

FL775



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GÖZ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**DIYABETİK SIÇANLARDA ALFA-LİPOİK ASİTİN⁺ LENS
ANTIOKSİDAN SİSTEMİ VE LİPİD PEROKSİDASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Semir HACIOĞULLARI

Uzmanlık Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Güler AKSU**

‘ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir ’

Antalya, 2004

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince eğitimime emeği geçen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. İclal Yücel ve tez hocam Sayın Prof. Dr. Güler Aksu başta olmak üzere, Sayın Prof. Dr. Cemil Apaydın'a, Sayın Doç. Dr. Yaşar Duranoğlu'na ve Sayın Yard. Doç. Dr. Yusuf Akar'a ve ayrıca projelerine dahil etmek suretiyle tezime katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Tevfik Aslan Aksu'ya; İhtisasım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarım ile anabilim dalımız personeline teşekkür ederim.

Dr. Semir Hacıoğulları

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Diyabetes Mellitus	2
2.1.1 Diyabetes Mellitus Sınıflaması	3
2.1.2 Diyabetes Mellitus Patogenezi	4
2.1.3 Etyoloji ve Genetik	5
2.1.4 Tanı	6
2.1.5 Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları	6
2.2 Diyabetin Kronik Komplikasyonlarının Patogenezi	8
2.2.1 İleri Glikolizasyon Ürünleri Hipotezi	9
2.2.2 Aldoz redüktaz (poliol yolu)	11
2.2.3 Oksidatif Stres Hipotezi	12
2.3 Diyabetin Göz Komplikasyonları	12
2.3.1 Diyabetik Retinopati	14
2.3.2 Diyabetes Mellitus'un Lens Üzerine Etkileri	16
2.3.3 Diyabetik Lenslerde Katarakt Gelişim Mekanizmaları	16
2.4 Lipid Peroksidasyonunun Önemi Ve Malondialdehid (MDA)	20
2.5 Antioksidanlar	21
2.5.1 Serbest Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri	21
2.5.2 Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları	22
2.6 Antioksidan Savunma Sistemleri	23
2.6.1 Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri	24
2.6.2 Non Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri	26
2.7 α -Lipoik Asit	27
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Deney Hayvanları	29
3.2. Deney Ve Deney Grupları	29
3.2.1. Taşıyıcılar	29

3.2.2. Deney Grupları	29
3.2.3. Cerrahi İşlem	30
3.3. Metodlar	30
3.3.1. Protein Tayini	30
3.3.2. Cu/Zn Bağımlı Süperoksit Dismutaz Tayini	32
3.3.3. Katalaz Aktivitesinin Tayini	33
3.3.4. Malondialdehit Tayini	35
3.4. İstatistiksel Analiz	36
3.5. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri	36
3.5.1. Gereçler	36
3.5.2. Kimyasal Malzemeler	36
4. BULGULAR	37
4.1. Kan Şekeri Düzeyleri	37
4.2. Kilo Değişimleri	38
4.3. Lens Enzim Aktiviteleri Değerlendirilmesi	39
4.3.1. Lens SOD Aktiviteleri	39
4.3.2. Lens katalaz Aktiviteleri	40
4.3.3. Lens MDA Değerleri	40
5. TARTIŞMA	42
SONUÇLAR	49
ÖZET	50
KAYNAKLAR	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	α -Lipoik Asit
IDDM	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM	İnsülininden Bağımsız Diabetes Mellitus
ICA	Adacık Hücre Antikorları
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Protein
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünü
AR	Aldoz Redüktaz
SDH	Sorbitol Dehidrogenaz
OH	Hidroksil Radikali
O_2^-	Süperoksit Anyon Radikali
H_2O_2	Hidrojen Peroksit Molekülü
HO_2	Hidroperoksit
1O_2	Tekil Oksijen
HCl	Hidroklorik Asit
O_2^{2-}	Peroksil Anyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
NO	Nitrik Oksit
L	Lipid Radikali
LOO	Lipid Peroksiradikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
Cu/Zn-SOD	Bakır ve Çinko içeren Süperoksit Dismutaz
Mn-SOD	Manganez içeren Süperoksit Dismutaz
ATPaz	Adenozintrifosfataz
GK	Goto-Kakizaki
DAG	Diaçilgliserol

DHLA

Dihidrolipoik Asit

TBARS

Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri

STZ

Streptozotosin

BSA

Bovin Serum Albümin

FCF

Folin-Ciocalteu-Fenol

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 Diabetes mellitus’da görülen göz komplikasyonlar	12
Çizelge 4.1 Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri (mg/dl)	37
Çizelge 4.2 Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)	38
Çizelge 4.3 Grupların retinadaki SOD değerleri (U/mg protein)	39
Çizelge 4.3 Grupların retinadaki MDA değerleri (nmol/mg protein)	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil: 2.1 Aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenazın katalizlediği tepkimeler	11
Şekil 2.2 Haber- Weiss tepkimesi	22
Şekil 2.3 Fenton tepkimesi	22
Şekil 2.4 Nonenzimatik reaktif oksijen metabolit kaynakları	23
Şekil 2.5 Süperoksitin SOD ile hidrojen perokside dismutasyonu	24
Şekil:2.6 H ₂ O ₂ konsantrasyonuna bağlı olarak katalazın katalizlediği tepkimeler	25
Şekil:2.7 ALA ve DHLA yapıları	27
Şekil 4.1. Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri (mg/dl)	37
Şekil 4.2 Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)	38
Şekil 4.3 Grupların lens SOD değerleri (U/mg protein)	39
Şekil: 4.4 Grupların lens MDA düzeyleri(nmol/mg protein)	40

1-GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM) hiperglisemi ile karakterize endokrin bir hastalıktır. Diyabetin makrovasküler, mikrovasküler komplikasyonlarının yanında polinöropati, katarakt gibi nonvasküler komplikasyonları da vardır. Bu komplikasyonların önlenmesinde ana hedefin hipergliseminin kontrolü olduğu kuşkusuzdur. Fakat bazı hastalarda çeşitli sebeplerden dolayı normoglisemi sağlanamamakta, bazı hastalarda da normoglisemi sağlanmasına rağmen komplikasyonlar gerilememekte hatta ilerlemektedir. Bu nedenle hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ve proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonu gibi komplikasyonların ara mekanizmalarının önlenmesine yönelik çalışmalar giderek önem kazanmaktadır.

Diyabetin katarakta neden olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Diyabette kataraktın oluşmu ile ilgili olarak bir çok mekanizma vardır. Hiperglisemiye bağlı olarak polyol yolunun aktivasyonu, proteinlerin nonenzimatik glikolizasyonu bunlardan bazılarıdır.

Son zamanlarda hiperglisemiye bağlı oksidatif stresin bu olayda çok önemli olduğuna ait çalışmalar mevcuttur. Serbest radikal denilen çok reaktif bileşikler protein ve lipidlerle reaksiyona girerek hücrelerde hasara dolayısı ile katarakta neden olmaktadır. Geçektende bazı antioksidan maddelerin, hayvan deneylerinde katarakt gelişimini önlediği veya azalttığı gösterilmiştir.

İlk olarak Red ve arkadaşları tarafından bulunan α -Lipoik asitin (ALA) güçlü antioksidan özellikleri taşıdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Evrensel antioksidan olarak nitelenen ALA'nın nonenzimatik glikolizasyonu ve oksidatif hasar sonucu oluşan lipid peroksidasyonunu azaltmak gibi etkileri vardır. Ayrıca hiperglisemiye azalttığı yönünde yayınları vardır. Bu etkilerinden dolayı ALA diyabetin kronik komplikasyonlarının önlenmesinde deneysel olarak kullanılmaya başlanmıştır. Alınan sonuçlar olumlu olsa da yapılan çalışmalar hayvan deneyleridir ve ALA'nın klinik kullanımı için yetersizdir.

Bu çalışmamızda ALA'nın diyabetik ratlarda lens antioksidan enzimleri olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalazın antioksidan aktivitelerine ve oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonuna etkisini inceledik.

2- GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus

İnsülinin kısmen veya tamamen eksik ve veya etkisiz olması sonucu glukozun vucutta yetersiz kullanımına bağlı oluşan hiperglisemi ile karakterize bir grup bozukluk diyabetes mellitus sendromu olarak adlandırılmaktadır. Hedef dokularda insülin eksikliği veya etkisindeki anormallikler, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasında bozukluklara yol açmaktadır. Akut ve kronik komplikasyonları nedeni ile hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde azaltan diyabetes mellitus morbiditesi, mortalitesi ve topluma ekonomik yükü oldukça yüksek kronik metabolik bir hastalıktır.

Diyabetin dünyada yaklaşık 151 milyon kişiyi etkilediği rapor edilmiştir. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda, toplum içindeki prevalansı %1-6,5 arasında değişmektedir. Son yıllarda prevelansta görülen önemli artışlara tüm etnik gruplarda, kültür düzeylerinde ve hemen hemen tüm ülkelerde her iki cinsiyette ve yaşta rastlanmaktadır. Diyabet prevelansı yaşla beraber artış göstermektedir ve olguların yarısı 55 yaş üzerindedir. Altmışbeş yaş sonrası siyah ırkın % 25'inde ve beyaz ırkın % 17' sinde diyabet görülür (1-3).

Türkiyede İdil ve arkadaşlarının yaptığı 96348 kişiyi içeren geniş kapsamlı bir çalışmada diyabetin prevelansı % 2,2 bulunmuştur. Bunun % 96. 6 sı 30 yaş üstü başlangıçlı ve % 3,4' ü ereken başlangıçlı diyabettir. Geç başlangıçlı diyabeti olan hastaların diyabete bağlı olarak % 10,8'inde görme azlığı ve % 2,7'sinde legal körlük saptanmıştır(4).

Hiperglisemi semptomları arasında başlıca poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı, görmede bulanıklık ve enfeksiyonlara yatkınlık bulunmaktadır. Bazı hastalarda ketoasidoz ve nonketotik hiperozmolar koma gibi yaşamı tehdit eden hiperglisemik ataklar görülür. Bazı hastalarda da semptomsuz seyredebilir ve bu hastalarda tanı tesadüfen konur. Hastalık ilerledikçe özgün uzun dönem komplikasyon riski artmaktadır.

2.1.1. Diyabetes Mellitus Sınıflaması

1995 yılında Amerikan Diyabet Cemiyeti tarafından diyabet tanısı ve sınıflandırılması yeniden gözden geçirilmiş ve 1997 de çalışma sonuçları yayınlanmıştır(5).

Buna göre diyabet 6 grupta toplanmıştır

- a) Tip 1 DM İmmün aracılı
 İdyopatik a
- b) Tip 2 DM
- c) Diğer özgün diyabet tipleri
- d) Bozulmuş glukoz toleransı
- e) Bozulmuş açlık glukozu
- e) Gestasyonel diabet

Önceleri sıklıkla kullanılan insüline bağımlı DM (İDDM), insüline bağımlı olmayan DM (NİDDM), juvenil başlangıçlı DM ve erişkin başlangıçlı DM terimleri artık kullanılmamaktadır(2).

Diyabet olgularının yaklaşık % 10 'u tip 1 diyabettir. Erken yaşlarda polüüri, polidipsi, polifaji, ve hızlı kilo kaybı gibi semptomlarla aniden başlamaktadır. Pankreasın Langerhans adacıklarındaki β hücrelerinin kaybı nedeni ile insülin eksikliği görülen bu hastalar, ketoasidozdan korunmak ve yaşamlarını sürdürebilmek için ekzojen insüline bağımlıdırlar. Tip 1 diyabet pankreasın β - hücrelerinin otoimmün hasarı ile ortaya çıktığı için çoğu hastada otoimmün olayı gösteren antikorlar prelinik dönemde de bulunmaktadır. Otommünite kanıtı bulunmayan bazı hastalar ise tip 1 idyopatik grup olarak sınıflandırılmaktadır(6,7).

Tip 2 diyabet, diyabetik sendromda en yüksek prevalansa sahiptir ve hastaların % 90'ını kapsar. Semptomlu veya semptomsuz olan bu hastaların ketoasidoza eğilimleri olmadığından insüline bağımlılıkları yoktur. Burada insülin düzeyi azalmış, normal veya artmış olabilir. Bu hastaların çoğunda glukozu insülin yanıtı bozulmakta veya periferik reseptör düzeyinde insülin direnci bulunmaktadır. Bu hastalar sıklıkla obesite eşlik eder ve kilo kaybı çoğunlukla tek başına hiperglisemiyi kontrol edebilir. Buna rağmen tip 2 diyabetli hastaların çoğu hiperglisemiyi kontrol edebilmek için diyet düzenlenmesi, oral hipoglisemik ilaçlara ve insüline ihtiyaç

duymaktadır. Genellikle 40 yaşından sonra başlayan hastalık bazen genç yaşlarda da görülebilmektedir.

