

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

İNSÜLİN DİRENCİ OLUŞTURULAN RATLARDA
METFORMİN VE SAKSAGLİPTİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ

Dr. Halil DEMİRKAN

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI BİLİM DALI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU
2014-İSPARTA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**İNSÜLİN DİRENCİ OLUŞTURULAN RATLARDA
METFORMİN VE SAKSAGLİPTİNİN ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Dr. Halil DEMİRKAN

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI BİLİM DALI
YAN DAL UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Banu Kale KÖROĞLU
2014–ISPARTA**

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 4044-TU2-14 proje numarasıyla
desteklenmiştir.**

TEŞEKKÜR

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince ve tez çalışmamda bana desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. M. Numan Tamer'e, pozitif enerjisiyle bizlere çok rahat bir çalışma ortamı sağlayan tez danışmanım sayın Doç. Dr. Banu Kale Köroğlu'na, tezimin başlangıç aşamasından bitiş aşamasına kadar büyük fedakarlıklar göstererek tezimin hazırlanmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Mustafa Saygın, Yrd. Doç. Dr. Halil Aşçı ve Prof. Dr. Özlem Özmen'e teşekkür ederim.

Ayrıca bölüm hocalarım Prof. Dr. M. Tuğrul Sezer, Prof. Dr. Mehmet Şahin, Prof. Dr. M. Cem Koçkar, Doç. Dr. Altuğ Şenol, Doç. Dr. Zeynep Dilek Aydın, Yrd. Doç. Dr. Güçhan Alanoğlu, Yrd. Doç. Dr. Murat Koçer, Yrd. Doç. Dr. Salih İnal, Yrd. Doç. Dr. Oğuzhan Aksu, Uz. Dr. Bünyamin Aydın, Uz. Dr. Sadık Gümüş ve tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürü bir borç olarak görüyorum.

Projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine ve SDÜ Deney Hayvanları Laboratuvarı çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan, hayatımın vazgeçilmezi, sevgili eşim ve hayat arkadaşım Tuğba Demirkan'a ve biricik kızım Edanur Elisa Demirkan'a en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Halil DEMİRKAN

2014 – ISPARTA

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
TABLolar	VIII
RESİMLER	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İnsulin Direnci	2
2.1.1. Tanım.....	2
2.1.2. Epidemiyoloji	2
2.1.3. Patogenez.....	3
2.1.4. Klinik Bulgular.....	5
2.1.5. Tanı.....	6
2.1.6. Tedavi.....	6
2.2. Glukagon ve sirtuinler.....	6
2.2.1. Glukagon.....	6
2.2.2. Sirtuinler.....	7
2.3. Metformin ve saksagliptin.....	8
2.3.1. Metformin.....	8
2.3.2. Saksagliptin.....	8
2.4. Oksidatif Stres, antioksidanlar ve insülin direnci ile ilişkisi.....	9
2.4.1. Oksidatif Stres.....	9
2.4.2. Antioksidanlar.....	9
2.4.3. İnsulin Direnci ve Oksidatif Stres.....	10
2.5. Mısır Şurubu (MŞ).....	10
2.6. Apoptozis.....	12

3. MATERİYAL VE METOD.....	14
3.1. Materyal.....	14
3.1.1. Deney Hayvanları ve Diyet.....	14
3.1.2. Deney-Kontrol Gruplarının Seçimi.....	14
3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	15
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	15
3.2. Metod.....	16
3.2.1. Ağırlık Değişimi.....	16
3.2.2. Sıvı Alımı Ölçümü.....	16
3.2.3. Kan Şeker Takibi.....	16
3.2.4. Deneyin sonlandırılması (Ötenazi).....	17
3.2.5. Kan ve Dokuların alınması Saklanması.....	17
3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü.....	18
3.2.7. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Ölçümü.....	18
3.2.7.1. MDA Düzeyinin Saptanması.....	18
3.2.7.2 Katalaz Aktivitesi Ölçümü.....	19
3.2.7.3 SOD Aktivitesi Ölçümü.....	19
3.2.7.4.Dokuda Protein Tayini.....	19
3.2.8. Histopatoloji Metodu.....	20
3.2.9 İmmunohistokimya Yöntemi (İHK).....	20
3.3. İstatistiksel Analiz	21

4. BULGULAR.....	22
4.1. Ağırlık Değişim Sonuçları.....	22
4.2. Sıvı Alımı Ölçümü Takip sonuçları.....	22
4.3. Biyokimyasal Parametre sonuçları.....	23
4.4 Lipit Parametreleri Sonuçları.....	24
4.5. Glukoz, İnsülin ve HOMA-IR Sonuçları	25
4.6. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Sonuçları.....	26
4.6.1. Karaciğer dokusu için oksidatif stres sonuçları.....	26
4.6.2. Pankreas dokusu için oksidatif stres sonuçları.....	27
4.6.3 Kas dokusu için oksidatif stres sonuçları.....	28
4.7. Histopatolojik Analiz Sonuçları.....	29
4.8.İmmunhistokimyasal Bulgular.....	30
4.8.1. İnsulin İHK boyama skorların sonuçları.....	30
4.8.2. Glukagon İHK boyama skorların sonuçları.....	30
4.8.3. Aktif Caspase-3 İHK boyama skorların sonuçları.....	31
4.8.4. Sirtuin -1 İHK boyama skorların sonuçları.....	32
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ	52
ÖZET.....	53
ANAHTAR KELİMELER	53
SUMMARY.....	54
KEY WORDS.....	54
KAYNAKLAR.....	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABD:	Amerika Birleşik Devletleri
AST:	Aspartat Amino Transferaz
CAS:	Caspase (aktif)
DM:	Diyabetes Mellitus
DNA:	Deoksinukleik asit
DPP-4:	Dipeptil Peptidaz 4
EDTA:	Ethylenediaminetetraacetic Acid
ELISA:	Enzyme Linked İmmunoabsorbant Assay
F 55:	Fruktoz %55
GLP-1:	Glukagon Like Peptit-1
GLUT:	Glukoz Transporter Molekülleri
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HbA1c:	Hemoglobin A1c
HDL:	High Dansity Lipoprotein
HOMA-IR:	Homeostosis Model Asesment- İnsulin Resistance
İHK:	İmmunhistokimyasal
İRS:	İnsulin Reseptör Substrat
İVGTT:	İntravenoz Glukoz Tolerans Testi
KAT:	Katalaz
LDL:	Low Dansity Lipoprotein
MDA:	Malonildialdehit
PBS:	Fosfat Buffer Solusyon
QUICKI:	Quantative İnsulin Sensitivity Check index
RNA:	Ribonukleik asit
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
SIRT-1:	Sirtuin-1
SOD:	Superoksid Dismutaz
TBA:	Tiobarbiturik asit
TEP:	Tetraethoxypropane
YFMŞ:	Yüksek Fruktozlu Mısır Şurubu

TABLÖLAR

Tablo 1. Deney grupları ve deney planı.....	14
Tablo 2. Gruplara göre ortalama rat ağırlık değişimi.....	22
Tablo 3: Gruplara göre ortalama günlük rat başı sıvı tüketimi.....	22
Tablo 4. Biyokimyasal parametre sonuçları.....	23
Tablo 5. Lipit parametreleri sonuçları.....	24
Tablo 6. Glukoz, İnsülin ve HOMA-IR Sonuçları.....	25
Tablo 7. Karaciğer dokusu için oksidatif stres parametreleri.....	26
Tablo 8. Pankreas dokusu için oksidatif stres parametreleri.....	27
Tablo 9. Kas dokusu için oksidatif stres parametreleri.....	28
Tablo 10. İnsulin İHK boyama skorların istatistik sonuçları.....	30
Tablo 11. Glukagon İHK boyama skorların istatistik sonuçları.....	30
Tablo 12. Aktif Caspase-3 İHK boyama skorların istatistik sonuçları.....	31
Tablo 13. Sirtuin-1 İHK boyama skorların istatistik sonuçları.....	32

RESİMLER

Resim 1. Pankreasların histopatolojik görünümü.....	33
Resim 2. Karaciğerlerin histopatolojik görünümü.....	34
Resim 3. Böbreklerin histopatolojik görünümü	35
Resim 4. Kasların histopatolojik görünümü.....	36
Resim 5. Pankreasların anti-insülin antikoru ile İHK boyamaları.....	37
Resim 6. Pankreasların anti-glukagon antikoru ile İHK boyamaları	38
Resim 7. Pankreasların apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları.....	39
Resim 8. Karaciğerlerin apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları.....	40
Resim 9. Böbreklerin apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları.....	41
Resim 10. Kasların apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları	42
Resim 11. Pankreasların sirtuin-1 immunoreaktiviteleri.....	43
Resim 12. Karaciğerlerin sirtuin-1 immunoreaktiviteleri.....	44
Resim 13. Böbreklerin sirtuin-1 immunoreaktiviteleri.....	45

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde giderek artan obeziteye ve beraberinde insülin direncine, tüketimi gün geçtikçe artan fruktozun neden olabileceği ileri sürülmektedir. Fruktoz monosakkarit olarak pek çok sebze ve meyve içinde bulunduğu gibi, bir disakkarit olan sükroz içinde glikoz ile birlikte bulunmaktadır.

Günümüzde piyasada sıklıkla kullanılan yüksek fruktoz içeren mısır şurubu (YFMS) %55 fruktoz, %45 glikoz ve %3 glikoz polimerleri içermektedir (YFMS-55). Şekerli içecekler ve hazır gıdalar içinde yüksek fruktoz içeren mısır şurubu son 30 yılda sükrozun yerine ana tatlandırıcı olarak öne çıkmıştır. Halen Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) günlük toplam kalori alımının yaklaşık %10'unu yüksek fruktoz içeren mısır şurubu kaynaklı fruktoz oluşturmaktadır (1).

Deney hayvanlarında, yüksek fruktoz alımının insülin rezistansı, hipertrigliseridemi, hepatik steatozis ve hipertansiyona neden olduğu gösterilmiştir. İnsanlarda fruktoz ile tatlandırılmış içecek tüketiminin postprandiyal trigliserid düzeyini artırdığı ve insülin duyarlılığını azalttığı, fakat bu etkilerin glikozlu içecek tüketenlerde oluşmadığı saptanmıştır (2). Deney hayvanlarında metabolik sendrom oluşturmak üzere kullanılan şeker genellikle saf fruktoz şeklindedir. Fakat, insan diyetinde saf fruktoz tatlandırıcı olarak kullanılmamaktadır. Hazır gıdalar içinde en fazla kullanılan şekerlerden sükroz bir disakkarit olup bir molekül glikoz ve bir molekül fruktozdan oluşmaktadır. Son zamanlarda sükrozun yerini alan mısır şurubu içinde ise monosakkarit olarak glikoz ve fruktoz yan yana bulunmaktadır.

Mısır şurubunun deney hayvanları ve insanlar üzerinde biyolojik etkileri yeterince araştırılmamıştır. Biz bu deneysel çalışmada, Dipeptil Peptidaz (DPP-4) inhibitörü olan saksagliptinin insülin direnci üzerindeki etkisini metforminle ve tedavisiz grup ile karşılaştırılmayı planladık. Bu etkiler incelenirken insülin ve glukagon ile birlikte sirtuin 1 ve cappaz-3 ile apoptozis değerlendirilerek tedavilerin bu reseptörler üzerindeki etkisi araştırılacaktır. Ayrıca metformin ile saksagliptinin yüksek fruktozlu mısır şurubu verilen ve oksidatif stres oluşması beklenen ratlarda bu ilaçların oksidatif stres üzerindeki etkileri incelenecektir

Sonuç olarak insulın direncinin fizyopatolojisine yönelik önemli bulgular aydınlatılacak olup bazı tedavilerin bu bulgular üzerinde etkileri incelenecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsulin Direnci

2.1.1. Tanım

İnsülin direnci eksojen ya da endojen insüline karşı bozulmuş biyolojik yanıt olarak tanımlanır. Bu tanımlama insüline karşı biyolojik yanıt olarak, insülinin metabolik etkileri yanında (karbohidrat, protein, lipid metabolizması ile ilgili) mitojenik etkilerini (büyüme, farklılaşma, Deoksinükleik asit [DNA] sentezi, gen transkripsiyonunun düzenlenmesi üzerine olan etkileri) de kapsamaktadır. İnsüline karşı in vivo biyolojik yanıtlar, insülinin konsantrasyonuna, insülin salınım hızına ve dolaşımda kalış süresine bağlı olarak değişkenlik gösterir. İnsülinin biyolojik etkisini gösterebilmesi için, pankreas beta hücresinden sekrete edilmelidir. Portal yolla sistemik dolaşıma katılması, dolaşımdan interstisyuma geçmesi ve hedef dokulara ulaşarak bu dokuların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanması gerekmektedir. Reseptöre bağlanan insülin hücre içine girerek hormonun etkisini gerçekleştirecek bir seri post reseptör olayı başlatır. Bu basamakların birinde veya birkaçında gerçekleşebilecek bir aksama organizmanın insüline subnormal yanıt vermesi ile sonuçlanır (3, 4).

2.1.2. Epidemiyoloji

İnsülin direnci terimi 1922’de insülinin tedaviye girmesi ile bazı hastalarda hiperglisemiye düzeltmek için aşırı doz insülinin gerektiği durumda kullanılmaya başlanmıştır. İlk kez Himsworth ve Carr isimli araştırmacılar 1936 yılında obez diyabetiklerde eksojen insüline yetersiz glisemik yanıtla kendini gösteren bu durumu tanımlamak için insülin insensitivitesi (duyarsızlığı) terimini kullanmışlardır. Bu terim insülin direnci ile eş anlamlı kabul edilmektedir. Giderek insülin direncinin içeriği ve önemi artmıştır.

İnsülin direnci bir seri fizyolojik durumlarda (puberte, gebelik, yaşlılık, fiziksel inaktivite), metabolik hastalıklar (tip 2 diyabet, obezite, esansiyel hipertansiyon,

aterosklerotik kardiyovasküler hastalık, ovaryal disfonksiyon, dislipidemi) ve ilaç alımlarında (kortikosteroid, bazı oral kontraseptifler, diüretikler) görülen bir durumdur.

Endojen insülin direnci, normal veya artmış kan glukoz konsantrasyonu ile ilişkili artmış insülin konsantrasyonudur. Bu insülin yapı ve biyolojik aktivite olarak normaldir. Nadiren insülin gen mutasyonu görülebilir. Bu durumda oluşan insülinin biyoaktivitesi bozulmuştur, ancak immünoaktivitesi normal olarak devam eder (5).

2.1.3. Patogenez

İnsülin pankreastaki langerhans adacıklarının beta-hücreleri tarafından üretilen polipeptit yapıda 6000 dalton molekül ağırlığında bir hormondur. İnsülin molekülü 2 aminoasit zincirinden oluşmaktadır. Zincirler birbirlerine iki disülfür köprüsüyle ile bağlanmıştır. Bu hücreler pankreas kitlesinin yaklaşık %1'ini oluştururlar. İnsülin, dokular tarafından yakıtların kullanımını düzenleyen en önemli hormonlardan biridir. Metabolik etkileri anaboliktir, ör: glikojen, triaçilgliserol ve protein sentezini desteklemektedir (6).

İnsülin sentezinin basamakları sırasıyla şöyledir:

- 1) Nükleusta insülin kodlayan genlerden mRNA transkripsiyonu olur.
- 2) mRNA sitoplazmaya gelir ve kaba endoplazmik retikulumla bağlı polizom ile translasyona uğrar.
- 3) Polipeptit sentezi, N-Terminal sinyal polipeptidi oluşumuyla başlatılır ve kaba endoplazmik retikulum membranı içine penetre olur.
- 4) Polipeptit zinciri, kaba endoplazmik retikulum lümeni içine doğru uzar, sonucta preproinsulin oluşur.
- 5) Sinyal peptidi ayrılır ve sisternada proinsulin oluşur.
- 6) Proinsulin kaba endoplazmik retikulumdan golgi kompleksine taşınır, orada proteazların etkisiyle c-peptit segmentini kaybederek insüline dönüşür. Dönüşüm golgi aparatından kopma sonucu oluşan insulin depo veziküllerinde devam eder.
- 7) İnsülin parsiyel ekzositozla salgılanırken onunla birlikte ekimolar miktarda C peptit de salgılanır (6).

İnsülin direnci, insülin üretiminden reseptörlerine bağlanmasına ve daha sonra postreseptör olaylara kadar herhangi bir aşamada görülebilir (7).

İnsülin direncinin sebepleri;

1) Beta hücrelerinden anormal yapı ve fonksiyonda hormon üretimi:

- a) Anormal insülin molekülü(8).
- b) Proinsülin insülin dönüşüm bozukluğu (ör:ailesel hiperproinsulinemi)

2) İnsülin antagonistleri:

- a) Kontregulator hormon seviyelerinde artış; growth hormon, kortizol, glukagon, katekolaminler.
- b) Sitokinler: TNF alfa'nın obezite ve diabetes mellitusta görülen insülin direncinde rol aldığı düşünülmekte(9, 10).
- c) Serbest yağ asitleri: Periferik insülin kullanımını bozar ve obezite, Tip2 diabetes mellitus'ta hepatik insülin duyarsızlığını arttırırlar.
- d) Anti-insulin antikorları: Devamlı insülin tedavisi alan hastalarda görülür (11).
- e) Anti-insulin reseptör antikorları: Dolaşımdaki antikorlar insülin reseptörlerine bağlanarak etkilerini bloke ederler; Ya da nadiren etkisini taklit ederek hipoglisemiye neden olurlar (12, 13).

3) Hedef hücre defektleri:

- a) İnsülin reseptör defektleri
- b) Post-reseptör defektleri: Kinaz aktivitesi gibi insülinin transmembranöz sinyal fonksiyonundaki anormallikleri kapsar. Bu defekt insülin düzeyi arttırılarak düzeltilemez(14, 15).
- c) İnsülin reseptör fonksiyonlarında bozuklukların insülin direnci oluşturduğu durumlar: Obezite, tip 2 diabetes mellitus, diyabetik ketoasidoz, akromegali, glukokortikoid fazlalığı, üremi, karaciğer sirozu ve viral enfeksiyonlar(16).

2.1.4. Klinik Bulgular

İnsulin direncinin çok geniş bir klinik spektrumu vardır. Glikoz dengesi tamamen normal olabilir veya hiperglisemi görülebilir. Hatta bazı hastalarda hipoglisemi olabilir. İnsülin rezistansı cinsiyet farkı gözetmeksizin her yaşta ortaya çıkabilir. Ciddi insülin rezistansı olan bir çok hastada aşikar diyabet görülmez. Fakat çoğunda akantosis nigrikans, alopesi, otoimmün hastalık bulguları, over kaynaklı hiperandrojenizm, amenore, hirsutismus, büyüme gelişme bozuklukları, obezite, hipertrigliseridemi, lipoatrofi, lipodistrofi, psödoakromegali bulgularından en az biri bulunabilir (16).

İnsulin direnci sendromu; obezite, dislipidemi, tip2 diyabet ve hipertansiyondan oluşan bir grup hastalıktır. İnsülin direnci ve kompensatuar hiperinsülinemi ile karakterizedir. Bu hastalıklar arasında insülin direnci ile en yakın ilişkisi olan tip2 diyabettir. Diyabetik olmayan bireylerde insülin direncinin ileride gelişebilecek tip2 diyabetin önceden tahmin edilmesinde önemli bir rolü vardır. Glikozu normal düzeyde tutmak için beta hücrelerinden fazla miktarda insülin salınması birkaç dekad devam edebilir. Ancak bir süre sonra beta hücreleri yetersiz kalır ve aşikar diyabet ortaya çıkar (17).

