülinler bulunmaktadır. Kısa/hızlı etkili ya da inhaler insülinler prandiyal, orta/uzun etkili insülinler bazal ihtiyacı

karşılacaktır. Tedavi uyum kolaylığı sağlamak için orta/uzun etkili ile kısa/hızlı etkili insülinlerin birçok kombinasyonu oluşturulmuştur. Genelde ciltaltı enjeksiyonla kullanılırlar. Hızlı/kısa etkililer ayrıca intramüsküler ve intravenöz verilebilir ancak orta/uzun etkililerin intravenöz kullanımı kontrendikedir (5,187).

2.6. Deneysel Tip 2 Diabetes Mellitus Modelleri

Bu modeller üçe ayrılır;

Spontan modeller: Yüksek seviye hiperglisemi ile ılımlı seviyede hiperglisemi modelleri bulunur.

Deneysel modeller: Cerrahi modeller (hipotalamik lezyon, pankreatektomi), kimyasal modeller (alloksan, Streptozotosin), diyet (şekerli, yüksek yağlı beslenme), gebelikte malnutrisyon, uzun süreli hiperinsülinemi maruziyeti, yüksek doz insülin karşıtı hormonlar ve benzerlerini içermektedir.

Transgenik modeller: Bir gen insanda hastalıkla bağlantılı bulunursa, hayvanlarda hedef haline getirilerek mutant hayvan sentezlenir. Genomlarında kendilerinin sahip olmadığı bir geni taşıyan bu hayvanlar, Transgenik hayvanlar şeklinde isimlendirilir (215).

2.6.1. Nikotinamid (STZ+NA) ve Streptozotosin Kullanılarak Meydana Getirilen Deneysel Tip 2 Diabetes Mellitus Modeli

İnsan T2DM'sine çoğu açıdan yakın olan bir sıçan T2DM modeli son zamanlarda geliştirilmiş, sık sık çalışmalarda kullanılmıştır. Bu modelde; 60-65 mg/kg STZ (intravenöz ya da intraperitoneal) enjeksiyon yapılmasından 15 dakika evvel 90-290 mg/kg NA (intravenöz ya da intraperitoneal) enjeksiyon yapılmaktadır (216). NA bir Vitamin B3'ün formudur; temel nikotinamid adenin dinükleotid (NAD+) metaboliti öncülüğüyle enerji üretimi, genom bütünlüğünün sağlanması, sinyal uyumu ve besin metabolizmasıyla alakalı görevleri bulunmaktadır. NA'nın, etki mekanizması net biçimde bilinmemektedir ancak anti-diyabetojenik özelliği bilinmektedir. β hücrelerindeki immün hasarı azalttığı veya serbest radikalleri temizlediği gibi anti-diyabetojenik işleyişiyle alakalı hipotezler bildirilmektedir (217). STZ, serbest radikallerin pankreatik β hücrelerinde oluşumuyla, pankreatik β hücre işlevinin bozulmasına, β hücre

yıkımına ve DNA yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu mekanizmalar, poli ADP riboz sentazın aktive edilmesini DNA tamiri amacıyla stimüle eder ve NAD'ın önemli bir kısmı bu onarım sırasında biter. NA replasmanı ile biten NAD depoları dışarıdan doldurulur. STZ'nin bitirdiği NA depolarının tekrar doldurulması ve NA'nın β hücre hasarını engellemesi bu modelin ana işleyiştir (218). NA ve STZ'nin kombine edilmesi ile oluşan bu modelde β hücre kütleğinde yalnızca %40'lık düşüş meydana gelmektedir. İnsülin sekresyonunun devamlılığı, glukoz intoleransı ve stabil ile normal sınırlarda hiperglisemi tipiktir. Bu modelde β hücreleri işlevselliğini koruması sebebiyle insan T2DM'siyle birçok açıdan benzerliği ifade edilmiştir (216).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

“Deneyisel diyabetik ratlarda antidiyabetik LİRA ve EMPA’nın oksidatif stres, inflamatuvar yanıt ve kardiyoprotektif etkilerinin araştırılması” adlı çalışmamızda Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezinden (DÜSAM) temin edilen sıçanlar kullanıldı. Çalışma DÜSAM’da Eylül-Kasım 2022 tarihleri arasında yapıldı. Çalışma öncesi Dicle Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DÜHADEK)’ten 01/12/2021 tarihli 2021/29 protokol numaralı etik onayı alındı.

Araştırma Dicle Üniversitesi DÜSAM’da gerçekleştirildi ve çalışma bütçesi proje kapsamında Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından SBE.22.002 no’lu proje bütçesinden karşılandı.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışma için ortalama 260-300 g ağırlığında 37 adet 8-12 haftalık erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Deneye başlamadan önce bütün hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Hayvanlar; sağlıklı kontrol grubu, DM kontrol grubu, LİRA tedavi grubu, EMPA tedavi grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Hayvanlar deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşullarında (23 ± 2 °C, % 55 ± 5 nem, 12 saat aydınlık/karanlık periyodunda) standart sıçan yemi ve musluk suyu verilerek ad libitum beslenmişlerdir. “Laboratuvar Hayvanları Kullanımı ve Bakımı Kılavuzu”na uygun şekilde tüm uygulamalar gerçekleştirildi. Sağlıklı kontrol grubu hariç diğer gruplara STZ+NA uygulaması yapıldı.

Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğinde geçen 3R kuralının azaltma (reduction) ilkesi esas alınarak hayvan denek sayıları optimal düzeyde tutuldu. Kimyasal ajanlar ile meydana getirilen DM modellerinde hayvanların bir bölümünün öldüğü, bir bölümünde de DM oluşmadığı için DM gruplarındaki hayvan sayısı 10, sağlıklı kontrol grubundaki hayvan sayısı 7 olarak belirlendi. DeneySEL T2DM oluşturulmuş sıçanlarda deney boyunca mortalite % 20-25 oranında gözlenmiştir.

3.2. Tip-2 Diyabet Oluşturma

Diyabet oluşturmadan 6nce 12 saat a bırakılmış sıçanlara vucut ağırlıklarına g6re 2 ml olarak ayarlanan, serum fizyolojik (sf) içerisinde 6z6nm6ř 110 mg/kg dozunda NA intraperitoneal (i.p.) uygulanmıştır. 15 dakika sonra yine 2 ml hacimli olacak şekilde ayarlanan ve 0.1 M sitrat tamponu (pH: 4.5) içerisinde, uygulanacağı g6ne kadar -20 derecede muhafaza edilen, sigma marka STZ 6z6nd6r6lerek tek doz i.p. yolla enjekte edilmiştir. DM oluşturulmayan kontrol grubuna ise aynı miktarda serum fizyolojik (SF) i.p. yolla enjekte edilmiştir. Sitrat tamponu 1,3514 gram sodyum sitrat dihidrat ve 1,0384 gram sitrik asit 100 ml distile suyla karıştırılarak hazırlanmış, uygulama g6n6ne kadar +4 derecede muhafaza edilmiştir. NA +STZ uygulamasından sonra yem ve su alımı serbest bırakılmıştır. T2DM modeli için uygulanan ilacın oluşturabileceğı hipoglisemiye engellemek için ilaç uygulanan gece hayvanların sularına %15 glukoz 6z6ltisi eklenmiştir. STZ+NA uygulamasından 48 saat sonra sıçanların kuyruk veninden alınan kanda şeker 6l6m cihazı ile kan şekeri değerleri 6l6lm6ř ve 250 mg/dL (14mmol/dL) 6zerinde olan sıçanlar DM olarak kabul edilip çalışmaya dahil edilmiştir (219). Deney s6resince sıçanların kan şekerleri ve ağırlıkları haftalık olarak 6l6lm6řt6r ve alınan veriler kaydedilip istatistik değerlendirmesi yapılmıştır.



Resim 3.1. İnteraperitoneal STZ ve NAD uygulaması



Resim 3.2. Kan şekeri ölçümü

3.3. Deney Grupları

30 adet sıçana NA + STZ verilerek deneysel DM oluşturulmuş ve 3 gruba (n=10) ayrılmıştır. 7 sıçan sağlıklı kontrol olarak çalışmaya dahil edilmiştir

Sağlıklı kontrol grubu (n=7)

DM kontrol grubu (n=10)

DM + liraglutid tedavi grubu (n=10)

DM+ empagliflozin tedavi grubu (n=10)

3.4. Deney Süreci ve ilaç uygulaması

Diyabet oluşturulduktan sonraki gün tedaviye başlanmıştır ve 8 hafta devam edilmiştir. 3. Gruptaki sıçanlara 0,6 mg/kg dozunda LİRA (victoza, Novo Nordisk) hacmi 0,2 ml olacak şekilde ayarlanıp sf içerisinde çözdürülüp günde bir defa subkutan olarak enjekte edilip, 2 cc sf oral gavaj yoluyla verilmiştir. 4. gruptaki sıçanlara ise 30 mg/kg dozunda EMPA (jardiance; Jardiance, Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals) hacmi 2 cc olarak ayarlanıp sf içerisinde çözdürülüp oral gavaj yoluyla uygulanıp 0.2 cc sf subkutan olarak verilmiştir. Kontrol grubu ve DM gruplarına ise 0,2 ml sf subkutan ve 2 cc sf oral gavaj yoluyla verilmiştir. İlaç dozları haftalık ağırlık değişimi göz önünde bulundurularak günlük olarak hazırlanmıştır.



Resim 3.3. Subkutan Liraglutid enjeksiyonu



Resim 3.4. Oral gavaj ile Empagliflozin uygulaması

3.5. Deneyin sonlandırılması

8 haftalık tedavi süresinin sonunda sıçanlar 80 mg/kg dozunda ketamin ve 8 mg/kg dozunda ksilazin anestezisi altında göğüs kafesleri ve batınları açılıp vena cava caudalis'ten kan alma gerçekleştirildi (resim 3.5). Bu sayede genel anestezi altında eksanguinasyon ile hem sakrifikasyon gerçekleştirildi hem de kan örnekleri toplandı. Kanlar sarı kapaklı biyokimya tüplerine alınıp 3000 rpm'de elektromag M 815 A marka santrifüj cihazında santrifüjlenerek serumları ayrıldı ve -80°C'de saklandı. Kalp dokusu ve koronerler yüzde 10'luk formaldehit solüsyonuna alınıp inceleme için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim dalına teslim edildi.



Resim 3.5. Abdominal aortadan kan alınması



Resim 3.6. Kan ve doku örneklerinin toplanması

3.6. Kan Numunelerinde Ölçülen Biyokimyasal Parametreler

Kan numunelerinin biyokimyasal incelemesi Dicle Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi.

Değerlendirilecek biyokimyasal parametreler için daha önce alınan kan örnekleri -80 derecedeki dondurucudan çıkarılıp +4 derecede çözündürüldü. TNF- α , IL-1, insülin, MDA, SOD, AGE değerleri (Sunred Biological Technology Co., China) ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) kitleri kullanılarak belirlendi. Tüm biyokimyasal ölçümlerde sıçan kitleri kullanıldı.

Stok standarttan seri dilüsyon ile 5 farklı standart örneği hazırlanmıştır. 96 kuyulu plate içindeki kuyulara hazırlanan düşük yoğunluklu standarttan başlayarak 50 μ l sırasıyla eklenmiştir. Oda sıcaklığına getirilen serum örnekleri 40 μ l hacimde kuyulara eklenmiştir. Boş ve standart kuyular hariç, Elisa platedeki

örneklere 10 µl istenilen kite ait antikordan eklenmiştir. Boş kuyu dışındaki diğer kuyulara 50 µl Streptavidin-HRP eklenmiştir. Üzeri yapışkan film ile kapatılan plate 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde 60 dk inkübe edilmiştir. Kit içerisindeki yoğunlaştırılmış 20 ml hacimli yıkama solüsyonu 1/30 oranında distile su ile dilue edilmiştir. Plate içerisindeki sıvı içeriği boşaltıldıktan sonra tüm kuyular 0,35 ml yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkanmıştır. Tüm kuyulara 50 µl kromojen A, ardından da 50 µl kromojen B solüsyonundan eklenmiştir. Üzeri yapışkan film ile kapatılan plate (ışıktan korunarak) 37°C'de çalkalayıcı inkübatörde 10 dk inkübe edilmiştir. Her bir kuyuya 50 µl renk gelişimi durdurma solüsyonundan eklenmiştir Durdurma çözeltisi eklendikten sonra, elisa okuyucuda absorbanslar kaydedildi. Standartlara ait kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak absorbanslara karşılık gelen konsantrasyon değerleri belirlendi.

3.7. Doku Takibi

Çalışılan dokular ilk önce zinc formalin solüsyonuna alınarak rutin paraffin doku takibine başlandı. Bir gece fiksasyon işleminden sonra dokular 6 saat akar çeşme suyu altında bekletildi. Dokular %50, %70, %80, %90, %96 ve saf etil alkol serilerinden geçirilerek ve şeffaflaştırma işlemi için ksilende 3 kere 45 dakika bekletildi. Son olarak dokular infiltrasyon için 58°C' de parafin yağına alındı. Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü ve mikrotom yardımıyla bloklardan Hematoksilen-Eozin, Masson Trichrome boyamalar için 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.8. Hematoksilen-Eozin boyama

Parafin bloklardan alınan doku kesitleri 37°C'ye ayarlanmış benmariye alındı. Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58°C etüvde bir gece bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Hematoksilen boyasında 8 dakika bekletildikten sonra kesitler akar su altında 5 dakika yıkandı. Kesitler durulandı ve alkolik eozin boyasında 6 dakika bekletildi. Kesitler artan alkol serilerine (%80, %90, %96 etil alkol serileri) hızlıca daldırıldı ve saf (%100) alkolde 2 dakika

bekletildi. Son olarak kesitler 3x15 dakika ksilende bekletildi ve dokular kapatma mediumu ile kapatıldı.

3.9. Masson Trikrom Boyama

Lam üzerinde fazla parafini eritmek için kesitler 58°C etüvde bir gece bekletildi. Kesitler 3x15 dakika ksilende deparafinize edildi. Kesitler azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70, %50 etil alkol) 10'ar dakika geçirildi ve distile suya getirilerek 5 dakika bekletildi. Daha sonra üretici firmanın (Bio Optica) aşağıda belirtilen tavsiyeleri doğrultusunda Masson Trikrom boyama prosedürü gerçekleştirildi.

1. 6 damla reaktif A ve reaktif B eklenerek 10 dakika beklendi
2. Yıkama yapılmadan, sadece lam üzerindeki fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra 10 damla reaktif C eklendi ve etki etmesi için 4 dakika beklendi.
3. 3-4 saniye distile suda hızlıca yıkandıktan sonra 10 damla reaktif D eklendi ve etki etmesi için 4 dakika beklendi.
4. Distile suda yıkandı ve 10 damla reaktif E eklendi ve etki etmesi için 10 dakika beklendi.
5. Yıkama yapılmadan, lam üzerindeki fazla boya uzaklaştırıldıktan sonra 10 damla reaktif F eklendi ve etki etmesi için 5 dakika beklendi.
6. Distile suda yıkandı, artan alkol serilerinden (%80, %90, %96 etil alkol) geçirildi ve absolü (%100) alkolde 1 dakika bekletildi. Ksilenle temizlendi ve lamel ile kapatıldı.

3.10. İstatiksel Analiz

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 26.0 (Statistical Program for Social Sciences 26) paket programı kullanılarak çözümlendi. Sürekli değişkenlerin (sayısal veriler) normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi, histogram ve skewness- kurtosis ile değerlendirildi. Normal dağılım gösteren değişkenlerin gruplar arası karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. ANOVA'da P değeri 0.05'in altında olan değişkenlerin ikili karşılaştırmaları için post-hoc testi olarak Bonferroni testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen

değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmasında ise Kruskal-Wallis analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis analizinde P değeri 0.05'in altında olan değişkenler için farkın hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla alt grupların her bir ikili kombinasyonu arasında Mann Whitney U testi uygulandı ve Bonferroni düzeltmesi yapılarak $P < 0.01$ anlamlı farklılık düzeyi olarak belirlendi. Grupların 1. İle 8. hafta glukoz ve kilo değerlerinden kilo normal dağılıma uyduğu için her bir grup için ayrı ayrı paired samples t testi, normal dağılım göstermeyen glukoz için ise wilcoxon testi kullanıldı. Normal dağılıma uyan değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde, normal dağılıma uymayan değişkenler ise ortanca(min-max) şeklinde özetlendi.



4. BULGULAR

4.1. Ağırlık Değişimleri

Deney hayvanları deney başında ve 8. hafta sonunda tartılarak vücut ağırlıkları gram cinsinden kaydedildi. Dört grup için ağırlıklar, ortalama±standart sapma (SD) şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun ilk ağırlık ortalaması $280,6 \pm 13,5$, son ağırlık ortalaması $301,7 \pm 19,2$ olarak kaydedildi. İlk ve son ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunda bu süreçte %7,5'luk bir ağırlık artışı olduğu tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$).