Diğer özgün diyabet tipleri denilen ve az rastlanan bu alt grupta;

- Beta hücre fonksiyonlarındaki ve insülin etkisindeki genetik defektler
- Ekzokrin pankreas hastalıkları,
- Akromegali, Cushing hastalığı ve glukagonoma gibi endokrinopatiler
- Beta hücre fonksiyonunu bozan ilaç ve hormonlar (dilantin, pentamidin)
- İnsülin etkisini bozan ilaçlar (glukokortikokoidler, tiazidler, beta adrenerjikler)
- Enfeksiyonlar
- İmmün aracılı diyabetin az rastlanan formları ile Down, Klinefelter ve porfiri gibi genetik sendromlara bağlı olarak hiperglisemi görülebilir.

Bozulmuş açlık glukozu, açlık kan glukoz düzeyinin normal ile diyabetik arasında olması karakterizedir. Bu yeni grup bozulmuş glukoz toleransına benzerdir.

Gestasyonel diyabet gebelikte başlayan veya ilk kez gebelik sırasında tanı alan karbonhidrat intoleransıdır (diyabetik gebe kadınlar bu sınıflamanın dışındadır). Normal bir gebeliğin özellikle 2 trimestrinin (3 ay) sonları ve 3 trimestrda, artan insülin direncinin dengelenmesi için insülin salgılanması artırılmakta ve normal glukoz hemostazı korunmaya çalışılmaktadır. İnsülin düzeyinin yeterince artıramadığı kadınlarda gestasyonel diyabet gelişmektedir (2)

2.1.2. Patogenez

Tip1 diyabet pankreasın insülin salgılayan β - hücrelerinin hücre aracılı otoimmün yıkımından kaynaklanmaktadır. Adacık hücrelerinde insülitis denilen kronik mononükleer hücre infiltrasyonu vardır. Bu otoimmün olay hastalık ortaya çıkmadan yıllar önce başlamakta ve hastalık semptomlarının ortaya çıkması için beta hücre miktarının % 80-90 azalması gerekmektedir (8).

Hipergliseminin saptanmasından yıllar önce serumda saptanan bazı antikorlar beta hücresi otoimmunitesinin en önemli belirleyicisidir.

Bu antikorlar şunlardır;

Adacık hücre sitoplazmik antikorları (ICA)

İnsülin otoantikorları (IAA)

Glutamik asit dekarboksilaza karşı glişen antikor (anti-GAD)

Sıgı serum albuminine karşı gelişen antikorlardır (anti-BSA) (9,10).

Tip 2 diyabet patolojisinde iki etken rol oynar. Periferik dokularda insülin aktivitesinin azalmasına sebep olan insülin direnci primer patolojiyi oluşturmaktadır. İnsülin direncinin kompanse edilmesi için pankreasın yeterli insülin salgılayamadığı ikinci patolojiye β - hücreleri disfonksiyonu denmektedir. Hastalığı erken döneminde göreceli geç döneminde ise tam bir insülin yetmezliği görülmektedir. Diyet ve egzersiz gibi çevresel faktörler tip 2 diyabet patogeneğinde önemli belirleyicilerdir. Tip 2 diyabet ile obezite prevalansı pozitif korelasyon göstermektedir. Tip 2 diyabetde aile öyküsü (genetik yatkınlık), obesitenin süresi ve yağın vücuttaki dağılımı gibi faktörler oldukça önemlidir. Tip 2 diyabet olgularının % 60-80 kadarı obezdir. Tip 2 diyabet ile fiziksel aktivite arasında ters bir ilişki bulunmaktadır. Günlük kalori harcanmasının 500 kcal artması ile bu hastalığın riski % 6 azalmaktadır. Bu etki vücut ağırlığı ve ailesel diyabet öyküsünden bağımsızdır. Egzersiz iskelet kası ve yağ dokusundaki insülin duyarlılığını arttırmaktadır (2).

2.1.3. Etiyoloji ve Genetik

Kalıtsal olan tip 1 diyabet multigenik bir özellik taşımakta ve ana lokusu altıncı kromozomdaki major histokompatibilite kompleksinde yer almaktadır. Ayrıca dokuzuncu kromozomda en az 11 lokus daha olaya katılmaktadır. Tip 1 diyabetli hastaların % 95 kadarı HLA-DR3 veya HLA- DR4 histokompatibilite antijenlerini eksprese etmektedirler. Basit Mendel kalıtımını izleyen ve poligenetik bir hastalık olan Tip 1 diyabetin başlamasında çevresel faktörler rol oynamaktadır. Bunlar arasında rubella, kabakulak, Coxsackie B gibi virüsler yer almaktadır. Diğer çevresel faktörler streptozosin, siyanür gibi çeşitli kimyasallar ve inek sütüdür. Beta hücre dizilimi ile aynı dizilimi taşıyan bir viral proteinin otoimmün olayı başlattığı düşünülmektedir (2).

Tip 2 diyabet gelişiminde genetik faktörlerin katkısı bilinmektedir. Tek yumurta ikizlerinde tip 2 diyabet için uyum oranı % 100 civarındadır. Ebeveynlerin her ikisinde diyabet olan çocuklarda Tip 2 diyabet görülme şansı normal çocuklara göre 10 kat fazladır. Genetik araştırmalarda tip 2 diyabet ile ilişkili birçok gen bulunmasına rağmen bugüne kadar yalnızca % 5 civarındaki hastanın genetik kusuru kesin olarak belirlenmiştir. Tip 2 diyabete yol açan bir çok gen hala bilinmemektedir.

Bilinen genler arasında insülin sekresyonu, insülin aktivitesi ve vücut ağırlığının düzenlenmesinde görev alan genler bulunmaktadır

2.1.4. Tanı

Dünya Sağlık Örgütüne göre diyabetin tanı kriterleri şunlardır ;

- Klasik diyabet semptomlarına (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ek olarak rastgele ölçülen glukoz kan değerinin 200 mg/dl üzerinde olması
- İki ayrı zamanda ölçülen açlık kan glukoz düzeyinin 126 mg/dl üzerinde çıkması
- Oral glukoz tolerans testi sonrası 2. saat kan glukozunun 200 mg/dl üzerinde çıkması

Bu üç kriterden birinin saptanması ile kişi diyabet tanısı alır (2).

2.1.5. Diyabetes Mellitusun Komplikasyonları

Komplikasyonlar akut ve kronik olmak üzere ikiye ayrılabilir.

1-Akut Komplikasyonlar

- a) Diyabetik ketoasidoz
- b) Non ketotik hiperozmolar koma
- c) Hipoglisemi
- d) Laktik asidoz

2- Kronik Komplikasyonlar

- a) Mikrovasküler hastalık
 - Retinopati
 - Nefropati
- b) Makrovasküler hastalık:
 - Koroner arter hastalığı
 - Serebrovasküler hastalık
 - Periferik vasküler hastalık
- c) Nöropati
 - Periferik simetrik nöropati
 - Mononöropatiler

Otonom nöropatiler

Diyabetik amiyotrofi

d) Ayak ülserleri

e) Dermopatiler

f) Enfeksiyonlar

Gingivit

Deri enfeksiyonları

Vulvovaginit

g) Katarakt (6)

Mikrovasküler Hastalık diabete özgüdür. Küçük damarları tutar, göz ve böbrek hastalığı olarak kendini gösterir.

Diyabetik nefropati tip 1 diyabetiklerde hastalığın başlamasından 15-20 yıl sonra yaklaşık olarak % 50 oranında görünmektedir. Tip 2 diyabetiklerde nefropati daha az görünür. Makrovasküler hastalık daha geniş damarları tutar klinikte koroner, serebral ve periferik vasküler hastalık olarak ortaya çıkar. Aterosklerotik damar hasarı neticesinde ortaya çıkan makrovasküler hastalıkları diyabetik hastalarda genel nüfusa göre daha sık ve daha genç yaşta görülür. Makrovasküler hastalık diyabetik olmayanlarda görülen şekle benzer ancak özellikle bacaklar ve ayaklar olmak üzere ekstremiteleri tutma eğilimi daha fazladır. İlişkili nöropati nedeni ile sessiz miyokard iskemisi görülür (6)

Katarakt diyabetin sık görülen komplikasyonlarından biridir. Tip1 diyabetiklerde erken yaşlarda ortaya çıkar (2)

Diyabetik nöropati diyabetin en çok morbiditeye sebep olan komplikasyonlarından biridir. Simetrik distal polinöropati sıklıkla bilateral alt ekstremitelerde olmakla beraber üst ekstremitelerde de görülür ve başlıca eldiven çorap tarzında duyu dağılımında kayıp ile kendini gösterir. Duyusal algılama azalması nöropatik ayak ülserlerine ve Charcot eklemine neden olur. Duyusal sinir işlev bozukluğuna ek olarak özellikle ellerde bilateral interosseöz kasların atrofisi ile kendini gösteren, simetrik motor tutulumları vardır (6).

Otonom nöropatinin değişik organları etkileyen çeşitli klinik manifestasyonları vardır. İmpotans otonom nöropatinin sık görülen bir şeklidir. İdrar retansiyonu ve idrar yolları enfeksiyonuna sebep olan nörojenik mesane bir diğer örnektir. Ortostatik

hipotansiyonun yanında gastro intestinal sistem otonomik sinir işlev bozukluğundan etkilenir (6)

Polinöropatiler diyabetin geç dönemlerinde ortaya çıkmalarına rağmen mononöropatiler hafif diyabette veya diyabet tanısı konmadan öncede ortaya çıkabilirler. Burada 3., 4. ve 6. kraniyal sinir tutulumları sonucu ekstraoküler adele paralizileri ve diplopi ortaya çıkabilir. En sık görünen sendrom pupil refleksinin bozulmadığı 3. sinir felcidir. Periferik mononöropatiler sıklıkla dış bası bölgelerinde görülürler ve diğerleri gibi birkaç hafta veya ay içerisinde düzelirler. Bu komplikasyonların vasküler kökenli oldukları düşünülmektedir (6).

Diyabetik amyotrofi, özellikle yaşlı erkeklerde görülen ve bacakların üst kısmı ile pelviste geniş adele gruplarında atrofiye sebep olan bir nöropati şeklidir.

Diyabetik hastalarda ayak ülseri büyük damarlardaki aterosklerozis, mikroanjiyopati, nöropati veya bunların kombinasyonu sonucu meydana gelir. Büyük damar hastalığına bağlı ülserler; ayak parmak uçlarında, nöropati sonucu gelişen ülserler ise daha ziyade ağırlık binen ve basınca maruz kalan kısımlarda görülür (6)

2.2. Diyabetin Kronik Komplikasyonlarının Patogenezi

Kronik komplikasyonlarının patogenezinde etkili olan faktörler arasında; intrasellüler sinyal transdüksiyonunda değişiklik, aldoz redüktaz aktivitesinde artış, sodyum potasyum adenozintrifosfataz ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$) aktivitesinde azalma, tromboksan A_2 (TXA_2) ve endotelin gibi bazı vazokonstriktörlerde artış, prostoglandin I_2 (PGI_2) ve nitrik oksit (NO) gibi vazodilatatörlerde azalma, reaktif oksijen ürünleri ve serbest radikallerin oluşumunda artma ve proteinlerin glikasyonundaki artış gibi pek çok faktör yer almaktadır.

Diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının ortaya çıkmasında uzun süreli hiperglisemi ve insülin direncinin rolü ile ilişkili çok sayıda mekanizma öne sürülmüştür;

- İleri Glikasyon Son Ürünleri (AGE) hipotezi
- Aldoz redüktaz (poliol yolu)
- Oksidatif stres
- İndirgen stres (pseudohipoksi)
- Karbonil stres

- Değişmiş lipoprotein metabolizması
- Artmış protein kinaz C aktivitesi
- Değişmiş büyüme faktörü (GF) aktivitesi
- Değişmiş sitokin aktivitesi ile ilgili hipotez

Bu hipotezlerin her biri temel ortak bir mekanizmanın farklı yansımaları olabileceği gibi, çeşitli dokuların farklı mekanizmalara duyarlılık göstermelerinden kaynaklanabilmektedir. Bir çoğu birbiri ile yakın ilişkili olan bu mekanizmaları bazen örtüşmektedir. AGE oluşumunun yola açtığı oksidatif stres, glikooksidasyonla AGE oluşumunu hızlandırmaktadır. Oksidatif stresi artıran ve AGE oluşumunu hızlandıran poliol yolu aktivasyonu damar duvarındaki doku protein kinaz C aktivasyonuna neden olmakta ve retina, lens, glomerüller ile sinir dokusunda miyoinositol düzeyinde ve protein kinaz C aktivitesinde azalmaya yol açmaktadır (2)

2.2.1. İleri Glikolizasyon Ürünleri Hipotezi

Enzimatik olmayan glikasyon, indirgeyici şekerlerin, protein ve nükleik asitlerin bazik amino grupları ile enzim yardımı olmaksızın reaksiyona girme yetenekleridir. Enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları, ilk kez 1912 yılında Fransız kimyacı Millard tarafından tanımlanmıştır ve bu yüzden onun adı ile anılmaktadır (11).