Esansiyel hipertansiyonlu hastaların yarısından çoğunda insülin rezistansı ve hiperinsülinemi vardır. İki olay arasındaki sebep sonuç ilişkisi netlik kazanmamıştır (17).

Aterogenez ile insülin rezistansı arasındaki ilişki trombotik faktörlerle alakalı bulunmuştur. İnsülin rezistansına sahip hastalarda düşük High density lipoprotein (HDL) düzeyleri, artmış serbest yağ asidi düzeyleri ve hipertrigliseridemi mevcuttur. Obezite, insülin rezistansından kaynaklandığı gibi insülin rezistansına da sebep olabilir. Kilo kaybı insülin rezistansını azaltır (18).

2.1.5. Tanı

İnsülin rezistans sendromunun tanısı klinik şüpheyeye dayanır. Eğer hastanın birinci derece akrabalarında tip2 diyabet varsa, kendisinde gestasyonel diyabet, polikistik over sendromu, bozulmuş glikoz toleransı, obezite mevcutsa insülin direncinden şüphelenilmelidir.

İnsülin direncini değerlendirmede birçok yöntem kullanılabilir. Öglisemik insülin klemp testi altın standarttır. İntravenöz glukoz tolerans testi (IVGTT), insülin tolerans testi (ITT) kullanılabilir, ancak rutin klinik pratikte kullanımı zor testlerdir (19).

Epidemiyolojik çalışmalarda sık olarak homeostasis model assessment (HOMA-IR), insülin duyarlılık indeksleri (QUICKI, Quantitative insulin sensitivity check index) kullanılmaktadır (20). Spesifite ve sensitivite %70-85 arasındadır. Klinik pratikte sık kullanılan basit ve güvenilir testlerdir (21).

$$\text{HOMA- IR} = \left[\text{Açlık glikozu (mmol/L)} \times \text{Açlık insülini (mU/ml)} \right] / 22,5$$

2.1.6. Tedavi

İnsulin direncinin tedavisi, yaşam tarzı değişikliklerini içerir. Bunlar, egzersiz, düşük kalorili diyet ve kilo verilmesidir. Kalori kısıtlanmasından kısa bir süre sonra kilo kaybı olmasa bile insulin sensitivitesi artar (22). Metformin ve tiazolidinedion grubu ilaçlar insülin direncini azaltırlar. Fakat Amerikan diyabet Cemiyeti eğer diyabet yoksa insülin direnci için farmakoterapi önermemektedir (23).

2.2. Glukagon ve sirtuinler

2.2.1. Glukagon

İnsulin ve glukagon fizyolojik olarak antagonisttir; insülin öğünler sırasında glikozun karaciğer, kas ve yağ dokusu tarafından alınmasını sağlayarak dolaşımdan glikozu uzaklaştırırken glukagon özellikle karaciğerden glikoz oluşumunu ve dolaşıma glikoz salınmasına yol açar. Bu nedenle insülin salınımının aksine

glukagon salınımı açlık sırasında artarken yüksek glikoz düzeylerinde ise baskılanır. İnsulin ve glukagonun dengeli zıt işleyişleri kan glikoz düzeylerinin dar bir aralıkta tutulmasını sağlar.

Diyabetik bireylerde glukagon düzeylerinin uygunsuz olarak yükseldiği ve bu durumun da karaciğerden (hepatik glikoz çıkışını artırıp ve kan glikoz düzeylerini yükselterek) aşırı glikoz üretimine yol açarak diyabetteki fizyolojik bozuklukları daha da kötüleştirdiği ortaya konmuştur (24).

Glukagon böbrek ve karaciğerde sırasıyla % 30 ve % 20 olarak dolaşımdan temizlenir. Geriye kalan % 50'si, dolaşımda bulunan serin ve sistein proteaz, katepsin B ve glukagonu proteolitik fragmanlara ayıran DPP-4 gibi enzimler tarafından yıkılır.

Glukagonun diyabette yükselmesi gösterilmişken insülin direnci ya da prediyabetteki durumu bilinmemektedir. Çalışmamızda bu konuda araştırma olacaktır, ayrıca DPP-4 inhibitörünün glukagon düzeyi üzerine etkisi incelenecektir.

2.2.2. Sirtuinler

Sirtuin 1'in (SIRT 1) memeli benzeri canlılardakinin homoloğu olan SiR2 'nin, kalori kısıtlaması altındaki canlı ömrü ile ilişkili aktivitesi olan bir NAD-bağımlı bir histon deasetilazdır. Artan kanıtlar SIRT 1'in bilinen iki düzineden fazla substrat için deasetilaz etkinliği ile glikoz veya lipid metabolizmasını düzenleyip metabolik yolda insülin sinyalizasyonda doğrudan veya dolaylı katılımı yoluyla olumlu bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

SIRT1'in pankreatik β hücrelerinden glukozla bağımlı insülin salgılanmasını uyarır ve insüline duyarlı organlarda doğrudan insülin sinyal yollarını uyarır. Ayrıca, SIRT1 fazla ekspresyonu ve çeşitli SIRT1'in aktivatörlerinin obez fare modellerinde glükoz homeostaz ve insülin duyarlılığı üzerinde yararlı etkileri vardır. Bu bulgular SIRT1'in, metabolik sendrom ve diabetes mellitus gibi insülin direnci ile ilişkili hastalıkların önlenmesi için yeni bir terapötik hedef olabileceğini düşündürmektedir. Ancak doğrudan bir kanıt olasılığını kanıtlamak için insanlar üzerindeki klinik çalışmalar gereklidir (25).

2.3. Metformin ve saksagliptin

2.3.1. Metformin

Metformin, tip 2 Diyabetes Mellitusun (DM) tedavisinde kullanılan, biguanid grubu insülin duyarlandırıcı bir ilaçtır. Aslında ortaçağ zamanından beri Goat's rue, Fransız leylağı ya da İtalyan fitch olarak da bilinen *Galega officinalis*'in diyabete eşlik eden yoğun ürinasyonu düzelttiği bilinmektedir (26). Daha sonraları bitkideki aktif maddenin guanidin olduğu keşfedilmiş ve normalde oldukça toksik olan bu bileşik 1950'li yıllarda biguanid (bağlanmış halde iki guanidin halkası içerir) haline getirilerek diyabetli hastaların kullanımına sunulmuştur. Ancak bu grubun ilk temsilcileri olan fenformin ve buforminin laktik asidoz riskini arttırdıkları gösterilmiş ve bu nedenle özellikle ABD'de uzun yıllar biguanidlerin kullanımına izin verilmemiştir (27). Oysa grubun yeni temsilcisi olan metformin diğerlerinden farklı olarak daha az lipofilik olup, çok daha düşük laktik asidoz riskine sahiptir ve tüm dünyada yıllardır güvenle kullanılmaktadır (28).

İnsülin duyarlaştırıcı ilaçlar biguanidler ve tiazolidinedionlar olmak üzere başlıca iki gruptur. Bu iki grubun temel farklılıkları etki yerleridir. Metformin karaciğerin endojen glikoz üretimini azaltırken, tiazolidinedionlar primer olarak kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda etkilidir (29). Metforminin tip 2 diyabetli hastalarda antihiperglisemik etkileri yanında kilo kaybı, hiperinsülineminin azalması, lipid profilinin düzelmesi, artmış fibrinolizis ve güçlenmiş endotelial fonksiyonlar gibi başka yararlı etkileri de vardır (30).

2.3.2. Saksagliptin

Saksagliptin bir DPP4 inhibitörü olup postprandial glisemi ve hemoglobin A1c (HbA1c) seviyesinde önemli oranda düşmeye neden olur (31, 32). DPP4 aktivitesinin inhibisyonu glukagon like peptid 1 (GLP1) ve Gastrik inhibitör polipeptidin yarılanma ömrü uzatarak ve dolaşımdaki miktarını artırarak pankreas insülin salgısını uyarıp hepatik glukoz çıkışını inhibe eder ve böylelikle postprandial glukoz klirensi düzeltilmiş olur (33). DPP4'ün kronik inhibisyonu GLP-1 seviyesinin

artmasını sağlayarak metabolik kontrol sağlar, bunu hiperglisemik deneysel modellerde artmış insülin duyarlılığı ve beta hücrelerini apoptozise karşı koruma sağlayarak göstermiştir (34).

2.4. Oksidatif Stres, antioksidanlar ve insülin direnci ile ilişkisi

2.4.1. Oksidatif Stres

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (35). Çalışmamızda oksidatif stres göstergesi olarak malonildialdehit (MDA) çalışıldı

2.4.2. Anti-Oksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar ‘antioksidan savunma sistemleri’ olarak bilinirler. Antioksidan Savunma Sistemleri Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler.

Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz (KAT) ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (36).

2.4.3. İnsulin Direnci ve Oksidatif Stres

Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (37). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (38, 39).

2.5. Mısır Şurubu (MŞ)

Sükroz, bitkisel nişastada en çok bulunan disakkarit olup son derece ucuz ve kolay bir enzimatik yöntemle glukozla früktoza ayrılabilir (40, 41). Glukoz ve früktoz benzer formüle sahiptir. Fruktoz; meyve şekeri olarak da bilinir. Glukoz ile aynı enerji yüküne sahiptir (40, 42). Ancak fruktoz; glukoz gibi doyma ve tokluk hissi oluşturmaz, bunun sonucunda ise daha çok tüketilir (40, 43). En önemli fruktoz kaynağı hazır gıda üretiminde yaygın olarak kullanılan yüksek fruktozlu mısır şurubudur. Glukozun früktoza izomerizasyonu, yüksek früktozlu mısır şurubu oluşumunda önemli bir ticari aşamadır (40, 44).

Günümüzde gıda sanayisinde 3 tip YFMS kullanılmaktadır. Bunlar YFMS-42 (HFCS-42), YFMS-55 (HFCS-55) ve YFMS-90 (HFCS-90)'dır. YFMS-42, %42 oranında fruktoz, %55 oranında glikoz ve %3 başka şekerler içiren YFMS'dir. YFMS-55 de fruktoz %55, glikoz %42, diğer şekerler %3 dolayındadır. F-90 ise %90 fruktoz içermektedir. Meşrubat sanayisinde genellikle YFMS-55 kullanılmaktadır (45).

İngiltere' de kişi başına düşen ortalama şeker tüketimi 1700'lü yıllarda 1.8 kg/yıl ve 1800 yılında 8.1 kg/yıl, 1950'lerde ortalama 45 kg/yıl'a, artmıştır (46). Yüksek fruktozlu mısır şurubu, ABD'de 1970'lerin başlarında ilave bir tatlandırıcı olarak tanıtıldı. Yaygın olarak meşrubat, meyveli içecek, kurabiye ve diğer işlenmiş

yiyecekleri tatlandırmada kullanıldı. Bunun normal şekere göre raf ömrü ve maliyetle ilgili bazı avantajları vardı (46-48).

Fruktoz tüketimi; yüksek fruktozlu mısır şurubu ya da sukroz şeklinde özellikle karbonatlı içecek tatlandırıcısı olarak son 30 yılda belirgin artış göstermiştir (47, 49). Modern dünyada hızla artan çocukluk ve gençlik dönemi kronik hastalıklarında, kullanımı yaygın olan ve giderek artan mısır kaynaklı fruktozla yapılan yiyecek içecek tüketimi önemli rol oynamaktadır (46). Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalarda yüksek fruktozlu besinlerin özellikle fiziksel hareketsizlik ve tüketim fazlalığı ile birlikte, kronik hastalıkların (hipertansiyon, obezite, metabolik sendrom, böbrek hastalığı, taş) gelişiminde önemli bir rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. Bu üçlünün temelindeki sorunun ise fruktoz olabileceği özellikle belirtilmiştir (46, 50).

Yüksek miktarda fruktoz tüketimi sonucunda da; serum yağ asiti düzeyleri artar ve insüliniden bağımsız yağ depolanmasına neden olarak obeziteye (özellikle de abdominal bölgede yağlanmaya) neden olur. Hipertansiyon, obezite, metabolik sendrom gibi kronik hastalıklar için risk artar (40, 51).

Yüksek fruktozlu mısır şurubunun tercih edilme sebepleri ;

- Daha tatlı
- Nemlendirme özelliği
- Renk ve tat geliştirme
- Donma noktasına düşme
- Osmotik kararlılık
- Pek çok ürün ile kolayca karışabilme
- Yiyeceklere ve meşrubatlara uygulanan hem fiziksel hem fonksiyonel özelliklere katkı sağlama
- Glukoz ile aynı enerji yüküne sahip olma
- Glukoz gibi doyma ve tokluk hissi oluşturmaması (ikinci acıkma hissini öne çeker, daha çok tüketilir)
- Raf ömrü uzun
- Maliyeti az
- Sukrozdan daha güçlü bir tatlandırıcı (Sukroz 100 birim, fruktoz 173 birim, glukoz 74 birim tatlılığa sahip)

Klinik çalışmalar ile sükröz özellikle de fruktozun metabolik sendroma yol açabildiği gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada diyetlerine sukroz (200 g/gün) eklenen genç erkeklerin serum trigliserid düzeylerinin arttığı ve üçte birinde hiperinsülinemi geliştiği gösterilmiştir (46). Raben ve ark. yaptıkları çalışmada sukroz takviyesi ile vücut ağırlığında artma, serum TG düzeyinde ve sistolik kan basıncında yükselme saptamışlar (52). Diğer çalışmalarla da fruktoz ya da sukroz ile zenginleştirilen diyetlerle bozulmuş glukoz toleransı ve insülin rezistansı geliştiği bildirilmiştir (46, 53). Nakagawa ve ark. fruktozla beslenen sıçanlarda metabolik sendrom gelişirken aynı miktarda glukoz verilen sıçanlarda gelişmediğini saptamışlar (54).

2.6. Apoptozis

Apoptoz terimi ilk olarak 1972 de J.F.K.Kerr tarafından (55) nekrozdan (56) farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlanmıştır ve fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Eski bir yunan terimi olan apoptoz, kelime anlamı olarak yaprakların ağaçtan doğal olarak düşmesi anlamına gelmektedir. Bugün de bu terimin kullanımı uygundur ve fizyolojik nedenlerden kaynaklanan hücre ölümünü anlatır.

Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücre ölümünün ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücre ölümünün intihar programının apoptoza neden olduğu söylenebilir (56).

Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (57). Bu da demektir ki, apoptoz oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptoz oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir.

Günümüzde insanı da içeren memeliler grubunda üretkenliğin dengelenmesinde apoptozun önemli rol oynadığına dair sağlam kanıtlar vardır (58). Ayrıca birçok hastalığın genetiğinde de bu değişimler söz konusudur (59). Apoptoz tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur (60). Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptoz vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur (61). Apoptoz olayının oluşmasından daha önce hücresel replikasyon işlemi durur (DNA onarımı) eğer bu esnada DNA tamiri gerçekleşemezse apoptoz ile sonuçlanan olaylar serisi başlar. Bu sırada apoptozun başlayıp başlamaması hasarın boyutuna, hücrenin tipine ve hücrenin üretkenlik potansiyeli olan tümör geliştirme riskine bağlıdır. Apoptoz sadece intra-uterin gelişme esnasındaki organogenez ve sinaptogenez olaylarında değil, aynı zamanda farklılaşmış dokuların olgunlaşmasında da esastır. Çünkü apoptoz vücudun bütünündeki hücre sayısının sabit tutulmasını ve immün sistem faaliyetlerinin gerçekleşmesini sağlar (61). Bu son olaya örnek olarak, immün bir reaksiyonun sonucu dikkate alınacak olursa; bu noktada aktive edilmiş lenfositlerin direkt apoptoz vasıtasıyla kendi antijenlerini elimine ettikleri görülür (62).

Aktif kaspaz 3: Kaspazlar inaktif bir proenzim olarak sentezlenip apoptoz geçiren hücrelerde aktif forma dönüşür. Kaspaz 3 geniş kapsamlı olarak araştırılmış ve apoptoz için de çok önemli bir rol oynadığı işaret edilmiştir. Aktif kaspaz 3 proteolitik olarak bölünür ve diğer kaspazlar ile aynı zamanda ilgili hücrelerdeki hedefleri etkinleştirir. Kaspaz-3 aktif formlarını tanıyan afinite hem kültürlenmiş hücrelerde de doku kesitlerinde apoptotik hücre popülasyonunu belirlenmesi için yeni bir araç içerir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları ve Diyet

Çalışmaya kontrol grubunda 8 adet, diğer gruplarda 10'ar adet olmak üzere toplam 38 adet 4 grup 9-12 aylık Sprague-Dawley (250-300 g) cinsi dişi rat alındı. Bu deneysel çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurulundan 21438139-93 sayılı etik kurul onayı alınmıştır. Ratlar 21-23 C sabit ortam ısısında, %55-60 nem sağlanan, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olacak şekilde takip edildi. Yem ve sıvılar ad libitum olarak verildi. Altlıkları ve aldıkları sıvıları gūnaşırı değıştirildi. Ratlar Euro type-2 kafesler içerisinde barındırıldı.

3.1.2. Deney-Kontrol Gruplarının Seçimi

Çalışma dört gruptan oluştu. Kontrol grubunda 8 adet diğer gruplarda 10'ar adet rat alınıp randomize dağıtılarak 4 grup oluşturuldu.

Gruplar kontrol, mısır şurubu grubu, mısır şurubu + metformin ve mısır şurubu + saksagliptin olmak üzere sınıflandırıldı (Tablo 1). İkinci grup kısaca mısır şurubu, üçüncü grup metformin grubu, dördüncü grup ise saksagliptin grubu olarak bahsedilecek.

Tablo 1: Deney grupları ve deney planı

Deney Grupları	Rat Sayısı	Uygulama (0-4 hafta)	Uygulama (5-10 hafta)	Doz
I: Kontrol	8	Çeşme suyu	Çeşme suyu	(ad libitum)
II: Mısır Şurubu	10	Mısır şurubu	Mısır şurubu	F 55 %20'lık çözeltib (ad libitum)
III:Mısır şurubu + Metformin	10	Mısır şurubu	Mısır şurubu + Metformin	F 55 %20'lık çözeltib (ad libitum) + 500 mg/kg / gün gavaj
IV:Mısır şurubu + Saksagliptin	10	Mısır şurubu	Mısır şurubu + Saksagliptin	F 55 %20'lık çözeltib (ad libitum) + 10 mg/kg/gün gavaj

3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Mısır şurubu %55 (TAT nişasta /Adana)
 Saksagliptin (onglyza 28 tablet)
 Rodajlı yazı yazılabilir lam
 Polilizinli lam PATOLAB
 Lamel (24x60) 100 lük
 Lamel (24x50 mm) 100 lük
 Kapaklı ependorf tüp 1000 lik
 Lam saklama kapları (50 lık) ISOLAB 076.02.001

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Potasyum hidrojen fosfat (KH₂PO₄) sigma kodu SIGMA 04243
 Methanol (2.5 lt) sigma kodu 24229
 NaCl sigma kodu 31434
 Sirtuin-1- (Anti –SIRT1 antibody [E104] (ab32441)-Abcam
 Glukagon- (anti-Glukagon antibody [EP3070] ab92517)- Abcam
 İnsulin- (anti- insulin + Proinsulin antibody) Abcam [DC4] ab83049
 TUNNEL (in situ BrdU- Red DNA fragmentation (TUNEL Assay Kit ab66110-
 Abcam
 Cayman Rat İnsulin A05105
 2-Thiobarbituric acid SIGMA T5500 25 GR
 1.1.3.3-Tetraethoxypropane (TEP) SIGMA T9889 100 ML
 Sodium carbonate SIGMA S7795 500 GR
 Albumin from bovine serum (BSA) SIGMA 10 GR
 Ammonium sulfate SIGMA A4418 500 GR
 Sodium phosphate dibasic dihydrate SIGMA 71643
 Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA disodyum tuzu)
 E 5134 250 GR
 B-Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced tetra
 (cyclohexylammonium) salt SIGMA G5130 25 MG

Glutathione Reductase from baker's yeast SIGMA G3664 500 UNIT

Hydrogen peroxide solution % 30 SIGMA 95321 100 ML

Orto fosforik asit 04107 1 lt

Mause and RAbbit specific HRP plus (ABC) detection İHC kit (125 ml) Ab 94698 (3 paket)

DAB Substrate Kit (125 ml) Ab 64238

3.2. Metod

3.2.1 Ağırılık Değişimi

Ratların ağırılık değişimleri deney başında bir kere bakıldı sonrasında haftalık olarak bakıldı. Ağırılık ölçümü yapılırken hassas terazi kullanıldı. Ratların ağırılık ölçümü 0,1,3,5,7,9 ve 10. haftalarda tok olarak ve 2,4,6,8 haftalarda açken ölçüldü.