DM kontrol grubunun ilk ağırlık ortalaması $277,1 \pm 12,3$, son ağırlık ortalaması $236,4 \pm 18,2$ olarak kaydedildi. İlk ve son ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında Tip 2 DM grubunda bu süreçte %14,7'lik bir ağırlık kaybı olduğu tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$).

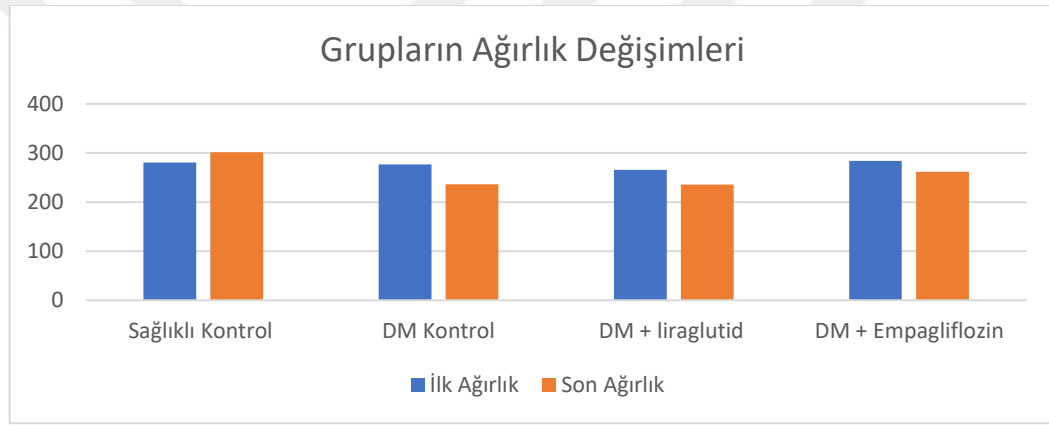
DM + liraglutid grubunun ilk ağırlık ortalaması $265,8 \pm 20,1$, son ağırlık ortalaması $235,8 \pm 32,6$ olarak kaydedildi. İlk ve son ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında Tip 2 DM + liraglutid grubunda bu süreçte %11,2'lik bir ağırlık kaybı olduğu tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p = 0,02$).

DM + Empagliflozin grubunun ilk ağırlık ortalaması $284 \pm 8,6$, son ağırlık ortalaması $261,7 \pm 12,7$ olarak kaydedildi. İlk ve son ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında DM + Empagliflozin grubunda bu süreçte %8,1'lik bir ağırlık kaybı olduğu tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,01$).

Tablo 2. Grupların ilk ve son Ağırlıklarının Karşılaştırması

	İlk ağırlık		Son ağırlık		% Değişim	P
	Ortalama	SD	Ortalama	SD		
Sağlıklı Kontrol	280,6	±13,5	301,7	±19,2	+%7,5	<0,01*
DM kontrol	277,1	±12,3	236,4	±18,2	-%14,7	<0,01*
DM + Liraglutid	265,8	±20,1	235,8	±32,6	-%11,2	0,02*
DM + Empagliflozin	284,0	±8,6	261,7	±12,7	-%8,1	<0,01*

* P<0,05 Paired Samples T Testi Anlamlılık Değeri

**Şekil 4.1.** Grupların İlk ve Son Ağırlık Değişimlerinin Grafiği

4.2. Kan Şekeri Düzeyleri

Deney hayvanlarından deney başlangıcında ve 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda glukoz düzeyleri çalışıldı ve mg/dl cinsinden kaydedildi. Dört grup için glukoz düzeyleri, ortanca (min-max) şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun ilk glukoz ortancası 89(70-97), son glikoz ortancası 77(66-85) olarak kaydedildi. İlk ve son glikoz ortancaları karşılaştırıldığında sağlıklı kontrol grubunda bu süreçte glukoz düzeyinin düştüğü tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0,02).

DM kontrol grubunun ilk glukoz ortancası 367(258-559), son glikoz ortancası 472(263-600) olarak kaydedildi. İlk ve son glukoz ortancaları

karşılaştırıldığında Tip 2 DM grubunda bu süreçte glukoz düzeyinin yükseldiği tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,23$).

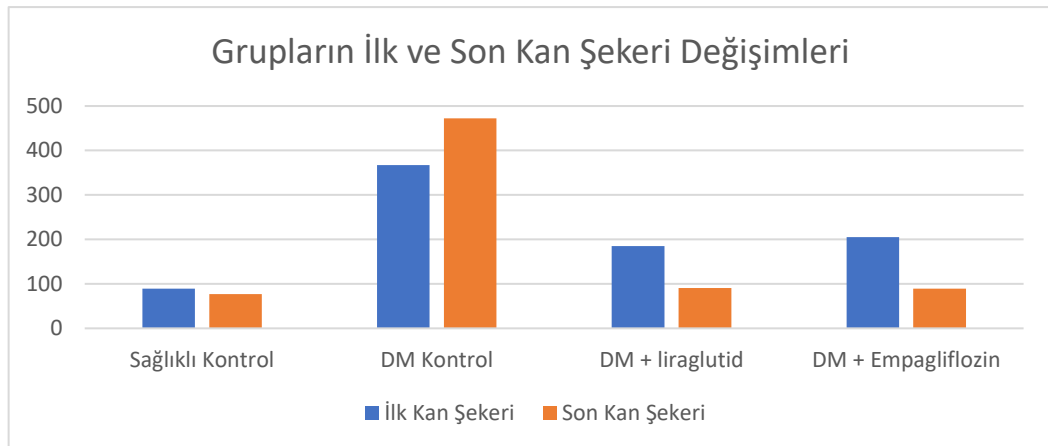
DM + liraglutid grubunun ilk glukoz ortancası 317(251-432), son glukoz ortancası 91(79-138) olarak kaydedildi. İlk ve son glukoz ortancaları karşılaştırıldığında Tip 2 DM + liraglutid grubunda bu süreçte glukoz düzeyinin düştüğü tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,03$).

DM + Empagliflozin grubunun ilk glukoz ortancası 336(274-461), son glukoz ortancası 99(76-118) olarak kaydedildi. İlk ve son glukoz ortancaları karşılaştırıldığında Tip 2 DM + Empagliflozin grubunda bu süreçte glukoz düzeyinin düştüğü tespit edildi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,03$).

Tablo 3. Grupların İlk ve Son Hafta Kan Şekeri Değerleri (mg/dL)

	İlk Kan Şekeri		Son Kan Şekeri		P
	Median	Min-Max	Median	Min-Max	
Sağlıklı Kontrol	89	70-97	77	66-85	0,02*
DM kontrol	367	258-559	472	263-600	0,23
DM + Liraglutid	317	251-432	91	79-138	0,03*
DM + Empagliflozin	336	274-461	99	76-118	0,03*

* $P<0,05$ Wilcoxon Testi Anlamlılık Değeri



Şekil 4.2. Grupların İlk ve Son Hafta Kan Şekeri Değişimlerinin Grafiği

Son hafta ölçülen kan şekeri düzeyleri gruplar arasında karşılaştırıldığında DM kontrol grubunun kan şekeri düzeyinin diğer üç gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$).

DM+ liraglutid grubunun son hafta kan şekeri düzeyi sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$).

Sağlıklı kontrol ile DM+ empagliflozin ve DM+ liraglutid ile DM+ empagliflozin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 4. Son Hafta Ölçülen Kan Şekeri Düzeylerinin Gruplar Arası Karşılaştırması

	Son Kan Şekeri		P
	Median	Min-Max	
Sağlıklı Kontrol	77	66-85	<0,01*
DM Kontrol	472	263-600	
DM + Liraglutid	91	79-138	
DM + Empagliflozin	99	76-118	
			1&2 ► <0,01**
			1&3 ► <0,01**
			1&4 ► 0,06
			2&3 ► <0,01**
			2&4 ► <0,01**
			3&4 ► 0,93

* $P<0,05$ Kruskal-Wallis Testi Anlamlılık Değeri

** $P<0,01$ Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testi Anlamlılık Değeri

4.3. İnsülin Düzeyleri

Deney hayvanlarından 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda insülin düzeyleri çalışıldı ve mU/L cinsinden kaydedildi. Deney gruplarının insülin değerleri tablo-5'te gösterilmiştir.

İnsülin değerleri, Sağlıklı kontrol grubunda 14,45(8,46-14,82), DM kontrol grubunda 5,87(4,51-7,81), DM + liraglutid grubunda 8,04(7,11-10,22) ve DM + Empagliflozin grubunda 7,08(5,44-9,43) olarak bulundu.

İnsülin değeri sağlıklı kontrol grubunda diğer üç gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$).

DM + liraglutide grubunun insülin değeri DM kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$).

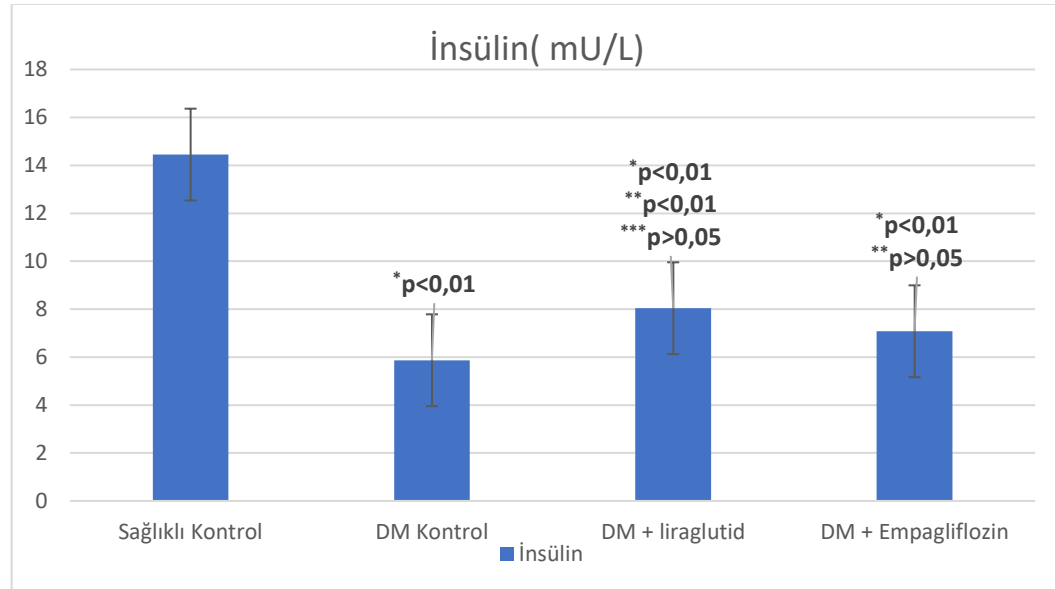
DM kontrol ile DM+empagliflozin ve DM+liraglutide ile DM+empagliflozin grubu insülin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 5. Gruplara Ait İnsülin Değerleri (mU/L)

	İnsülin		P	
	Median	Min-Max		
Sağlıklı Kontrol	14,45	8,46-14,82	<0,01*	1&2 ► <0,01**
DM Kontrol	5,87	4,51-7,81		1&3 ► <0,01**
DM + Liraglutid	8,04	7,11-10,22		1&4 ► <0,01**
DM + Empagliflozin	7,08	5,44-9,43		2&3 ► <0,01**
				2&4 ► 0,11
				3&4 ► 0,09

* $P<0,05$ Kruskal-Wallis Testi Anlamlılık Değeri

** $P<0,01$ Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testi Anlamlılık Değeri



Şekil 4.3. Grupların İnsülin Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.4. AGE Düzeyleri

Deney hayvanlarından deney sonunda alınan venöz kanda AGEs düzeyleri çalışıldı ve ng/L cinsinden kaydedildi. Dört grup için AGEs düzeyleri, ortanca (min-max) şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun AGEs ortancası 30,3(11,03-44,02), DM kontrol grubunun AGEs ortancası 74,37(43,28-90,72), DM + liraglutid (grup 3) grubunun AGEs ortancası 31,6(17,33-47,72) ve DM + Empagliflozin (grup 4) grubunun AGEs ortancası 38,83(29,22-51,43) olarak bulundu.

Yapılan Kruskal-Wallis analizinde dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,01$).

Gruplar arası farklılığı tespit edebilmek için ikili gruplar arasında Mann-Whitney U testi yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi sonucu yeni anlamlılık düzeyi $P<0,01$ olarak alındı.

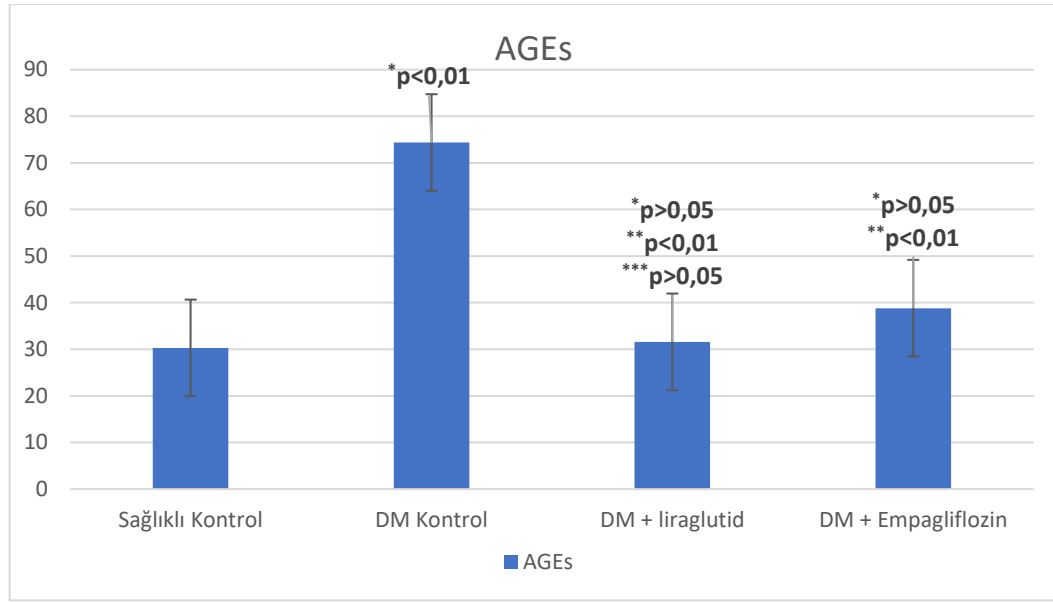
DM kontrol grubunun AGEs ortanca değeri diğer üç grubun AGEs ortanca değerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 6. Gruplara ait AGEs Değerleri (ng/L)

	AGEs		P
	Media n	Min- Max	
Sağlıklı Kontrol	30,30	11,03- 44,02	<0,01*
DM kontrol	74,37	43,28- 90,72	
DM + Liraglutid	31,60	17,33- 47,72	
DM + Empagliflozin	38,83	29,22- 51,43	

* $P<0,05$ Kruskal-Wallis Testi Anlamlılık Değeri

** $P<0,01$ Bonferroni Düzeltmeli Mann-Whitney U Testi Anlamlılık Değeri



Şekil 4.4. Grupların AGEs Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.5. IL-1 Düzeyleri

Deney hayvanlarından 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda İnterlökin-1 (IL-1) düzeyleri çalışıldı ve ng/L cinsinden kaydedildi. Dört grup için IL-1 düzeyleri, ortalama±SD şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun IL-1 ortalaması 163,6±21,7, DM kontrol grubunun IL-1 ortalaması 275,5±14,85, DM + liraglutid grubunun IL-1 ortalaması 214,65±23,35 ve DM + Empagliflozin grubunun IL-1 ortalaması 219,15±37,6 olarak bulundu.

Yapılan ANOVA analizinde dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0,01).

Gruplar arası farklılığı tespit edebilmek için post-hoc testi olarak yapılan Bonferroni analizinde;

Sağlıklı kontrol grubunun IL-1 ortalaması diğer üç grubun IL-1 ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0,01).

DM +liraglutide ve DM+ empagliflozin gruplarının IL-1 ortalaması DM kontrol grubunun IL-1 ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu ($p<0,01$).