Fizyolojik şartlar altında enzimatik olmayan glikasyon yaşlanma sürecinde saptanabilir. Glukoz konsantrasyonunun kalıcı olarak yükseldiği diyabet gibi patofizyolojik durumlarda daha hızlı ve yoğun bir şekilde ilerler. Enzimatik glikasyon, proteinlerin translasyon sonrası geçirdikleri normal fizyolojik bir süreçtir. Eğer bir protein yüksek glukoz konsantrasyonu ile karşılaşır, glukoz bir enzime ihtiyaç göstermeksizin proteine bağlanabilir. Yarı ömrü gün veya haftalar gibi kısa olan proteinler, yüksek glukoz konsantrasyonunda, kimyasal olarak geri dönüşümlü glikasyon ürünlerine çevrilirler. Bu olay, fizyolojik pH'da lizin ve arjinin'in ϵ -amino grupları gibi serbest amino grupları içeren proteinlerin, glukoz gibi aldehit veya keton grupları bulunduran şekerler ile enzimatik olmayan reaksiyona girmesi ile başlar. Hızlı olan bu reaksiyonun sonucunda, stabil olmayan Schiff bazları oluşur. Bu bazlar, haftalar içerisinde yavaş olarak stabil bir bileşik olan Amadori (Ketoamin türevi) ürününe dönüşürler. Bu reaksiyonlar kan glukozu yüksek olduğu sürece devam eder. Kan glukozunun normale indirilmesi sonucunda ürünlerde azalma

meydana gelir Myelin, t b lin, kollajen gibi uzun ömürlü yapısal proteinler ise, daha yavaş olarak Amadori sonrası glikasyona uğrayarak İleri Glikasyon Son  r nlerine (Advanced Glycation Endproducts=AGE) d n   rl r AGE'ler hiperglisemi süresince artarak damar endoteli, ekstraselüler matriks, glomerüler bazal membran gibi çeşitli yerlerde birikerek patolojik süreçleri ba latırlar (11-16).

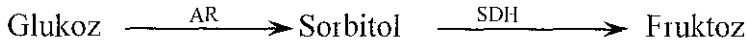
Özellikle gukozun hücre içine alınmasının insülinden bağımsız olduğu eritrositler, beyin, böbrek, lens, periferik sinirler gibi dokular hiperglisemiye bağlı nonenzimatik glikolizasyondan daha fazla etkilenmektedir. Protein glikasyonu hipergliseminin şiddetine ve süresine, proteinlerin yarı ömrüne, dokuların glukoza olan geçirgenliğine ve proteinlerdeki serbest amino gruplarının sayısına bağlıdır. Bu olay yarı ömrü kısa ve uzun olan tüm proteinlerde gerçekleşebilir (2).

Proteinlerin yapı, işlev ve metabolizmasını etkileyen protein glikasyonunu serbest radikallerin oluşumu ve glikooksidasyon izlemektedir. Glukoz kaynaklı amadori ürünlerinden, glikooksidasyon ile uzun ömürlü proteinlerdeki amino gruplarını tersinmez olarak çapraz bağlayabilen AGE bileşikleri oluşmaktadır. Anjiotoksik olan AGE bileşikleri ve AGE peptidleri vasküler doku hasarına yol açmaktadır. Proteinlerin büyüklüğünü, şeklini, elektriksel yüklerini, viskositesini, çözünürlüğünü değiştiren glikasyon molekül i  ve dış çapraz bağlanmaları ısı ve enzimlere dayanıklılığı ve mebran reseptörüne bağlanmayı etkilemektedir. AGE bileşikleri monosit makrofaj ve damar duvarı endotel hücrelerinde bulunan reseptörleri (Reseptor Advanced Glycation Endproducts=RAGE) aracılığı ile hücresel etkilerini göstermektedirler. AGE resept rlarına bağlanan AGE bileşikleri vasküler tonus artı ı ve vazokon tr ksyona, makrofajlardan sitokin salınımına, hücre proliferasyonu ile matriks sentezi artışına ve bazal mebran kalınla masına, adezyon moleküllerinin translasyonu ve koagülasyona eğiliminin artışına, lipoproteinler, nükleik asitler, histonlar ve enzimlerin yapı ve işlevlerinde bozukluğa bağlı aterojenik ve mutajenik etkilere yol açmaktadır. Ayrıca bu etkileşimler sonucu nükleik asitlerde kırılma eksizyon, tamir, delesyon, insersyon artışına bağlı mutasyon sıklığı ve gen ekspresyonu değişimi görülmektedir. SOD ve katalaz gibi antioksidan enzimler glikasyon ile inaktive olmaktadır (2, 11, 17, 18)

En iyi bilinen ve diyabetiklerde glisemik kontrolün izlenmesinde kullanılan gliko proteinler glikohemoglobin (HbA1c) ve fruktozamindir (11).

2.2.2. Aldoz Redüktaz (poliol yolu)

Sorbitol ve myoinositol metabolizmasında ortaya çıkan değişiklikler, diyabette gelişen çeşitli komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Pek çok şeker hücre içine girmesi ile beraber fosforile edilir. Bu yolla şekerlerin hücre içinde tutulması sağlanır, çünkü organik fosfatlar zarları serbestçe geçemezler. Bir monosakkaridi metabolize etmenin bir diğer yolu da aldehid grubunu indirgeyerek onu poliol haline çevirmek böylece ilave bir hidroksil grubu elde etmektir. Hidroksillenen molekülün hidrofilik özelliği artar ve çevresinde tuttuğu suyu arttırarak zarlardan geçebilme özelliğini kaybeder. Aldoz redüktaz (AR) enzimi glukozu indirgeyerek bir alkol-şeker bileşiği olan sorbitol oluşumuna neden olur. Aynı şekilde oluşan bu sorbitol, sorbitol dehidrogenaz enzimi (SDH) ile fruktoza dönüştürülür (2,3,19).



Şekil 2.1 Aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenazın katalizlediği tepkimeler

Yüksek glukoz konsantrasyonunda aldoz redüktaz aktivitesi artarken, sorbitol dehidrogenaz aktivitesi azalır. Glukozun hücre içine girişinin insülininden bağımsız olduğu dokularda, hipergliseminin etkisi ile bu hücrelerde hücre içi glukoz konsantrasyonu çok artar. Bunun sonucunda hücre içi sorbitol düzeyi artar. Sorbitol hidrofilik yapısından dolayı hücrede ödeme ve buna bağlı hasara neden olur (2,19,20).

Glukoz ve myoinozitol yapısal olarak birbirlerine benzerler, bu benzerlik nedeni ile glukoz hücrelerdeki myoinozitol taşıyıcısı için, myoinozitol ile yarışarak, myoinozitolün hücre içine geçmesini önler ve hücre myoinozitol düzeyi hiperglisemiye paralel olarak düşer. Hücre içi myoinozitol düzeyinin düşmesi, protein kinaz C ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya neden olur. Azalmış Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi hücrelerde Na^+ artışı ile sonuçlanır. Bu durum hücrede ödeme neden olurken nöronlarda uyarıların iletilmesinde yavaşlama görülür. Sinir sistemi dışında retina, glomerül ve aortada da sorbitolün arttığı, myoinozitol azalışına bağlı olarak Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (2,21,22).

2.2.3. Oksidatif Stres Hipotezi

Oksidatif stres, oksijenden türeyen reaktif oksijen ürünleri (ROS) ve serbest radikallerin oluşum hızı ile antioksidan savunma kapasitesi arasındaki dengesizlik olarak açıklanmaktadır. Hücre içindeki ve dışındaki glukoz konsantrasyon artışı nonenzimatik glikolizasyon ve glikooksidasyon denilen etki ile antioksidan savunma sistemlerini zayıflatmakta oksidan stresi arttırmaktadır. Lipid hidroperoksitleri, konjuge dienler, tiobarbitürik asit reaktif maddeler (TBARS) ve izoprostanlar gibi oksidan stres göstergelerinin düzeylerinin arttığı diyabetli hastalarda E vitamini, C vitamini, glutatyon, SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan savunma sistemi parametrelerinin düzeylerindeki değişiklikler, diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının patogeneğinde oksidatif stresin önemli bir rolü olabileceğini göstermektedir (23, 24).

Diyabetik vasküler komplikasyonların en önemlilerinden biri olan endotel fonksiyon bozukluklarından endoteldeki nitrik oksit üretimin azalması sorumlu tutulmaktadır. Bu azalmaya reseptör aracılı iletilerin aksaması, substant arginin- L yetmezliği veya nitrik oksit sentaz için gerekli kofaktörlerin azalması neden olabilmektedir. Öte taraftan endotele bağımlı vazodilatasyon azalmasının NO üretimindeki azalmadan çok, oksidatif strese bağlı AGE ve RAGE etkileşimi sonucu NO biyoyararlanımının bozulması nedeni ile olduğu öne sürülmektedir (2,25).

2.3. Diyabetin Göz Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonlarının mekanizmaları göz önünde alındığı zaman tüm sistemlerin yanı sıra gözleri ve fonksiyonlarını etkilemesi kaçınılmazdır. Gözme sisteminin tüm elemanları diyabetten etkilenir.

Çizelge 2.1. Diabetes Mellitus'ta görülen göz komplikasyonları (26).

Lakrimal sistem	Gözyaşı üretiminde azalma
Ekstraoküler kaslar	III., IV., VI. sinir felçleri
Kornea	Korneal abrazyon
İris	Rubeosis iridis
Lens	Diyabetik katarakt

Retina	Diyabetik retinopati, maküler ödem
Refraksiyon	Geçici refraksiyon kusurları
Glokom	Görülme sıklığında artış

Diyabette korneada hiperglisemiye bağlı bazal membranda gelişen değişiklikler sonucu epitel hüce sayısında azalma olur. Klinik olarak diyabet hastalarında keratit daha sık görülür ve daha ciddi bir seyir gösterir (27)

Diyabette korneal duyarlılıkta azalma olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin hiperglisemiye bağlı hüce içi myoinozitol düzeyinin düşmesi sonucu, protein kinaz C ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya bağlı değişikliklerin reseptör iletimine etkisinden dolayı geliştiği düşünülmektedir (28).

Diyabetik hastalarda gözyaşı miktarında ve gözyaşı kırılma zamanında azalma vardır. Ayrıca konjonktival goblet hüce sayısında azalma ve impresyon sitolojisinde skuamoz metaplazide artış mevcuttur. Diyabetik hastaların korneal endotellerinde polimegatzim ve fonksiyon kaybının olduğu gösterilmiştir (29,30).

Diyabet primer açık açılı glokom açısından bir risk faktörüdür. Diyabetin göziçi basınç artışının indüklediği retina ganglion hücrelerindeki apaptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca aç kapanması glokomuda diyabetik hastalarda daha sık saptanmaktadır. Bunua özellikle iridokorneal açısı dar kişilerde hiperglisemiye bağlı lens üzerindeki kalınlık artışının neden olduğu düşünülmektedir (31-35).

Ekstraoküler kas felci, diyabetin ilk belirtisi olarak da ortaya çıkabilen ve diyabetin derecesi ile korelasyon göstermeyen bir komplikasyonudur. Genellikle tek kraniyal sinir tutulumu şeklinde gözlenir ve en sık 3. ve 6. kraniyal sinirler tutulur. Etyolojisinde vasküler ve metabolik faktörlerin rol aldığı düşünülmektedir (6,36).

Diyabet, iskemik optik nöropati için bir risk faktörüdür. Bir çalışmada 56 iskemik optik nöropatili hastanın % 21,4'ü diyabetik bulunmuştur. Diyabet, optik disk ödemi için bir risk faktörüdür (37- 39).

Ayrıca sıçanlarda, diyabetin uyarılmış görsel potansiyel üzerine etkisi ilgili çalışmalar mevcuttur (40).