3.2.2. Sıvı Alımı Ölçümü

Ratlara sıvı verilirken yöntem konusunda belirtildiği gibi birinci gruba çeşme suyu diğer gruplara fruktoz şurubu verildi. İnce uçlu suluk kullanıldı. Her iki günde bir ratların sıvılarının kalan miktarı öğrenilip tüketim miktarı not edildikten sonra kalan su atılıp yerine yenisi verildi. Mısır şurubu hazırlanırken F55 (% 55 fruktoz içeren çözelti) sulandırılarak %20 oranındaki sıvı karışımı oluşturuldu. Bu karışım hazırlanırken taze günlük olarak hazırlandı. Kontrol grubundakilere sade çeşme suyu verildi.

3.2.3. Kan Şekeri Takibi

Hayvanların kan şekeri ölçümü yapılırken 4. hafta ve 10. Haftada yapılan ölçümler anestezi altındaki hayvanda direkt venöz kandan yapıldı. Diğer ölçümler olan 0, 2, 6 ve 8. haftalarda kuyruktan kan damlatılarak yapıldı. Kan şekeri ölçümü Optium Xceed kan şekeri ölçüm cihazı ve optium Freestyle stripler ile yapıldı.

3.2.4. Deneyin sonlandırılması (Ötenazi)

Çalışmaya 38 rat alındı. 4. Hafta sonunda kan alınırken anesteziye bağlı olarak mısır şurubu grubunda iki adet rat öldü. Çalışma sonuna kadar 36 rat ile devam edildi. Deney hayvanları 10 haftalık deney sonundan kan alınarak ötenazi işlemi gerçekleştirildi. Öncesinde hayvanlara intraperitoneal anestezi uygulandı. Anestezik olarak 10 mg/kg ketamin ve 80mg/kg ksilazin uygulandı. Hayvanlara anestezi uyguladıktan sonra ortalama 5 dakika beklendikten sonra orta hat kesi ile batin açıldı.

3.2.5. Kan ve Dokuların Alınması ve Saklanması

Anestezi verilip batını açılan hayvanlar öncelikle vena kava superiordaki kanın alınabilecek en çok miktarı alınarak hayvanlara ötenazi gerçekleştirildi. Sonrasında alınacak organlar olan böbrek, pankreas, karaciğer ve en son kasa ulaşarak tek parça halinde alındı. Böbrek iki tane olduğundan tam halinde diğer dokular ikiye bölünerek bir parça alüminyum folyoya sarıldı, diğer parça içinde formaldehit bulunan idrar kaplarına konuldu. Alüminyum folyoya konulan parçalar sonradan çalışılmak üzere – 81 C dolaba konuldu. Formaldehite konulan parçalar +4 C buzdolabına konuldu.

3.2.6. Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Biyokimyasal incelemeler Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda yapıldı. Biyokimyasal analizler için kan örnekleri biyokimya tüplerine alındı ve 4000 rpm'de 5 dakika santrifüj (NF 800. Türkiye) edilerek serumları porsiyonlandı. Elde edilen serumlar küçük porsiyonlar halinde eppendorf tüplere konuldu. Daha sonrasında serumlar vortekslenerek (Labinco L-46 Hollanda) biyokimyasal parametre düzeyleri ticari kit kullanılarak (Beckman Coulter, ABD) spektrometrik olarak otoanalizör cihazda ölçüldü.

İnsülin düzeyleri enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) rat spesifik (Cayman, USA) kitleri kullanılarak ölçüldü. Yıkama işlemlerinde otomatik yıkayıcı olarak Bio-tek ELX50 yıkama cihazı kullanıldı. Absorbanslar, kit kullanım kılavuzunda belirtilen 420 nm dalga boyu kullanılarak Organon Teknika Microwell System ELISA okuyucusunda spektrofotometrik olarak elde edildi. Her bir parametre için standartların optik dansite-konsantrasyon grafiği çizildi ve tüm parametreler hesaplandı.

Fosfat tamponuna alınmış olan pankreas ve karaciğer dokuları ayrı ayrı tartılarak 50mM fosfat tamponu (pH 7.4) ile 10 kat dilüe edildi. Janke&Kunkel Ultraturrax T-25 (Almanya) marka doku parçalayıcı ile ve daha sonra UW-2070 Bandeun Electronic (Almanya) marka sonikatör ile sonike edilerek homojenizasyon tamamlandı. Doku örnekleri Eppendorf 5415-R (Almanya) soğutmalı santrifüj ile 5000 devir/dk, 15 dk. santrifüj edildi ve süpernatanı alınarak eppendorf tüplere aktarıldı.

3.2.7. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Ölçümü

3.2.7.1. MDA Düzeyinin Saptanması

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan malondialdehid (MDA) ölçümü için Draper ve Hadley'in çift ısıtma yöntemi kullanılmıştır (63). Metodun prensibi TCA ile çöktürme işleminden sonra MDA-TBA (Tiobarbitürik asit) kompleksinin 532

nm'de (Shimadzu UV-1601, Almanya) verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanır. Sonuçlar nmol/gr protein olarak verilmiştir.

3.2.7.2 Katalaz Aktivitesi Ölçümü

KAT aktivitesi Aebi yöntemine göre çalışılmıştır. Yöntem, hidrojen peroksidin (H_2O_2) katalaz varlığında su ve moleküler oksijene dönüşmesi sırasında harcanan H_2O_2 'nin absorbansının 240 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (64). Böbrek dokusuna ait KAT aktivite değerleri, U/mg protein olarak verildi.

3.2.7.3 SOD Aktivitesi Ölçümü

SOD aktivitesi, Olympus AU 2700 (Japonya) marka otoanalizöre applike, Randox marka ticari kit kullanılarak spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür. Yöntemin prensibi, ksantin oksidazın katalizlediği reaksiyon sonucunda ksantinden ürik asit ve süperoksit radikali oluşumuna ve bunu takiben oluşan süperoksit radikalının de kırmızı renkli formazon bileşiği oluşturmak üzere INT (2-(4 iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5 pheniltetrazoliumchloride ile reaksiyona girmesine dayanır. SOD aktivitesi bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür (65). Karaciğer dokusuna ait SOD aktivite değerleri, U/mg protein şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.7.4. Dokuda Protein Tayini

Homojenize edilen örneklerin süpernatantlarında mikroprotein düzeyleri Bredford yöntemi ile manuel spektrofotometre ile ölçülmüştür (66). Standartların absorbans değerleri ile oluşturulan optik dansite-konsantrasyon grafiği çizildi ve tüm numuneler bu standart grafiğe göre hesaplandı. Sonuçlar mikroprotein düzeyine bölünerek dokuda enzim aktivitesi olarak verildi.

3.2.8. Histopatoloji Metodu

Formaldehid içerisinde Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilim Dalına getirilen doku örnekleri, tespitin ardından takip prosedürüne alındılar. Bu amaçla her hayvana ait doku örnekleri ayrı takip kasetlerine konuldu. Akarsu altında 1 saat yıkanan dokular doku takip cihazına takıldı ve gerekli ayarlamalar yapılarak dokuların gece boyunca düşük dereceli alkollerden yüksek dereceli alkollere (%70'den %100'e) geçirilerek sularının alınması, iki adet ksilolden geçirilerek yağının alınması ve sıcak parafine geçirilerek doku boşluklarına parafin dolması sağlandı. Ertesi gün sabah dokular parafine gömülerek blokajları sağlandı. Bloklardan 4-5 saat soğutulmanı ardından Leica 2155 rotary mikrotomda 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilen eozin ile boyanarak incelendi.

3.2.9 İmmunohistokimya Yöntemi

İmmunohistokimyasal incelemeler için parafine gömülmüş pankreas, karaciğer, böbrek ve kas dokularından kesitler alındı. Pankreas dokuları insülin, glukagon, sirtuin ve aktif Caspase-3 antiserumu kullanılarak, Karaciğer, böbrek ve kas dokuları sirtuin ve aktif Caspase-3 antiserumu kullanılarak boyandı. İmmunoperoksidaz yöntem için streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi kullanıldı. Kesitler ksilol ve dereceli alkollerden geçirilerek deparafinize ve dehidre edildi. Dokular 10 dakika süreyle fosfat buffer tampon solusyonunda (PBS) yıkandı. Daha sonra dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla %3'lük metanoldeki hidrojen peroksit ile 20 dakika muamele edildi. Dokular 2 defa 10'ar dakika süreyle PBS'de yıkandı. Takiben mikrodalga fırında sitrat buffer solusyonunda (pH 6) 700 0C de 5 dakika süreyle iki defa ile kaynatıldı. Dokular 10'ar dakika süreyle 2 defa PBS'te yıkandı. Dokularda non spesifik boyamaları önlemek amacıyla normal serumda 45 dakika süreyle tutuldu. Bu aşamadan sonra yıkama yapılmadan dokulara primer antiserumlar döküldü ve bir gece bekletildi. Daha sonra dokular aynı şekil ve süreyle PBS'te yıkandı, takiben biotin ile 30 dakika süreyle muamele edildi ve PBS'te 2 defa 10'ar dakika yıkandı. Bu işlemten sonra

dokular streptoavidin ile 30 dakika süreyle muamele edildi. Dokular aynı şekil ve süreyle yıkandı ve hazırlanmış olan DAP kromojen ile boyandı. Karşıt boyama için Harris hematoxilen kullanıldı ve lamel ile kapatılan preparatlar ışık mikroskopunda incelendi.

İmmunohistokimyasal boyamalarda doku reaksiyonu her antikor için ayrı ayrı değerlendirildi. Bu amaçla semikantitatif yöntem kullanıldı ve immunhistokimyasal boyamanın şiddeti 0-3 arasında değerlendirildi. Buna göre;

- 0: Negatif boyanma
- 1: Hafif immunopozitif reaksiyon
- 2: Orta şiddette immunopozitif reaksiyon
- 3: Şiddetli immunopozitif reaksiyonlar için kullanıldı.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Mikrofotografi için Olympus CX41 ışık mikroskobu ve Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanıldı.

3.3. İstatistiksel Analiz

Tüm gruplara ait biyokimya parametreleri, ağırlık değişimi, sıvı tüketimi MDA düzeyleri, SOD ve KAT enzim aktivitelerinin istatistiksel analizi için SPSS Ver 15.0 (SPSS Inc., Chicago, Amerika) istatistik programı kullanılmıştır. Tüm gruplar arasındaki çoklu karşılaştırma için öncelikle Kolmogorov simirnov testi ile grupların homojen dağılımı kontrol edilmiştir. Grupların homojen dağılım göstermesi sonucu, ANOVA testi PostHoc LSD, Bonferroni ve Tukey testleri ile gruplar karşılaştırılmış ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Gruplar arasında histolojik ve histomorfolojik bulguların değerlendirmesinde One-way ANOVA testi uygulanmış, gruplar arası farklar Bonnferroni-Dunn testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi. Gruplar arası karşılaştırma için mann whitney – U testi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Ağırlık Değişim Sonuçları

Haftalık olarak ölçülen ağırlık değişimlerinden önemli olan 0, 4ve 10. haftalarındaki ağırlık değişimleri Tablo 2’de verilmiştir. Dördüncü haftada bakılan ağırlıklardan kontrol ve metformin grubunun başlangıca göre düşük çıkması açlık-tokluk ölümü ile ilişkili düşünüldü. Başlangıçta ve dördüncü hafta sonunda tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Deney bitişinde mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı ağırlık artışı izlendi. Metformin ve saksagliptin alan grupta mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüklük izlendi

Tablo 2: Gruplara göre ortalama rat ağırlık değişimi

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.
0 hafta	264,88 ± 14,367		262,88 ± 14,177		264,4 ± 18,204		263,9 ± 16,809	
4. hafta	251,13 ± 20,746		264,88 ± 16,805		251,6 ± 28,179		263,2 ± 15,950	
10. hafta	263,88 ± 22,592		288,63 ± 21,427 ^a	a:0,04	266 ± 18,132 ^b	b:0,04	266,1 ± 15,772 ^b	b:0,02

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.2. Sıvı Alımı Ölçümü Takip sonuçları

Aldıkları sıvı tüketimlerine göre gruplar karşılaştırıldığında tüm deney boyunca mısır şurubu tüketen tüm gruplar kontrol grubuna göre fazla sıvı tüketti.

Tablo 3: Gruplara göre ortalama günlük rat başı sıvı tüketimi

	Kontrol	Mısır şurubu	Metformin	Saksagliptin
	Ortalama (ml)	Ortalama (ml)	Ortalama (ml)	Ortalama (ml)
0-4 hafta	50	88,75	92,25	90
4-10 hafta	50	98,75	96,50	83

4.3. Biyokimyasal Parametre sonuçları

Çalışma sonunda ratlardan alınan kanlar serumları ayrıştırılarak biyokimyasal parametreler incelendi. Bakılan kreatinin değerinde mısır şurubu alan grupta almayan kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gözlemlendi. Buna karşın mısır şurubu alırken yanında metformin ya da saksagliptin alan gruplarda sadece mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüklük gözlemlendi (Tablo 4).

Bakılan Aspartat aminotransferaz (AST) değerlerinde mısır şurubu alan grup kontrol grubuna göre anlamlı olmayan bir yükseklik gösterirken metformin alan grupta mısır şurubuna göre anlamlı olmayan saksagliptin alan grupta ise anlamlı bir düşüklük izlendi (Tablo 4).

Amilaz değerlerinde mısır şurubu alan üç grupta da kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik vardı. Metformin alan grupta mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüş vardı. Saksagliptin alan grupta metformin alan gruba göre anlamlı yükseklik vardı (Tablo 4).

Pankreatit göstergesi olandığı bir enzim olan lipaz değerlerinde kontrol grubu ile mısır şurubu ve metformin grubu arasında anlamlı fark gözlenmezken mısır şurubu ile birlikte saksagliptin alan grupta diğer üç gruba göre anlamlı yükseklik izlendi (Tablo 4).

Tablo 4: Biyokimyasal parametre sonuçları

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.
Kreatinin	0,49 ± 0,02		0,60 ± 0,12 ^a	a:0,004	0,52 ± 0,05 ^b	b:0,046	0,51 ± 0,07 ^b	b:0,019
AST	77,42 ± 10,17		88,50 ± 13,57		78,50 ± 12,98		68,12 ± 8,13 ^b	b:0,003
Amilaz	1358,16 ± 93,88		2090,83 ± 155,52 ^a	a:0,000	1731,87 ± 264,77 ^{a,b}	a:0,020 b:0,025	2035,53 ± 385,73 ^{a,c}	a:0,000 c:0,039
Lipaz	5,00 ± 3,28		6,28 ± 2,36		4,66 ± 2,54		10,57 ± 3,56 ^{a,b,c}	a:0,001 b:0,008 c:0,000

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.4 Lipit Parametreleri Sonuçları

Tüm gruplar arasında total kolesterol açısından anlamlı farklılık izlenmedi. Aynı zamanda tüm gruplar arasında LDL kolesterol açısından anlamlı farklılık izlenmedi. HDL kolesterol açısından kontrol grubu ile mısır şurubu ve metformin alan gruplar arasında anlamlı fark gözlenmezken saksagliptin alan grupta mısır şurubu ve metformin alan gruba göre anlamlı yükseklik izlendi. Trigliserid açısından mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı (iki kat) bir yükseklik varken mısır şurubuyla beraber metformin ya da saksagliptin verilen gruplarda sadece mısır şurubu alan gruplara göre anlamlı bir düşüklük izlendi (Tablo 5).

Tablo 5: Lipit parametreleri sonuçları

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.
Total kolesterol	79,60 ± 16,9		90,28 ± 9,72		85,12 ± 7,27		85,80 ± 11,2	
LDL kolesterol	19,85 ± 4,45		18,00 ± 6,81		14,42 ± 5,25		17,57 ± 4,40	
HDL kolesterol	64,00 ± 8,07		60,40 ± 0,89		59,66 ± 3,84		73,62 ± 12,64 ^{b,c}	b:0,008 c:0,002
Trigliserid	35,50 ± 7,81		72,50 ± 9,37 ^a	a:0,000	52,00 ± 10,63 ^b	b:0,008	51,28 ± 10,96 ^b	b:0,009

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.5. Glukoz, İnsülin ve HOMA-IR Sonuçları

Deney sürerken dördüncü hafta sonunda venöz kandan insulin ve deney bitişinde insulin, glukoz ve HOMA-IR değerlendirildi. Dördüncü haftada mısır şurubu alan üç grupta da kontrol grubuna göre yüksek insulin düzeyleri gözlenirken bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. 10. Hafta sonunda bakılan insulin düzeylerinde mısır şurubu ile metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gözlenirken saksagliptin grubunda bu anlamlı yükseklik saptanmadı. 10. Hafta sonunda glukoz değerlerinde sadece mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi ve metformin ile saksagliptin alan gruplarda bu yükselmenin olmadığı gözlemlendi. 10. Hafta sonunda bakılan HOMA-IR sonuçlarında mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi. Metformin alan grupta da kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlenirken saksagliptin alan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekliğin ve mısır şurubu grubuna göre istatistiksel anlamlı düşüklüğün olmadığı gözlemlendi (Tablo 6).

Tablo 6: Glukoz, İnsülin ve HOMA-IR Sonuçları

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.
4.hafta İnsülin	0,113 ± 0,108		0,282 ± 0,152		0,246 ± 0,102		0,270 ± 0,182	
10.hafta İnsülin	0,170 ± 0,066		0,357 ± 0,156 ^a	a:0,023	0,321 ± 0,101 ^a	a:0,012	0,266 ± 0,128	
10.hafta Glukoz	141,50 ± 18,07		171,00 ± 8,71 ^a	a:0,005	157,17 ± 40,167		172,67 ± 52,740	
10.hafta HOMA-IR	1,488 ± 0,617		3,771 ± 1,639 ^a	a:0,01	3,060 ± 0,030 ^a	a:0,009	2,769 ± 1,330	

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.6. Oksidatif Stres Belirteçlerinin Sonuçları

4.6.1. Karaciğer dokusu için oksidatif stres sonuçları

Oksidatif parametreler dokuların homojenize edilerek sıvılaştırılması sonrası çalışıldı. Bu organlardan karaciğerde bakılan lipid peroksidasyon ürünü Malonildialdehit (MDA) seviyeleri arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 7). Anti oksidan avtivityyi gösteren enzimlerden Katalazda (KAT) kontrol ve mısır şurubu grubu arasında anlamlı fark gözlenmezken metformin ve saksagliptin alan gruplarda kontrol ve mısır şurubu gruplarına göre anlamlı yükseklik gözlemlendi (Tablo 7). Diğer bir antioksidan olan speroksid dismutaz (SOD) enziminde kontrol, mısır şurubu ve metformin alan gruplar arasında fark gözlenmezken saksagliptin alan grupta hem kontrol grubuna göre hemde mısır şurubu alan gruba göre anlamlı yükseklik izlendi (Tablo 7).