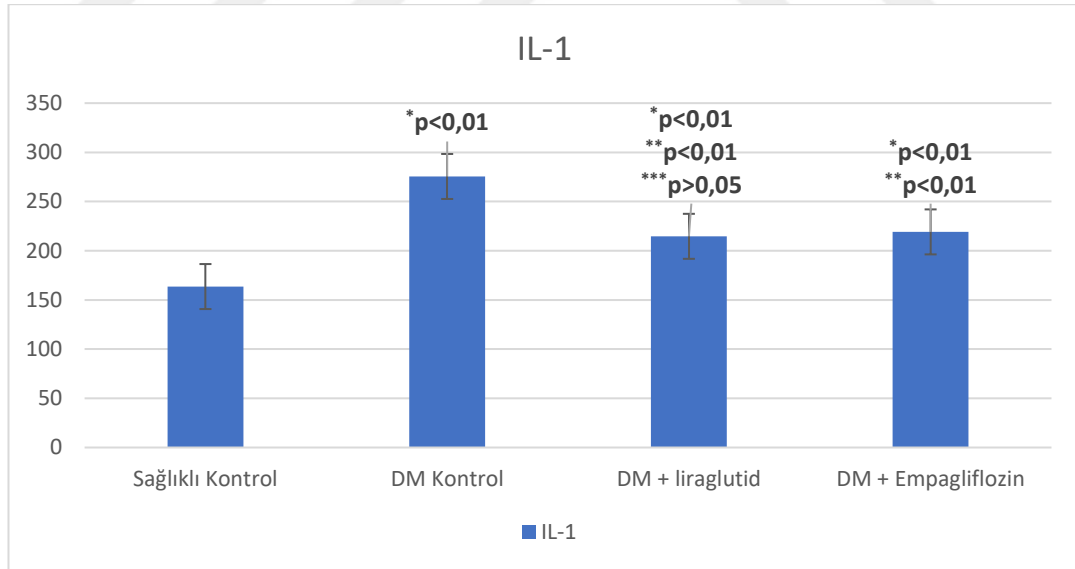
DM +liraglutide ve DM+ empagliflozin gruplarının IL-1 ortalamaları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 7. Gruplar Arasında IL-1 Değerleri Karşılaştırması (ng/L)

	IL-1		P	
	Ortalama	SD		
Sağlıklı Kontrol	163,59	$\pm 21,73$	<0,01 *	1&2▶ <0,01**
DM kontrol	275,48	$\pm 14,85$		1&3▶ <0,01**
DM + Liraglutid	214,65	$\pm 23,35$		1&4▶ <0,01**
DM + Empagliflozin	219,15	$\pm 37,62$		2&3▶ <0,01**
				2&4▶ <0,01**
				3&4▶ 1,00

* $P<0,05$ ANOVA Anlamlılık Değeri

** $P<0,05$ Post-hoc Testi Olarak Bonferroni Anlamlılık Değeri



Şekil 4.5. Grupların IL-1 Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.6. TNF- α Düzeyleri

Deney hayvanlarından 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda TNF- α düzeyleri çalışıldı ve ng/ml cinsinden kaydedildi. Dört grup için TNF- α düzeyleri, ortalama $\pm$ SD şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun TNF- α ortalaması 38,56 $\pm$ 8,41, DM kontrol grubunun TNF- α ortalaması 76,3 $\pm$ 13,48, DM + liraglutid grubunun TNF- α ortalaması 28,43 $\pm$ 13,75 ve DM + Empagliflozin grubunun TNF- α ortalaması 36,76 $\pm$ 18,38 olarak bulundu.

Yapılan ANOVA analizinde dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,01$).

Gruplar arası farklılığı tespit edebilmek için post-hoc testi olarak yapılan Bonferroni analizinde;

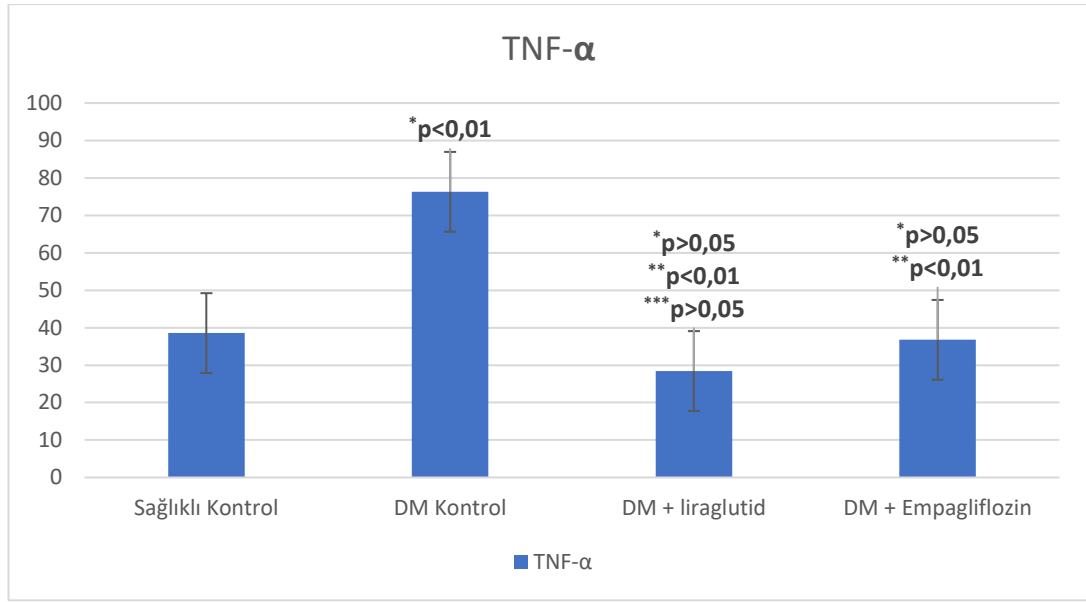
DM kontrol grubunun TNF- α ortalaması diğer üç grubun TNF- α ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,01$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Tablo 8. Gruplar ait TNF- α Değerleri (ng/ml)

	TNF- α		P
	Ortalama	SD	
Sağlıklı Kontrol	38,56	$\pm$ 8,41	<0,01*
DM kontrol	76,30	$\pm$ 13,48	
DM + Liraglutid	28,43	$\pm$ 13,75	
DM + Empagliflozin	36,76	$\pm$ 18,38	
			1&2 ► <0,01*
			1&3 ► 1,00
			1&4 ► 1,00
			2&3 ► <0,01*
			2&4 ► <0,01*
			3&4 ► 1,00

* $P<0,05$ ANOVA Anlamlılık Değeri

** $P<0,05$ Post-hoc Testi Olarak Bonferroni Anlamlılık Değeri



Şekil 4.6. Grupların TNF- α Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.7. SOD Düzeyleri

Deney hayvanlarından 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda SOD düzeyleri çalışıldı ve ng/ml cinsinden kaydedildi. Dört grup için SOD düzeyleri, ortalama $\pm$ SD şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun SOD ortalaması 10,2 $\pm$ 0,96, DM kontrol grubunun SOD ortalaması 6,9 $\pm$ 1,65, DM + liraglutid grubunun SOD ortalaması 9,5 $\pm$ 1,86 ve DM + Empagliflozin grubunun SOD ortalaması 9,8 $\pm$ 1,77 olarak bulundu.

Yapılan ANOVA analizinde dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi (p<0,01).

Gruplar arası farklılığı tespit edebilmek için post-hoc testi olarak yapılan Bonferroni analizinde;

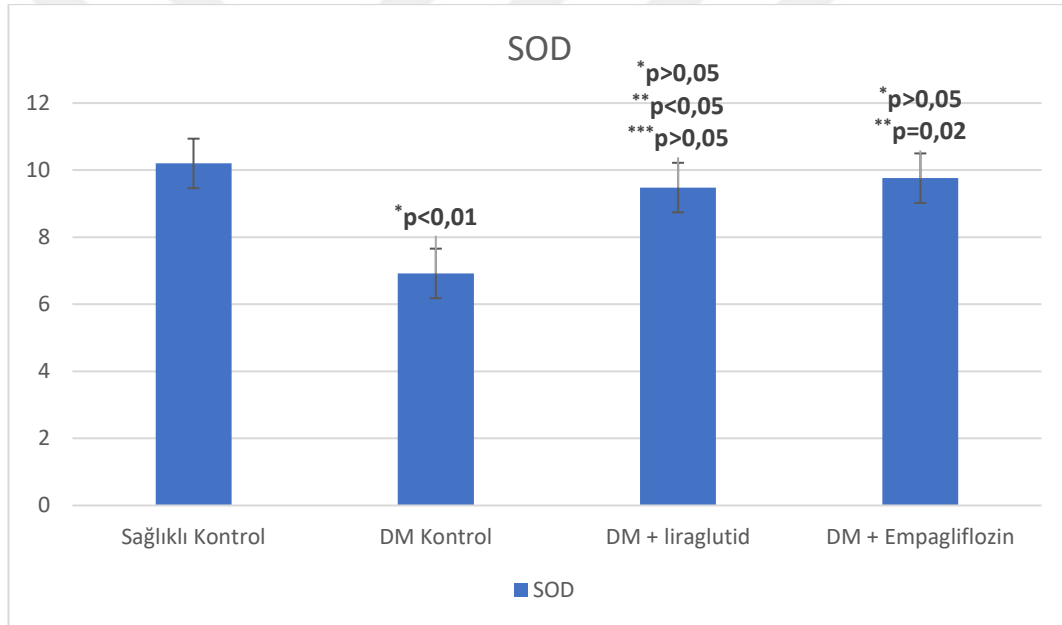
DM kontrol grubunun SOD ortalaması diğer üç grubun SOD ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük bulundu (p<0,01). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).

Tablo 9. Gruplar Arasında SOD Değerleri Karşılaştırması (ng/ml)

	SOD		P
	Ortalama	SD	
Sağlıklı Kontrol	10,20	±0,96	<0,01* 1&2 ► <0,01** 1&3 ► 1,00 1&4 ► 1,00 2&3 ► 0,049** 2&4 ► 0,023** 3&4 ► 1,00
DM kontrol	6,92	±1,65	
DM + Liraglutid	9,48	±1,86	
DM + Empagliflozin	9,76	±1,77	

* P<0,05 ANOVA Anlamlılık Değeri

** P<0,05 Post-hoc Testi Olarak Bonferroni Anlamlılık Değeri



Şekil 4.7. Grupların SOD Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.8. MDA Düzeyleri

Deney hayvanlarından 8. Hafta sonunda alınan venöz kanda MDA düzeyleri çalışıldı ve nmol/ml cinsinden kaydedildi. Dört grup için MDA düzeyleri, ortalama±SD şeklinde özetlendi.

Sağlıklı kontrol grubunun MDA ortalaması $0,36 \pm 0,20$; DM kontrol grubunun MDA ortalaması $0,67 \pm 0,07$; DM + liraglutid grubunun MDA ortalaması $0,44 \pm 0,06$ ve DM + Empagliflozin grubunun MDA ortalaması $0,38 \pm 0,15$ olarak bulundu.

Yapılan ANOVA analizinde dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p < 0,01$).

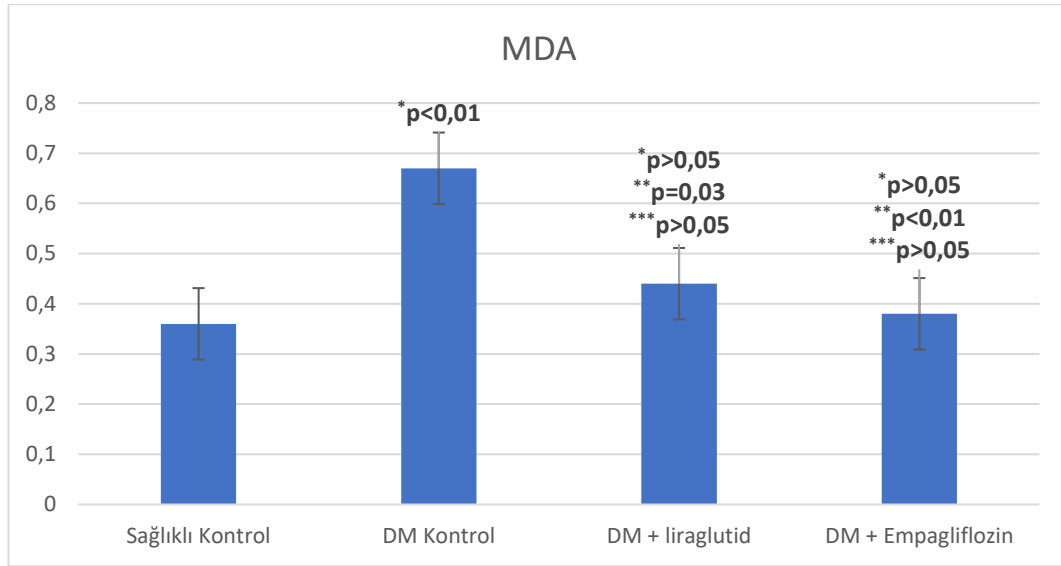
Gruplar arası farklılığı tespit edebilmek için post-hoc testi olarak yapılan Bonferroni testinde DM kontrol grubunun MDA ortalaması diğer üç grubun MDA ortalamasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

Tablo 10. Gruplar Arasında MDA Değerleri Karşılaştırması (nmol/ml)

	MDA		P	
	Ortalama	SD		
Sağlıklı Kontrol	0,36	$\pm 0,20$	<0,01*	1&2 ► <0,01**
DM kontrol	0,67	$\pm 0,07$		1&3 ► 1,00
DM + Liraglutid	0,44	$\pm 0,06$		1&4 ► 1,00
DM + Empagliflozin	0,38	$\pm 0,15$		2&3 ► 0,03**
				2&4 ► <0,01**
				3&4 ► 1,00

* $P < 0,05$ ANOVA Anlamlılık Değeri

** $P < 0,05$ Post-hoc Testi Olarak Bonferroni Anlamlılık Değeri



Şekil 4.8. Grupların MDA Düzeyi Grafiği

*Sağlıklı Kontrol ile karşılaştırıldığında

**DM Kontrol ile karşılaştırıldığında

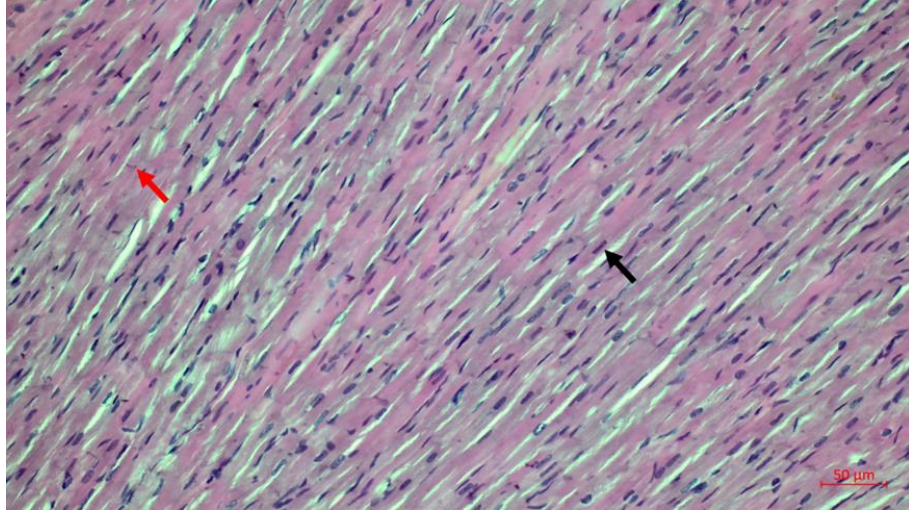
***DM+ Empagliflozin ile karşılaştırıldığında

4.9. Histopatolojik bulgular

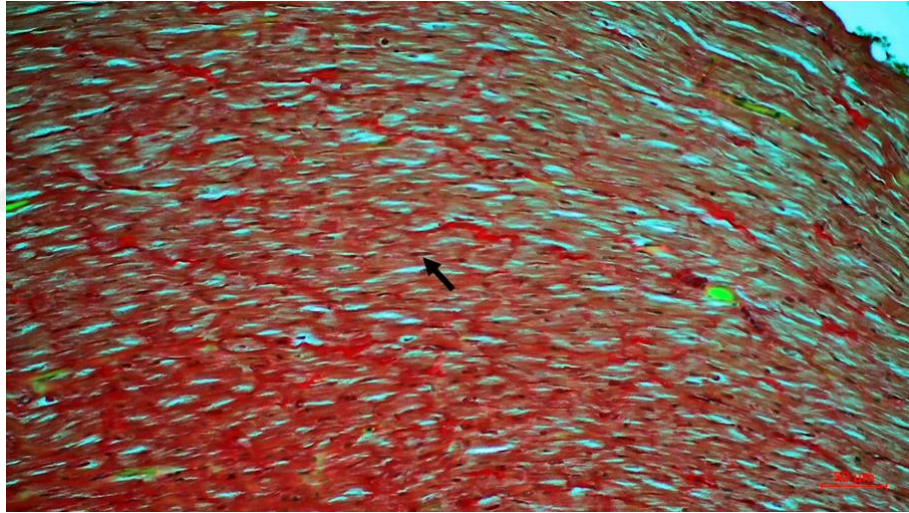
4.9.1. Miyokard incelemesi

4.9.1.1. Sağlıklı Kontrol grubu

Kontrol grubuna ait miyokard kesitlerinin histolojik incelemesinde, kardiyomiyositlerde çekirdek tek ve merkezi yerleşimli, düzgün seyirli sarkolemma ile sınırlı, interstisyel alan ve vasküler yapıların, diskus interkalarislerin normal yapıda olduğu herhangi bir fibrotik yapının gelişmediği kas yapısının histolojik olarak normal olduğu tespit edildi (Resim 4.1 ve 4.2).