2.3.1. Diyabetik Retinopati

Bütün dünyada 20-65 yaş arası bireylerde yasal körlüklerin bir numaralı nedeni olarak gösterilen diyabet retinopatisi, retinanın prekapiller arterioller, venüllerini tutan bir mikroanjyopati tablosudur ve diyabetin en sık karşılaşılan komplikasyonlarından biridir. Diyabetik retinopati, tip 1 diyabetiklerde (%40) tip 2 diyabetiklerde (%20) oranlarında görülür. Diyabetin süresinin uzaması, metabolik kontrolün kötü olması, gebelik, hipertansiyon, renal hastalık, şişmanlık, hiperlipidemi, tütün kullanımı ve anemi retinopatinin gelişimini hızlandıran faktörlerdir (31)

Etyopatogenez

Diyabetik retinopatide temel problem hipergliseminin retina kapillerlerinde yarattığı hasar ve buna bağlı sızıntı ve iskemidir. Hiperglisemi nedeni ile kapiller bazal membranda kalınlaşma ve trombositlerde koagülasyona eğilim artışı sonucu mikrovasküler oklüzyonlar meydana gelir. Mikrovasküler oklüzyonların yarattığı iskemi sonucu neovaskülarizasyon adı verilen fragil yeni damar oluşumlarına ve artero venöz şantlara, sinir liflerinin infarktı ise yumuşak eksuda denilen lezyonların oluşumuna neden olur. Yine kronik hiperglisemiye bağlı olarak perisit hücrelerinin kaybı sonucu kan- retina bariyeri bozulur ve damar dışına sızıntı olur. Bunun klinik yansıması retinal hemoraji, sert eksuda ve ödemdir. Ayrıca kapiller endotelinde perisit hücreleri kaybı fiziksel olarak kapilleri zayıflatır ve mikroanevrizma gelişimlerine neden olur (31)

Klinik

Klinik açıdan diyabetik retinopatinin 3 e ayrılır (31).

a) Zemin Diyabetik Retinopati

Mikroanevrizmalar retinanın iç nükleer tabakasına yerleşen ve retinopatinin klinik açıdan ilk tespit edilebilir lezyonlarını oluştururlar. İntraretinal hemorajiler, retinanın daha kompakt olan orta tabakalarına yerleşmiş olup nokta veya leke tarzında bir görünüme sahiptirler. Sert eksudalar, dış pleksiform tabakasına yerleşmişlerdir. Değişik büyüklüklerde bulunurlar ve nispeten belirgin kenarlara sahip sarımsı ve muma benzer bir görüntü arzederler. Geçen zaman ile birlikte sayı

ve büyüklüklerinde artış olur. Retinal ödem, başlangıçta dış pleksiform ve iç nükleer tabakalar arsına yerleşmiştir. Daha sonraları iç pleksiform ve sinir lifleri tabakaları da tutulur ve retinanın tüm katları ödemli hale gelebilir.

b) Preproliferatif Diyabetik Retinopati

Başlangıçta sadece zemin diabetik retinopati bulguları ile seyreden bazı gözlerde ortaya çıkmaktadır. Klinik lezyonların tamamının sebebi retina iskemisidir. Vasküler değişiklikler, venlerde tespihleşme ve parmak sucuk şeklinde segmentasyon tarzında değişikliklerden meydana gelmektedir. Arteriollerde daralma olduğu gibi arter dallarının tıkanmasını andırır tarzda tümden silinme dahi görülebilir. Atılmış pamuk tarzında lezyonlar, retina sinir lifleri tabakasındaki prekapiller arteriyollerin oklüzyonu sebebiyle ortaya çıkarlar. İskemi sebebi ile aksoplazmik akımda ortaya çıkan kesinti ve sonucunda tıkanıklık oluşuncaya kadar taşınmakta olan materyallerin sinir aksonları içinde birikmesi bu lezyonların beyaz görünmesine sebep olur. Koyu leke biçiminde hemorajiler, hemorajik retina enfarktılarını temsil ederler. İntraretinal mikrovasküler anomaliler sıklıkla kapiller kapanma sahaları bitiştiğinde görülürler. Klinik açıdan düz retinal neovaskülarizasyonların yer aldığı fokal alanlara benzerler.

c) Proliferatif Diyabetik Retinopati

Neovaskülarizasyon, proliferatif diyabetik retinopatinin göstergesidir. Optik sinir başında veya büyük damarlar boyunca yeni damarlar proliferasyon gösterebilir. Vitreus ayrışması, proliferatif diabetik retinopatinin ilerleyişi içinde önemli bir rol oynar. Genellikle kortikal vitreus jelinin fibrovasküler proliferasyon sahalarına güçlü bir şekilde yapışmış olmasından dolayı posterior vitreus ayrışması tamamlanmaksızın kalır. Büzüşen vitreus damarları çekerek kaldırır. Sonrasında fibrovasküler doku kısmi ayrışma gösteren vitreusun posterior yüzeyi boyunca proliferat olmaya devam eder. Hemoraji, vitreus içerisine olduğu kadar yaygın bir şekilde retro hiyaloid boşluğada olabilir.

Proliferatif diyabetik retinopati sonucu traksiyone retina dekolmanı, rubeozis iridis ve neovasküler glokom gelişebilir veya göz fitizise gidebilir.

2.3.2. Diyabetes Mellitus'un Lens Üzerine Etkileri

Lens iris arkasında, vitreusun önünde ön hiyaloid mebran tarafından oluşturulan patellar fossaysa yerleşmiş bikonveks optik bir yapıdır. Zonüller aracılığı ile ekvatoryal bölgesinden prosesus siliyarislere tutunmuştur. Lensin doğumda 6-6,5 mm olan ekvatoryal çapı, genç erişkinlerde 9 mm'ye 3-3,5 mm olan ön arka uzunluğu ise 4-4,5 mm'ye ulaşır. Biyomikroskopik incelemede lens yapısal olarak zonlar şeklinde gözlenir. Bunlar sırası ile ön kapsül, supkapsüler saydam bölge, korteks ayrılama bölgesi, adult nukleus, infantil nukleus, fetal nukleus ve arka kapsül şeklindedir. Lens kollajen elastik bir kapsül tarafından bütünü ile çevrelenmiştir. Bu kapsül primer olarak tip 4 kollajen ve glikoproteinden oluşmuştur. Kapsülün hemen altında tek sıra halinde düzenli olarak dizilmiş küboidal nukleuslu epitel hücreleri yer alır. Epitel fonksiyonel olarak iki bölümde incelenir. Bunlar ekvator da bulunan ve aktif olarak bölünebilen ve lens fibrillerine dönüşebilen hücreler ile bölünmeyen, lens ile aköz arasındaki madde alışverişini sağlayan ve kapsüler materyali salgılayan hücrelerdir. Ekvator da hücreleri lens fibrillerine farklılaşırken mitokondri ve çekirdek gibi organeller parçalanır ve kaybolurlar. Lens fibrillerinin arasında çok yaygın ara bağlantı sistemi bulunur ve bunlar ara metabolizmada rol oynarlar. Korteksi oluşturan ve lameller yapı sergileyen liflerin kesitleri hekzagonaldir. Buradaki aktin lifleri belli bir düzende yer alırlar ve lense ince filamantöz bir iskelet yapısı kazandırılırlar. Bu düzen lensin şekil değiştirmesinde görev alır.

Yapılan gerek hayvan deneylerinde gerekse insan lensleri üzerindeki çalışmalarda diyabetin kataraktojenik etkisi gösterilmiştir. Katarakt dışında diyabetik hastalarda akomodasyonda zayıflama ve geçici refraksiyon değişimleri görülür. Akomodasyonda zayıflamanın nedeni siliyer cisimde glikojen depolanmasıdır. Hiperglisemiye bağlı olarak, lens içi sorbitol düzeyi artar ve ödem dolayısı ile lens kalınlık ve kırılganlığında artış olur. Bu durumda miyopik refraksiyon kusuru meydana gelir. Diyabetin tedavisi ile birlikte refraksiyon kusuru düzelir (41-43).

2.3.3. Diyabetik Lenslerde Katarakt Gelişim Mekanizmaları

Katarakt diyabetin önemli komplikasyonlarından biridir. Diyabete bağlı katarakt gelişimi ile ilgili bir çok görüş bulunmasına karşın temel olarak iki mekanizma rol oynamaktadır.

Hipergliseminin yarattığı ozmotik etki ile oluşan katarakt, bilateral beyaz punktat veya kar tanesi şeklinde ön ve arka opasitelerin gelişimine sebep olabilir. Bu tür katarakt, lensin yumuşak yapıda olmasından dolayı ile ozmotik değişikliklerden daha çok etkilenmesi nedeni ile daha çok 30 yaş altı gençelerde görülür. Bu nedenle daha çok tip 1 diyabetli hastalarda görülür. Bu tür katarakt hızlı gelişir ve hipergliseminin kontrolü ile kısmen veya tamamen geri dönebilir. İkinci tür diyabetik kataraktın fizyopatolojisi daha çok yaşa bağlı katarakt gelişim mekanizmalarının hipergliseminin çeşitli etkileri ile hızlanması şeklindedir. Bu kataraktın gelişimi uzun sürer. En erken 4. ve 5. dekadlarda ortaya çıkar ve geri dönüşümsüzdür (44)

1-Osmotik Stres ve Sorbitol Yolu

Metabolize ettiği glukozun enerjiye dönüşmesi için lenste iki yol mevcuttur. Aerobik ve anaerobik glukolizis. Aerobik glikoliziste bir glikoz molekülünden 36 molekül ATP açığa çıkarken, anaerobik glikolizde 2 molekül ATP açığa çıkar. Ancak lensin içindeki oksijen oranı düşüktür ve lense giren glukozun yalnızca % 3'ünün aerobik glikoliz ile enerji üretimine faydalı olabileceği bilinmektedir. Buna rağmen aerobik mekanizma lensin enerji ihtiyacının yaklaşık % 25'ini karşılamaktadır. Lensin enerji ihtiyacının büyük bir kısmı nonaerobik glikoliz ile karşılanır. Nitekim lens oksijensiz bir ortamda kaldığı zaman saydamlığını uzunca bir süre koruyabilmesine karşılık glukozun olmadığı bir ortamda birkaç saat içerisinde şeffaflığını kaybeder. Lensin içine normal miktarlarda giren glukoz aerobik ve nonaerobik glikoliz ile enerjiye dönüşürken yalnız % 3'ü aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole dönüştürülür. Hiperglisemi durumlarında aldoz redüktaz enziminin aktivitesi artar ve sorbitole dönüşen glukoz oranında artış olur. Sorbitolün poliyoldehidrogenaz enzimi ile fruktoza dönüşmesi çok daha yavaş gerçekleştiğinden, sorbitol hücre içinde birikebilir. Sorbitolün lens hücrelerinde büyük oranda birikmesi hücre ozmatik basıncını artırarak hücrenin hasarlanmasına ve lens fibrillerinin düzgün yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Diyabetik kataraktın oluş mekanizmasının önemli kısmını hücre içi aşırı sorbitol birikimi oluşturmaktadır. Ancak bu mekanizma özellikle kan şekeri 200 mg /dl den yüksek olduğunda işlerlik kazanır (45- 47).

Sorbitol yolu ve aldoz redüktaz inhibitörleri üzerine yapılmış ve yapılagelen bir çok hayvan deneyi mevcuttur. Bu çalışmalarda aldoz redüktaz inhibitörleri ile sorbitol birikimi ve buna bağlı katarakt oluşumu engellenmesine rağmen henüz insanlara yönelik kaydedeğer çalışmalar yoktur (44, 48-51).

2- Protein Modifikasyonu

Lens yapı olarak yaklaşık % 66'sı su, % 33'ü protein ve % 1'de aminoasit, lipid, karbonhidrat, elektrolitler ve peptitlerden oluşur. Lens diğer dokulardan daha yüksek oranda protein içerir. Bu yüksek bir refraktif indeks oluşturmak için gereklidir. Proteinlerin büyük kısmı suda eriyen proteinler yani kristalinler oluştururken % 15 kadarı suda erimeyen proteinlerden meydana gelir (46).

Suda eriyen proteinler strese bağlı bir dizi kimyasal olay sonrasında disülfid bağları ile birbirlerine bağlanarak suda erimeyen proteinlere dönüşürler. Suda eriyen proteinlerin agregasyonu sonucunda bunların çok büyük moleküller oluşturdukları ve suda erime özelliklerini kaybettikleri kabul edilmektedir. Yaşlanma ile beraber suda eriyen proteinlerin oranı % 80'lerden % 50-60'a kadar düşebilir. Özellikle kataraktlı lenslerde suda eriyen proteinlerin oranının belirgin şekilde düştüğü bilinmektedir. Buna karşın kataraktlı lenslerde suda erimeyen proteinlerin (özellikle ürede erimeyenlerin) belirgin şekilde artışı söz konusudur (46).

Kronik hipergliseminin katarakt oluşturma yollarından biri de lensin nonenzimatik glikolizasyonu sonucu oluşan protein ile glukoz arasındaki geniş çapraz bağlardır. Nonenzimatik glikolizasyonda bir glukoz molekülü bir aminoasit molekülüne (lizin veya valin) yapışarak proteinin yapısını değiştirir ve fonksiyonunu etkiler. Yaşlıların glikozillenmiş protein oranı gençlerin dört katı fazladır. Diyabetiklerde aynı yaştaki kişilere oranla glikozillenmiş protein oranı yüksektir (46,52,53).

3-Oksidasyon

Serbest oksijen radikalleri membran lipidleri ve membran proteinleri ile reaksiyona girerek yapılarını değiştirirler ve fonksiyonlarına engel olurlar. Serbest radikaller hem lens hücrelerindeki DNA molekülüne zarar vererek protein sentezini bozarlar hem de lensin fibrillerini oluşturan protein moleküllerine hasar verirler.

Metabolik aktivitenin son derece zayıf olduğu kortikal lens liflerinde meydana gelebilecek değişikliklerin tamiri zordur. Geçen zamanla birlikte bu oksidatif hasara bağlı protein moleküllerinde çapraz bağların oluşması ile meydana gelen polimerizasyon sonucunda, suda erimeyen protein oranında artış meydana gelmektedir (52,53,54).

Lensde serbest oksijen radikallerin yapacağı hasara karşı korunma mekanizması olarak glutatyon peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi enzimler bulunmaktadır. Lensin içindeki serbest oksijen radikalleri bu enzimler ile zararsız hale getirilmeye çalışılır. Buradan anlaşıldığı gibi lensin serbest radikallerden korunması saydamlığının devamı için çok önemlidir ve lens metabolizmasının önemli bir kısmı buna ayrılmıştır (46).

Diyabetik hastaların lenslerinde AGE proteinlerinin direkt oksidasyonu, artmış Aldoz Redüktaz aktivitesi veya antioksidan savunma mekanizmalarının baskılanması sonucu artmış bir oksidatif hasar söz konusudur. Diyabette katarakt gelişimin en önemli sebeplerinden biri budur. Deneysel olarak diyabetin rat lenslerindeki kataraktojenik etkisi gösterilmiştir. Gelişen kataraktın antioksidan kullanılarak azaltılabildiği veya önlenemediğine dair bir çok çalışma mevcuttur (55-57).