Tablo 7: Karaciğer dokusu için oksidatif stres parametreleri

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.	(Ort ± SD)	P değ.
MDA (µmol/mg protein)	1,62 ± 0,11		1,66 ± 0,06		1,54 ± 0,05		1,57 ± 0,22	
KAT (ku/mg protein)	3,25 ± 0,88		2,80 ± 0,30		4,23 ± 0,30 ^{a,b}	a:0,006 b:0,000	4,63 ± 0,52 ^{a, b}	a:0,001 b:0,000
SOD (U/mg protein)	0,047 ± 0,003		0,048 ± 0,003		0,054 ± 0,001		0,061 ± 0,013 ^{a,b}	a:0,031 b:0,028

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.6.2. Pankreas dokusu için oksidatif stres sonuçları

Pankreasın oksidatif stres belirteçlerinden lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve antioksidan SOD çalışıldı. MDA açısından pankreasta gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 8). Antioksidan kapasiteyi gösteren enzimlerden olan SOD Mısır şurubu alan grupta diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında fark izlenmedi (Tablo 8).

Tablo 8: Pankreas dokusu için oksidatif stres parametreleri

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.
MDA (µmol/mg protein)	7,26 ± 2,88		7,78 ± 0,69		5,24 ± 2,65 ^b	b:0,033	7,74 ± 2,60	
SOD (U/mg protein)	0,111 ± 0,028		0,325 ± 0,059 ^a	a:0,000	0,138 ± 0,026 ^b	b:0,000	0,126 ± 0,030 ^b	b:0,000

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.6.3 Kas dokusu için oksidatif stres sonuçları

Kas dokusunda MDA, KAT ve SOD çalışıldı. MDA mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yüksekken metformin ve saksagliptin alan gruplarda bu yükselmenin engellendiği gözlemlendi (Tablo 9). Antioksidan aktiviteyi gösteren enzimlerden olan KAT kasta gruplar arasında anlamlı fark göstermedi (Tablo 9). Diğer bir antioksidan enzim olan SOD mısır şurubu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanırken metformin ve saksagliptin alan gruplarda mısır şurubu alan gruplara göre anlamlı düşük izlendi (Tablo 9).

Tablo 9: Kas dokusu için oksidatif stres parametreleri

	Kontrol		Mısır şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.
MDA (µmol/mg protein)	3,29 ± 0,40		4,81 ± 0,79 ^a	a:0,000	2,51 ± 0,36 ^b	b: 0,000	3,26 ± 0,21 ^b	b: 0,000
KAT (ku/mg protein)	3,04 ± 0,67		2,98 ± 0,34		3,60 ± 1,34		3,56 ± 0,43	
SOD (U/mg protein)	0,104 ± 0,016		0,191 ± 0,012 ^a	a:0,000	0,094 ± 0,002 ^b	b:0,000	0,107 ± 0,008 ^b	b:0,000

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.7. Histopatolojik Analiz Sonuçları

Karaciğer, böbrek, pankreas ve kas dokularının histopatolojik incelemelerinde dokularda hiperemi, yangısal hücre infiltrasyonu, dejenerasyon ve nekrozların bulunup bulunmadığı araştırıldı. Hiçbir dokuda yaygın nekroz ve infiltrasyon gözlenmedi ancak fruktoz verilen gruptaki karaciğer, böbrek ve pankreaslarda tek hücre nekrozları ve hiperemi dikkati çekti. Pankreaslarda sadece fruktoz grubunda Langerhans adacıklarında vakuoler dejenerasyonlar gözlenirken diğer grupların pankreasları histopatolojik olarak normaldi (Resim 1). Karaciğerlerin histopatolojik incelemesinde fruktoz grubunda vakuolizasyon gözlenirken diğer gruplar normaldi (Resim 2). Böbreklerin histopatolojik incelemesinde fruktoz grubunda şiddetli vakuolizasyonlar ve tubullerde proteinöz materyal gözlenirken ilaç uygulamalarının böbrek patolojisini önemli ölçüde düzelttiği gözlemlendi. Kontrol grubundaki hiçbir ratta patolojik bulgu saptanmadı (Resim 3). Kas örneklerinde histopatolojik incelemede hiçbir grupta patolojik bulgu gözlenmedi (Resim 4).

4.8. İmmunhistokimyasal Bulgular

4.8.1. İnsulin İHK boyama skorların sonuçları

Pankreas dokularının insülin antiserumu kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamalarında fruktoz grubunda insülin salgılayan hücrelerin sayıca belirgin şekilde azaldıkları ve boyanma şiddetinde de büyük kayıplar şekillendiği dikkati çekti. Gerek metformin ve gerekse saksagliptinin insülin sekresyonunu büyük ölçüde normale çevirdiği saptandı (Tablo 10) (Resim 5).

Tablo 10: İnsulin İHK boyama skorların istatistik sonuçları

	Kontrol		Mısır Şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.
İnsülin	2,90 $\pm$ 0,31		1,10 $\pm$ 0,56 ^a	a<0,001	2,50 $\pm$ 0,52 ^b	b<0,001	2,60 $\pm$ 0,51 ^b	b<0,001

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.8.2. Glukagon İHK boyama skorların sonuçları

Pankreas dokularının glukagon antiserumu ile yapılan immunhistokimyasal boyamasında fruktoz grubunda glukagon sentezleyen hücrelerin rölatif olarak sayıca artmış oldukları diğer gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığı dikkati çekti (Tablo 11) (Resim 6).

Tablo 11: Glukagon İHK boyama skorların istatistik sonuçları

	Kontrol		Mısır Şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.
Glukagon	1,20 $\pm$ 0,42		2,30 $\pm$ 0,48 ^a	a<0,001	1,20 $\pm$ 0,42 ^b	b<0,001	1,20 $\pm$ 0,42 ^b	b<0,001

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

4.8.3. Aktif Caspase-3 İHK boyama skorların sonuçları

Karaciğer, böbrek ve pankreasların apoptotik aktivitelerini belirlemek için aktif caspase-3 boyaması ile yapılan immunohistokimyasal incelemelerinde fruktoz uygulamasının bu organlarda apoptotik aktiviteyi arttırdığı ancak saksagliptin ve metformin uygulamalarının fruktozun bu etkisini düzelttiği dikkati çekti (Tablo 12) (Resim 7-10). Kaslarda apoptotik aktivitede herhangi bir değişiklik saptanmadı.

Tablo 12: Aktif Caspase-3 İHK boyama skorların istatistik sonuçları

	Kontrol		Mısır Şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.	(Ort ± SD)	p değ.
Pankreas Cas-3	0,50 ± 0,52		2,40 ± 0,84 ^a	a<0,001	0,20 ± 0,42 ^b	b<0,001	0,30 ± 0,48 ^b	b<0,001
Karaciğer Cas-3	0,80 ± 0,42		2,50 ± 0,70 ^a	a<0,001	0,20 ± 0,42 ^b	b<0,001	0,50 ± 0,52 ^b	b<0,001
Böbrek Cas-3	0,30 ± 0,48		2,50 ± 0,52 ^a	a<0,001	1,10 ± 0,56 ^b	b<0,001	1,20 ± 0,63 ^b	b<0,001

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre

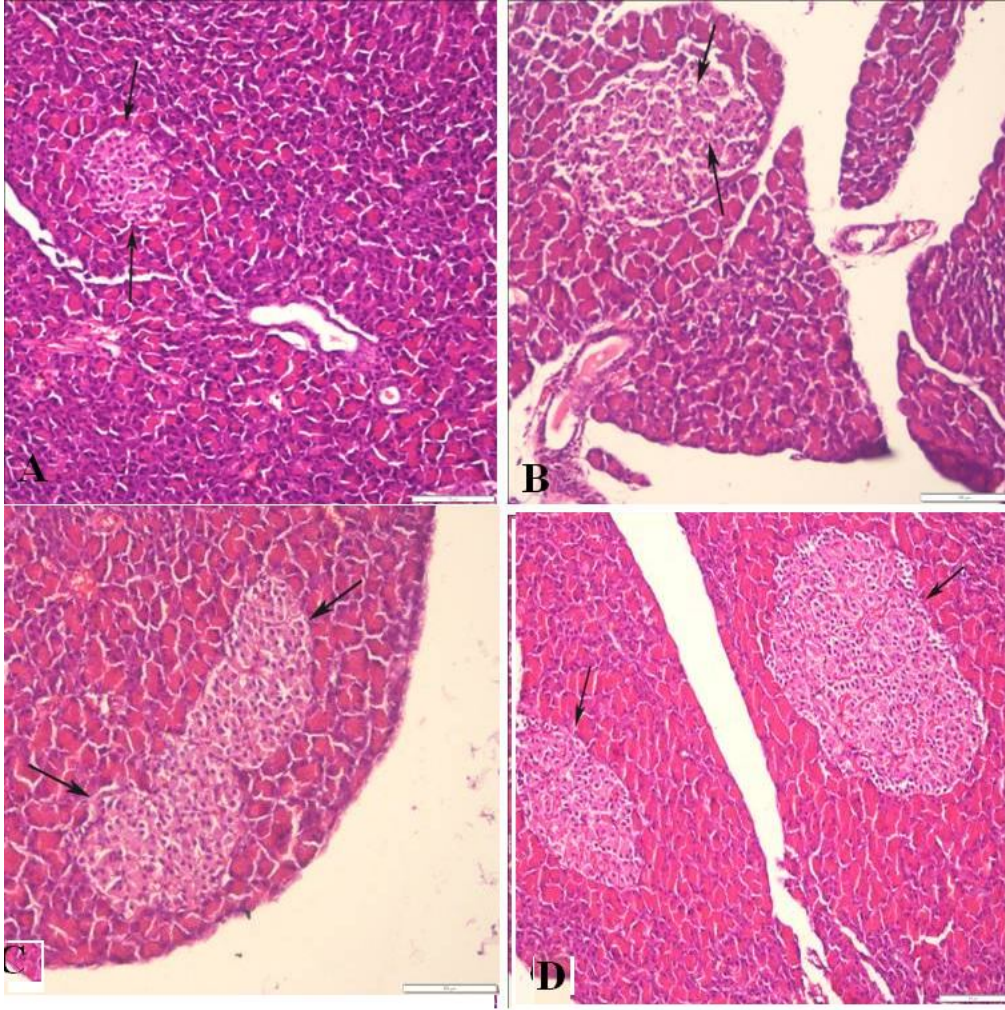
4.8.4. Sirtuin -1 İHK boyama skorların sonuçları

Pankreas, karaciğer ve böbrek dokularının sirtuin-1 ile immunohistokimyasal boyaması sonucunda sirtuin -1 aktivitesinin bütün dokularda fruktoz tarafından belirgin şekilde inhibe edildiği gözlemlendi. Saksagliptin ve metforminin fruktozun bu patolojik etkilerini önemli ölçüde düzelttiği ve sirtuin-1 aktivitesini arttırdığı saptandı (Tablo 13) (Resim 11-13).

Tablo 13: Sirtuin -1 immunohistokimyasal skorların istatistik sonuçları

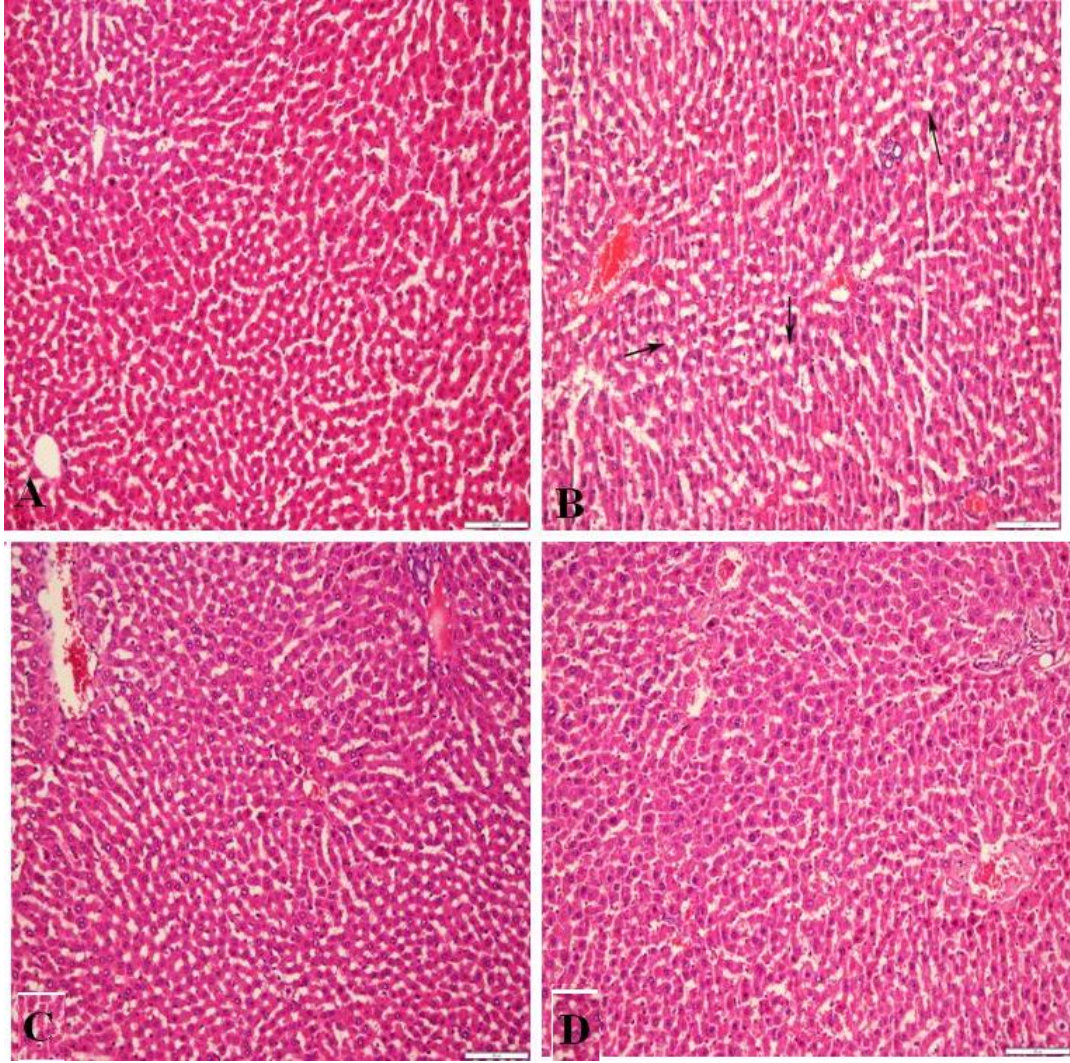
	Kontrol		Mısır Şurubu		Metformin		Saksagliptin	
	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.	(Ort $\pm$ SD)	p değ.
Pankreas sirtuin-1	2,60 $\pm$ 0,69		0,60 $\pm$ 0,69 ^a	a<0,001	2,40 $\pm$ 0,51 ^b	b<0,001	2,60 $\pm$ 0,51 ^b	b<0,001
Karaciğer sirtuin-1	2,70 $\pm$ 0,48		1,00 $\pm$ 0,81 ^a	a<0,001	2,60 $\pm$ 0,51 ^b	b<0,001	2,60 $\pm$ 0,51 ^b	b<0,001
Böbrek sirtuin-1	2,60 $\pm$ 0,51		0,60 $\pm$ 0,51 ^a	a<0,001	2,30 $\pm$ 0,67 ^b	b<0,001	2,20 $\pm$ 0,78 ^b	b<0,001

a: p<0.05 kontrol grubuna göre, b: p<0.05 MŞ grubuna göre, c: p<0.05 Metformin grubuna göre



Resim 1: Pankreasların histopatolojik görünümü;

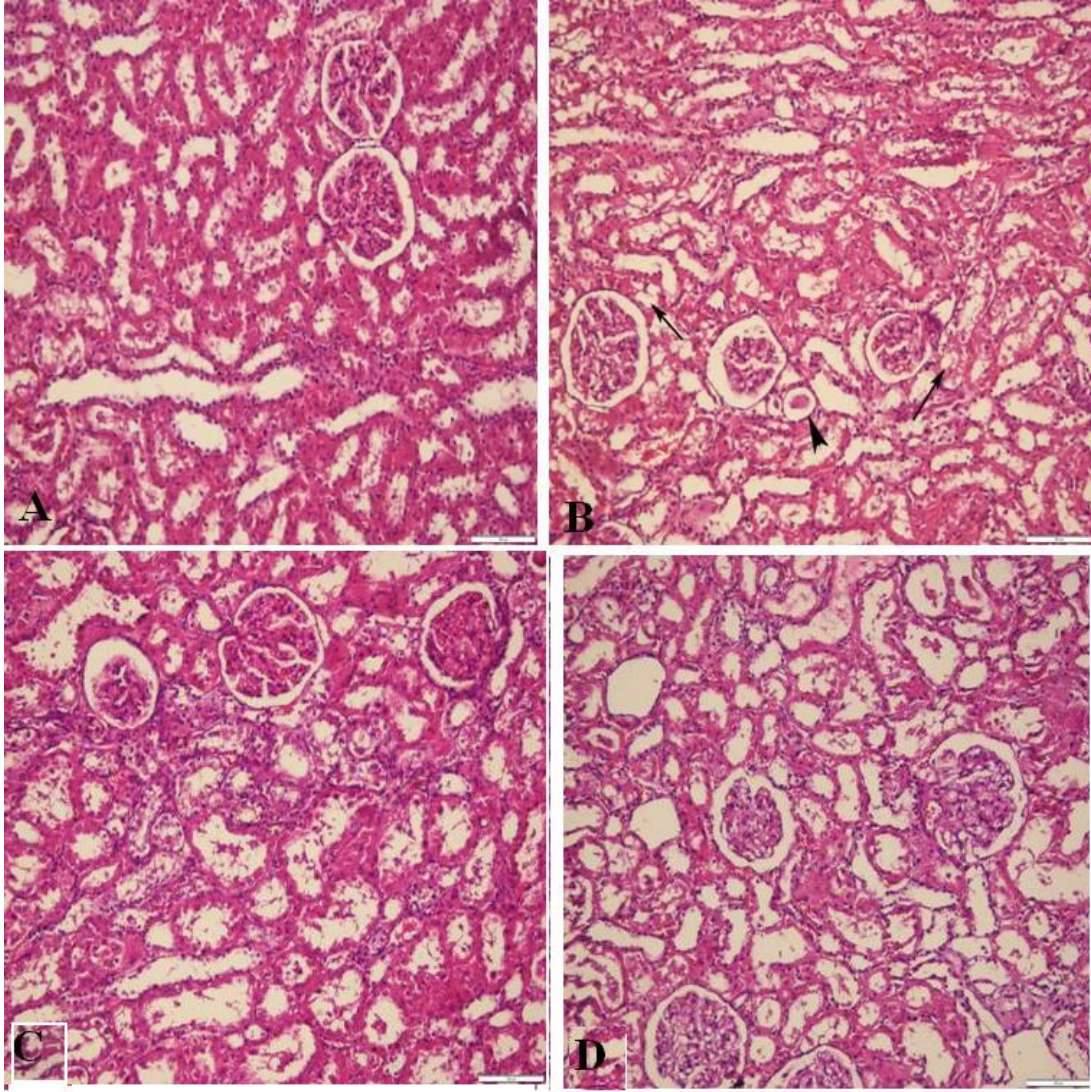
- (A) Kontrol grubunda normal görünümlü Langerhans adacığı (oklar),
 (B) Mısır şurubu grubunda vakuollerin bulunduğu (oklar) Langerhans adacığı;
 (C) Metformin grubunda normal görünümlü Langerhans adacıkları (oklar),
 (D) Saxagliptin grubunda normal görünümlü Langerhans adacıkları (oklar)
 HE, Bar= 100 µm.