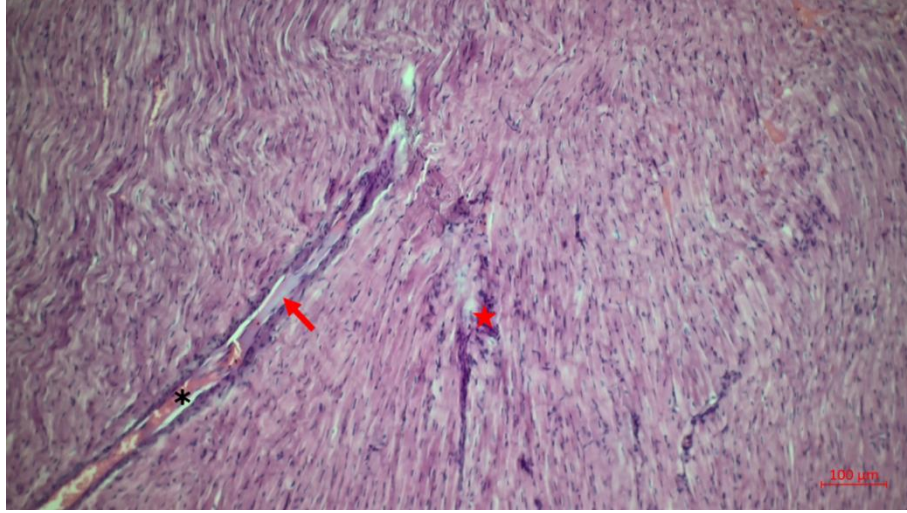
Resim 4.1. Sağlıklı kontrol grubuna ait miyokard dokusu. Merkezi yerleşimli nükleus (siyah ok) ve diskus interkalaris (kırmızı ok) (H&E boyama)



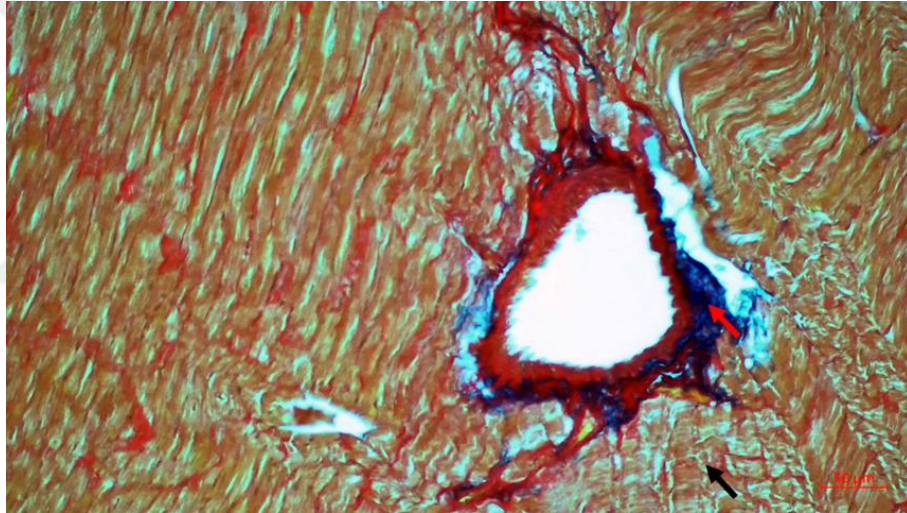
Resim 4.2. Sağlıklı kontrol grubu miyokard dokusu. Nukleusu merkezi yerleşimli (siyah ok) normal kardiyomiyositler (Masson Trikrom boyama)

4.9.1.2. DM kontrol grubu

DM Grubuna ait miyokard kesitlerinde; kardiyomiyositlerde dejenerasyon, piknotik çekirdekler, ödem, lökosit infiltrasyonu, vakuolizasyon ve vasküler konjesyon, damarların çevresinde fibrozis, kardiyomiyositlerde hipertrofi izlendi (Resim 4.3 ve 4.4).



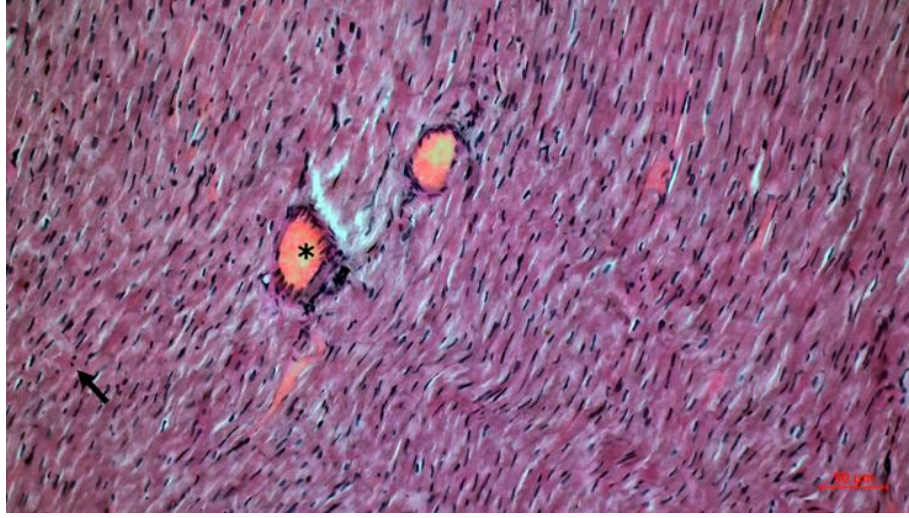
Resim 4.3. DM kontrol grubu miyokard dokusu. Lökosit infiltrasyonu (yıldız), vasküler konjesyon (asteriks), ödem (kırmızı ok) (H&E boyama)



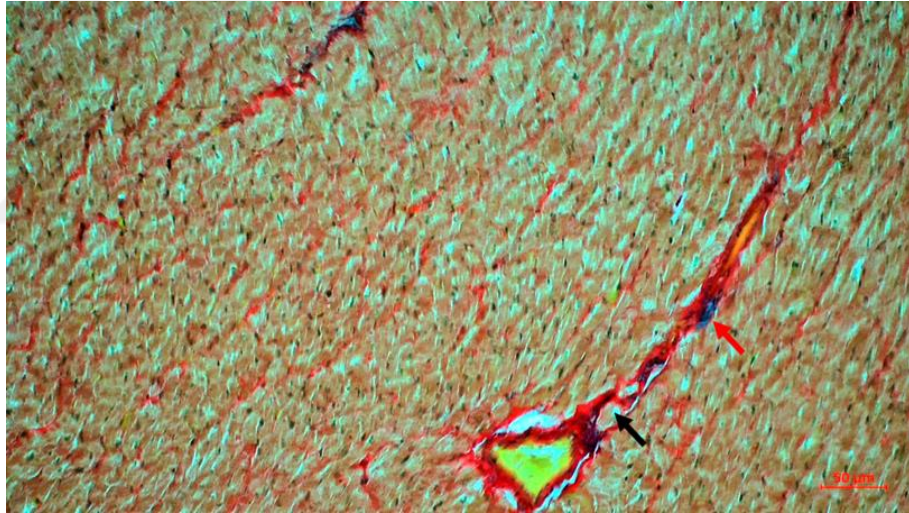
Resim 4.4. DM kontrol grubu miyokard dokusu. Kardiyomiyositlerde dejenerasyon (siyah ok), damarların çevresinde fibrozis (kırmızı ok) (Masson Trikrom boyama).

4.9.1.3. DM + Liraglutide grubu

DM + Liraglutide tedavi grubuna ait miyokard kesitlerinin histolojik incelemesinde kardiyomiyositlerde dejenerasyon, inflamasyonun, damarlarda konjesyon, kas hücrelerinde hiperplazi, kas hücrelerinin sitoplazmalarında yer yer vakuoller ve bağ dokuda fibrozisin devam ettiği izlendi. DM kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bu gruptaki patolojilerin azaldığını gözlemlendi (Resim 4.5 ve 4.6).



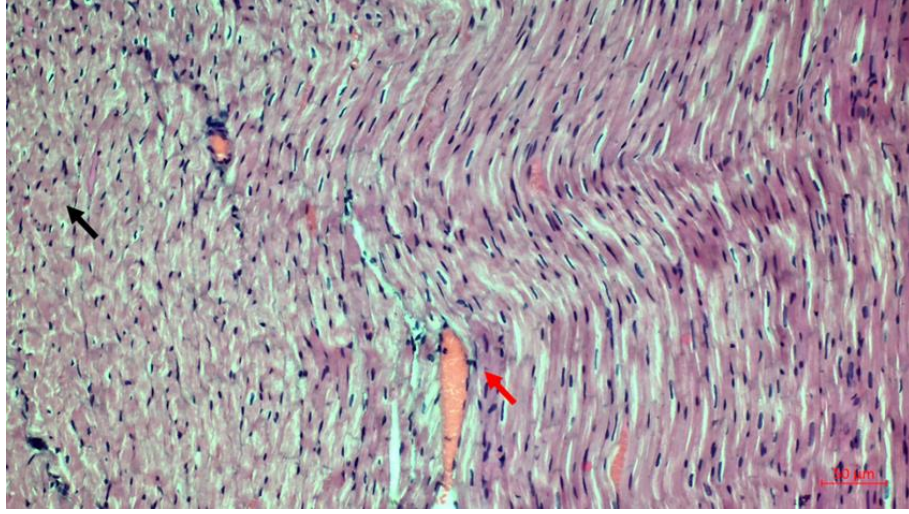
Resim 4.5. DM + Liraglutide tedavi grubu miyokard dokusu kardiyomiyositlerde dejenerasyon (siyah ok), damarlarda konjesyon (asteriks) (H&E boyama).



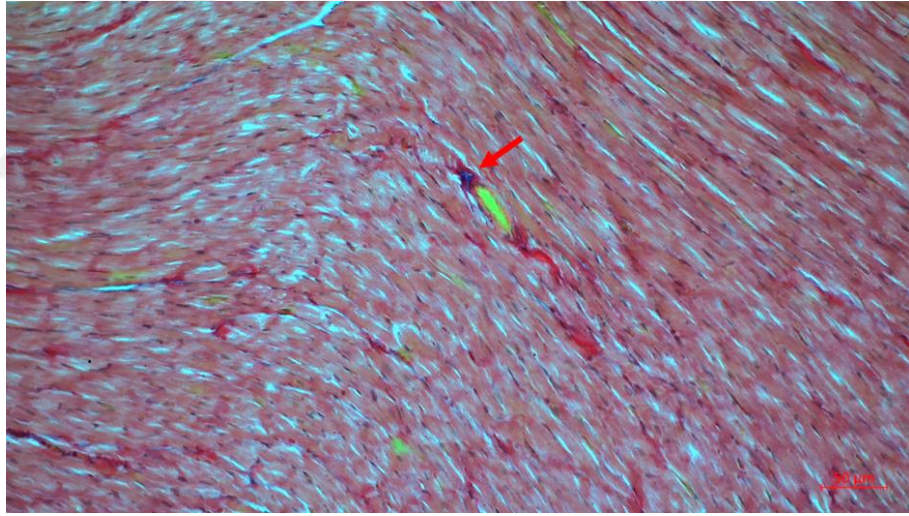
Resim 4.6. DM + Liraglutide tedavi grubu miyokard dokusu. İnflamasyon (siyah ok), fibrozis (kırmızı ok) (Masson trikrom boyama).

4.9.1.4. DM + Empagliflozin grubu

DM + Empagliflozin grubuna ait miyokard kesitlerinin histolojik incelemesinde kardiyomiyositlerde nekrozis, fibrozisin, damar dilatasyonu ve konjesyonun diğer gruplara göre büyük oranda azaldığı gözlemlendi. EMPA tedavisinin LİRA tedavisine göre miyokard dokusunun onarımında daha etkin olduğu söylenebilir (Resim .4.7 ve 4.8).



Resim 4.7. DM + Empagliflozin tedavi grubu miyokard dokusu. Kardiyomiyositlerde necrosis (siyah ok), damar dilatasyonu ve konjesyonun (kırmızı ok) (H&E boyama).



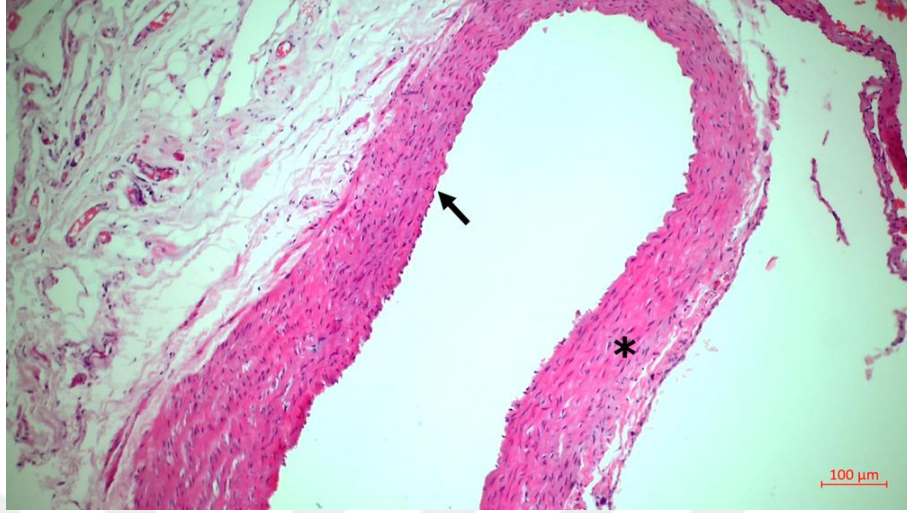
Resim 4.8. DM + Empagliflozin tedavi grubu miyokard dokusu Fibrozis (kırmızı ok) (Masson trikrom boyama).

4.9.2. Koroner Arter incelemesi

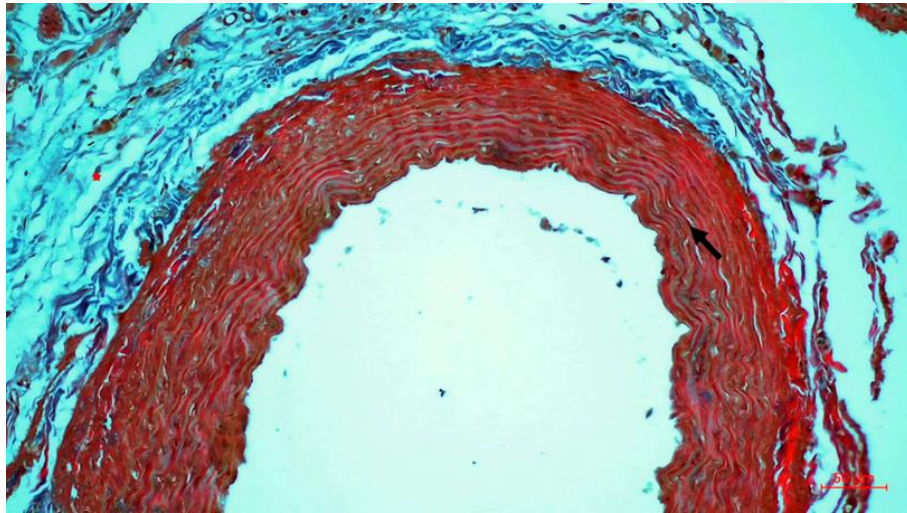
4.9.2.1. Sağlıklı Kontrol Grubu

Sağlıklı kontrol grubu koroner arterlerine ait histolojik kesitler incelendiğinde; endotel tabakasının yassı olduğu, media tabakasının normal görünümde merkezi yerleşimli düz kas nükleuslara sahip olduğu, tunika

adventisyadaki bağ dokusunun normal görünümde olduğu tespit edilmiştir (Resim 4.9 ve 4.10).



Resim 4.9. Sağlıklı kontrol grubu koroner arter Endotel tabakasının yassı olduğu (siyah ok), media tabakasının normal görünümde (asteriks) (H&E boyama).

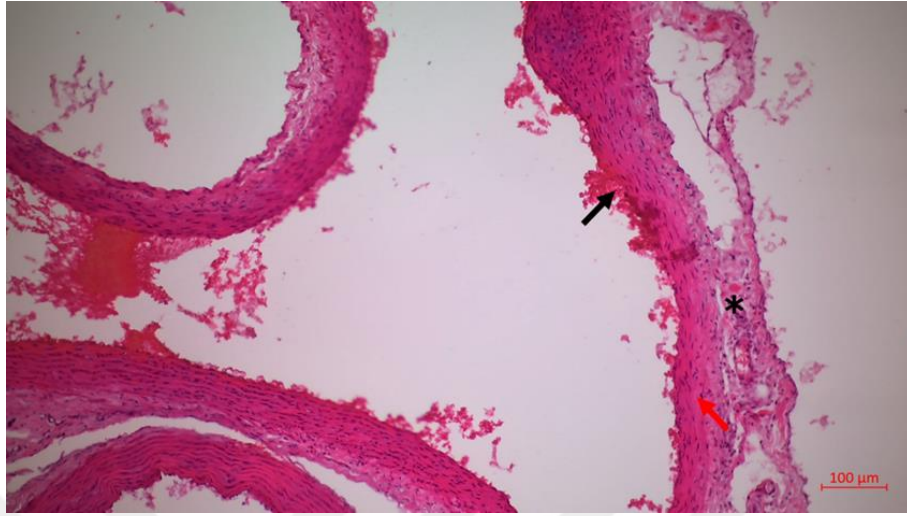


Resim 4.10. Sağlıklı kontrol grubu koroner arter. Media tabakası (siyah ok) (Masson Trikrom boyama).