Diyabetik rat ve insan lenslerinde glutatyon, katalaz, SOD gibi antioksidan enzim aktivite ve miktarlarında azalma olduğu ve oksidatif hasara bağlı olarak oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinde artma olduğu gösterilmiştir (58-60).

4-Elektrolit Dengesizliği

Suda eriyen proteinlerin agregasyonunda oksidatif stresin ve nonenzimatik glikolizasyonun yanı sıra hücre içi Ca^{+2} artışı da rol oynar. Normal lens metabolizmasının gerçekleşebilmesi için lensin içinde belli bir iyonik ve osmotik ortamın korunması gerekmektedir. Bu ortamın korunması için aktif transporta gerek vardır. Kameralar sıvısında 150 milimolar olan sodyum konsantrasyonu lens içinde 20 milimolar iken, 5 milimolar olan potasyum ise lens içinde 120 milimolarlık bir konsantrasyona ulaşmaktadır. Aktif sodyum potasyum pompasının yalnız lensin epitelinde bulunuyor olması, lensin metabolizmasının en aktif bölümünün lens epitel hücrelerinde gerçekleştiğini göstermektedir. Lensin hücre içi kalsiyum oranı da çok düşüktür. Kalsiyumun hücre içinde düşük oranlarda kalabilmesinde calmodülin

tarafından regüle edilen kalsiyum adenozintrifosfataz pompası (Ca^{+2} -ATP az pompası) ile hücre içi $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{+2}$ değiş tokuş mekanizması da rol oynar hücre içine giren her üç Na^+ iyonuna karşılık bir Ca^{+2} iyonu hücre dışına atılır.

Hiperglisemiye bağlı antioksidan enzim aktivitesinde azalma nedeni ile lipid peroksidasyonu ve kükürt içeren proteinlerin oksidasyonu artar. Bunun sonucu mebran geçirgenliği ve kırılabilirliğinin artması ile mebran enzimlerinin aktivitesi azalmakta ve hücreye Ca^{+2} girişi artmaktadır. Bu durumda sonuçta katabolik enzimlerin aktivitesinde artışa ve endonükleaz aktivitesi ile DNA kırılmalarına sebep olan bir dizi reaksiyonu başlatmaktadır. Diyabetik sıçanlarda bir kalsiyum antagonisti olan verapamil kullanımının katarakt oluşumunu engellediği gösterilmiştir (61).

Diyabete bağlı lensteki osmotik değişiklikler sonucu elektrolit düzeyindeki değişiklikler ile katarakt oluşabilir. Yapılan bir çalışmada diyabetik ratların lens, $\text{Cl} / \text{Ca}^{+2}$ -3 ve $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{+2}$ kanal proteinlerinde artış olduğu ve bunun antioksidan bir madde olan Troloks ile zaman içerisinde normale geldiği gösterilmiştir (62).

Ayrıca lens moleküllerinin elektrostatik yapısında yaşlanma ile birlikte değişiklikler olur. Proteinlerin toplam elektrostatik yüklerinin eksiye kayması ile Ca^{+2} iyonuna affinite artar. İleri yaştaki kişilerin lens proteinlerinin Ca^{+2} içeriği belirgin artış gösterir (46).

2.4. Lipid Peroksidasyonunun Önemi Ve Malondialdehid (MDA)

Memeli hücreleri mebranları peroksidatif hasara karşı çok duyarlı olan büyük miktarda çok doymamış yağ asidi içermektedir. Bunların peroksidasyonu hücresel hasarın en önemli nedenlerinden biridir. Yağ asidi ile birleşen radikal bir dizi tepkimeyi başlatır. İlk olarak yağ asidi radikalının oksijen ile birleşmesi sonucu lipid peoksid radikali ($\text{ROO}\cdot$) meydana gelir. Bir diğer yağ asidi zincirleri ile tepkimeye giren lipid peroksid radikalleri, hidroperoksidleri oluşturmaktadır. Metal iyonlarının katkısı ile bazı enzimatik tepkimelere katılan bu peroksit ürünlerinden metan, pentan, malondialdehid (MDA) gibi yıkım bileşikler elde edilmektedir (2).

Lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA'nın toksik, karsinojenik ve mutajenik etkileri yanında yaşlanmada da rol oynadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. MDA'nın bu etkileri makromoleküllerle çapraz bağlar

oluşturabilmesine bağlıdır. MDA amino asitlerin amino grupları ve adenin, sitozin bazları ile reaksiyona girerek nükleik asitlerin yapısında değişiklikler yapar veya DNA zincir kopmasına neden olur. Kromozomal yapıda gelişen bu değişiklikler sitotoksiktir. MDA DNA'nın serbest radikaller ile parçalanması sonucu da oluşmaktadır. Tiyoarbitürik asid testi ile MDA ölçümü, besinlerde oksidatif kokuşmanın belirlenmesinde ve ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonunun tesbit edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyon ürünlerinin miktarının ölçülmesi doku hasarının bir göstergesi olabilir (2,60,63-66).

Diyabetik sıçanların lenslerinde MDA miktarı artar. Diyabette, katarakt gelişiminde oksidatif strese bağlı lipid peroksidasyonunun etkisi olduğuna ve antioksidan kullanımı ile katarakt gelişiminin engellendiği veya yavaşlatıldığına dair çalışmalar mevcuttur (67,68).

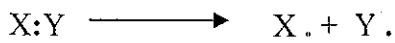
2.5. Antioksidanlar

2.5.1. Serbest Radikal Kavramı ve Oksijen Radikalleri

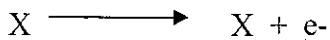
Serbest radikal, oksidan molekül veya diğer adlandırma ile reaktif oksijen türleri, moleküler veya atomik yapılarında eşlenmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir.

Serbest radikal başlıca 3 şekilde oluşabilir (69):

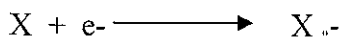
1-Kovalent bağın hemolitik ayrılması sonucu eşlenmiş elektronlardan her birinin ayrı parçada kalması ile;



2- Bir molekülün elektron kaybetmesi ile,

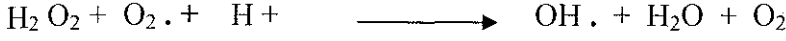


3- Bir moleküle tek bir elektron eklenmesi ile;



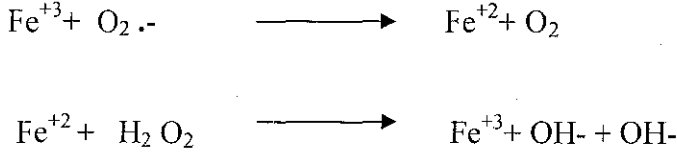
Negatif yüklü elektron sayısı çekirdekdeki pozitif yüklü proton sayısı ile eşit olmayan moleküller oldukları için serbest radikaller, elektron konfigürasyonlarını pozitif yükle dengelemeleri gerektiğinden çok reaktiftirler. Çok reaktif olan serbest radikaller tek elektronunu bir başka moleküle verebilir, bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilirler. Sonuçta radikal olmayan bir yapıyı elektron vererek radikal şekline dönüştürebilirler (69).

En reaktif ve toksik etkili radikal olan hidroksil radikali (OH .) Haber- Weiss tepkimesi ile oluşmaktadır.



Şekil 2.2. Haber- Weiss tepkimesi

Metallerin varlığında ise aynı tepkime geçiş metalleri ile gerçekleşmektedir (Fenton tepkimesi)



Şekil 2.3. Fenton tepkimesi

2.5.2. Reaktif Oksijen Metabolitlerinin Kaynakları

1- Elektron Transport Zinciri

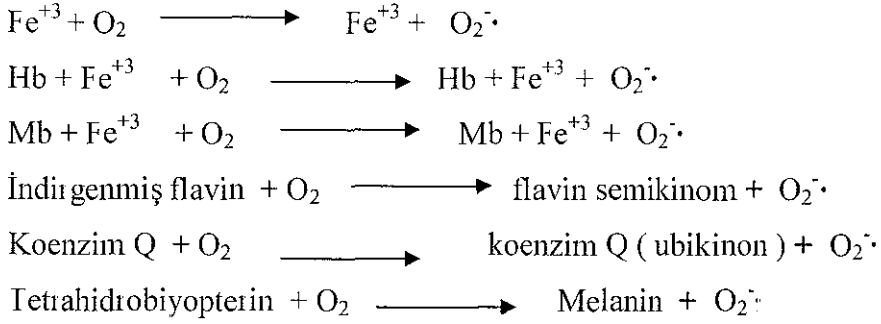
Normal koşullarda mitokondri, sitokrom oksidaz sistemi ile oksijeni suya indirgeyerek detoksifiye etmektedir. Elektron transport zincirinde yer alan pek çok birleşik (NAD, FAD, Koenzim Q gibi) oksijen ile tepkimeye girerek O₂ salınımına neden olmaktadır. Bu tek değerli oksijen kaçağı olarak tanımlanmaktadır. Bu kaçağa neden olan faktörler bilinmemektedir. Normal koşullarda bu kaçak hücrenin savunma sistemleri ile yok edilebilmektedir. Ancak oksidan stres durumunda savunma sistemleri yetersiz kalmakta ve mitokondriada hasar oluşmakta ve ATP sentezi azalmaktadır (69).

2- Enzimatik Tepkimeler

Oksijen içeren tepkimeleri katalizleyen enzimler oksidazlar veya oksijenazlar olarak sınıflandırılmaktadır. Elektronları oksijene aktaran oksidazlar oksijenin su veya hidrojen perokside indirgenmesini sağlamaktadır. Oksijenazlar oksijenin bir substratın yapısına katılmasını gerçekleştirmektedirler. Bu gruptaki enzimlerin katalizlediği tepkimelerde serbest radikaller oluşabilmektedir. Vücutta enzimatik tepkimelerde endojen olarak oksijen metabolitleri meydana gelmektedir (69).

3- Enzimatik Olmayan Tepkimeler

Otooksidasyon tepkimeleri sonucu enzimatik olmayan kaynaklardan reaktif oksijen metabolitleri oluşmaktadır (69).



Şekil 2.4. Nonenzimatik reaktif oksijen metabolit kaynakları

4- Dış Etkenler

Çeşitli dış etkenler ile reaktif oksijen metabolitleri oluşturulabilmektedir. CCl_4 , halojenlenmiş hidrokarbonlar, difenoller, kinonlar gibi kimyasallar, radyasyon, hava kirliliği, sitostatikler, pestisitler, titanyum, aliminyum, kurşun, molibden, nikel, krom, kobalt, civa, kadmiyum, arsenik gibi metaller, tetrasiklinler, aminoglikozidler, kinonlar gibi antibiyotikler, sigara ve alkol serbest radikal oluşumuna sebep olur (69)

2.6. Antioksidan Savunma Sistemeleri

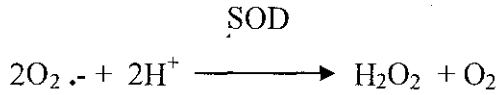
Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar bulunmaktadır. Direkt etki ile oksidanları inaktif hale getiren maddelere antioksidanlar adı verilmektedir. Tüm antioksidanlar etkilerini başlıca dört şekilde gerçekleştirirler. Enzimler oksidanları tutarak daha zayıf moleküllere dönüştürürler. Vitaminler ve flavanoidler gibi bileşikler, oksidanlara bir hidrojen katarak etkisiz hale getirirler. Oksidanların oluşturduğu hasarı onaran antioksidanlar bulunmaktadır. Ağır metaller, hemoglobin, seruloplazmin, vitamin E oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engeller.

Antioksidan moleküller kaynaklarına göre doğal antioksidanlar ve ilaçlar olarak, yöntemlerine göre koruyucu ve zincir kırıcı, yerine göre hücre içi, hücre dışı, hücre membranı veya etkisinin tipine göre enzimatik, non-enzimatik olarak sınıflandırılabilir (69,70).

2.6.1. Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

1-Superoksit Dismutaz (SOD)

Superoksit oksidoredüktaz; oksijeni metabolize eden bütün hücrelerde bulunan SOD, süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalizleyen bir metaloenzimdir. İlk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır (71,72).