Resim 2: Karaciğerlerin histopatolojik görünümü;

- (A) Kontrol grubunda normal görünümlü, karaciğer
- (B) Mısır şurubu grubunda şiddetli vakuolizasyon ve yağlanmanın bulunduğu (oklar) karaciğer
- (C) Metformin grubunda normal görünümlü karaciğer
- (D) Saxagliptin grubunda normal görünümlü karaciğer

HE, Bar= 100



Resim 3: Böbreklerin histopatolojik görünümü;

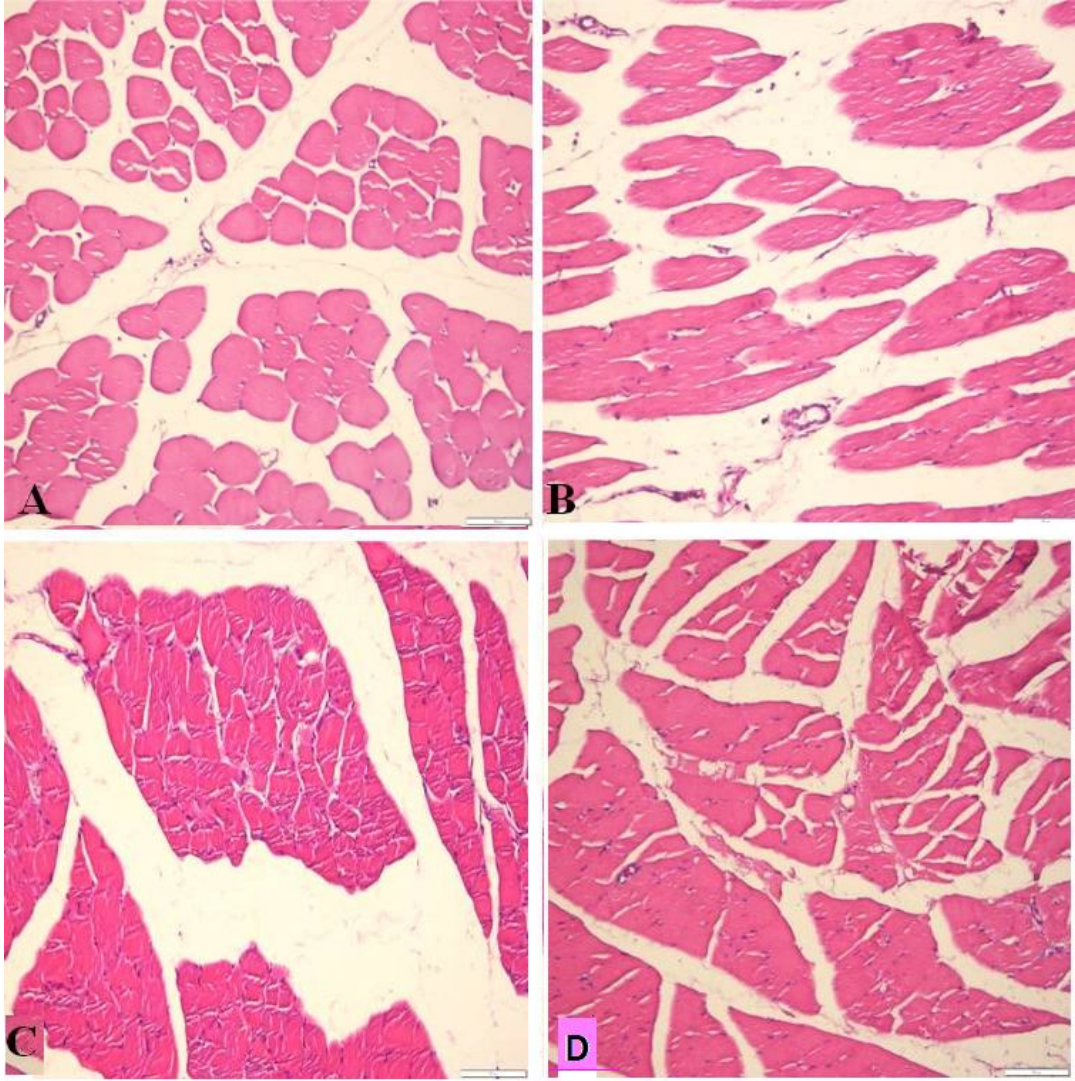
(A) Kontrol grubunda normal görünümlü, böbrek

(B) Mısır şurubu grubunda şiddetli vakuolizasyonların (oklar) ve tubullerde proteinöz materyalin bulunduğu (ok başı) böbrek

(C) Metformin grubunda lezyonları azaldığı böbreklerin görünümü

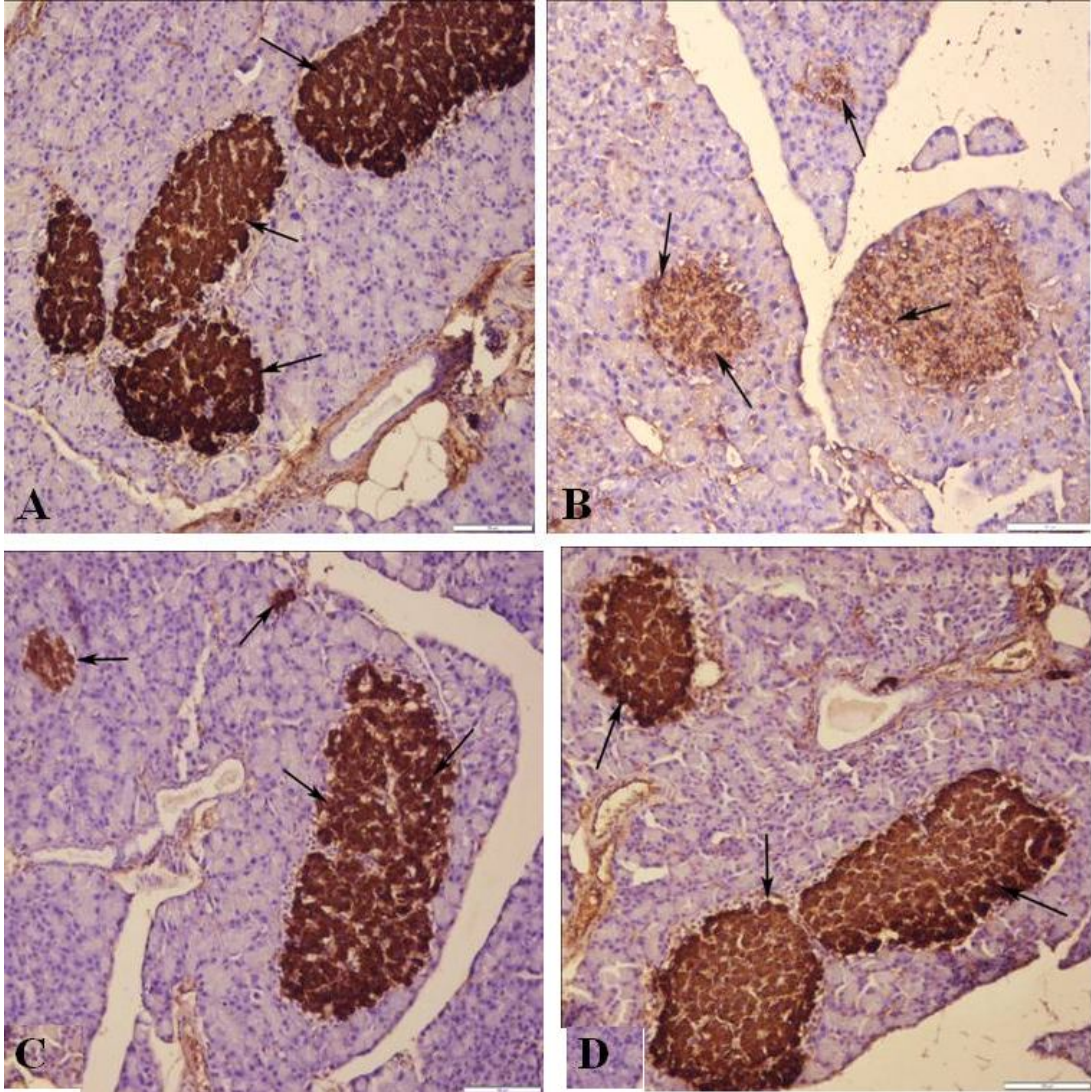
(D) Saxagliptin grubunda lezyonları azaldığı böbreklerin görünümü

HE, Bar= 100 μ m.



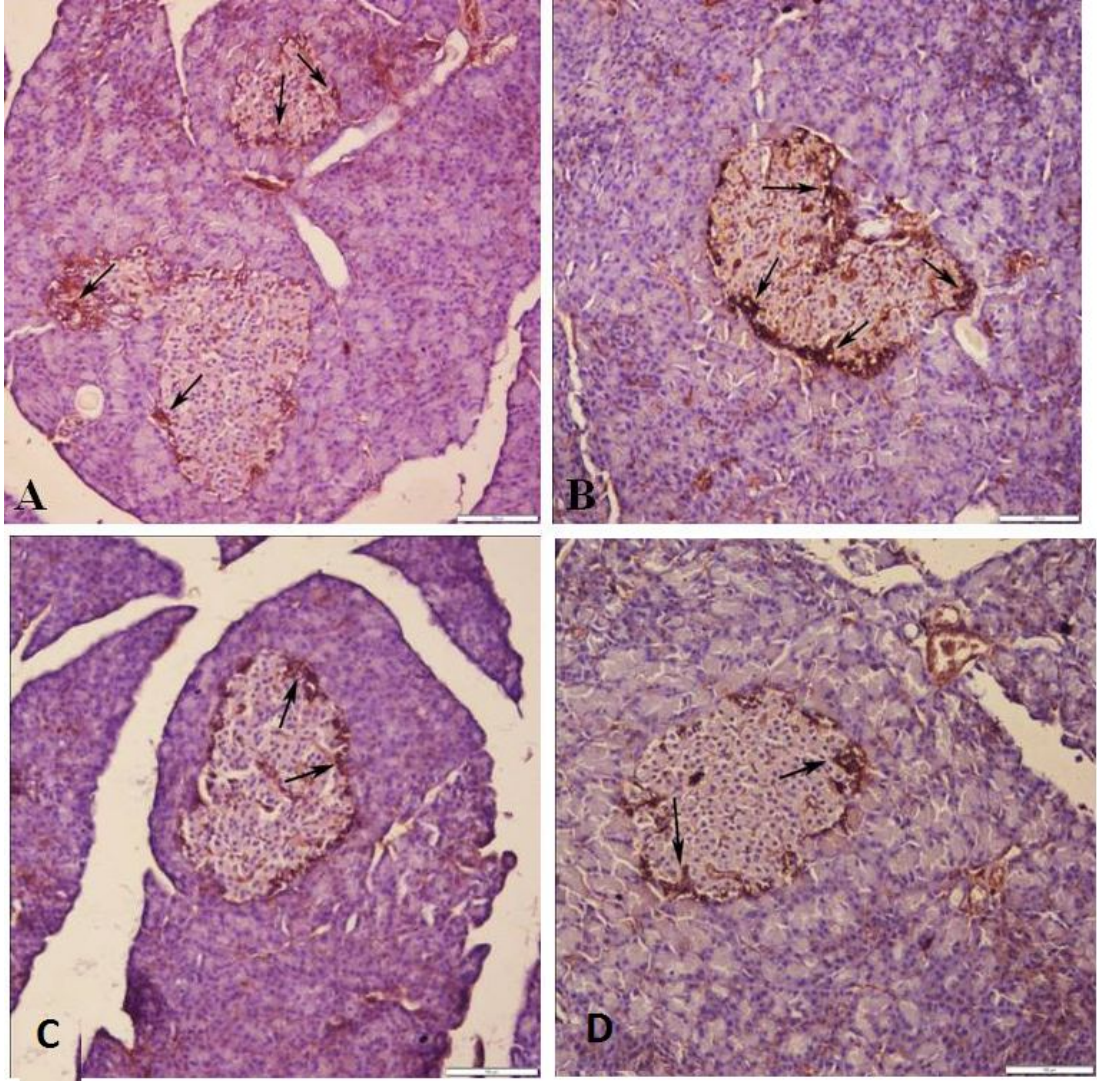
Resim 4: Kasların histopatolojik görünümü;

- (A) Kontrol grubu normal görünümlü kas dokuları
 - (B) Mısır şurubu normal görünümlü kas dokuları
 - (C) Metformin grubunda normal görünümlü kas dokuları
 - (D) Saxagliptin grubu normal görünümlü kas dokuları
- HE, Bar= 100 μ m.



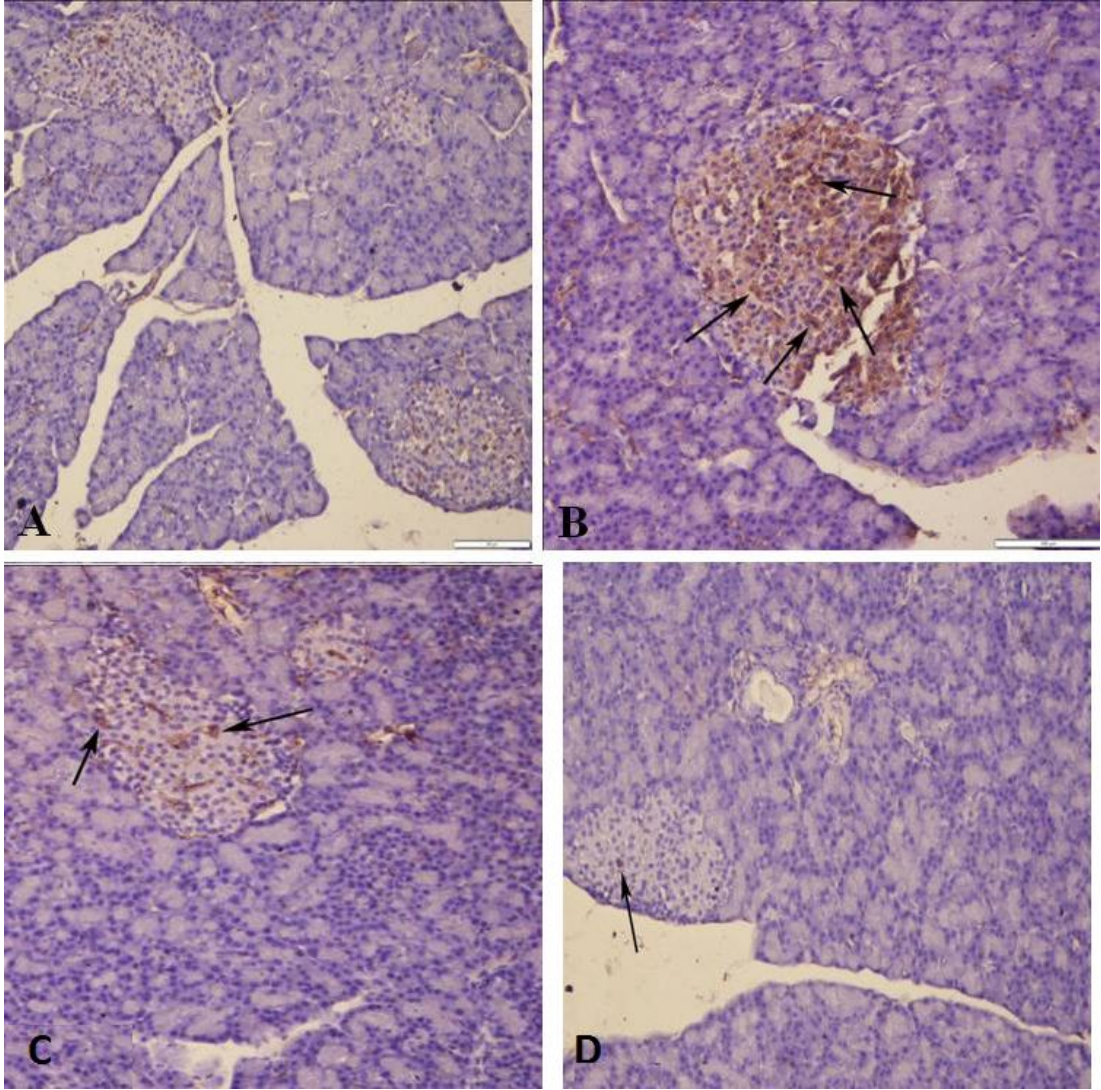
Resim 5. Pankreasların anti-insülin antikoruna ile İHK boyamaları

- (A) Kontrol grubundaki Langerhans adacıklarında şiddetli ve yoğun insülin reaksiyonu (oklar),
 (B) Mısır şurubu grubunda belirgin şekilde azalmış insülin reaksiyonu (oklar) Langerhans adacığı;
 (C) Metformin grubunda normale dönmüş insülin reaksiyonu (oklar)
 (D) Saxagliptin grubunda normale dönmüş insülin reaksiyonu (oklar)
 Streptavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 µm.