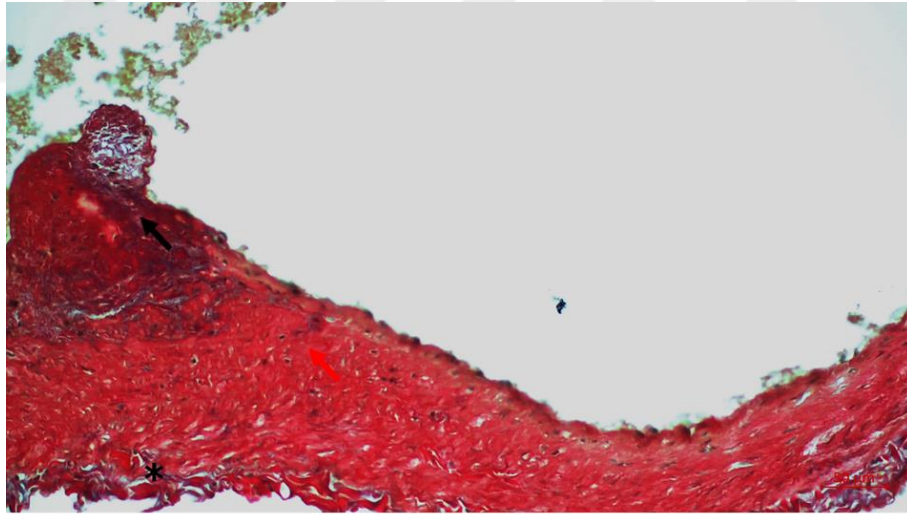
4.9.2.2 DM kontrol Grubu

DM kontrol grubunun koroner arterlerine ait kesitler histolojik olarak incelendiğinde endotel hücreleri ve elastik liflerinin dejenere olduğu, adventisyaya

tabakasında lökosit infiltrasyonu, subendotel ve media arasındaki alanda yoğun bir inflamasyon ve fibrozis olduğu gözlemlenmiştir (Resim 4.11 ve 4.12).



Resim 4.11. DM kontrol grubu koroner arter Endotel hücreleri (siyah ok) ve elastik liflerinin (kırmızı ok) dejenere olduğu, adventisya tabakasında lökosit infiltrasyonu (asteriks) (H&E boyama).

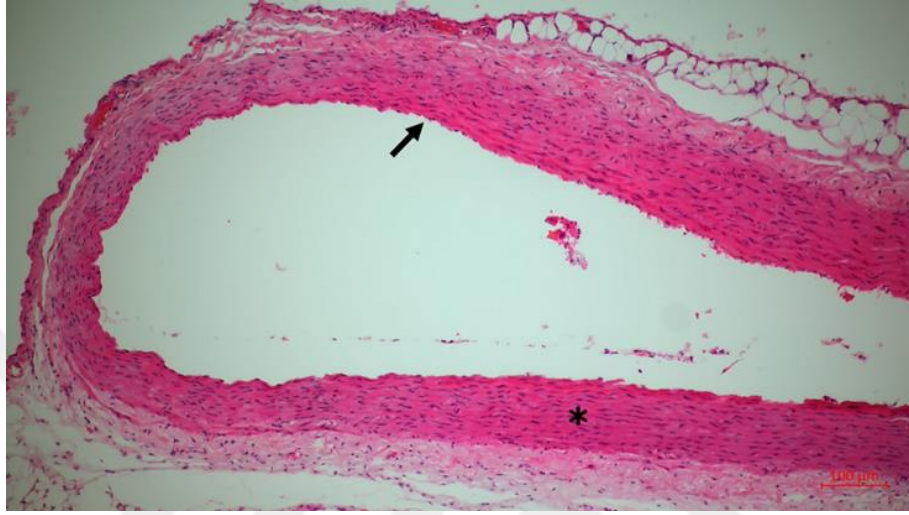


Resim 4.12. DM kontrol grubu koroner arter. İnflamasyon (siyah ok) ve fibrozis (asteriks) (Masson Trikrom boyama).

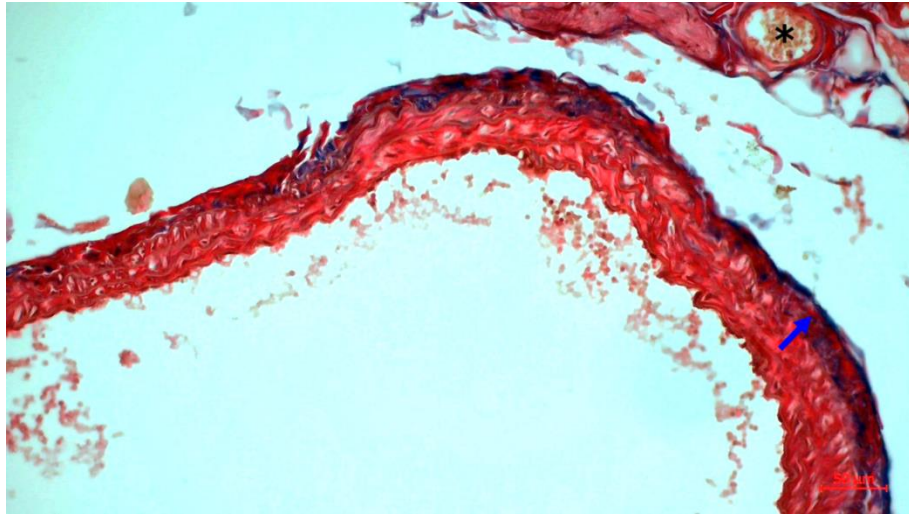
4.9.2.3 DM + Liraglutide tedavi grubu

DM+Liraglutide grubunun koroner arterlerine ait kestiler histolojik olarak incelendiğinde endotel hücrelerinin normal olduğu, kas hücrelerinde hiperplazi,

elastik lif yoğunluğunun arttığı, vaza vazorumlarda vasküler dilatasyon ve konjesyon ve yer yer fibrozisin kısmen devam ettiği izlendi. DM grubuyla karşılaştırıldığında LİRA tedavisinin genel olarak koroner arter histolojisini restore ettiği ancak bazı alanlarda patolojilerin devam ettiği izlendi (Resim 4.13 ve 4.14).



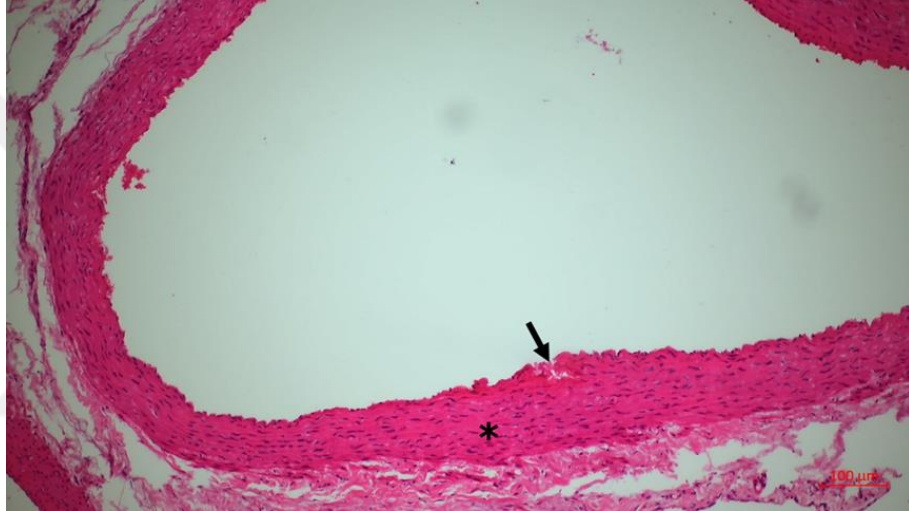
Resim 4.13. DM + Liraglutide tedavi grubu koroner arter. Endotel hücrelerinin normal olduğu (siyah ok), elastik lif (asteriks) (H&E boyama).



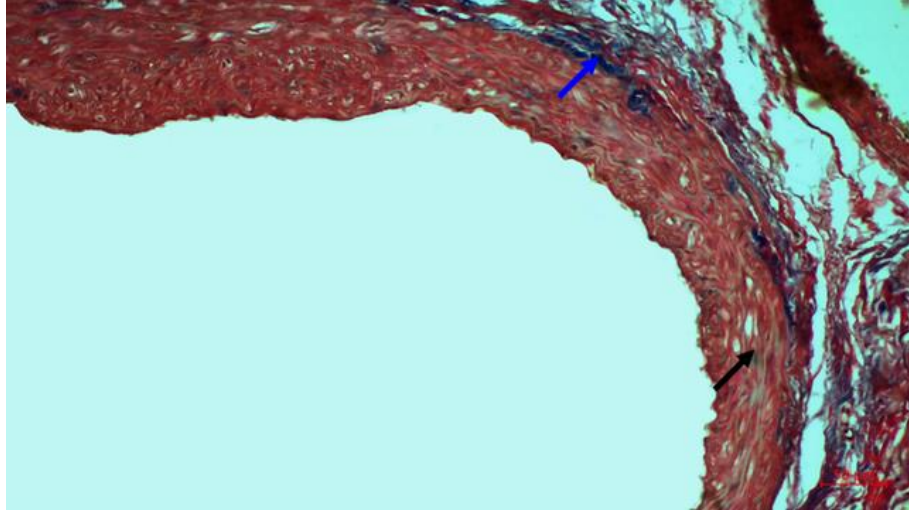
Resim 4.14. DM + Liraglutide tedavi grubu koroner arter Vaza vazorumlarda vasküler dilatasyon /konjesyon (asteriks) ve fibrozis (mavi ok) (Masson Trikrom boyama).

4.9.2.4. DM + Empagliflozin tedavi grubu

DM+ Empagliflozin grubunun koroner arterlerine ait kestiler histolojik olarak incelendiğinde, endotel hücrelerinde bazılarında dejeneratif değişiklikler, tunika mediada elastik lif yoğunluğunun arttığı ve adventisyal bölgede kollajen liflerin düzenli olduğu ancak fibrozisin kısmen devam ettiği görüldü. Genel olarak damar histolojisinin korunduğu söylenebilir. DM sonrası EMPA tedavisinin damar histolojik yapısı üzerinde LİRA tedavisine benzer sonuçlar verdiği gözlemlendi (Resim 4.15 ve 4.16).



Resim 4.15. DM + Empagliflozin tedavi grubu koroner arter. Endotel hücrelerinde dejeneratif değişiklikler (siyah ok), tunika mediada elastik lif (asteriks) (H&E boyama).



Resim 4.16. DM + Empagliflozin tedavi grubu koroner arter. Adventisyal tabakada kollajen lifler (siyah ok) ve fibrozis (mavi ok) (Masson trikrom boyama).

5. TARTIŞMA

Çalışmamızın temel bulgularına göre T2DM; glukoz seviyelerinin yükselmesi, bozulmuş miyokardiyal morfoloji, artmış miyokardiyal fibrozis, artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan savunma, artmış inflamatuvar yanıt ile karakterize edilmiştir. Ayrıca DM’de oksidatif stresin ve inflamasyonun artmasına neden olan AGE seviyelerinde artış gözlemlenmiştir. LİRA ve EMPA ile tedavi bu bulguları önemli ölçüde iyileştirdi, bu iki ilaç karşılaştırıldığında histopatolojik olarak miyokard üzerinde empagliflozinin daha etkin olduğunu gözlemledik. Diğer bulgular bakımından ise belirgin bir fark gözlemlenmedi.

Bu çalışmada bilinen bir DM modeli (NA ve STZ ile oluşturulan) kullanıldı. STZ pankreatik β hücre hasarını tetiklemek için, NA ise bu hücreleri STZ hasarına karşı kısmen korumak için kullanıldı. Böylece DM grubunda T2DM’nin geliştiğini teyit eden nispeten düşük insülin düzeyi ile seyreden yüksek kan şekeri düzeyi saptandı (220,221). Ayrıca çalışmamızın bulguları arasında IL1, TNF α gibi bazı proinflamatuvar sitokinlerin artışı, serum AGE ve MDA artışı ile SOD azalışı gibi oksidatif stres lehinde olan parametreler de mevcuttur. Çalışmamızda hem LİRA hem de EMPA’nın yükselen kan glukoz seviyelerini anlamlı derecede düşürdüğünü, iki ilaç arasında glukoz seviyeleri açısından fark olmadığını gözlemledik. Ayrıca bu iki ajanın kan insülin düzeyini arttırdığı ve iyi bir glisemik kontrol sağladığını bulgularımıza dayanarak söyleyebiliriz. Önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar bildirilmiştir (22, 222, 223). Diyabetik sıçanlarda SGLT-2i uygulamasının GLP-1 analoglarına göre daha güçlü bir hipoglisemik etki yarattığını ve insülin direncini azalttığını belirten araştırma sonuçları da vardır (22, 31). Yeni nesil antidiyabetik ilaç olarak kabul gören bu ajanların vücut ağırlığını hafiflettiğini, dolayısıyla vücut kitle indeksini azalttığı rapor edilmiştir (224,225). Biz de çalışmamızda LİRA ve EMPA ile tedavi edilen grupların son ölçülen vücut ağırlıklarının ilk ölçülen vücut ağırlıklarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğunu bulduk. Bu sonuçlar her iki ilacın da DM hastalarında kilo kaybına engel olamayacağını göstermektedir.

DM'de kardiyovasküler komplikasyonların patogenezi kronik hipergliseminin yol açtığı oksidatif stres, inflamasyonla seyreden karmaşık ve çok faktörlü bir süreçtir. Oksidatif stres DKM'nin ve aterosklerozun patofizyolojisinde önemli rol oynar. Hipergliseminin arttırdığı ROT'lar hücre hasarına ve sonuç olarak kalpte miyokardiyal fibrozis ve apoptozise neden olur. Ayrıca DM'de oluşumu artan AGE'ler de oksidatif stresi ve inflamasyonu arttırarak kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde rol oynar (90,109,110). Biz bu çalışmada DM-kontrol grubunda oksidatif stres belirteci olarak bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın ve ileri glikasyon son ürünlerin (AGE) serum seviyelerinde artış olduğunu bularak, DM'de oksidatif stresin arttığını gösterdik. Yang ve ark. ve Wilson ve ark., oksidatif stresin DKM gelişimindeki rolünü gösteren benzer bulgular saptamışlardır (226,227). Biz çalışmamızda LİRA ve EMPA ile tedavi edilen diyabet gruplarının serum MDA seviyelerinin DM-kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını tespit ettik. Tedavi grupları ile sağlıklı kontrol grubu arasında ise anlamlı bir fark bulunmadı. Bu da kullandığımız ilaçların MDA seviyelerini neredeyse normale çevirdiğini ve oksidatif strese karşı koruyucu etki sağlayabileceğini göstermektedir. Bizim bulgularımızla uyumlu olarak Ashrafi Jigheh ve ark.nın yaptıkları deneysel bir çalışmada, EMPA tedavisinin diyabetik-kontrol grubuna göre MDA'nın renal konsantrasyonunu azalttığı ve önemli bir serbest oksijen radikal temizleyicisi olan süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesini arttırdığı bulunmuştur (228). Oksidatif strese karşı vücudun enzimatik antioksidan savunma sistemlerinden biri olan SOD enzimi süperoksit radikalini hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürerek hücresel hasarı önler. Li C. ve ark. diyabetik sıçanlarda yaptıkları çalışmada EMPA ile tedavi edilen grubun kalp dokusunda MDA düzeyinin DM kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı gösterilmiştir (13). Benzer konuda bir başka araştırmada diyabetik sıçanlarda LİRA'nın nöroprotektif etkileri araştırılmış, LİRA ile tedavi edilen DM grubun beyin dokusunda MDA düzeyinin DM-kontrol grubuna göre düşük olduğu gösterilmiştir (229). Aynı çalışmada antioksidan GSH ve SOD enzimlerinin de DM-kontrol grubuna göre tedavi alan gruplarda arttığı gözlemlenmiştir (229). Diyabetik sıçanlarda LİRA'nın serebral iskemiye karşı koruyuculuğunun araştırıldığı başka bir çalışmada LİRA'nın sıçanların beyin dokusunda SOD aktivitesini arttırdığını

gözlemlemiştir (230). Aya Shiraki ve çalışma grubu LİRA ile in-vitro olarak endotel hücrelerinde yaptığı çalışmada LİRA'nın SOD seviyesini arttırdığını bulmuşlardır (231). Bizim çalışmamızda da hem LİRA hem de EMPA ile tedavi edilen grupların SOD düzeyi, DM-kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekti. Sağlıklı kontrol grubu ile tedavi grupları arasında ise fark yoktu. Bu sonuçlar her iki ilacın DM hastalarında, antioksidan etki gösteren bir enzim olan SOD düzeyini yükseltebildiğini ve bu sayede oksidatif stresin olumsuz kardiyak etkilerini önleyebileceğini göstermektedir.

AGE'ler, şekerlere maruz kalmanın bir sonucu olarak glike hale gelen proteinler veya lipitlerdir. AGE oluşumu diyabetik koşullarda artan oksidatif strese bağlı olarak artar ve artmış AGE seviyeleri de oksidatif stresin artmasına sebep olur. Yani oksidatif stres ve AGE oluşumu birbirini tetikleyen durumlardır (107).