Şekil 2.5. Süperoksitin SOD ile hidrojen perokside dismutasyonu

SOD, %16,53 oranında nitrojen, %1,05 oranında kükürt ve az miktarda karbonhidrat içermektedir. Protein kısmında metionin yoktur. Yapısında heksoz, heksozamin ve siyalik asit çok düşük; aspartik asit, glutamik asit ve glisin ise büyük miktarlarda yer almaktadır. Bu güne kadar 4 farklı şekli bulunmuştur. SOD'ın hücre içinde aynı reaksiyonu katalizleyen iki değişik formu vardır (69).

a) Cu/Zn-SOD: Ökaryotik hücrelerin sitozolü ile mitokondri membran aralığında bulunur, molekül kitlesi 31,2 kDa'dır. Disülfit köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir dimerik molekül için birer adet çinko ve bakır atomu içermektedir. Çinkonun stabiliteyi sağladığı bakırın ise aktiviteden sorumlu olduğu düşünülmektedir (69,73,74)

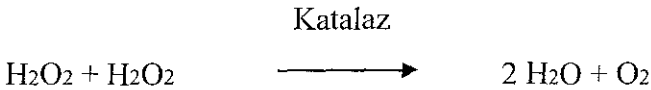
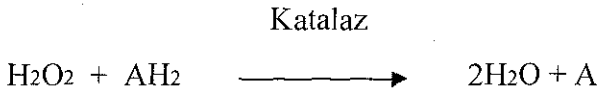
Cu/Zn-SOD oldukça kararlı bir enzimdir. Üre ve sodyum dodesil sülfat gibi organik çözücüler ile aktivitesini kaybetmez. Cu/Zn-SOD 10 µM'ten yüksek konsantrasyondaki hidrojen peroksit ile geridönüşsüz inhibe olur (75)

b) Mn-SOD: Molekül ağırlığı 40 kD civarındadır. Prostetik grup olarak mangan (Mn) içeren ökaryotik hücrelerin mitokondri matrislerinde ve çeşitli bakterilerde

bulunan bir enzimdir. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur ve her bir dimer bir Mn^{+2} içermektedir. Mitokondriyal enzim ise dört alt birim içeren ve molekül ağırlığı 80 kD olan bir tetramerdir. Mn-SOD organik çözücüler ile inhibe olur (69,76).

2- Katalaz

Hidrojen peroksit (hidrojen peroksit oksidoredüktaz): Yapısal olarak 4 ünitte oluşan bir hemoprotein olan katalazın molekül kütlesi 248 kDa'dır. Kovalent olmayan bağ ile bağlı protoporfirin IX Fe^{+3} (hem) grubu içerir. Dokularda farklı düzeylerde katalaz aktivitesi mevcuttur. Kan, kemik iliği, muköz mebranlar, karaciğer ve böbreklerde yüksek miktarda bulunmaktadır. Düşük hızlarda hidrojen peroksidin olduğu durumlarda veya ortamda yüksek miktarda elektron alıcısı bulunduğu peroksidatif, hidrojen peroksit oluşum hızının yüksek olduğu durumlarda ise katalitik tepkime ile hidrojen peroksidi suya dönüştürerek ortamdan uzaklaştırır. Etanol, metanol, asetat, askorbat hidroksilamin ve siyanid gibi maddeler ile inhibe olur (69, 77,78).



Şekil:2.6 H_2O_2 konsantrasyonuna bağlı olarak katalazın katalizlediği tepkimeler

Enzimler arasında en yüksek katalitik dönüşüm hızına sahip olduğu bilinen katalazın aktivitesi için demir gerekmektedir (69).

3 -Glutasyon redüktaz ve glutasyon peroksidaz

Glutasyon peroksidaz glutasyon ile hidrojen peroksit veya lipid peroksidlerinin indirgenmesinde glutasyon redüktaz ise glutasyonda oluşan disülfid bağlarının tekrar sülfidril yapısına indirgenmesinde görev yapmaktadır. Glutamik asit, sistein ve glisinden oluşan bir tripeptid olan glutasyon (gama-glutamilsisteinglisin), indirgenmiş (GSH) ve yükseltgenmiş (GSSG) şeklinde bulunmaktadır. Hücrenin

yükseltgenme–indirgenme dengesini koruyan önemli bir indirgen ve antioksidan olan glutatyon, hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların zararlı etkisinden korumaktadır. Proteinlerdeki - SH gruplarının korunması ve amino asitlerin hücre içine taşınmasında rol oynamaktadır. Glutatyon selenyum içeren glutatyon peroksidaz ile yükseltgenmektedir. Glutatyonun sentezi iki enzim gama-glutamilsistein sentetaz ve glutatyon sentetaz ile gerçekleşmektedir (69).

2.6.2. Non Enzimatik Antioksidan Savunma Sistemleri

1-Metal iyonlarının etkisizleşmesini sağlayan antioksidanlar

Bu grupta metal iyonlarını bağlayarak elektron transferini engelleyen bileşikler bulunmaktadır.

Bunlar ;

Demir bağlayan bileşikler; Transferin, laktoferrin, ferritin

Bakır bağlayan bileşikler; Seruloplazmin, albumin

Hem proteinleri ; Hemoglobin, haptoglobulin, hemopeksin

Diğerleri ; Metallothioneinler (5-7 adet Zn, AG, Cu, Cd veya Hg) (69)

2 - İnvivo Sentezlenebilen Düşük Moleküler Ağırlıklı Antioksidanlar

-Ürik asit; O_2^- , OH^- ve peroksit tutucu

-Ubikinon (koenzim Q); serbest radikal tutucu

-Bilirubin; peroksid radikali ve singlet oksijeni yok etmektedir

-Alfa-ketoasidler; pirüvat ve alfa-ketoglutarat H_2O_2 ile non enzimatik tepkimeye girmektedir

-Melatonin; antioksidan enzim sentezini uyarmaktadır.

-Melaninler; melanin polimerleri yapılarındaki eşleşmemiş elektronlar ile UV radyasyonun absorbe edilmesini sağlamaktadır.

-Histidin içeren dipeptidler; bakır iyonlarını şelatyon karnozin, homokarnozin ve anserin, lipid peroksidasyonunu önlemektedir.

-Tiyol içerenler; glutatyon, N- asetilsistein, metilyonin, kaptopril

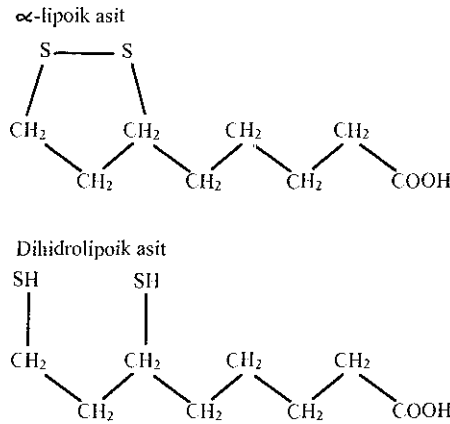
-Lipoik asit (69).

2.7. α -Lipoik Asit

α -Lipoik asit (ALA) (thioctic acid; 2-dithiolane-3 pentanoic acid; 1,2-dithiolane-3 valeric acid), püruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz enzim komplekslerinde önemli rol oynayan bir kofaktördür (Şekil 2.7) Son zamanlarda antioksidan özellikleri ile önemli derecede dikkat çeken ALA ve onun redükte formu olan dihidrolipoik aside (DHLA) ideal bir antioksidanın tüm özelliklerine sahip oldukları için evrensel antioksidanlar denmektedir. ALA'nın metabolik rolleri yıllardır bilinmektedir. ALA, ilk kez Reed ve arkadaşları tarafından izole edildikten sonra, vitaminler sınıfına dahil edilmesi önerilmiştir. Daha sonra hayvanlar ve insanlar tarafından da sentezlenebildiği gözlenmiştir (79).

ALA veya onun redükte formu olan DHLA önemli rollerinden bazıları şu şekilde özetlenebilir;

- 1 Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girer (80, 81)
- 2 Şelatlayıcı aktivite gösterir (80, 82, 83).
- 3 Lipid peroksidasyonunu azaltır (84).
- 4 Serum albümininin ve proteinlerin nonenzimatik glikasyonunu önler (82, 85-87).
- 5 DHLA formunda iken askorbat ve vitamin E'nin rejenerasyonunda rol alır (85).
- 6 Hücre içi glutatyon seviyelerini yükseltir (79,85)



Şekil:2.7. ALA ve DHLA yapıları

ALA'nın hem Tip I hem de Tip II diyabette potansiyel koruyucu veya iyileştirici etkileri rapor edilmiştir. Diyabette indüklenen polinöropati ve katarakt dahil olmak üzere, birçok komplikasyonun, oksidatif serbest radikal oluşumu ile ilgili olduğu gösterilmiştir. Diyabetik hastaların serum tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) seviyeleri diyabetik olmayanlara oranlara daha yüksek bulunmuştur. ALA ve DHLA'nın diyabette indüklenen komplikasyonları önlediği gösterildiğinden beri, bu komplikasyonlarda oksidan stresin rolü ile LA ve DHLA'nın antioksidan özellikleri arasındaki ilişki çok ilgi çekmektedir (88-90)

Deney hayvanları üzerine yapılan bazı çalışmalarda, ALA'nın diyabette sadece antioksidan özelliklerinden dolayı değil, başka sebeplerle de kullanıldığı rapor edilmiştir. Örneğin intraperitoneal ALA uygulamasının streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş sıçanların fetüslerini nöral tüp hasarından koruduğu, glisemiye düşürdüğü ve kas GLUT-4 (glukoz taşıyıcı protein) seviyelerini arttırdığı ve gentamisin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin olduğu bildirilmiştir (91- 93).

Diyabetik bireylerdeki kataraktların yüksek aldoz redüktaz seviyesi ve artmış oksidatif stres ile korelasyon gösterdiği ve bu durumun sıçan lenslerinde ALA tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir. Ayrıca yine sıçan lens, beyin, kalp, böbrek ve testislerinde ve ALA'nın lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir (23,84,94,95)

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada, ağırlıkları 230-300 gram arasında değişen, 37 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Her kafeste altı hayvan olacak şekilde muhafaza edilen sıçanlar, 12 saatlik karanlık-aydınlık periyotlarında, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $\%50\pm 5$ nem içeren koşullarda ticari sıçan yemi ve musluk suyu ile beslendiler.

3.2. Deney ve Deney Grupları

3.2.1. Taşıyıcılar

Streptozotosin (Sigma S-0130) (STZ) taşıyıcısı: soğuk sitrat tamponu (0.1 M, pH: 4.5) 0.1 M trisodyum sitrat ve 0.1 M sitrik asit

α -Lipoik asit (Sigma T-5625) (ALA) taşıyıcısı: $\%0.5$ NaOH (serum fizyolojik içinde çözüldükten sonra 1 M HCl ile pH'ı 7'ye ayarlandı)

3.2.2. Deney Grupları

10 haftalık deney süresinin başlangıcında, tüm hayvanların ağırlıkları ve kan şekeri seviyeleri (Accu-Chec marka glukometri cihazı ile ölçülen) kaydedildi. Sıçanlar rasgele olarak dört gruba ayrıldı.

1. Kontrol grubu: 10 sıçan içeren bu grup kontrol grubu olarak seçildi. Bu gruba deney başlangıcında 1 kez STZ taşıyıcısı intraperitoneal olarak enjekte edildikten sonra, 10 hafta süresince her gün intraperitoneal olarak ALA taşıyıcısı enjeksiyonu uygulandı.

2. Lipoik asit grubu: 10 sıçan içeren bu gruptaki hayvanlara, deney başlangıcında tek doz STZ taşıyıcısı uygulandıktan sonra, 10 hafta süresince her gün intraperitoneal olarak taşıyıcı içerisindeki ALA 50 mg/kg dozunda enjekte edildi.

3. Diyabet grubu: Başlangıçta 20 sıçan ile başlanan, fakat diyabet nedeni ile ölümlerden dolayı dokuz sıçan ile bitirilen bu gruptaki hayvanlara, ilk kan şekeri ölçümleri sonrası 60 mg/kg STZ enjeksiyonu tek doz ve intraperitoneal olarak uygulandı. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kan şekerleri ölçüldü ve

kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi (normal açlık kan şekeri sınırları 50-135 mg/dl). Bu sıçanlara 10 hafta boyunca her gün ALA taşıyıcısı intraperitoneal olarak enjekte edildi

4. Diyabet-Lipoik asit grubu: Başlangıçta 20 sıçan ile başlanan, fakat diyabet nedeni ile ölümlerden dolayı sekiz sıçan ile bitirilen bu gruptaki hayvanlara, ilk kan şekeri ölçümleri sonrası 60 mg/kg STZ enjeksiyonu tek doz ve intraperitoneal olarak uygulandı. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kan şekerleri ölçüldü ve kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi. Bu sıçanlara 10 hafta boyunca her gün 50 mg/kg dozunda ALA taşıyıcı içerisinde ve intraperitoneal olarak enjekte edildi.

3.2.3. Cerrahi İşlem

10 haftalık deney süresinin sonunda, bir gecelik açlık sonrası sıçanlara, tartıldıktan sonra, eter anestezisi uygulandı. Kan şekerleri kuyruk veninden bakıldı. Son açlık kan şekerleri ve ağırlıkları kaydedildi. Abdominal aortadan tüm kanları alınarak ötenazi uygulandı. Gözler, enükleasyon sonrası buz üzerindeki bir kaba alındı. Gözlerin lensleri etraf dokulardan sıyılarak alındı. Alınan her sıçanın bir çift lensi ependorf içinde bulunan 250 µl fosfat tampon salin (PBS tamponu; pH:7.4; 8.1 g NaCl, 2.302 g Na₂HPO₄, 0.194 g NaH₂PO₄, distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır) içerisine eklendi. Karışım vortekslendi. Ependorf içine alınan lensteki biyokimyasal tetkikler aynı gün içerisinde uygulandı ve bu süre içerisinde lensler buz içinde saklandı.