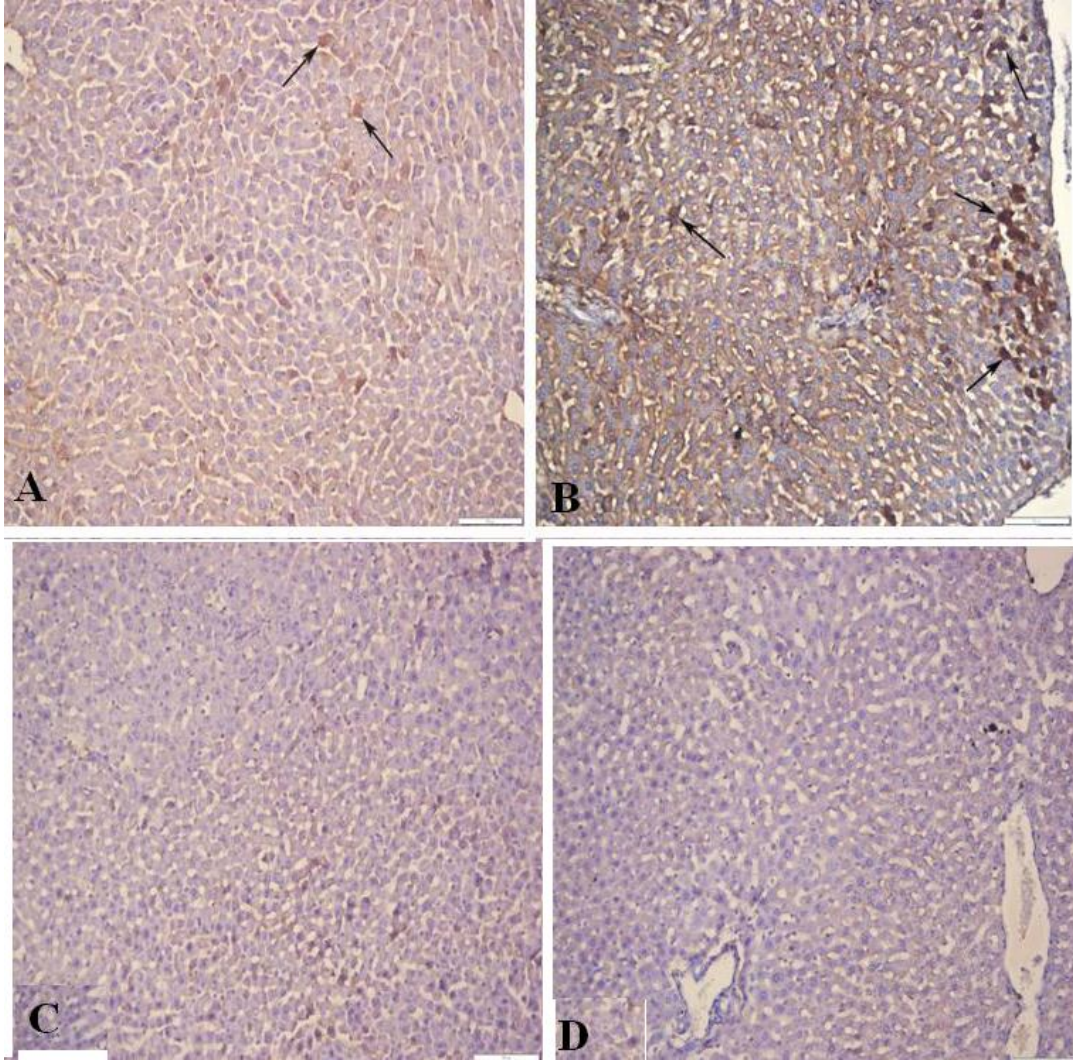
Resim 6. Pankreasların anti-glukagon antikorü ile İHK boyamaları

- (A) Kontrol grubundaki Langerhans adacıklarında periferel ve normal glukagon reaksiyonu (oklar)
- (B) Mısıır şurubu grubunda hafifçe artmış glukagon pozitif hücreler (oklar) Langerhans adacığı
- (C) Metformin grubunda normale dönmüş glukagon reaksiyonu (oklar)
- (D) Saksagliptin grubunda normale dönmüş glukagon reaksiyonu (oklar)
- Streotoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 µm.



Resim 7. Pankreasların apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları

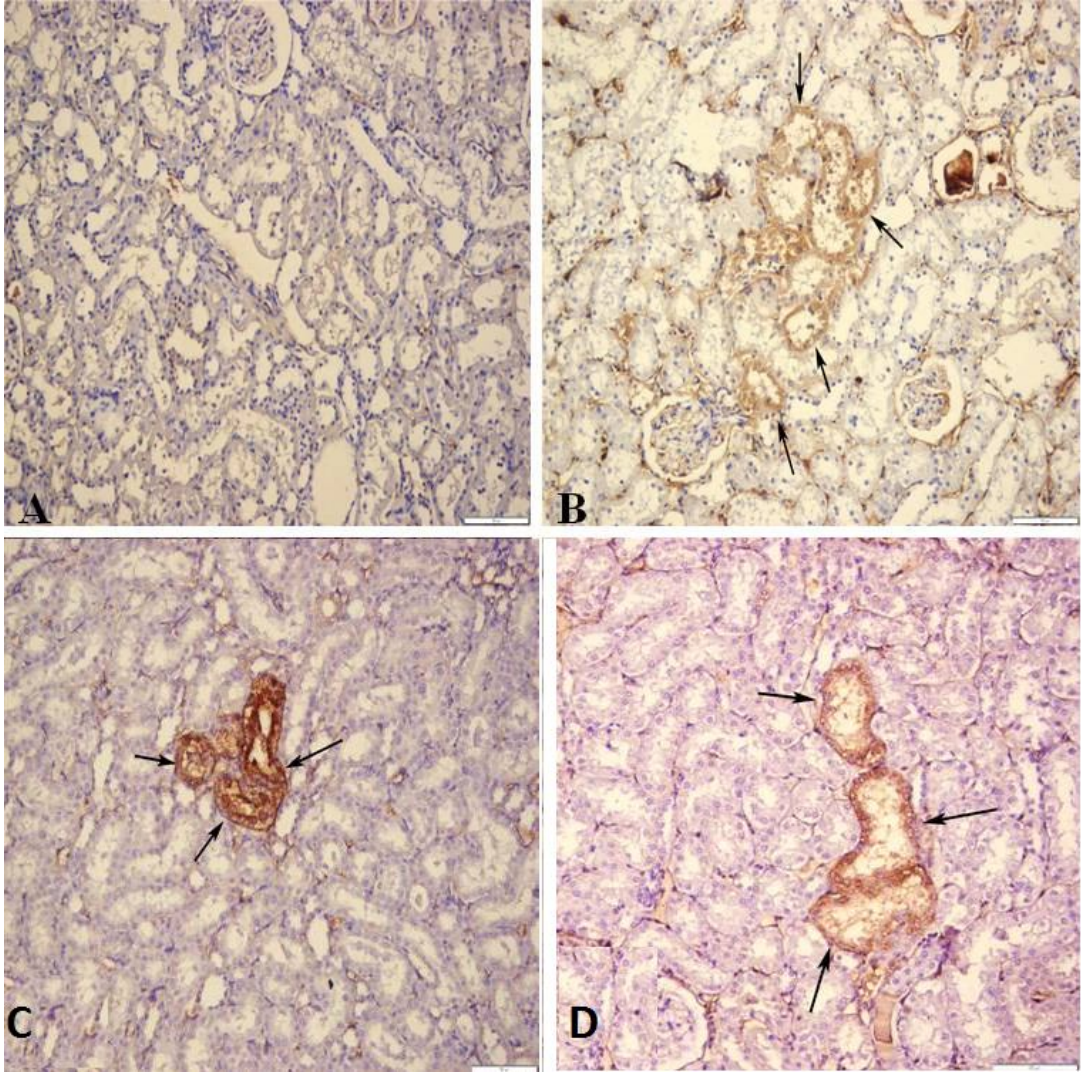
- (A) Kontrol grubundaki Langerhans adacıklarında tek tük immunpozitif hücreler
 (B) MŞ grubunda belirgin şekilde artmış aktif caspase-3 pozitif reaksiyon (oklar), Langerhans adacığı
 (C) Metformin grubunda normale dönmüş apoptotik aktivite (oklar)
 (D) Saxagliptin grubunda normale dönmüş apoptotik aktivite (oklar)
 Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 µm.



Resim 8. Karaciğerlerin apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları

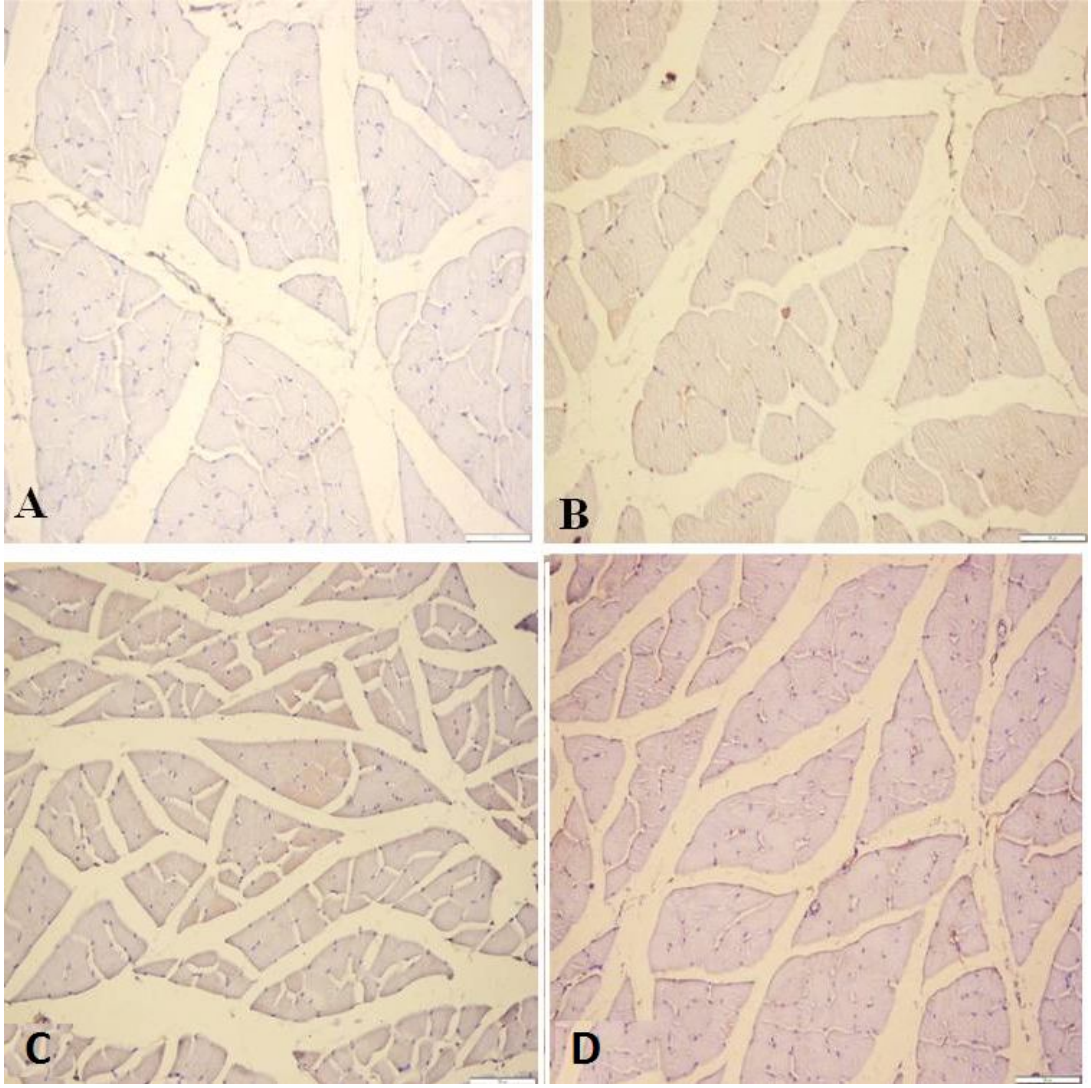
- (A) Kontrol grubundaki karaciğerde tek tük immunpozitif hücreler
- (B) Mısır şurubu grubunda belirgin şekilde artmış aktif caspase-3 pozitif reaksiyon (oklar)
- (C) Metformin grubunda normale dönmüş apoptotik aktivite
- (D) Saxagliptin grubunda normale dönmüş apoptotik aktivite (oklar)

Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 μ m.



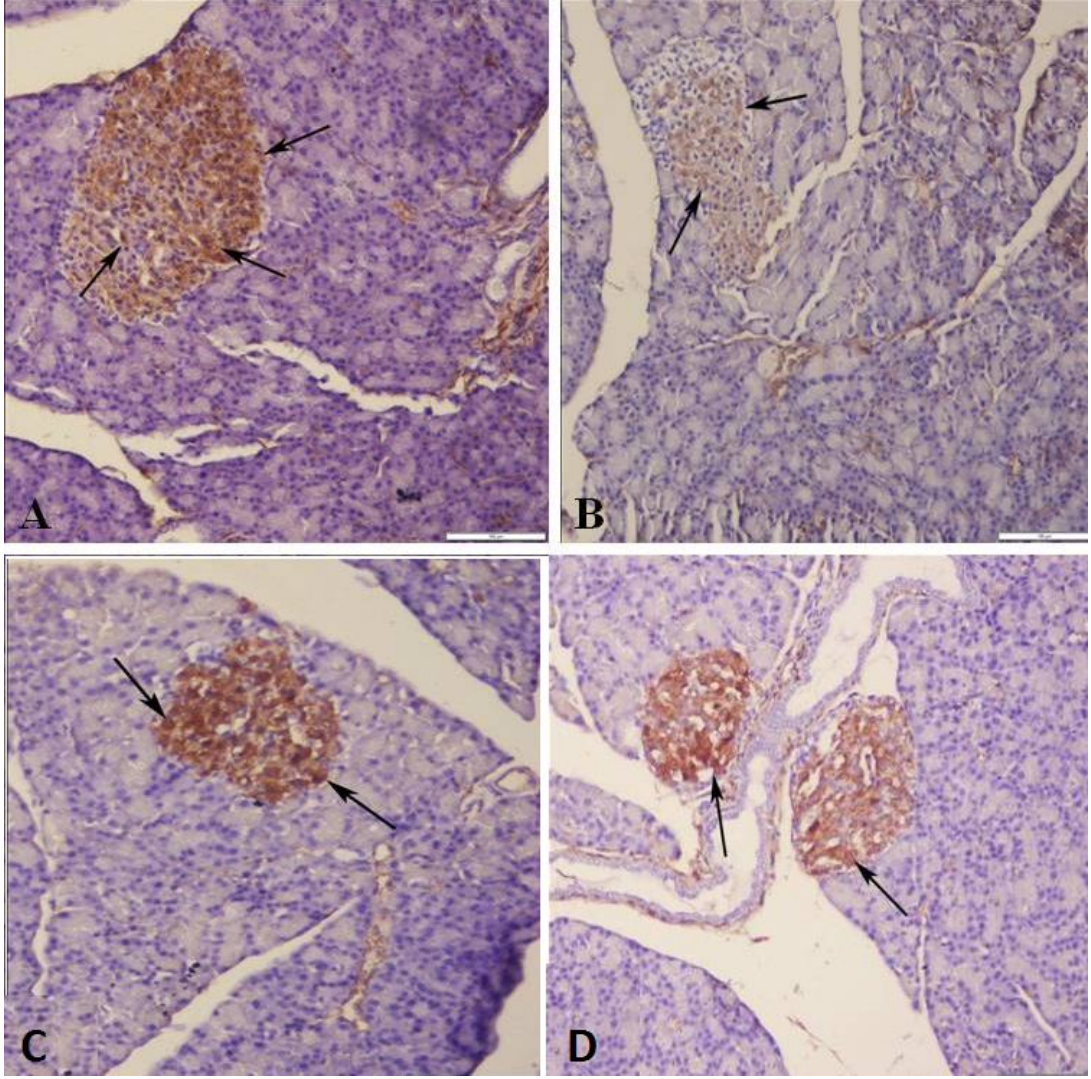
Resim 9. Böbreklerin apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları

- (A) Kontrol grubundaki çok hafif immunoreaksiyon
- (B) Mısır şurubu grubunda tubul hücrelerinde belirgin şekilde artmış aktif caspase-3 pozitif reaksiyon (oklar)
- (C) Metformin grubunda böbrek tübülllerinde azalmış apoptotik aktivite (oklar)
- (D) Saxagliptin grubunda böbrek tübülllerinde azalmış apoptotik aktivite (oklar)
- Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 μ m.



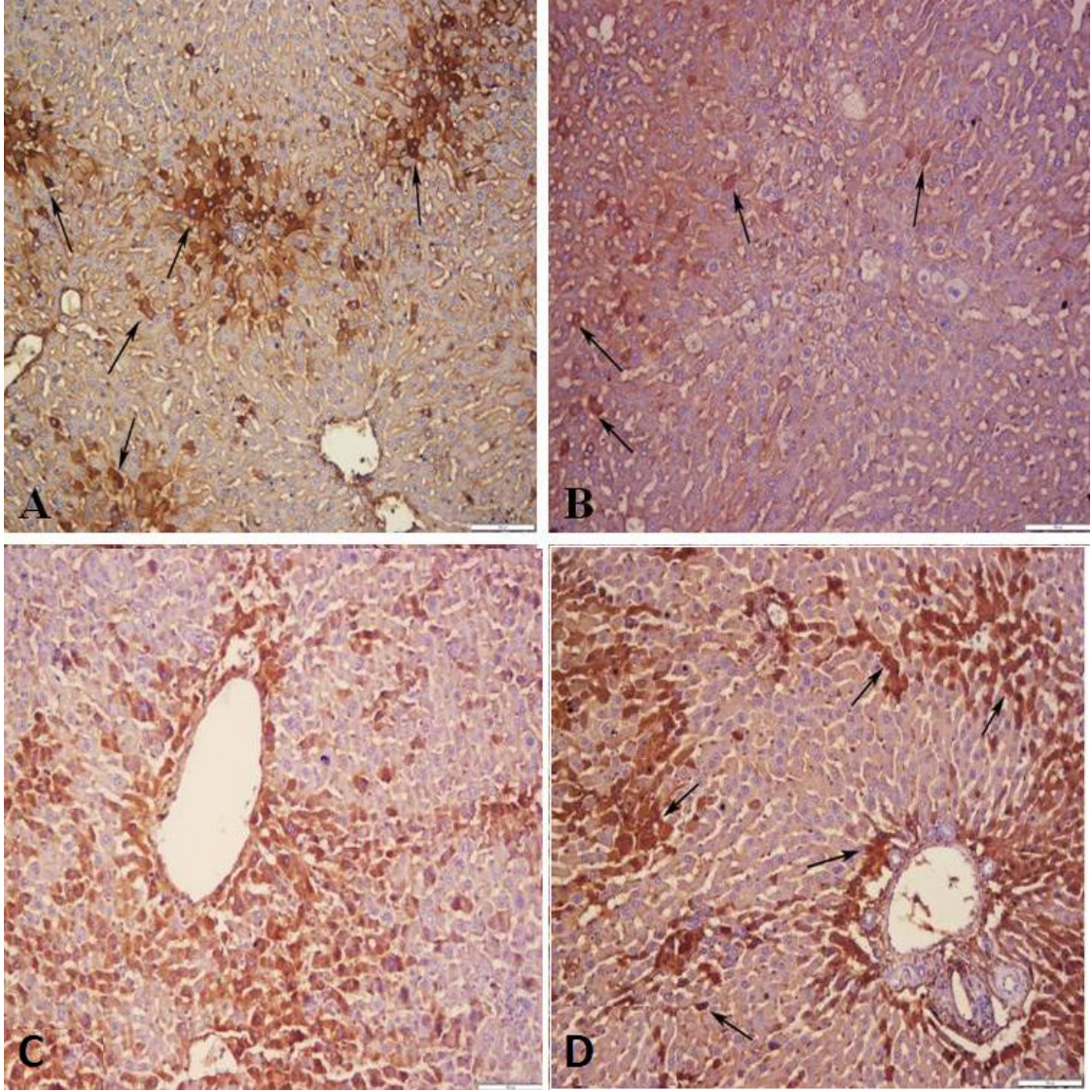
Resim 10. Kasların apoptotik aktivitelerinin İHK boyamaları

- (A) Kontrol grubu normal görünümlü kas dokuları
 - (B) Mısır şurubu grubu normal görünümlü kas dokuları
 - (C) Metformin grubunda normal görünümlü kas dokuları
 - (D) Saxagliptin grubu normal görünümlü kas dokuları
- Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 μ m.