Çalışmamızda AGE seviyelerinin DM-kontrol grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre arttığını, EMPA ve LİRA tedavisinin ise AGE oluşumunu azalttığını ve sağlıklı kontrol grubu seviyesine getirdiğini tespit ettik. Bulgularımıza benzer olarak APO-E'si olmayan farelerde LİRA ile yapılan çalışmada, LİRA tedavisinin serum AGE seviyelerini hem sağlıklı farelere göre hem de eksojen AGE verilen gruba göre anlamlı olarak düşürdüğü tespit edilmiştir (225). Empagliflozinin oksidatif stres ve vasküler disfonksiyona etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada DM-kontrol grubunda AGE seviyesinin sağlıklı-kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükseldiği, EMPA ile tedavi edilen grubun AGE seviyesinin DM-kontrol grubuna göre önemli ölçüde düştüğü gözlemlenmiştir (222). Yukarıda verilen sonuçlar ve bulgularımız doğrultusunda her iki ilacın da DM hastalarında oksidatif stres ürünü ve tetikleyicisi olan AGE seviyesini önemli derecede düşürebileceğini ve AGE'lerin aterosklerotik lezyon gelişimi üzerine gösterdiği olumsuz etkiyi azaltabileceğini göstermektedir.

İnsülin direnci ve hiperglisemi, inflamasyon, oksidatif stres, hiperkoagülasyon, yüksek kan basıncı, dislipidemi ve obezite, T2DM ve kardiyovasküler hastalıkların patofizyolojisinde rol oynayan önemli faktörlerdir (232). DKM'nin erken dönemindeki inflamatuvar süreçte TNF- α , IL-1, IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin ve VCAM-1, ICAM-1 gibi adezyon moleküllerinin

düzeyleri artar (233). Abdelaziz M. Hussein ve ark. 2020 yılında LİRA ve dapagliflozin ile yaptığı çalışmada inflamatuvar sitokin olarak TNF- α çalışılmış ve bu parametrede tedavi gruplarının düzeyleri DM kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (22). Nguyen Ngoc Trang ve ark. diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada IL-1 β , TNF- α ve bölünmüş kaspaz-1 'in miyokardiyal protein ekspresyonlarında hem EMPA hem de LİRA ile tedavi edilen gruplarda DM-kontrol grubuna göre azalma olduğu saptanmış ve bu ilaçların miyokariyal fibrozis ve apoptozisi azalttığı belirtilmiştir (31). Hattori'nin tip 2 DM'li hastalarda EMPA'nın anti- inflamatuvar etkilerini araştırdığı çalışmasında hsCRP düzeyleri ölçülmüş ve EMPA tedavisinin hsCRP'nin serum düzeyini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (224). Ashrafi Jigheh ve ark. diyabetik sıçanlarda EMPA ile yaptığı bir çalışmada EMPA'nın TNF- α 'nın renal ekspresyonlarında DM'nin neden olduğu artışları azalttığı gösterilmiştir (228). Ayrıca Oelze ve ark. çalışmasında da EMPA'nın TNF- α ve IL-6 düzeylerinin DM-kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürdüğü tespit edilmiştir (222). Bizim çalışmamızda hem LİRA hem de EMPA ile tedavi edilen grupların IL-1 ve TNF- α düzeyleri DM kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulundu. Yukarıdaki çalışmaların ve bizim bulgularımız doğrultusunda her iki ilacın da DM'den kaynaklanan inflamasyonu azaltabildiğini göstermektedir. Bu anti inflamatuvar etki aynı zamanda inflamasyonun olumsuz kardiyak sonuçlarını önleyecektir.

Çalışmamızın amaçlarından biri de LİRA ve EMPA'nın kardiyoprotektif etkilerini araştırmaktır. Buna yönelik olarak yaptığımız histopatolojik inceleme neticesinde de DM- kontrol grubunda miyokard fibrozis ve nekrozunun arttığını, kardiyomiyositlerin düzensiz yerleşim gösterdiğini, ödem, inflamasyon ve vasküler konjesyonun arttığını tespit ettik. Yine aynı grupta koroner arterlerde dejenerasyon, fibrozis, lökosit infiltrasyonu gibi diyabete bağlı bulgular saptadık. Tedavi gruplarında ise hem miyokard dokusunda hem de koroner arterlerde bu olumsuzlukların azaldığını gözlemledik. Aynı amaca yönelik yapılmış bir araştırmada LİRA ve dapagliflozinin miyokardiyal morfoloji ve fibrozis üzerindeki etkileri çalışılmıştır. DM grubunda geniş kardiyomiyosit aralıkları, interstisyel ödem, kanama ve miyokard nekrozu ile düzensiz lif ve çekirdek

yerleşim gösterdiğini tespit etmişlerdir (22). Ayrıca, tedavi gruplarından aldıkları kalp numunelerinde, minimal deforme olmuş çekirdeklerle düzenli kardiyomiyosit dizilimi gösterilmiştir. Fibrozis açısından incelendiğinde sağlıklı kontrol grubundan alınan kalp örneklerinde kollajen lifleri ve fibrozis bulunmazken, DM grubunun kalp dokularında kollajen liflerinin aşırı birikimi gösterilmiştir. Tedavi gruplarında ise orta derecede interstisyel fibrozis saptanmıştır (22). Nguyen Ngoc Trang ve ark. 2021 yılında yaptığı çalışmada kardiyomiyositlerde kaspaz-3'ün immünohistokimyasal boyanması ile apoptotik indeksi DM-kontrol grubunda sağlıklı kontrol, EMPA ve LİRA ile tedavi edilen gruptan daha yüksek bulmuşlardır. DM kontrol grubunun kalplerinde sağlıklı kontrol grubunun kalplerinden 2,5 kat daha fazla fibrozis tespit edilmiştir (31). Benzer bir diğer çalışmada ApoE^{-/-} fare modelinde LİRA'nın, erken başlangıçlı, düşük yüklü aterosklerotik hastalığın ilerlemesini azalttığı, aterosklerotik hastalıkta stabilize plak fenotipini önemli ölçüde arttırdığı ve yerleşik, yüksek yüklü aterosklerotik hastalıkta endotel hücre işlev bozukluğunu hafiflettiği bulunmuştur (234). Oelze ve ark.nın çalışmasında ise aort duvarı kalınlığının EMPA ile tedavi edilen grupta anlamlı bir azalma gösterdiği bulunmuştur (222). SGLT-2i ile yapılan bir diğer çalışmada tedavi grubunda miyokardiyal fibrozis düzeyi DM kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (13).

Bu çalışmada; miyokard dokusu incelememizde sağlıklı kontrol grubunda kardiyomiyositlerin normal olduğunu, çekirdeklerinin merkezi yerleşimli olduğunu ve fibrozisin olmadığını gözlemledik. DM-kontrol grubunda ise düzensiz kardiyomiyositler, artmış fibrozis, artmış inflamasyon, ödem ve vasküler konjesyon gözlemledik. Tedavi gruplarında ise bu olumsuz bulguların önemli ölçüde azaldığını tespit ettik. İki ilaç karşılaştırıldığında EMPA'nın miyokard üzerinde LİRA'ya göre daha fazla iyileştirici etki gösterdiğini gözlemledik. Koroner arter incelememizde; sağlıklı kontrol grubumuzda endotel tabakasının yassı olduğu, media tabakasının normal görünümde merkezi yerleşimli düz kas nükleuslarına sahip olduğu, tunika adventisyadaki bağ dokusunun normal görünümde olduğu tespit edildi. DM- kontrol grubunda ise endotel hücreleri ve elastik liflerde dejenerasyon, adventisya tabakasında lökosit infiltrasyonu, subendotel ve media arasında yoğun bir inflamasyon ve fibrozis olduğunu

gözlemledik. LİRA ve EMPA gruplarımızda yine tüm bu bulguların azaldığını, normale yakın seviyelere geldiğini gözlemledik. İki ilaç karşılaştırıldığında koroner arterlere etkileri bakımından fark olmadığını tespit ettik. EMPA ve LİRA tedavilerinin, DM'in neden olduğu miyokard fibrozisini ve dejenerasyonunu azalttığını, koroner arterlerde DM ile meydana gelen dejenerasyonları iyileştirdiğini, EMPA'nın miyokard üzerindeki iyileştirici etkisinin LİRA tedavisine göre daha yüksek olduğunu histopatolojik bulgulara dayanarak ifade edebiliriz.



6. SONUÇ

Literatür taramasından edindiğimiz bilgiye göre bu çalışma liraglutid ve empagliflozinin deneysel diyabet modelinde miyokard ve koroner arter histopatolojisi ile oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtların birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır.

Çalışmamızın bulgularına göre diyabet oluşturulan sıçanlarda serum IL-1, TNF- α , AGE, MDA seviyelerinde önemli bir artış, SOD seviyelerinde önemli bir azalma gözlemledik. Histopatolojik incelememizde DM grubunda bozulmuş miyokardiyal ve arteriyal yapı tespit ettik. Her iki ilacımızın da bu bozulma üzerinde iyileştirici etkisi olduğunu gözlemledik. Empagliflozinin miyokard üzerinde daha fazla iyileştirici etkiye sahip olduğunu, koroner arterler üzerindeki etkileri bakımından ise iki ilaç arasında fark olmadığını gözlemledik. Bulgularımıza göre, inflamatuvar yanıt ve oksidatif stresin diyabetin patogenezinde önemli rol oynadığını, empagliflozin ve liraglutidin kardiyoprotektif etkisinin oksidatif stres ve inflamatuvar yanıtı azaltmasından ileri geldiğini söyleyebiliriz.

7.KAYNAKLAR

1. Hussein AM, Eid EA, Taha M, Elshazli RM, Bedir RF, Lashin LS. Comparative study of the effects of GLP1 analog and SGLT2 inhibitor against diabetic cardiomyopathy in Type 2 diabetic rats: possible underlying mechanisms. *Biomedicines*. 2020 ve 8(3):43.
2. Zhang P, Li T, Wu X, Nice EC, Huang C, Zhang Y. Oxidative stress and diabetes: antioxidative strategies. *Front Med*. 2020 Oct ve 14(5):583-600.
3. Deshpande AD, Harris-Hayes M, Schootman M. Epidemiology of diabetes and diabetes-related complications. *Phys Ther*. 2008 Nov ve 88(11):1254-64.
4. Tuomilehto, J. ve Lindström, J. The major diabetes prevention trials. *Curr. Diab. Rep*. 2003,3, 115–122.
5. TEMD Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı Tedavi ve İzlem Klavuzu. TEMD Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu .Ankara., BAYT Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım, 2022.
6. O'GARA, Patrick T., et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Journal of the American co*.
7. Xu J, Hirai T, Koya D, Kitada M. Effects of SGLT2 Inhibitors on Atherosclerosis: Lessons from Cardiovascular Clinical Outcomes in Type 2 Diabetic Patients and Basic Researches. *J Clin Med*. 2021 Dec 27;11(1):137.
8. JOHNSTON, G. D. Ulster says' NO' ve explosion, resistance and tolerance. Nitric oxide and the actions of organic nitrates. *The Ulster medical journal*, 1998, 67.2: 79.
9. Nedeljkovic ZS, Gokce N, Loscalzo J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. *Postgrad Med J* 2003;79:195--200.
10. Shi Y, Vanhoutte PM. Macro- and microvascular endothelial dysfunction in diabetes. *J Diabetes*. 2017 May;9(5):434-449.

11. Kibel A, Selthofer-Relatic K, Drenjancevic I, Bacun T, Bosnjak I, Kibel D, Gros M. Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus. *J Int Med Res.* 2017 Dec;45(6):1901-1929.
12. Kaur, R., et al. (2018). "Endothelial dysfunction and platelet hyperactivity in type 2 diabetes mellitus: molecular insights and therapeutic strategies". *Cardiovasc Diabetol*, 17(1), 121.
13. Li, Chenguang, et al. "SGLT2 inhibition with empagliflozin attenuates myocardial oxidative stress and fibrosis in diabetic mice heart." *Cardiovascular diabetology* 18 (2019): 1-13.
14. Huttunen HJ, Fages C and Rauvala H: Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF-kappaB require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *J Biol Chem* 274: 1991.
15. Bierhaus A, Schiekfer S, Schwaninger M, Andrassy M Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, et al: Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes* 50: 2792-2808, 2001.
16. Luft, Friedrich C. "Somatic DNA oxidative damage and coronary disease." *Journal of molecular medicine* 83 (2005): 241-243.
17. Heinecke, Jay W. "Oxidative stress: new approaches to diagnosis and prognosis in atherosclerosis." *The American journal of cardiology* 91.3 (2003): 12-16.
18. Keskin, Ö., Balcı, B., 2011. Diabetes mellitus ve kardiyovasküler komplikasyonlar. *Kafkas J. Med. Sci.* 1, 81-85.
19. Matsutani, Daisuke, et al. "Effect of canagliflozin on left ventricular diastolic function in patients with type 2 diabetes." *Cardiovascular diabetology* 17.1 (2018): 1-12.
20. Pfeifer, Michael, et al. "Effects of canagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor, on blood pressure and markers of arterial stiffness in patients with type 2 diabetes mellitus: a post hoc analysis." *Cardiovascular Diabetology* 16 (2017): 1-9.
21. Eckhouse S.R., Spinale F.G. Changes in the myocardial interstitium and contribution to the progression of heart failure. *Heart Fail. Clin.* 2012;8:7–20.

22. Hussein AM, Eid EA, Taha M, Elshazli RM, Bedir RF, Lashin LS. Comparative Study of the Effects of GLP1 Analog and SGLT2 Inhibitor against Diabetic Cardiomyopathy in Type 2 Diabetic Rats: Possible Underlying Mechanisms. *Biomedicines*. 2020 Feb 25;8(3):43.
23. Wilson, Adam J., et al. "Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting." *Heart* 104.4 (2018): 293-299.
24. Russo, Ilaria, and Nikolaos G. Frangogiannis. "Diabetes-associated cardiac fibrosis: cellular effectors, molecular mechanisms and therapeutic opportunities." *Journal of molecular and cellular cardiology* 90 (2016): 84-93.
25. ANDREADOU, Ioanna, et al. Empagliflozin limits myocardial infarction in vivo and cell death in vitro: role of STAT3, mitochondria, and redox aspects. *Frontiers in physiology*, 2017, 8: 1077.
26. BAARTSCHEER, Antonius, et al. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na⁺ through inhibition of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*, 2017, 60: 568-573.
27. BYRNE, Nikole J., et al. Empagliflozin prevents worsening of cardiac function in an experimental model of pressure overload-induced heart failure. *Basic to Translational Science*, 2017, 2.4: 347-354.
28. WANG, Y., et al. Exendin-4 decreases liver inflammation and atherosclerosis development simultaneously by reducing macrophage infiltration. *British journal of pharmacology*, 2014, 171.3: 723-734.
29. DOZIER, Kristopher C., et al. Glucagon-like peptide-1 protects mesenteric endothelium from injury during inflammation. *Peptides*, 2009, 30.9: 1735-1741.
30. HOSAKA, Toshio, et al. Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 2009, 390.3: 613-618.
31. Trang NN. et al. Empagliflozin and Liraglutide Differentially Modulate Cardiac Metabolism in Diabetic Cardiomyopathy in Rats. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 25;22(3):1177.
32. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus 2009. *Diabetes Care*, 33(Supplement_1), S62–S69.

33. Unger RH, Orci L. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Sep 14. 107(37):16009-12.
34. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018 ve 98., 14(2):88–.
35. Satman, İ., & Grubu, T. Ç. (2010). TURDEP-II Çalışması ilk sonuçlar, 32. TEMH Kongresi, 13,17.
36. Oğuz, A. (2018). The Prospective Urban Rural Epidemiology (PURE) study: PURE Turkey. *Türk Kardiyoloji Dernegi Arsivi: Türk Kardiyoloji Derneginin Yayin Organidir*, 46(7), 613-623.
37. International Diabetes Federation, IDF Diabetes Atlas 2021, <https://diabetesatlas.org> (Erişim tarihi: 24.03.2023).
38. Mayer-Davis E. J. et. al (2018). ISPAD Clinical Practice Consensus Guidelines 2018: Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatric Diabetes*, 19 (27), 7–19.
39. Rewers M. Hyöty H. et al. (2018). The Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY) Study: 2018 Update. *Curr Diab Rep.*, 18(12), 136.
40. T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk sağlığı Kurumu Türkiye Diyabet Programı (2015-2020).
41. Tanrıverdi MH, Çelepkolu T, Aslanhan H, 2013. Diyabet ve birinci basamak sağlık hizmetleri. *J Clin Exp Invest*, 4, 4, 562-567.
42. Schwartz SS, Epstein S, Corkey BE, Grant SFA, Gavin Iii JR, Aguilar RB, Herman ME, 2017. A unified pathophysiological construct of diabetes and its complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 28, 9, 645-55.
43. Rodrigues TC, Canani LH, Gross JL. Metabolic syndrome, insulin resistance and cardiovascular disease in type-1 diabetes mellitus. *Arq Bras Cardiol* 2010; 94: 134-9.
44. American Diabetes Association; Introduction: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care* 1 January 2022; 45 (Supplement_1): S1–S2. .
45. Brunton, S. Pathophysiology of type 2 diabetes: The evolution of our understanding. *J Fam Pract* 65(4), 2016.
46. Chan M. Global report on diabetes. Vol. 58, World Health Organization, 2014.