3.3 Metod

3.3.1 Protein Tayini

Lens içerisinde yer alan protein içerikleri, Lowry'nin metoduna göre bovine serum albümin (BSA) standardı kullanılarak ölçüldü (96).

Prensip.

Alkali şartlarda Cu⁺² iyonu proteinlerdeki peptid bağları ile tek değerli Cu⁺¹ iyonuna dönüşümün gerçekleştiği bir kompleks oluşturur. Tek değerli bakır iyonu ve

tirozin, triptofan ve sistein amino asitlerinin fonksiyonel grupları, sarı renkli Folin Ciocalteu reaktifi (polifosfomolibdik ve polifosfotungstik asit) ile reaksiyona girer ve molibdenyum ve tungsten mavisine indirgenen kararsız bir ürün oluştururlar. Oluşan mavi rengin absorbanşı 750 nm’de okunur ve standart eğri ile karşılaştırılarak değerlendirilir.

Ayırıcılar.

1. D Reaktifi:

- a. Na_2CO_3 (%2 susuz) 10.0 ml
- b. CuSO_4 (%1) 0.1 ml
- c. Na-K tartarat 0.1 ml

2. NaOH (1 N)

3. Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF reaktifi) (Sigma F-9252): FCF, protein tayini için, distile su ile 1/1 oranında dilüe edilerek kullanıldı.

4. Bovin serum albumin (BSA) (Sigma A-7906): 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 g/ml’lik konsantrasyonlarda protein standardı olarak kullanılan çözelti hazırlandı ve kullanıldı.

Yöntem.

Örneklerdeki protein miktarının belirlenmesi, aşağıdaki prosedüre göre yapıldı.

	Kör (µl)	Standart (µl)	Numune (µl)
Distile su	25		
Standart		25	
Numune			25
NaOH	25	25	25
D Reaktifi	250	250	250
	Oda sıcaklığında ve karanlıkta 20 dakika inkübe edildi		
FCF reaktifi	25	25	25
	Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildi.		
Distile su	500	500	500

Kör, standart ve numune tüpleri karıştırıldıktan sonra numuneler 750 nm’de köre karşı okundu ve protein konsantrasyonları standart grafiğine göre mg/ml olarak hesaplandı. Sonrasında SOD, CAT ve MDA aktiviteleri mg protein başına hesaplanmıştır.

3.3.2. Cu/Zn Bağımlı Süperoksit Dismutaz (Cu/Zn-SOD) Tayini

Cu/Zn-SOD aktivitesi, Misra ve Fridovich’in yöntemine göre ölçüldü (97)

Prinsip.

Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun, Cu/Zn-SOD ile inhibisyonunun yüzdesine göre, enzim aktivitesi hesaplanır. Adrenokromun 480 nm’de vermiş olduğu maksimum absorbans değişikliği, SOD inhibisyonu ile ilişkilidir.

Ayırıcılar.

1. Na_2CO_3 / NaHCO_3 tamponu (0.3 M, pH: 10.2)
2. EDTA (0.075 mM)
3. Epinefrin HCl (1.8 mM, pH: 2) (Sigma E-4642): 0.01 M HCl ile günlük hazırlanır.

Yöntem.

Tampon ile gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra aşağıdaki yöntem uygulanır.

	Kontrol (µl)	Numune (µl)
Tampon	110	110
EDTA	80	80
Numune (dilüe edilmiş)		150
Tampon	150	
Epinefrin	100	100

Epinefrin eklendikten ve tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 480 nm’de ve 30°C tampon körne karşı, kontrol ve numune tüplerindeki absorbans artışları üç dakika süresince kaydedildi.

Standart Hazırlanması.

Potasyum fosfat tamponu (20 mM, pH: 7.4) içinde 0.0625, 0.125, 0.25 ve 0.5 µg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlanan Cu/Zn-SOD standartları (bovine eritrosit SOD, Sigma S-2515) numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar üç kez çalışılarak ortalamaları alındı.

Aktivitenin Hesaplanması:

Kontrol tüpünde, epinefrinin otooksidasyonunun Cu/Zn-SOD ile inhibisyon yüzdesi sıfırdır. Çünkü, kontrol tüpünde gerçekleştirilen deneyde enzim yoktur. Bu tüpte, epinefrin kolayca nonenzimatik olarak adrenokroma dönüşecektir. Bu nedenle, kontrol tüpündeki inhibisyonun yüzdesi sıfırdır. Standart ve numune tüplerindeki inhibisyon yüzdeleri, Cu/Zn-SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

ΔOD / dk (kontrol)	100 aktif birim
--------------------	-----------------

ΔOD / dk (standart)	X
---------------------	---

$$X = [(\Delta OD / dk (\text{standart})) / (\Delta OD / dk (\text{kontrol}))] \times 100$$

$$\text{Standartın \% inhibisyon değeri} = 100 - X$$

ΔOD / dk (kontrol)	100 aktif birim
--------------------	-----------------

ΔOD / dk (numune)	Y
-------------------	---

$$Y = [(\Delta OD / dk (\text{numune})) / (\Delta OD / dk (\text{kontrol}))] \times 100$$

$$\text{Numunenin \% inhibisyon değeri} = 100 - Y$$

Numunenin yüzde inhibisyon değeri bulunduktan sonra, bu değerler standartların regresyon analiz sonuçlarından elde edilen formülde yerine kondu. Sonuçlar U/mg protein şeklinde verileceği için, numunenin son hacmindeki protein değeri hesaplandı ve mg protein başına enzim aktivitesi bulundu.

3.3.3. Katalaz Aktivitesinin Tayini

Katalaz aktivitesi, Aebi'nin yöntemine göre ölçüldü (98).

Prinsip.

Katalaz aktivitesinin tayini, H_2O_2 'nin katalaz tarafından O_2 ve H_2O 'ya parçalanması sırasında, H_2O_2 'nin azalan absorbansının 240 nm'de ölçümü esasına dayanır.

Ayrıştırıcılar.

1. Fosfat tamponu (50 mM, pH: 7.0):

a. 6.81 g KH_2PO_4 : bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanır

b. 8.90 g Na_2HPO_4 : bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanır

Solüsyonlar a ve b sırası ile 1:1.5 oranında karıştırılır.

2. H_2O_2 (30 mM): 0.34 ml %30'luk H_2O_2 , fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır. Fosfat tamponu 2°C'de stabildir. H_2O_2 ise taze hazırlanmalıdır.

Yöntem.

Katalaz aktivitesinin ölçümü için gerekli dilüsyonlar fosfat tamponu ile yapıldıktan sonra aşağıdaki prosedür uygulandı.

	Kör (µl)	Numune (µl)
Fosfat tamponu	200	
Dilüsyon uygulanmış numune		200
H_2O_2	100	100

Reaksiyon, H_2O_2 eklenmesi ile başlatıldı. Başlangıç absorbansının 500 civarında olmasına dikkat edildi. 15 saniye süresince 240 nm'de ve 25°C'de absorbans azalışı kaydedildi.

Aktivitenin Hesaplanması.

Katalaz aktivitesi, birinci dereceden reaksiyon hız sabiti (k) kullanılarak hesaplandı.

$$k = 2.3 / \Delta t \times \log (A_0 / A_{15}) s^{-1}$$

$$k = 2.3 / 15 \times \log (A_0 / A_{15}) s^{-1} = 0.153 \times \log (A_0 / A_{15}) s^{-1} (ml)$$

Litredeki değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpılır.

$$k = 153 \times \log (A_0 / A_{15}) s^{-1} L^{-1}$$

k : birinci dereceden reaksiyon hız sabiti

A_0 : 0. saniyedeki absorbans değeri

A_{15} : 15. saniyedeki absorbans değeri

Anormal kinetiği nedeni ile katalaz ünitesi için “birinci derece reaksiyon sabiti” (k) kullanılır ve katalazın spesifik aktivitesi protein ile ilişkilendirilmiş şekilde k / mg protein olarak verilir

3.3.4. Malondialdehit Tayini

MDA düzeyleri, Gümüşlü ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemleri kullanılarak ölçüldü (99,100).

Prensip.

Bu metodun temel prensibi, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın 1 molünün 2 mol 2-tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan bileşiğin, asidik ortamda n-bütanol fazına ekstrakte edilerek, 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanır

Ayırıcılar.

1. 2-tiyobarbitürik asit (TBA) (29 mM): 8 75 M asetik asit içinde hazırlanır
2. Hidroklorik asit (HCl) (5 M)
3. n-bütanol
4. 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma T-9889)

Yöntem.

	Numune (μ l)
Numune	50
Distile su	1000
TBA	1000
	60 dakika 100°C'de su banyosunda inkübe edildi. Sonrasında musluk suyu ile oda sıcaklığına kadar soğutuldu.
HCl	25
n-bütanol	3500

Tüpler 1 dakika vortekslendi. Floresansı ölçülecek olan MDA, numunelerin 3000 x g'de 10 dakikalık santrifüjü sonucu bütanol fazına geçirildi. Bütanol fazının floresansı 525 nm eksitasyon ve 547 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometrede ölçüldü. MDA konsantrasyonları, grafikten nmol / ml olarak hesaplandı. MDA sonuçları, nmol / mg protein şeklinde verildi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Tüm sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata şeklinde verildi. İstatistiksel değerlendirmeler, SPSS 10.0 paket programı ile bilgisayarda yapıldı. Tüm gruplardaki sıçanların, lenslerinde ölçülen parametrelerin ve kan glukoz değerlerinin karşılaştırılması "Mann-Whitney U" testi kullanılarak yapıldı. $P < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

3.5. Kullanılan Laboratuvar Malzemeleri

3.5.1. Gereçler

1. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601
2. Spektrofotometre: Shimadzu RF-5000
3. Su banyosu: Precitherm PFV-Boehringer Mannheim
4. Santrifüj: Heraeus Sepatech Labofuge 200
5. Hassas terazi: Sartorius 2472
6. Test tüpleri: 16x160 mm
7. Ependorflar
8. Otomatik pipetler: Biohit marka; 5-50, 50-200, 200-1000 μ L'lik
9. Cam pipetler: 1, 2, 5 ve 10 mL'lik, serolojik
10. Cam balon jojeler, beherler ve erlen mayerler

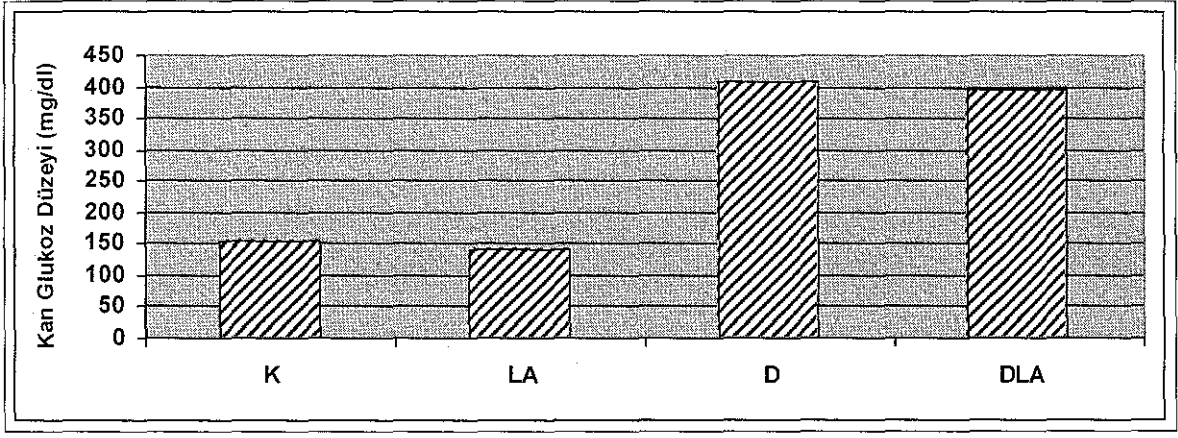
3.5.2. Kimyasal Malzemeler

Tüm kimyasal maddeler "Sigma" ve "Merck" ten temin edildi.

4. BULGULAR

4.1. Kan Şekeri Düzeyleri

Dört grupta yer alan hayvanların son açlık kan şekeri düzeyleri şekil 4.1 ve çizelge 4.1’de verilmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, diyabetik olmayan gruplarda, diyabetik gruplara oranla kan şekeri düzeyi anlamlı derecede düşük olarak saptanmıştır ($p < 0.001$). Buna karşın, lipoik asit uygulaması ile birlikte görülen kan şekeri seviyesindeki değişiklikler anlamlı değildir ($p > 0.05$).