Resim 11. Pankreasların sirtuin-1 immunoreaktiviteleri

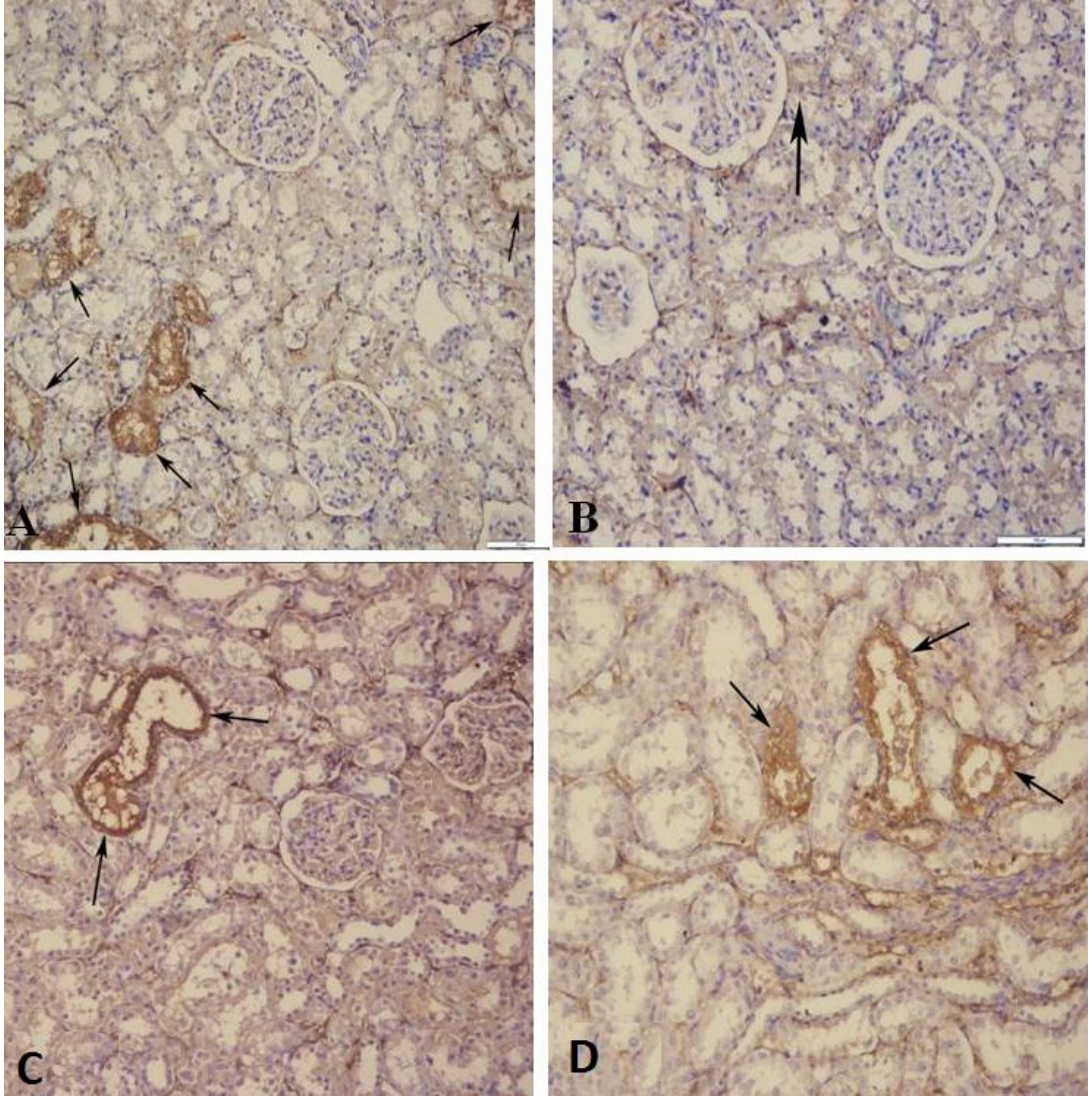
- (A) Kontrol grubundaki Langerhans adacıklarında belirgin immunopozitif reaksiyon (oklar)
 (B) MŞ grubunda önemli şekilde azalmış sirtuin-1 pozitif reaksiyon (oklar), Langerhans adacığı
 (C) Metformin grubunda normale dönmüş sirtuin-1 aktivitesi (oklar)
 (D) Saxagliptin grubunda normale dönmüş sirtuin-1 aktivitesi (oklar)
 Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 µm.



Resim 12: Karaciğerlerin sirtuin-1 immunoreaktiviteleri;

- (A) Kontrol grubundaki hepatositlerde belirgin immunopozitif reaksiyon (oklar)
- (B) Mısır şurubu grubunda önemli şekilde azalmış sirtuin-1 pozitif reaksiyon (oklar)
- (C) Metformin grubunda normale dönmüş sirtuin-1 aktivitesi
- (D) Saxagliptin grubunda normale dönmüş sirtuin-1 aktivitesi (oklar)

Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 μ m.



Resim 13: Böbreklerde sirtuin-1 immunoreaktiviteleri;

- (A) Kontrol grubundaki böbrek tubüllerinde belirgin immunopozitif reaksiyon (oklar)
- (B) Mısır şurubu grubunda önemli şekilde azalmış sirtuin-1 pozitif reaksiyon (oklar)
- (C) Metformin grubunda belirgin sirtuin-1 aktivitesi (oklar)
- (D) Saxagliptin grubunda belirgin sirtuin-1 aktivitesi (oklar)

Streptoavidin biotin peroksidaz yöntemi, Bar= 100 μ m.

5. TARTIŞMA

İnsülin rezistansı hiperinsülinemi ile birlikte insülin etkisinde bir duyarsızlaşma olarak tanımlanmaktadır (67). İnsülin direnci başta DM olmak üzere birçok hastalığının patogeneğinde rol aldığından önemi ve toplum tarafından bilinirliği gün geçtikçe artan bir kavramdır. İnsulin direncine artan ilgi nedeniyle insülin direncinin patofizyolojisini anlamaya ve yeni tedavi yaklaşımları ortaya koymaya yönelik araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Günümüzde rutin olmayan insülin direncine yönelik medikal tedavi seçeneği seçeneklerin artması ve olumlu yararlarının gösterilmesiyle gelecekte belki de rutin hale gelip tedavi kılavuzlarına girecektir.

Çalışmamızda 10 hafta boyunca mısır şurubu verilen ratlar verilmeyen kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Mısır şurubu verilenler kendi içerisinde üç gruba ayrılmış olup bir gruba mısır şurubu dışında bir şey verilmezken bir gruba metformin bir gruba saksagliptin dördüncü haftanın sonunda ilave edilerek çalışma sonuna kadar günde bir kere gavaj ile verilmiştir.

Başlangıçta ve dördüncü hafta sonunda tüm gruplar arasında ağırlık bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Dördüncü haftanın sonunda mısır şurubu alan gruplarda kontrol grubuna göre artışın olmaması sürenin kısa olması ile ilgili olabilir. Deney bitişinde mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı ağırlık artışı izlendi. Saksagliptin ve metformin alan gruplarda mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüklük izlendi. Bu sonuçlara göre mısır şurubu anlamlı ağırlık artışına neden olurken saksagliptin ve metformin bu etkiyi engellemektedir.

Metforminin tip 2 diyabetli hastalarda antihiperglisemik etkileri yanında kilo kaybı, hiperinsülineminin azalması, lipid profilinin düzelmesi, artmış fibrinolizis ve güçlenmiş endotelial fonksiyonlar gibi başka yararlı etkileri de vardır (68).

Aldıkları sıvı tüketimlerine göre gruplar karşılaştırıldığında deney boyunca tüm gruplar kontrol grubuna göre anlamlı oranda fazla tüketti. Bu fazla tüketim mısır şurubun tatlı olması ve fruktozun tokluğu uyarmaması ile ilişki olabilir. Ayrıca tokluk sağlayan ve insülinle ilişkili salgılanan leptinin salgılanmaması bu duruma

neden olabilir. Çalışmamızda ayrıca gözlemsel olarak mısır şurubu tüketen gruplarda kontrol grubuna göre yem tüketimlerinin azaldığı dikkati çekti.

Bakılan kreatinin değerlerinde mısır şurubu alan grupta almayan kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gözlemlendi. Bu etki mısır şurubunun nefrotoksik etkisinden olabilir. Buna karşın mısır şurubu alırken yanında metformin ya da saksagliptin alan gruplarda sadece mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüklük gözlemlendi. Bu etki metformin ve saksagliptinin mısır şurubunun nefrotoksik etkisini önlediği şeklinde yorumlanabilir.

Çalışmamızda karaciğer fonksiyon göstergesi olan AST ve ALT değerlerinde daha önceki çalışmaların aksine mısır şurubu alan grupta kontrol grubundan anlamlı yükseklik saptanmadı. Bu durum sürenin kısa olması ile ilişkili olabilir.

Amilaz değerlerinde diğer üç grup kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik vardı. Metformin alan grupta mısır şurubu alan gruba göre anlamlı düşüş vardı. Saksagliptin alan grupta metformin alan gruba göre anlamlı yükseklik vardı. Lipaz değerlerinde kontrol grubu ile mısır şurubu ve metformin grubu arasında anlamlı fark gözlenmezken mısır şurubu ile birlikte saksagliptin alan grupta diğer üç gruba göre anlamlı yükseklik izlendi. Beraberinde saksagliptin grubunda bakılan histolojik incelemede 10 hayvandan üçünde nötrofil infiltrasyonu izlendi. Bu sonuçlara göre mısır şurubu pankreas hasarı yapmasına rağmen direkt pankreatit etkisinin olmadığı ancak saksagliptinin daha önce de bilindiği gibi pankreatit riski olduğunu düşündürmektedir. DPP-4 inhibitörleri ilk çıktığından beri pankreatit riski sorgulanıyor. Bazı çalışmalar pankreatit riskinin artmadığını söylesede bununla ilgili vaka bildirimleri vardır (69).

Çalışmamızda gruplar arasında total kolesterol ve LDL açısından anlamlı farklılık izlenmezken HDL kolesterol açısından saksagliptin alan grupta mısır şurubu ve metformin alan gruba göre anlamlı yükseklik izlendi. Bu sonuçlara göre saksagliptin HDL yükselmesine neden olurken metforminde bu etki olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Trigliserid açısından mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı (iki kat) bir yükseklik varken mısır şurubu ile beraber metformin ya da saksagliptin verilen gruplarda sadece mısır şurubu alan gruplara göre anlamlı bir düşüş izlendi. Bu sonuçlara göre mısır şurubu hipertrigliseridemiye

neden olurken metformin ve saksagliptin bu etkiyi önlemektedir. Saksagliptinin HDL yükseltmesi ve trigliseridi düşürmesi ile ilgili yeterli bilgi yoktur.

Dördüncü hafta sonunda mısır şurubu alan üç grupta da kontrol grubuna göre yüksek insulin düzeyleri gözlenirken bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi. Bu durum süreninin kısalığı ile ilişkilidir. Zira 10. Hafta sonunda bakılan insulin düzeylerinde mısır şurubu ile metformin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik gözlenirken saksagliptin grubunda bu anlamlı yükseklik saptanmadı. 10. Hafta sonunda bakılan HOMA-IR sonuçlarında mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi. Metformin alan grupta da kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlenirken saksagliptin alan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olabilecek yükselmenin engellendiği gözlemlendi. 10. Hafta sonunda glukoz değerlerinde sadece mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükseklik izlendi ve metformin ile saksagliptin alan gruplarda bu yükselme eğilimin engellendiği gözlemlendi. Bu sonuçlara göre mısır şurubu hiperglisemi ve insulin direncine neden olurken saksagliptin hem hiperglisemiyi hem de insulin direncini engellemekte olup metforminde bu etki daha düşüktür.

Yüksek fruktoz tüketiminin hepatik ve periferik insülin direncine neden olduğuna ilişkin birçok hayvan çalışması bulunmaktadır (70-72). Ancak insanlarda fruktozun insülin duyarlılığı üzerine direkt negatif etkisi olduğuna dair net kanıt bulunmamaktadır.

Hemşire Sağlık Çalışması I ve II'nin sonuçlarına göre artmış fruktoz alımı ve artmış C-peptid konsantrasyonları arasında ilişki bulunmuştur (73). Bu ilişkiye göre, fruktoz alımı insülin direnci ve tip 2 diyabetin gelişiminde rol oynayabilir.

Janket ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 38.480 kadın sağlık personeli üzerinde tip 2 diyabet riski ile enerji içeren tatlandırıcı (sakaroz, fruktoz, glukoz ve laktoz) alımı arasındaki ilişkiyi incelemiştir (74). Bu çalışmada fruktoz, glukoz ve sakaroz tüketimi ile tip 2 diyabet gelişimi arasında bir ilişki tespit edilmemiştir.

İnsanlar üzerinde yapılan bir araştırmada enerjinin %25'inin fruktozdan karşılanması durumunda visseral yağlanma, hiperlipidemi ve insülin rezistansı geliştiği gösterilmiştir (75)

İnsülin direnci oluşturmak için hayvan deneylerinde tercih edilen yollardan birisi de yüksek konsantrasyonda fruktoz verilmesidir (76, 77). Fruktozdan zengin

bir öğün yendikten sonra insülin ve leptin düzeyinde yükselme olmazken açlık trigliserit düzeyi yükselmektedir (78).

Farklı şeker içeriklerinin metabolik fonksiyon üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 8 hafta boyunca dişi Sprague–Dawley sıçanlara içme suyu içinde %13 glikoz, fruktoz, sükroz ve yüksek fruktoz içeren mısır şurubu verilmiştir. Tatlandırılmış içecek alan hayvanların katı yem tüketiminde belirgin bir azalma olduğu bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu gözlemsel olarak izlenmiştir. Bu şekerlerden yalnız yüksek fruktoz içeren mısır şurubunda ağırlık artışı ve yağ kitlesinde artış olduğu saptanmıştır. Şekerli içeceklerle beslenmenin serum glikoz ve insülin düzeyleri ile lipit profilleri üzerinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığı gözlemlenmiştir (79).

Fruktozla yapılan bir çalışmada içme suyu içinde %30 fruktozun 4 hafta boyunca erkek Sprague–Dawley sıçanlara verilmesi sonucunda karaciğer zedelenmesi, steatozis olduğu ve karaciğer ağırlığının arttığı bildirilmiştir. Ayrıca karaciğer trigliserit düzeyi, plazma glikoz düzeyi ve insülin düzeylerinin arttığı saptanmıştır (80).

Karaciğerde bakılan lipit peroksidasyon ürünü olan MDA seviyeleri arasında anlamlı fark izlenmedi. Antioksidan avtivitéyi gösteren enzimlerden olan Katalaz kontrol ve mısır şurubu grubu arasında anlamlı fark gözlenmezken metformin ve saksagliptin alan gruplarda kontrol ve mısır şurubu gruplarına göre anlamlı yükseklik gözlemlendi. Speroksid dismutaz enziminde sadece saksagliptin alan grupta diğer gruplara göre yükseklik izlendi. Bu sonuçlara göre karaciğerde metformin sadece KAT enzimini saksagliptin ise hem KAT hem de SOD enzimini yükselterek antioksidan etki göstermektedir.

Pankreasın oksidatif stres belirteçlerinden olan lipit peroksidasyon ürünü MDA ve antioksidan enzim SOD çalışıldı. MDA açısından pankreasta gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi Antioksidan SOD mısır şurubu alan grupta diğer tüm gruplara göre anlamlı yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında fark izlenmedi. Bu sonuçlar beklenenin aksine mısır şurubu alan grupta pankreasta antioksidan bir enzim olan SOD yüksekliği ve metformin ile saksagliptin alan gruplarda bu yükselmenin engellenmesi şaşırtıcıdır.

Kas dokusunda lipit peroksidasyon ürünü olan MDA, mısır şurubu alan grupta kontrol grubuna göre anlamlı yükselmişken metformin ve saksagliptin alan gruplarda bu yükselmenin engellendiği gözlemlendi. Bu sonuçlar mısır şurubunun kaslarda oksidatif stres yaptığını metformin ve saksagliptinin bu etkiyi engellediğini göstermiştir. Antioksidan enzim olan KAT kasta gruplar arasında anlamlı fark göstermedi. Diğer bir antioksidan enzim olan SOD mısır şurubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek saptanırken metformin ve saksagliptin alan gruplarda mısır şurubu alan gruplara göre anlamlı düşük izlendi. Bu sonuçlar beklenenin tersine çıkmış olup şaşırtıcıdır.

Histopatolojik incelemede pankreaslarda sadece mısır şurubu grubunda Langerhans adacıklarında vakuoler dejenerasyonlar gözlenirken diğer grupların pankreasları histopatolojik olarak normaldi. Karaciğerlerin mikroskopik incelemesinde fruktoz grubunda vakuolizasyon gözlenirken diğer gruplar normaldi. Böbreklerin mikroskopik incelemesinde fruktoz grubunda şiddetli vakuolizasyonlar ve tubullerde proteinöz materyal gözlenirken ilaç uygulamalarının böbrek patolojisini önemli ölçüde düzelttiği gözlemlendi. Kontrol grubundaki hiçbir ratta patolojik bulgu saptanmadı. Kas örneklerinde hiçbir grupta patolojik bulgu gözlenmedi.

Bu sonuçlara göre mısır şurubunun çeşitli dokularda (Pankreas, Karaciğer ve Böbrek) histopatolojik değişimlere neden olup her iki ilaç bu etkiyi engellemektedir.

Pankreas dokularının insulin antiserumu kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamalarında mısır şurubu grubunda insülin salgılayan hücrelerin sayıca belirgin şekilde azaldıkları ve boyanma şiddetinde de büyük kayıplar şekillendiği dikkati çekti. Gerek metformin ve gerekse saksagliptinin insülin sekresyonunu büyük ölçüde normale çevirdiği saptandı.

YFMS gibi hızlı emilen karbonhidratların fazla tüketimi, yüksek glisemik diyet yüküne neden olup inflamasyon, insülin direnci ve bozulmuş beta hücre disfonksiyonuna neden olarak Tip 2 DM riskini obeziteden bağımsız olarak artırır (81-83).

Fruktozun insülin direnci oluşturma mekanizmaları incelendiğinde etkili mekanizmalar olarak karaciğerde VLDL üretiminin arttırması ve kanda trigliserit seviyesini yükseltmesi ileri sürülmektedir (84).

DPP-4 üzerinde inhibisyonla etki gösteren ilaçların ilk çıktığı zamanda yapılan çalışmalarda bu ilaçların beta hücre fonksiyonlarını koruyarak ve restore ederek olumlu etkilerinin olduğu preklinik olarak gözlemlenmiştir (85, 86).

Pankreas dokularının glukagon antiserumu ile yapılan immunhistokimyasal boyamasında mısır şurubu grubunda glukagon sentezleyen hücrelerin rölatif olarak sayıca artmış oldukları diğer gruplar arasında önemli bir fark bulunmadığı dikkati çekti.

Karaciğer, böbrek ve pankreasların apoptotik aktivitelerini belirlemek için aktif caspase-3 ile yapılan immunohistokimyasal incelemelerinde fruktoz uygulamasının bu organlarda apoptotik aktiviteyi arttırdığı ancak saksagliptin ve metformin uygulamalarının fruktozun bu etkisini düzelttiği dikkati çekti. Kaslarda apoptotik aktivitede herhangi bir değişiklik saptanmadı.

Pankreas, karaciğer ve böbrek dokularının sirtuin-1 ile immunohistokimyasal boyaması sonucunda sirtuin -1 aktivitesinin bütün dokularda mısır şurubu grubunda fruktoz tarafından belirgin şekilde inhibe edildiği gözlemlendi. Saksagliptin ve metforminin fruktozun bu patolojik etkilerini önemli ölçüde düzelttiği ve sirtuin-1 aktivitesini arttırdığı saptandı.