47. DeFronzo RA: Banting Lecture. From the Triumvirate to the Ominous Octet: anew paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes* 2009;58:773–795.
48. DeFronzo RA: Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia* 2010 ve 53:1270–1287.
49. XVI. Metabolik sendrom sempozyumu, 19-22/09/2019, <http://www.metsend.org> (Erişim tarihi: 24.03.2023).
50. Marcia F. K., M. Goncalves, J. John, Kalarickal Vivian Fonseca Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus Principles of Diabetes Mellitus pp 1-11 09 February 2017.
51. Saltiel A.R., New perspectives into the molecular pathogenesis and treatment of type 2 diabetes. *Cell*;104:517-29, (2001).
52. Yılmaz C., Yılmaz T., İmamoğlu Ş., Diabetes Mellitus'un tarihçesi. In: *Diabetes Mellitus Mayıs 2000*, Gri Tasarım, pp: 13-15, (2000).
53. Kahn SE, Prigeon RL, Mc Cullock DK, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and B cell function in human subjects: evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993; 42: 1642-63.
54. Salmin F. Atia Ali GLUT 4 and Insulin Resistance Wright State University, 2014.
55. Alam F, Islam MA, Khalil MI, Gan SHMetabolic Control of Type 2 Diabetes by Targeting the GLUT4 Glucose Transporter: Intervention Approaches. *Curr Pharm Des.* 2016;22(20):3034-49.
56. InterAct Consortium. The link between family history and risk of type 2 diabetes is not explained by anthropometric, lifestyle or genetic risk factors: the EPICInterAct study. *Diabetologia* 2013; 56(1): 60-69.
57. Karakurt, F., Çarlıoğlu, A., Kasapoğlu, B., & Gümüş, İ. (2009). Gestasyonel diabetes mellitus tanı ve tedavisi. *Yeni Tıp Dergisi*, 26(3), 134-138.
58. Olgun N, Eti Aslan F, Coşanu G, Çelik S, 2014. Diabetes mellitus. In: *Dahili ve Cerrahi Hastalıklarda Bakım*. Edt: Karadakovan A, Eti Aslan F, 2. Baskı, Ankara: Nobel Kitapevi, p. 796-808.
59. İmamoğlu Ş, 2005. Diabetes mellitus. İçinde: *İç Hastalıkları*. Edt: Dolar E, 1. baskı, Bursa: Nobel Kitapevi, p. 692-712.

60. Glasheen WP, Renda A, Dong Y, 2017. Diabetes complications severity index (dcsi)-update and icd-10 translation. *Journal of Diabetes and its Complications*, 31, 6, 1007-13.
61. Sabuncu T, Bayram F, Kıyıcı S, Satman İ, Yumuk V, İzol AN. Obezite Tanı ve Tedavi Kılavuzu 2019. 6. Baskı. Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği 2019; 33: 4-6.
62. Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, Denaxas S, Pujades-Rodriguez M, Gale CP, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1· 9 million people. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2015;3(2):105-13.
63. Eroğlu, Nermin. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları. *Izmir Democracy University Health Sciences Journal*, 2018, 1.2: 6-12.
64. Uludağ, Mecit Orhan. Diyabete bağlı ikincil hastalıklar (komplikasyonlar). *Mised*, 2010, 23: 39-44.
65. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 93(1):137–88, 2013.
66. Koulis C, Watson AMD, Gray SP, Jandeleit-Dahm KA. Linking RAGE and Nox in diabetic micro and macrovascular complications. *Diabetes and Metabolism* 41(4): 272-281, 2015.
67. Unger RH, Orci L. Glucagon and the A cell: physiology and pathophysiology (first two parts). *N Engl J Med*. 1981 Jun 18;304(25):1518-24.
68. Vladimir VF. Suppression of counterregulatory hormone response to hypoglycemia by insulin per se. *Gastron ecuatoriana y Tur local*. 1967;1(69):5–24.
69. Randall L, Begovic J, Hudson M, Smiley D, Peng L, Pitre N, et al. Recurrent diabetic ketoacidosis in inner-city minority patients: behavioral, socioeconomic, and psychosocial factors. *Diabetes Care*. 2011 Sep;34(9):1891-6.
70. Wachtel TJ, Tetu-Mouradjian LM, Goldman DL, Ellis SE, O'Sullivan PS. Hyperosmolarity and acidosis in diabetes mellitus - A three-year experience in Rhode Island. *J Gen Intern Med*. 1991;6(6):495–502.
71. Özcan Ş. Kronik Komplikasyonlar, Erdogan, S (Ed) *Diyabet Hemşireliği Temel Bilgiler*, İstanbul; Yüce Basımevi, 2002: 141-156.

72. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998 Jul 23;339(4):229-34. .
73. Balakumar P, Maung-U K, Jagadeesh G. Prevalence and prevention of cardiovascular disease and diabetes mellitus. Vol. 113, *Pharmacological Research.* Academic Press; 2016. p. 600–9.
74. Groop PH, Thomas MC, Moran JL, Wadèn J, Thorn LM, Mäkinen VP, et al. The presence and severity of chronic kidney disease predicts all-cause mortality in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2009;58(7):1651–8.
75. MAISCH, B., ALTER, P. ve PANKUWEIT, S. Diabetic cardiomyopathy--fact or fiction?. *Herz,* 2011, 36.2: 102.
76. MYTAS, Dimitrios Z., et al. Diabetic myocardial disease: pathophysiology, early diagnosis and therapeutic options. *Journal of Diabetes and its Complications,* 2009, 23.4: 273-282.
77. ovacic JC, Castellano JM, Farkouh ME, Fuster V. The relationships between cardiovascular disease and diabetes: focus on pathogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2014 Mar ve 43(1):41-57.
78. Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:791-804.
79. Christopher Glass AK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead Review. Vol. 104, *Cell.* 2001.
80. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 6;21(5):1835.
81. Poznyak A v., Bharadwaj D, Prasad G, Grechko A v., Sazonova MA, Orekhov AN. Renin- angiotensin system in pathogenesis of atherosclerosis and treatment of cvd. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences.* MDPI; 2021.
82. Insull W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *American Journal of Medicine.* 2009 Jan;122(1 SUPPL.).
83. Şazi İmamoğlu. Diabetes Mellitus 2009. Multidisipliner Yaklaşımla Tanı, Tedavi ve İzlem. 3.Baskı.

84. Prasad K. AGE-RAGE Stress and Coronary Artery Disease. *Int J Angiol*. 2021 Mar;30(1):4-14.
85. Singh S, Dhingra S, Ramdath DD, Vasdev S, Gill V, Singal PK. Risk factors preceding type 2 diabetes and cardiomyopathy. *J Cardiovasc Transl Res* 2010;3:580-96.
86. Rodrigues B, Cam MC, McNeill JH. Metabolic disturbances in diabetic cardiomyopathy. *Mol Cell Biochem* 1998;180:53-7.
87. Malhotra A, Sanghi V. Regulation of contractil proteins in diabetic heart. *Cardiovasc Res* 1997;34:34-40.
88. Vered A, Battler A, Segal P. Exercise-induced left ventricular dysfunction in young men with asymptomatic diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1984;54:633-7.
89. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L. Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2001;24:5-10.
90. Fang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy:evidence, mechanism.and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2004;25:543-67.
91. Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin resistance-induced heart disease. Vol. 61, *Diabetologia*. Springer Verlag; 2018. p. 21–8.
92. Zile MR, Brutsaert DL. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic heart failure: Part II. Causal mechanisms and treatment. *Circulation*. 2002 Mar 26;105(12):1503–8.
93. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*. 2005 Apr 9;365(9467):1333–46.
94. Katsarou A, Gudbjörnsdottir S, Rawshani A, Dabelea D, Bonifacio E, Anderson BJ, Jacobsen LM, Schatz DA, Lernmark Å. Type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Mar 30;3:17016.
95. León DDD, Crutchlow MF, Ham JYN, Stoffers DA. Role of glucagon-like peptide-1 in the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2006 May 1;38(5–6):845–59.
96. Hande Bayram Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi E, Öğrencisi L, Hatice Kübra Elçioğlu T, Hande Bayram E, Kübra Elçioğlu H. Diyabetik

Nöropatiye Güncel Tedavi Yaklaşımları. Marmara Pharmaceutical Journal. 2016;20:252–62.

97. Kim J. et al. Involvement of advanced glycation end products, oxidative stress and nuclear factor-kappa B in the development of diabetic keratopathy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2011;249:529-36.

98. Kandarakis SA, Piperi C, Moschonas DP, Korkolopoulou P, Papalois A, Papavassiliou AG. Glycotoxins induce RAGE and VEGF up-regulation in the retina of normal rats. Exp Eye Res. 2015;137:1-10.

99. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. Cell Metab. 2013 Jan 8;17(1):20-33.

100. Menini S, Iacobini C, Vitale M, Pugliese G. The Inflammasome in Chronic Complications of Diabetes and Related Metabolic Disorders. Cells. 2020 Jul 30;9(8):1812.

101. Afkarian M, Zelnick LR, Hall YN, Heagerty PJ, Tuttle K, Weiss NS, de Boer IH. Clinical Manifestations of Kidney Disease Among US Adults With Diabetes, 1988-2014. JAMA. 2016 Aug 9;316(6):602-10.

102. Goldfine AB, Shoelson SE. Therapeutic approaches targeting inflammation for diabetes and associated cardiovascular risk. J Clin Invest. 2017 Jan 3;127(1):83-93.

103. Fukami K, Yamagishi S, Kaifu K, Matsui T, Kaida Y, Ueda S, et al. Telmisartan inhibits AGE-induced podocyte damage and detachment. Microvasc Res. 2013;88:79-83.

104. Demirer, B.; Yardımcı, H. İleri Glikasyon Son Ürünlerinin Diyabet Komplikasyonları Üzerine Etkileri: Bir Derleme. Bes Diy Derg 2022, 50, 101-108.

105. Michael J. Fowler; Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. Clin Diabetes 1 April 2008; 26 (2): 77–82.

106. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R, Malik RA, Maser RE, Sosenko JM, Ziegler D: Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. Diabetes Care 28:956-962, 2005.

107. Singh R, Barden A, Mori T, et al. Advanced glycation end-products: A review. Diabetologia 2001;44:129-46.

108. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research* 107(9):1058-1070, 2010.
109. Rains JL, Jain SK. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radical Biology And Medicine* 50(5):567-575, 2011.
110. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol* 17(1):24–38, 2003.
111. cordain L, Eaton SB, Sebastian A, Mann N, Lindeberg S, Watkins BA, O’Keefe JH, Brand-Miller J (2005) Origins and evolution of the western diet: health implications for the 21st century. *Am J Clin Nutr* 81:341–354.
112. Sharma C, Kaur A, Thind SS, Singh B, Raina S. Advanced glycation End-products (AGEs): an emerging concern for processed food industries. *J Food Sci Technol* 2015; 52:7561-76.
113. Rahbar S, Blumenfe O, Ranney HM (1969) Studies of an unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 36:838–843.
114. Ulrich P, Cerami A (2001) Protein glycation, diabetes and aging. *Recent Prog Horm Res* 56:21.
115. O’Brien J, Morrissey PA (1989) Nutritional and toxicological aspects of the maillard browning reaction in foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 28: 211–248.
116. Cerami C, Founds H, Nicholl I et al (1997) Tobacco smoke is a source of toxic reactive glycation products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 13915–13920.
117. Nicholl ID, Bucala R (1998) AGE and cigarette smoking. *Cell Mol Biol* 44:1025–1033,.
118. Parmaksız, İlker. Diyabet Komplikasyonlarında İleri Glikasyon Son Ürünleri. *Marmara Medical Journal*, 2011, 24.3.
119. Turk Z. Glycotoxines, carbonyl stress and relevance to diabetes and its complications. *Physiol Res* 2010;59: 147-56.
120. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, et al. Advanced glycation end products: Sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation* 2006;114:597-605.
121. Nessar A. Advanced glycation endproducts-role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract* 2005;67: 3–21.

122. Schmidt AM, Yan SD, Yan SF, et al. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J Clin Invest* 2001;108:949-55.
123. Ding Q, Keller JN. Evaluation of RAGE isoforms, ligands and signaling in the brain. *Biochim Biophys Acta* 2005;1746:18-27.
124. Lapolla A, Traldi P, Fedele D. Importance of measuring products of non-enzymatic glycation of proteins. *Clin Biochem* 2005; 38:103- 15.
125. Kamer K, 2011, Protein Glikasyonu, Hacettepe Tıp Dergisi;42:95-104.
126. Singh VP, Bali A, Singh N, Jaggi AS. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2014 Feb;18(1):1-14.
127. Demirel, B., & Yardımcı, H. (2022). İleri Glikasyon Son Ürünlerinin Diyabet Komplikasyonları Üzerine Etkileri: Bir Derleme. *Beslenme Ve Diyet Dergisi*, 50(1), 101–108. <https://doi.org/10.33076/2022.BDD.1516>.
128. The absence of a glycemic threshold for the development of long-term complications: the perspective of the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes*. 1996;45:1289-1298.
129. Parving HH, Hommel E, Mathiesen E, et al. Prevalence of microalbuminuria arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin dependent diabetes. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296:156-160.
130. Edwards JL, Vincent AM, Cheng HT, Feldman EL. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther* 2008; 120:1.
131. Ueno H, Koyama H, Tanaka S, et al. Skin autofluorescence, a marker for advanced glycation end product accumulation, is associated with arterial stiffness in patients with end-stage renal disease. *Metabolism* 2008;57:1452-7.
132. Gerrits EG, Lutgers HL, Kleefstra N, Graaff R, Groenier KH, Smit AJ, Gans RO, Bilo HJ: Skin autofluorescence: a tool to identify type 2 diabetic patients at risk for developing microvascular complications. *Diabetes Care* 2008;31:517–521.
133. Chabroux S, Canoui-Poitrene F, Reffet S, Mills-Joncour G, Morelon E, Colin C, Thivolet C: Advanced glycation end products assessed by skin autofluorescence in type 1 diabetics are associated with nephropathy, but not retinopathy. *Diabetes Metab* 2010;.

134. Monami M, Lamanna C, Gori F, Bartalucci F, Marchionni N, Mannucci E: Skin autofluorescence in type 2 diabetes: beyond blood glucose. *Diabetes Res Clin Pract* 2008;79:56–60.
135. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem*. 2007; 18(9): 567–579.
136. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997; 82(2): 291–295.
137. Hepel M, Andreescu S. Oxidative Stress and Human Health. In: Hepel M, Andreescu S, editors. ACS Symposium Series. 1200. Washington, DC: American Chemical Society; 2015. p. 1-33.
138. Khan AN, Khan R, Ahmad M, Mushtaq N. Role of antioxidant in oxidative stress and diabetes mellitus. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2015;3:217-20.
139. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging*. 2018;Volume 13:757-72. en.
140. Nair A, Nair B. Comparative analysis of the oxidative stress and antioxidant status in type II diabetics and nondiabetics: A biochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2017;21(3):394. en.
141. Yan L-J. Pathogenesis of chronic hyperglycemia: From reductive stress to oxidative stress. *J Diabetes Res*. 2014;2014:137919.
142. ÇETİNER, Özlem, and Neslişah RAKICIOĞLU. "Hiperglisemi, Oksidatif Stres ve Tip 2 Diyabette Oksidatif Stres Belirteçlerinin Tanımlanması." *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi* 4.1 (2020): 60-68.
143. Lorenzi M. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:61038.
144. Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol*. 2012;3:87.
145. Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J*. 1999;13(1):23-30.
146. Drel VR, Pacher P, Ali TK, Shin J, Julius U, El-Remessy AB. Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract

formation,retinal oxidative nitrosative stress,glial activation,and apoptosis. *Int J MoMed*. 2008;21(6):667-676.

147. Ramirez MA, Borja NL. Epalrestat: An aldose reductase inhibitor for the treatment of diabetic neuropathy *Pharmacotherapy*. 2008;28(5):646-655.

148. Giannoukakis N. Drug evaluation: ranirestat--an aldose reductase inhibitor for the potential treatment of diabetic complications. *Curr Opin Investig Drugs*. 2006;7(10):916-923.

149. Johnson BF, Nesto RW, Pfeifer MA, Slater WR, Vinik AI, Chyun DA, Law G, Wackers FJ, Young LH. Cardiac abnormalities in diabetic patients with neuropathy: Effects of aldose reductase inhibitor administration. *Diabetes Care*.2004;27(2):448-454.

150. . Soetikno V, Watanabe K, Lakshamanan AP, Arumugam S, Sari FR, Sukumaran V, et al. Role of protein kinase C-MAPK,oxidative stress and inflammation pathways in diabetic nephropathy. *J Nephrol Ther*. 2012;s2(1).

151. Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem*. 2004;279(41):42351-42354.

152. Semba RD, Huang H, Luttly GA, Van Eyk JE, Hart GW. The role of O-GlcNAc signaling in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Proteomics Clin Appl*. 2014;8(3-4):218-231.

153. Horal M, Zhang Z, Stanton R, Virkamäki A, Loeken MR. Activation of the hexosamine pathway causes oxidative stress and abnormal embryo gene expression: Involvement in diabetic teratogenesis. *Birth Defects Res Part A - Clin Mol Teratol*. 2004;70(8):519-527.

154. Ramazan MEMİŞOĞULLARI .Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* (2005).

155. M. J. Fowler, "Microvascular and macrovascular complications of diabetes," *Clinical Diabetes*, vol. 26, no. 2, pp. 77–82, 2008.

156. Saddala, Rajeswara Reddy, et al. "Regulation of cardiac oxidative stress and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats treated with aqueous extract of *Pimpinella tirupatiensis* tuberous root." *Experimental and toxicologic pathology* 65.1-2.

157. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E: The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *ClinBiochem* 33:669-674, 2000.
158. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL: Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews*. 25: 612–628, 2004.
160. Ramesh, B., et al. "Effect of Commiphora mukul gum resin on hepatic marker enzymes, lipid peroxidation and antioxidants status in pancreas and heart of streptozotocin induced diabetic rats. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 2.11 (2012): 895-900.
161. Yang Z, Laubach VE, French BA, Kron IL. Acute hyperglycemia enhances oxidative stress and exacerbates myocardial infarction by activating nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase during reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Mar;137(3):723-9.
162. ALTINIŞIK, M., and ADÜ Tıp Fakültesi Biyokimya AD. "Serbest oksijen radikalleri ve antioksidanlar." ADÜ Tıp Fakültesi, Biyokimya AD., Aydın (2000).
163. Tabei, S. M. B., et al. "Effect of vitamins A, E, C and omega-3 fatty acids supplementation on the level of catalase and superoxide dismutase activities in streptozotocin-induced diabetic rats." *Bratislava Medical Journal* 116.2 (2015): 115-118.
164. Garg MC, Chaudhary DP, Bansal DD. Effect of vitamin E supplementation on diabetes induced oxidative stress in experimental diabetes in rats. *Indian J Exp Biol*. 2005; 43(2):177-180.
165. McMurray J, Chopra M, Abdullah I, Smith WE, Dargie HJ Evidence of oxidative stress in chronic heart failure in humans. *EurHeart J* 1993;14:1493–1498.
166. Ghatak A, Brar MJ, Agarwal A et al. Oxy free radical system in heart failure and therapeutic role of oral vitamin E. *Int J Cardiol* 1996;57:119–127.
167. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1998;31:1352–1356.
168. Yucel D, Aydogdu S, Cehreli S et al. Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem* 1998;44:148–154.

169. Khaper N, Singal PK. Effects of afterload-reducing drugs on pathogenesis of antioxidant changes and congestive heart failure in rats. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:856–861.
170. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003; 17(1): 24–38.
171. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98–107.
172. Yalçın T. , Rakıcıoğlu N. Diyetel Etmenler, Tip 2 Diyabet ve İnflamasyon. *Sakarya Tıp Dergisi*. 2018; 8(4): 686-694.
173. Esser N, Legrand-Poels S, Piette J, Scheen AJ, Paquot N. Inflammation as a link between obesity, metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014;105(2):141-50.
174. Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):738–49.
175. Kılıçlı F, Acıbuca F. Kronik inflamasyon, insülin direnci ve diyabet. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*. 2015;3(3):30-5.
176. Watanabe Y, Nagai Y, Takatsu K. Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance. *Nutrients* 2013; 5(9): 3757-78.
177. Özbayer, C. , Yağcı, E. & Kurt, H. (2018). Obezite, Tip 2 Diyabet ve İnsülin Direnci Arasındaki Bağlantı: İnflamasyon . *Tıp Fakültesi Klinikleri Dergisi* , 1 (2) , 27-36 . Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/atk/issue/39731/469981>.
178. Massaro M, et al. Therapeutic potential of the dual peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α/γ agonist aleglitazar in attenuating TNF- α -mediated inflammation and insulin resistance in human adipocytes. *Pharmacol Res* 2016; 107: 125-36.
179. Dandona P, Ghanim H, Bandyopadhyay A et al. Insulin suppresses endotoxin-induced oxidative, nitrosative, and inflammatory stress in humans. *Diabetes Care* 2010; 33(11): 2416-23.
180. Kaur N, Guan Y, Raja R, Ruiz-Velasco A, Liu W. Mechanisms and Therapeutic Prospects of Diabetic Cardiomyopathy Through the Inflammatory Response. *Front Physiol*. 2021 Jun 21;12:694864.

181. Dinççağ, N. (2011). Diabetes mellitus tanı ve tedavisinde güncel durum. İç Hastalıkları Dergisi, 18(4), 181-223.
182. Tümer, G, Çolak, R. (2012). Tip 2 diabetes mellitusda tıbbi beslenme tedavisi. Journal of Experimental and Clinical Medicine, 29 (1s), 12-15.
183. Özelgün, D . (2017). Diabetes Mellitus'ta Tıbbi Beslenme Tedavisi İlkeleri . Klinik Tıp Bilimleri, 5 (4), 41-49.
184. O'Hagan, C., De Vito, G. & Boreham, C.A.G. Exercise Prescription in the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. Sports Med 43, 39–49 (2013).
185. Quianzon CC, Cheikh IE. History of current non-insulin medications for diabetes mellitus. Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives. 2012;2(3):19081.
186. White JR. A brief history of the development of diabetes medications. Diabetes Spectrum. 2014;27(2):82-6.
187. Ulusal Diyabet Konsensus Grubu. TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2019. Armoni Nüans Baskı Sanatları A.Ş. 1–192 p.
188. Trevor AJ, Katzung BG, Kruidering-Hall M. Katzung & Trevors Pharmacology Examination & Board Review, p:341-345, 11th edition, 2015.
189. Comparison of the Effects of Glucagon-Like Peptide Receptor Agonists and Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitors for Prevention of Major Adverse Cardiovascular and Renal Outcomes in Type 2 Diabetes Mellitus. Circulation. 2019 Apr 23;139(17):2022-2031. Zelniker TA, Wiviott SD, Raz I, Im K, Goodrich EL, Furtado RHM, Bonaca MP, Mosenzon O, Kato ET, Cahn A, Bhatt DL, Leiter LA, McGuire DK, Wilding JPH, Sabatine MS.
190. Ceylan Ünlüsoy M, Akkuç S, İnceli H.İ. Diyabet Tedavisinde SGLT2 İnhibitörleri. FABAD J. Pharm. Sci., 43, 2, 157-170, 2018.
191. Seman L, Macha S, Nehmiz G, Simons G, Ren B, Pinnetti S, et al. Empagliflozin (BI 10773), a Potent and Selective SGLT2 Inhibitor, Induces Dose-Dependent Glucosuria in Healthy Subjects. Clin Pharmacol Drug Dev. 2013;2 (2):152-61.
192. Isaji M. Sodium-glucose cotransporter inhibitors for diabetes. Curr Opin Investig Drugs. 2007;8 (4):285-92.

193. Ndefo UA, Anidiobi NO, Basheer E, Eaton AT. Empagliflozin (Jardiance): A Novel SGLT2 Inhibitor for the Treatment of Type-2 Diabetes. *P T*. 2015;40 (6):364-8.
194. Roden M. et al. Empagliflozin monotherapy with sitagliptin as an active comparator in patients with type 2 diabetes: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1 (3):208-19.
195. Fitchett DH, Udell JA, Inzucchi SE. Heart failure outcomes in clinical trials of glucose-lowering agents in patients with diabetes. *Eur J Heart Fail*. 2017;19 (1):43-53.
196. Zinman B, Wanner C, Lachin JM, Fitchett D, Bluhmki E, Hantel S, et al. Empagliflozin, Cardiovascular Outcomes, and Mortality in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2015;373 (22):2117-28.
197. Cherney DZ, Perkins BA, Soleymanlou N, Har R, Fagan N, Johansen OE, et al. The effect of empagliflozin on arterial stiffness and heart rate variability in subjects with uncomplicated type 1 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol*. 2014;13:28.
198. Efficacy and safety of empagliflozin added to existing antidiabetes treatment in patients with type 2 diabetes and chronic kidney disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2014 May;2(5):369-84. . Barnett AH, Mithal A, Manassie J, Jones R, Rattunde H, Woerle HJ, Broedl UC ve investigators., EMPA-REG RENAL trial.
199. Cardoso CR, Ferreira MT, Leite NC, Salles GF. Prognostic impact of aortic stiffness in high-risk type 2 diabetic patients: the Rio de Janeiro Type 2 Diabetes Cohort Study. *Diabetes Care*. 2013;36 (11):3772-8.
200. Bakris GL, Molitch M. Microalbuminuria as a risk predictor in diabetes: the continuing saga. *Diabetes Care*. 2014;37 (3):867-75.
201. Lytvyn Y, Bjornstad P, Udell JA, Lovshin JA, Cherney DZI. Sodium Glucose Cotransporter-2 Inhibition in Heart Failure: Potential Mechanisms, Clinical Applications, and Summary of Clinical Trials. *Circulation*. 2017;136 (17):1643-58.
202. Packer M, Anker SD, Butler J, Filippatos G, Pocock SJ, Carson P, et al. Cardiovascular and Renal Outcomes with Empagliflozin in Heart Failure. *N Engl J Med*. 2020.

203. Santos-Gallego CG, Vargas-Delgado AP, Requena JA, Garcia-Ropero A, Mancini D, Pinney S, et al. Randomized Trial of Empagliflozin in NonDiabetic Patients with Heart Failure and Reduced Ejection Fraction. *J Am Coll Cardiol*. 2020.
204. Lee MMY, Brooksbank KJM, et al. Effect of Empagliflozin on Left Ventricular Volumes in Patients with Type 2 Diabetes, or Prediabetes, and Heart Failure with Reduced Ejection Fraction (SUGAR-DM-HF). *Circulation*. 2020.
205. Baartscheer A, Schumacher CA, Wust RC, Fiolet JW, Stienen GJ, Coronel R, et al. Empagliflozin decreases myocardial cytoplasmic Na (+) through inhibition of the cardiac Na (+)/H (+) exchanger in rats and rabbits. *Diabetologia*. 2017;60 (3):568-73.
206. Nakamura TY, Iwata Y, Arai Y, Komamura K, Wakabayashi S. Activation of Na⁺/H⁺ exchanger 1 is sufficient to generate Ca²⁺ signals that induce cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ Res*. 2008;103 (8):891-9.
207. Turan, E., & Kulaksızoğlu, M. (2015). Tip 2 diyabet tedavisinde güncel yaklaşımlar. *Okmeydanı Tıp Dergisi*, 31(ek sayı), 86-94.
208. Madsbad S. Review of head-to-head comparisons of glucagon-like peptide-1 receptor agonists. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2016;18(4):317-32. en.
209. ÖZAÇMAK, Hale Sayan; BAYRAKTAROĞLU, Taner. Glukagon benzeri peptid-1'in sinir sistemi ve iştah kontrolü üzerine etkileri. *Türkiye Diyabet ve Obezite Dergisi*, 1.1: 1-6.
210. Vandemark C, Nguyen J, Zhao ZQ. Cardiovascular Protection with a Long-Acting GLP-1 Receptor Agonist Liraglutide: An Experimental Update. *Molecules*. 2023 Feb 1;28(3):1369.
211. MÜLLER, Timo D., et al. Glucagon-like peptide 1 (GLP-1). *Molecular metabolism*, 2019, 30: 72-130.
212. Gaspari T, Liu H, Welungoda I, et al. A GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelial cell dysfunction and vascular adhesion molecule expression in an ApoE^{-/-} mouse model. *Diab Vasc Dis Res* 2011; 8: 117–124.
213. Tashiro Y, Sato K, Watanabe T, Nohtomi K, Terasaki M, Nagashima M, Hirano T. A glucagon-like peptide-1 analog liraglutide suppresses macrophage foam cell formation and atherosclerosis. *Peptides*. 2014 Apr;54:19-26.

214. Marso SP, Poulter NR, Nissen SE, Nauck MA, Zinman B, Daniels GH, et al. Design of the liraglutide effect and action in diabetes: evaluation of cardiovascular outcome results (LEADER) trial. *Am Heart J*. 2013 Nov;166(5):823-30.e5.
215. Kurçer Z., Karaoğlu D. Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turk Jem*. 2012;16(2):34-40.
216. Novelli M, Pocai A, Lajoix AD, Beffy P, et al. Alteration of β -cell constitutive NO synthase activity is involved in the abnormal insulin response to arginine in a new rat model of type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;219(1-2):77-82.
217. Roche E, Jones J, Arribas MI, Leon-Quinto T, Soria B. Role of small bioorganic molecules in stem cell differentiation to insulin-producing cells. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(19):6466-74.
218. Nakamura T, Terajima T, Ogata T, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, et al. Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biol Pharm*. 2006;29(6):1167-74.
219. Masiello, P., Broca, C., Gross, R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., Ribes, G. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 2, 224-9.
220. The effect of pomegranate fresh juice versus pomegranate seed powder on metabolic indices, lipid profile, inflammatory biomarkers, and the histopathology of pancreatic islets of langerhans in streptozotocin nicotinamide induced type 2 diabetic Sprague Daw. *TAHERI ROUHI, Seyedeh Zeinab, et al*.
221. Abd El Motteleb DM, Abd El Aleem DI. Renoprotective effect of Hypericum perforatum against diabetic nephropathy in rats: Insights in the underlying mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017 Apr;44(4):509-521.
222. Oelze M, et al. The sodium-glucose co-transporter 2 inhibitor empagliflozin improves diabetes-induced vascular dysfunction in the streptozotocin diabetes rat model by interfering with oxidative stress and glucotoxicity. *PLoS One*. 2014 Nov 17;9(11):e112394.
223. Liraglutide suppresses postprandial triglyceride and apolipoprotein B48 elevations after a fat-rich meal in patients with type 2 diabetes: a randomized,

- double-blind, placebo-controlled, cross-over trial. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Nov;15(11):1040-8. Hermansen K, Bækdal TA, Düring M, Pietraszek A, Mortensen LS, Jørgensen H, Flint A.
224. Hattori S. Anti-inflammatory effects of empagliflozin in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetol Metab Syndr*. 2018 Dec 18;10:93.
225. Glucagon-like peptide-1 analogue liraglutide ameliorates atherogenesis via inhibiting advanced glycation end product-induced receptor for advanced glycosylation end product expression in apolipoprotein-E deficient mice. *Mol Med Rep*. 2017 Sep;16(3):3421-3426. Li P, Tang Z, Wang L, Feng B.
226. YANG, Rui, et al. Effect of hydrogen sulfide on oxidative stress and endoplasmic reticulum stress in diabetic cardiomyopathy. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi Zhongguo yingyong shenglixue zazhi= Chinese journal of applied physiology*, 2016, 32.1: 8-12.
227. WILSON, Adam J., et al. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. *Heart*, 2018, 104.4: 293-299.
228. Ashrafi Jigheh Z, Ghorbani Haghjo A, Argani H, et al. Empagliflozin alleviates renal inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats partly by repressing HMGB1-TLR4 receptor axis. *Iran J Basic Med Sci*. 2019 Apr;22(4):384-390.
229. Briyal S, Shah S, Gulati A. Neuroprotective and anti-apoptotic effects of liraglutide in the rat brain following focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 2014 Dec 5;281:269-81.
230. Deng C, Cao J, Han J, Li J, Li Z, Shi N, He J. Liraglutide Activates the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway and Protects Brain Nerve Cells against Cerebral Ischemia in Diabetic Rats. *Comput Intell Neurosci*. 2018 Feb 12;2018:3094504.
231. Shiraki A, Oyama J, Komoda H, Asaka M, Komatsu A, Sakuma M, Kodama K, et al. The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- α -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012 Apr;221(2):375-82.
232. De Rosa, S.; Arcidiacono, B.; Chiefari, E.; Brunetti, A.; Indolfi, C.; Foti, D.P. Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. *Front. Endocrinol*. 2018, 9, 2.

233. Fuentes-Antrás J, Picatoste B, Gómez-Hernández A, Egido J, Tuñón J, Lorenzo Ó. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Res.* 2015;2015:656795. doi: 10.1155/2015/656795. Epub 2015 Apr 20. PMID: 25973429; PMCID: PMC4417999.) .

234. Gaspari T, et al. The GLP-1 receptor agonist liraglutide inhibits progression of vascular disease via effects on atherogenesis, plaque stability and endothelial function in an ApoE(-/-) mouse model. *Diab Vasc Dis Res.* 2013 Jul;10(4):353-60.



8. EKLER

1) Turnitin intihal raporu

Uzmanlık Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

% **13**
BENZERLİK ENDEKSİ

% **12**
İNTERNET KAYNAKLARI

% **4**
YAYINLAR

% **4**
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