Literatürde fruktozun sirtuin-1 seviyesini düşürdüğünü ve metformin ile saksagliptinin bu düşmeyi engellemsi ile ilgili çalışma yoktur. Bu bakımdan çalışmamız önemli sonuçlar ortaya koymuştur.

6. SONUÇ

Son yıllarda toplumda DM ve dolayısıyla insulin direnci, yüksek fruktozlu mısır şurubunun yiyecek ve içeceklere yüksek oranda girmeye başlamasıyla sıklığı giderek artmaktadır. Deneysel çalışmalarda fruktozdan zengin diyetle beslenen hayvanlarda insulin direnci olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda da bu sonuç doğrulanmıştır. Aynı zamanda çalışmamızda yüksek fruktozlu mısır şurubu tüketiminin hiperglisemiye, kilo artışına, hipertrigliseridemi, azotemiye neden olduğu gösterilirken metformin ve saksagliptinin ve durumların oluşmasını engellediği gösterildi. Saksagliptin grupta HDL yüksekliği saptanmıştır. Ayrıca mısır şurubunun insülin direnci yaparken saksagliptinin bu durumu engellediği meforminin ise daha az oranda engellediği gözlemlenmiştir. Bakılan bazı organlarda oksidatif stres oluşup verilen ilaçların oksidatif stresi engellediği gözlenirken bazı organlarda da oksidatif stres oluşmadan antioksidan enzim yüksekliği tespit edildi. Karaciğer, pankreas ve böbrekte aktif caspase-3 ile bakılan apoptozis mısır şurubunda artmışken verilen iki ilacın da bu durumu engellediği gözlemlendi. Ayrıca insulin duyarlaştırıcı ve sekresyonunu düzenleyen sirtuinde karaciğer, pankreas ve böbrekte düşme gözlenirken her iki ilaçta bu azalmayı engellediği gözlemlendi. Tüm bu sonuçlar göz önüne alındığında insulin direnci tedavisinde metformine alternatif olarak saksagliptinin kullanılması değerlendirilmeli ve buna yönelik klinik çalışmalar yapılması gerekmektedir.

ÖZET

İnsülin direnci hiperinsülinemi ile birlikte insülin etkisinde bir duyarsızlaşma olarak tanımlanmaktadır. İnsulin direnci toplumda oldukça sık olan DM'un öncülü bir durum olduğundan tanı ve tedavisi önemlidir. Yüksek fruktoz tüketiminin hem klinik hem de denysel olarak insülin direncine neden olduğu çok sayıda çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızda 10 hafta boyunca mısır şurubu verilen ratlar verilmeyen kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Mısır şurubu alan bir gruba metformin diğer bir gruba saksagliptin dördüncü haftanın sonunda ilave edilerek çalışma sonuna kadar günlük gavaj ile verilmiştir.

Çalışmamızda fruktozdan zengin diyetle beslenen hayvanlarda insulin direnci olduğu gösterildi. Saksagliptinin mısır şurubuna bağlı insulin direncini engellediği halde meforminin ise daha az oranda engellediği gözlemlenmiştir. Aynı zamanda çalışmamızda yüksek fruktozlu mısır şurubu tüketiminin kilo artışına, hiperglisemiye, hipertrigliseridemi ve azotemiye neden olduğu gösterilirken metformin ile saksagliptinin bu durumların oluşmasını engellediği gösterildi.

Çalışmamızda karaciğer, pankreas ve kas dokularının bir kısmında oksidatif stres oluşup verilen ilaçların oksidatif stresi engellediği gözlenirken bazı dokularda da oksidatif stres oluşmadan antioksidan enzim yüksekliği tespit edildi.

Mısır şurubu verilen ratların karaciğer, pankreas ve böbreklerinde histopatolojik değişimler gözlenirken her iki ilacın bunu önlediği gözlemlendi. Pankreasta bakılan insülin boyamasında mısır şurubu ile azalma izlenirken her iki ilacın bu azalmayı engellediği görüldü. Glukagonda ise mısır şurubunda artma her iki ilacın bu artmayı engellendiği gözlemlendi. Aktif caspase-3 ile bakılan apoptozis mısır şurubunda artmışken verilen iki ilacın da bu durumu engellediği gözlemlendi. Ayrıca insulin duyarlaştırıcı ve sekresyonunu düzenleyen sirtuin-1'de karaciğer, pankreas ve böbrekte düşme gözlenirken her iki ilaçta bu azalmayı engellediği gözlemlendi.

Sonuç olarak mısır şurubu çeşitli patolojik değişimlere neden olmakta metformin ve saksagliptin ise bu değişimleri önlemektedir.

Anahtar kelimeler: İnsülin direnci, mısır şurubu, sirtuin-1, metformin, saksagliptin

SUMMARY

Insulin resistance is described as a desensitization on insulin effect together with hyperinsulinemia. Insulin resistance is a precursor condition of DM that is common in society, therefore its diagnosis and treatment are important. It is shown in numerous study as both clinical and experimental that high consumption of fructose causes to insulin resistance. In our study, for 10 weeks corn syrup given rats were compared with control group. At the end of the fourth week metformin was added to a group that was given corn syrup and also saxagliptin was added to another group that was given corn syrup, and they were given daily by gavage to end of the study.

In our study, it was shown to occur insulin resistance in the animals fed with fructose rich diet. It was observed that saxagliptin prevented to insulin resistance depends on the corn syrup and metformin prevented less than saxagliptin. Also, the study showed that consumption of corn syrup with high fructose caused to weight gain, hyperglycemia, hypertriglyceridemia and azotemia and saxagliptin and metformin prevented the occurrence of these conditions.

In our study, it was observed that oxidative stress occurred in a part of pancreas and muscle tissues and the given drugs prevented oxidative stress and antioxidant enzyme elevation was detected in some tissue without oxidative stress occurred.

It was observed that histopathological changes in liver, pancreas and kidney of corn syrup given rats and both of drugs prevented it. It was observed that decrease in pancreatic insulin staining with corn syrup and both of drugs inhibited this decrease. It was observed that increased in glucagon with corn syrup and both of drugs prevented the increase. It was observed that apoptosis viewed by active caspase-3 increased in corn syrup and both of the given two drugs prevented this situation. Also it observed that sirtuin -1 which was insulin sensitizing and regulating the secretion of insulin was decreased in liver, kidney and pancreas and both of the two drugs prevented this decrease.

As a result, the corn syrup causes various pathological changes and metformin and saxagliptin prevent these changes.

Key words: insulin resistance, corn syrup, sirtuin-1, metformin, saxagliptin.

KAYNAKLAR

1. Vos M KJ, Gillespie C et al. Dietary fructose consumption among US children and adults: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Medscape J Med* 2008; 10(7): 160.
2. Stanhope KL SJ, Keim NL et al. Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increases visceral adiposity and lipids and decreases insulin sensitivity in overweight/obese humans. *J Clin Invest* 2009; 119(5): 1322-1334.
3. Cefalu WT Insulin resistance: cellular and clinical concepts *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:13-26.
4. Samuel VT, Shulman GI Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links *Cell* 2012;148:852-71.
5. Musso C CE, Moran SA, et al. Clinical course of genetic diseases of the insulin receptor (type A and Rabson-Mendenhall syndromes): a 30-year prospective., 2004;83:209-22. MB.
6. Lippincott's Illustrated Review:Biochemistry sE, by Pamela C. Champe, and Richard A H, J.B. Lippincott company, PA,1994, 269-277.
7. Pedersen O BJ, AndersenPH. Evidence against altered expression of GLUT 1 or, *Diabetes Gismopwoon*, 1990;39:865-70.
8. Eriksson J, Koranyi L, Bourey R, et. al. Insulin resistance in type 2 (non-insulindependent) diabetic patients and their relatives is not associated with a defect in the expression of the insulin-responsive glucose transporter (GLUT 4) gene in human skeletal muscle . *Diabetologia* 1992; 35: 143-7.
9. Olefsky JM, Reaven GM. Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic patients. *J Clin Invest.* 1974;54:1323-28.
10. Bar RS, Gordon P , Roth J, et.al. Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients: Effects of starvation, refeeding and dieting. *J Clin Invest.* 1976;58:1123-35.
11. Bergman RN, Finegood DT, Ader M.Asseement of insulin sensitivity invivo. *Endeocr Rev.*1985;1:45-86.
12. Ginsberg H, Kimmerling G, Olefsky JM, Reaven GM. Demonstrations of insulin resistance in maturity onset diabetic patients with fasting hyperglycemia. *J Clin Invest.* 1975; 55:454-460.

13. Jones CNO, Pei D, Staris P, et al. Alterations in the glucose-stimulated insulin secretory dose-response curve and in insulin clearance in nondiabetic insulinresistant individuals. *J Clin Endocrinol metab.* 1997;82:1834-38.
14. Davies SJ, Phillips L, Griffiths AM, Russell LH, Naish PF, Russell GI. What really happens to people on long-term peritoneal dialysis? *Kidney Int.* 1998;54:2207-17.
15. De Santo NG, Capodicasa , Senatore R, et al. Glucose utilisation from dialysate in patients on CAPD. *Int J Artif Organs.* 1979;2:119-25.
16. Shockley TR, Wang T, Lindholm B. Future clinical research with icodextrin containing solutions. *Perit Dial Int.* 1997;17(suppl 2):70-4.
17. Hotamisligil GS AP, Caro JF, et al. Increased adipose tissue expression of, Invest. *tnf- α hoairJC*, 1995;95:2409-15.
18. Hotamisligil GS, Spiegelman BM. Tumour necrosis- α :A key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes* 1994;43:1271-78.
19. Buchanan TA, Watanabe RM, Xiang AH. Limitations in surrogate measures of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95:4874-6.
20. Ascaso JF PS, Real JT, et al. Diagnosing insulin, subjects rbsqmi, *Care wngmD*, 2003;26:3320-5.
21. McLaughlin T, Abbasi F, Cheal K, et al. Use of metabolic markers to identify overweight individuals who are insulin resistant. *Ann Intern Med* 003;139:802-9.
22. Flier JS, Minaker KL, Landsberg L, et al Impaired in vivo insulin clearance in patients with severe target cell resistance of insulin. *Diabetes* 1982;31:132-5.
23. Prager R, Wallace P, Olefsky JM: In vivo kinetics of insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output in normal and obese subjects. *J Clin Invest.* 1986;78:472-81.
24. Walter A. Müller MD, Gerald R. Faloona, Ph.D., Eugenio Aguilar-Parada, M.D., and Roger H. Unger, M.D. Abnormal Alpha-Cell Function in Diabetes — Response to Carbohydrate and Protein Ingestion. *N Engl J Med* 1970; 283:109-115.
25. Liang F, Kume S, Koya D. SIRT1 and insulin resistance. *Nat Rev Endocrinol.* 2009 Jul;5(7):367-73.
26. Witters LA. The blooming of the French lilac. *J Clin Invest* 2001; 108: 1105-7.
27. Kolata GB. The phenformin ban: Is the drug an imminent hazard? *Science* 1979; 203: 1094-6.

28. Bailey CJ, Turner RC. Metformin. *N Engl J Med* 1996; 334: 574-9.
29. Inzucchi SE, Maggs DG, Spollett GR, et al. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1998; 338: 867-72.
30. Inzucchi SE. Metformin or thiazolidinediones as firstline therapy for type 2 diabetes: Focus on cardiovascular protection. *Pract Diabetol* 2002; 21: 7-12.
31. Fura A, Khanna A, Vyas V, Koplowitz B, Chang SY, Caporuscio C, et al. Pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase 4 inhibitor saxagliptin in rats, dogs, and monkeys and clinical projections. *Drug Metab Dispos.* 2009 Jun;37(6):1164-71.
32. Tahrani AA, Piya MK, Barnett AH. Saxagliptin: a new DPP-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Adv Ther.* 2009;26(3):249-62.
33. Weber AE. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. *J Med Chem.* 2004;47(17):4135-41.
34. Conarello SL, Li Z, Ronan J, Roy RS, Zhu L, Jiang G, et al. Mice lacking dipeptidyl peptidase IV are protected against obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 May 27;100(11):6825-30.
35. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004; 9(3): 145- 152.
36. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49(10): 1341-1348.
37. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 1992; 50(5): 335-339.
38. Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, Koca C, Tutkun F, Özçelikay TA, Altan N (2003) Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 40(6), 447-450.
39. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B (1995) The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews* 11(3), 181-192.
40. Korkmaz A. Fruktöz; Kronik Hastalıklar İçin Gizli Bir Tehdit. *TAF Prev Med Bull* 2008; 7: 343-6.
41. Bhosale SH, Rao MB, Deshpande VV. Molecular and industrial aspects of glucose isomerase. *Microbiol Rev* 1996; 60: 280-300.

42. Mayes PA. Intermediary metabolism of fructose. *Am J Clin Nutr* 1993; 58: 754-65.
43. Wolf A, Bray GA, Popkin BM. A short history of beverages and how our body treats them. *Obes Rev* 2008; 9: 151-64.
44. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr* 2004; 79: 537-43.
45. White JS. Straight talk about high-fructose corn syrup: what it is and what it ain't. *Am J Clin Nutr*. 2008;88 : 1716–1721.
46. Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2007; 86: 899-906.
47. Kizhner T, Werman MJ. Long-term fructose intake: biochemical consequences and altered renal histology in the male rat. *Metabolism* 2002; 51: 1538-47.
48. Ferder L, Ferder MD, Insera F. The Role of High-Fructose Corn Syrup in Metabolic Syndrome and Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2010; 12: 105-12.
49. Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension. *Curr Hypertens Rep* 2011; 13: 29-35.
50. Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Jimenez A, Bautista P, Cristobal M, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. Fructose-induced metabolic syndrome is associated with glomerular hypertension and renal microvascular damage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007; 292: 423-9.
51. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: potential mechanisms for its effects to increase visceral adiposity and induce dyslipidemia and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* 2008; 19: 16-24.
52. Raben A, Vasilaras TH, Moller AC, Astrup A. Sucrose compared with artificial sweeteners: different effects on ad libitum food intake and body weight after 10 wk of supplementation in overweight subjects. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 721-9.
53. Gao X, Qi L, Qiao N, Choi HK, Curhan G, Tucker KL, Ascherio A. Intake of added sugar and sugar-sweetened drink and serum uric acid concentration in US men and women. *Hypertension* 2007; 50: 306-12.

54. Nakagawa T, Hu H, Zharikov S, Tuttle KR, Short RA, Glushakova O, Ouyang X, Feig DI, Block ER, Herrera-Acosta J, Patel JM, Johnson RJ. A causal role for uric acid in fructose-induced metabolic syndrome. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290: F625-31.
55. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26(4): 239-57.
56. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
57. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 665-73.
58. Schwartzman RA, Cidlowski JA. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Review* 1993; 14: 133-150.
59. Ballian N, Hu M, Liu SH, Brunicardi FC. Proliferation, hyperplasia, neogenesis, and neoplasia in the islets of Langerhans. *Pancreas.* 2007 Oct;35(3):199-206.
60. Lumachi F, Basso S. Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid* 2002; 12(1):27-34.
61. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1321.
62. Toubi E, Shoenfeld Y. Protective autoimmunity in cancer. *Oncol Rep.* 2007; 17(1): 245-51.
63. Drapper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186: 421–431.
64. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984;105:121–26.
65. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988;34(3):497-500.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal biochem.* 1976;72:248-254.
67. DeFronzo RA. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and coronary artery disease: a complex metabolic web. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 11: S1-16.

68. Inzucchi SE. Metformin or thiazolidinediones as first-line therapy for type 2 diabetes: Focus on cardiovascular protection. *Pract Diabetol* 2002; 21: 7-12.
69. Lee CF SM, Tai YK. Saxagliptin-induced recurrent acute pancreatitis. *Intern Med.* 2014;53(12):1351-4. .
70. Rizkalla SW, Boillot J, Tricottet V, et al: Effects of chronic dietary fructose on glomerular basement membrane thickness and on glycemic and lipid control in normal rats. Effect of copper supplementation. *Br J Nutr* 1993, 70:199-209.
71. Blakely SR, Hallfrisch J, Reiser S, Prather ES: Long-term effects of moderate fructose feeding on glucose tolerance parameters in rats. *J Nutr* 1981;111:307-314.
72. Thorburn AW, Storlien LH, Jenkins AB, Khouri S, Kraegen EW: Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. *Am J Clin Nutr* 1989;49:1155-1163.
73. Wu T, Giovannucci E, Pischon T, et al: Fructose, glycemic load, and quantity and quality of carbohydrate in relation to plasma C-peptide concentrations in US women. *Am J Clin Nutr* 2004; 80:1043-9.
74. Janket SJ, Manson JE, Sesso H, Buring JE, Liu S: A prospective study of sugar intake and risk of type 2 diabetes in women. *Diabetes Care* 2003; 26:1008-15.
75. Stanhope KL, Havel PJ. Fructose consumption: recent results and their potential implications. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1190: 15–24.
76. Xing SS, Bi XP, Tan HW, Zhang Y, Xing QC, Zhang W. Overexpression of interleukin-18 aggravates cardiac fibrosis and diastolic dysfunction in fructose-fed rats. *Mol Med.* 2010; 16(11-12): 465-70.
77. Ackerman Z, Oron-Herman M, Grozovski M, Rosenthal T, Pappo O, Link G, Sela BA. Fructose-induced fatty liver disease: hepatic effects of blood pressure and plasma triglyceride reduction. *Hypertension* 2005; 45(5): 1012-8.
78. Havel PJ. Dietary fructose: implications for dysregulation of energy homeostasis and lipid/carbohydrate metabolism. *Nutr Rev* 2005; 63: 133-57.
79. Light HR, Tsanzi E, Gigliotti J, Morgan K, And Tou JC. The type of caloric sweetener added to water influences weight gain, fat mass, and reproduction in growing Sprague-Dawley female rats. *The Society for Experimental Biology and Medicine (Maywood).* 2009; 234(6): 651-61.
80. Song M, Schuschke DA, Zhou Z, Chen T, Pierce Jr. WM, Wang R, Johnson WT, McClain CJ. High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague–Dawley rats: A novel mechanism for obesity related fatty liver. *J Hepatol.* 2012; 56(2): 433-40.

81. Schulze MB, Liu S, Rimm EB, Manson JE, Willett WC, Hu FB. Glycemic index, glycemic load, and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. *Am J Clin Nutr* Aug;2004 80(2):348–356.
82. Liu S, Manson JE, Buring JE, Stampfer MJ, Willett WC, Ridker PM. Relation between a diet with a high glycemic load and plasma concentrations of high-sensitivity C-reactive protein in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* Mar;2002 75(3):492–498. .
83. Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, Buring JE, Ridker PM. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *Jama* Jul 18;2001 286(3):327–334.
84. Cordain L, Eades MR, Eades MD. Hyperinsulinemic diseases of civilization: more than just Syndrome X. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2003; 136(1): 95-112.
85. Reimer, M. K.; Holst, J. J.; Ahre'n, B. Longterm inhibition of dipeptidyl peptidase IV improves glucose tolerance and preserves islet function in mice. *Eur. J. Endocrinol*. 2002; 146: 717-727
86. Pospisilik, J. A.; Stafford, S. G.; Demuth, H.-U.; Brownsey, R.; Parkhouse, W.; Finegood, D. T.; McIntosh, C. H. S.; Pederson, R. A. Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and β -cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. *Diabetes* 2002; 51: 943-950.