K: Kontrol, LA: Lipoik asit, D: Diyabet DLA: Diyabet + Lipoik asit

Şekil 4.1. Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri (mg/dl)

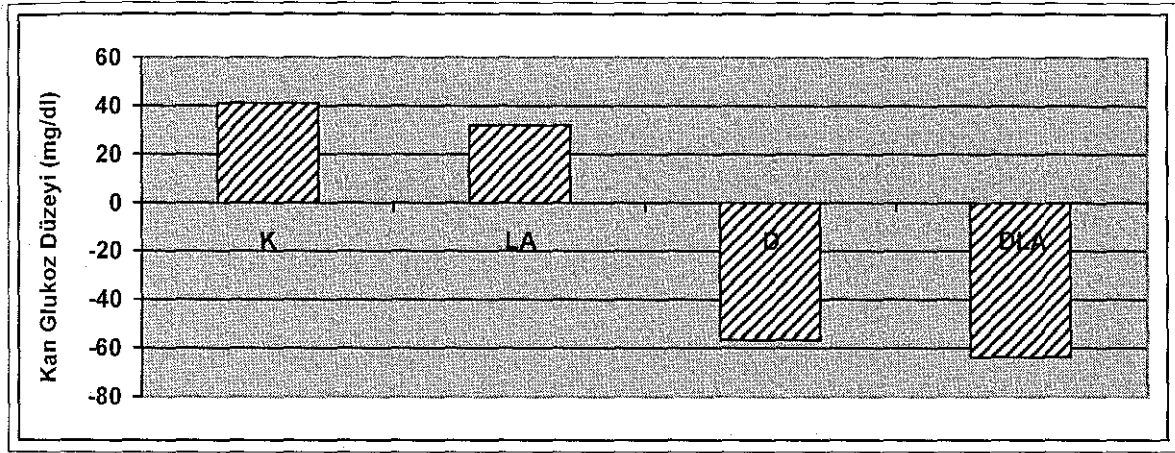
Çizelge 4.1 Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri (mg/dl)

Grup	Kan Şekeri Düzeyleri (ortalama ± standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	155.20 ± 4.40	
Lipoik asit grubu (LA)	141.40 ± 4.81	a: $p > 0.05$
Diyabet grubu (D)	409.33 ± 17.85	b: $p < 0.001$ c: $p < 0.001$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	395.25 ± 12.31	d: $p < 0.001$ e: $p < 0.001$ f: $p > 0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması. ($p < 0.005$ için)

4.2. Kilo Değişimleri

Dört grupta yer alan sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farklar çizelge 4.2 ve şekil 4.2'de verilmiştir. Diyabetik gruplarda bulunan hayvanların ağırlıklarında azalma saptanırken, diyabetik olmayan gruplarda ise artış görülmüştür. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde, diyabetik gruplar ile diyabetik olmayan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p < 0.001$). Buna karşın, lipoik asit uygulaması ile birlikte görülen değişiklikler anlamlı değildir ($p > 0.05$).



K: Kontrol, LA: Lipoik asit, D: Diyabet DLA: Diyabet + Lipoik asit

Şekil 4.2 Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)

Çizelge 4.2 Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)

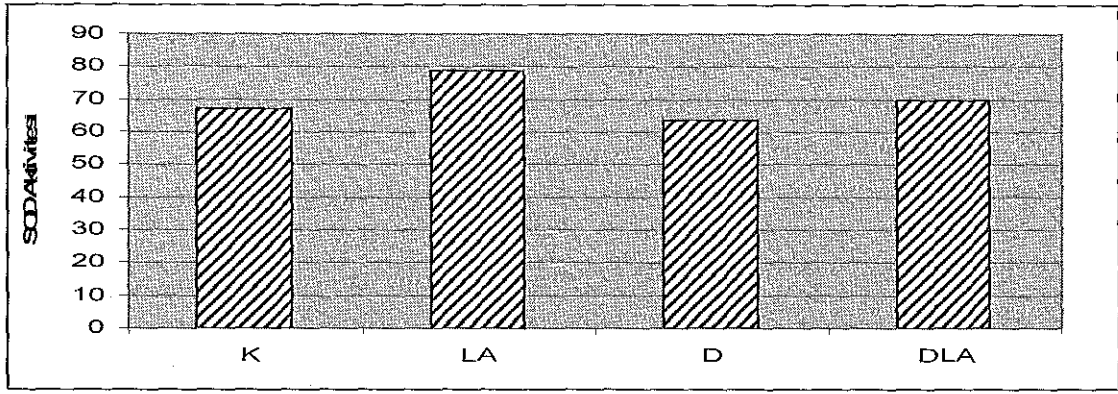
Grup	Kilo Değişimleri (ortalama ± standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	41.00 ± 2.08	
Lipoik asit grubu (LA)	32.00 ± 4.84	a: $p > 0.05$
Diyabet grubu (D)	- 56.56 ± 7.13	b: $p < 0.001$ c: $p < 0.001$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	- 63.75 ± 4.98	d: $p < 0.001$ e: $p < 0.001$ f: $p > 0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması ($p < 0.05$)

4.3. Lens Enzim Aktiviteleri Değerlendirilmesi

4.3.1 . Lenslerin SOD Aktiviteleri

Lenslerdeki SOD aktiviteleri çizelge 4.3 ve şekil 4.3’de verilmiştir. İstatistiksel olarak diyabetik gruplar diyabetik olmayan gruplar arasında SOD aktivitesi açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Kontrol grubuna göre Lipoik asit grubunda SOD aktivitesi anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.01$). Lipoik asit grubunda diyabet olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede SOD aktivitesi bulunmuştur ($p < 0.05$).



K: Kontrol, LA: Lipoik asit, D: Diyabet DLA: Diyabet + Lipoik asit

Şekil 4.3. Grupların lens SOD değerleri (U/mg protein)

Çizelge 4.3. Grupların lensteki SOD aktivite değerleri (U/mg protein)

Grup	SOD (ortalama ± standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	67,35 ± 2,53	
Lipoik asit grubu (LA)	78,72 ± 2,99	a: $p < 0.01$
Diyabet grubu (D)	63,36 ± 3,78	b: $p > 0.05$ c: $p < 0.05$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	69,96 ± 3,71	d: $p > 0.05$ e: $p > 0.05$ f: $p > 0.05$

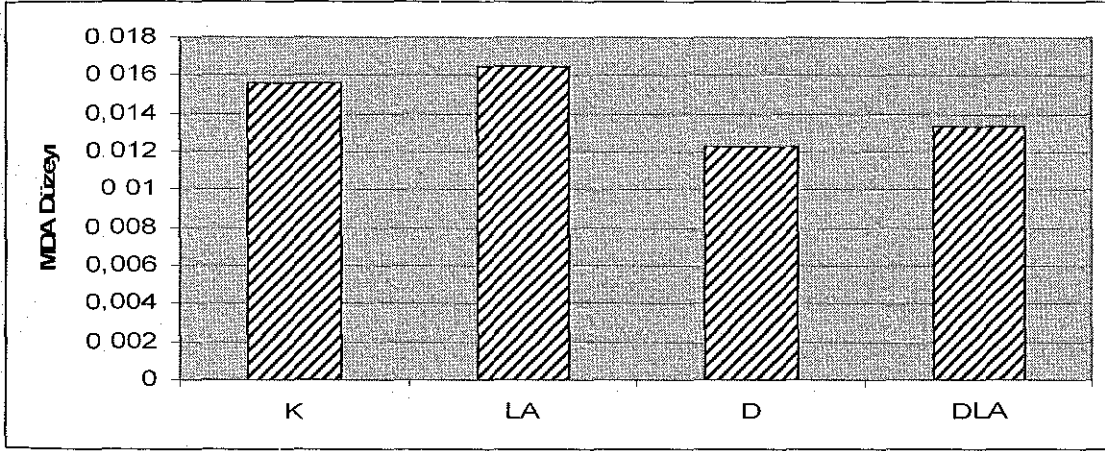
a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması ($p < 0.05$)

4.3.2. Lens CAT Aktiviteleri

Lensteki CAT aktivitesi tüm gruplarda ihmal edilecek kadar düşüktü. Bazı lenslerde hiç izlenmedi.

4.3.3 Lens MDA Değerleri

Lensteki MDA değerleri çizelge 4.4 ve şekil 4.4'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, hiçbir grupta MDA düzeyleri açısından anlamlı fark bulunamamıştır ($p>0.05$).



K: Kontrol, LA: Lipoik asit, D: Diyabet DLA: Diyabet + Lipoik asit

Şekil 4.4. Grupların lens MDA düzeyleri(nmol/mg protein)

Çizelge 4.4. Grupların lenslerdeki MDA değerleri (nmol/mg protein)

Grup	MDA (ortalama $\pm$ standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	0,0156 $\pm$ 0,00145	
Lipoik asit grubu (LA)	0,0165 $\pm$ 0,00087	a: p>0.05
Diyabet grubu (D)	0,0123 $\pm$ 0,00105	b: p>0.05 c: p>0.05
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	0,0133 $\pm$ 0,00130	d: p>0.05 e: p>0.05 f: p> 0.05

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması. (p<0.05)

5. TARTIŞMA

Dünya üzerinde yaklaşık 150 milyon kişiyi etkileyen diyabet akut ve kronik komplikasyonları ile ekonomik ve sosyal açıdan tüm toplumlar için büyük bir yüküdür. Diyabetin kronik komplikasyonları arasında mikroanjiyopatiye bağlı retinopati, nefropati ile makroanjiyopatiye bağlı koroner kalp, periferik vasküler, serebrovasküler hastalıkların yanı sıra vasküler ve yapısal doku değişikliklerine bağlı nöropati ile katarakt bulunmaktadır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının en önemli nedeninin kronik hiperglisemi olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Normal kan glukoz düzeyinin sağlanması bu komplikasyonların gelişimini engellemekte veya azaltmaktadır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının patogeneğinde etkili olan faktörler arasında proteinlerin glikasyonunda artış, poliol yolunda artmış aldoz redüktaz aktivitesi, intrasellüler sinyal transdüksiyonunda değişiklik, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalma, TXA_2 ve endotelin gibi bazı vazokonstriktörlerde artış, PGI_2 ve NO gibi vazodilatatörlerde azalma, reaktif oksijen ürünleri ve serbest radikallerin oluşumunda artma gibi pek çok faktör yer almaktadır (69).

Bu nedenle diyabete ait komplikasyonların önlenmesinde şu an kullanılan insülin, asetoheksamid, glipizid, talbutamid gibi ilaçlar hiperglisemiyi önlemeye yönelik ilaçlardır.

Diyabetin en önemli belirtici açlık kan şekeri (AKŞ) seviyelerinin yükselmesidir. Çalışmamızda diyabetik diyebilmek için sıçanlarda AKŞ alt sınırını 250 mg/dl olarak belirledik. Diyabet ve lipoik asit + diyabet gruplarındaki sıçanların AKŞ değerleri belirlediğimiz sınırın üstündeydi ve kontrol ve sadece lipoik asit verilen gruplarındaki sıçanların AKŞ değerlerine oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu bize streptozosin ile sıçanları başarılı bir şekilde diyabetik hale getirdiğimizi gösterdi. (101,102).

Diyabetin komplikasyonlarının önlenmesinde ALA'nın güçlü antioksidan etkisi nedeni ile etkili olduğu görülmektedir. Bunun yanında literatürde ALA'nın kan glukoz düzeyini düşürdüğü bildirilmiştir. Sun ve Zhang yaptıkları bir çalışmada kontrol, diyabet ve diyabet + ALA olmak üzere üç rat grubu oluşturmuşlar ve ALA'nın 80.gün sonunda glukoz düzeyini anlamlı derecede düşürdüğünü belirlemişlerdir (103).

ALA'in izole edilmiş sıçan diyaframı, kalbi ve kültürü yapılmış miyotübüller gibi çeşitli dokularda insüline bağımlı glukoz taşıyıcı reseptörler olan GLUT-1 ve GLUT-4 üzerinden glukozun hücre içine alımını arttırdığı saptanmıştır (103-106).

Başka bir çalışmada Tip II diyabet hastalarına intravenöz olarak uygulanan ALA'in hücelere glukoz geçişini arttırdığı görülmüştür (107).

Diyabetik hastalarda anabolik bir hormon olan insülin eksikliğinden dolayı ve katabolik hormonların da etkisi ile kilo kaybı olur. Benzer şekilde çalışmamızda diyabet ve lipoik asit + diyabet gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıkları, kontrol ve lipoik asit gruplarına ait sıçanların vücut ağırlıklarına oranla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p < 0.005$) (108,109).

Buna karşın, Obrosova ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdukları sıçan gruplarında ALA kullanımı ile kan glukoz konsantrasyonları ve kilo kaybında düzelme saptamamışlardır (110).

Çalışmamızda diyabetik rat grupları arasında ALA verilen gr grubun kan glukoz düzeyi diyabet olup ALA verilmeyen gruptan biraz düşük olmakla beraber bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ayrıca diyabet ile diyabet + lipoik asit grubu arasında kilo açısından anlamlı bir fark yoktu. Bu sonuç Obrosova ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ve ALA'nın glukoz düzeyini etkilemediği tezi ile uyumludur.

Yapılan çalışmalarda, ALA, oral, intraperitoneal, intramusküler, intravenöz ve subkutan olarak uygulanabilmektedir. ALA'in çeşitli dozları denenmiş, genellikle gittikçe artan dozların daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda literatürde çoğunlukla kullanılmış olan intraperitoneal 50 mg/kg/gün dozu kullanılmıştır ve bu doz sabit tutulmuştur. ALA'in kan glukoz düzeyine etki ettiği çalışmalarda kullanılan doz 100 mg/kg'dir. Kullandığımız dozun düşük olması ALA'in bu etkisinin ortaya çıkmamasının nedeni olabilir (89,90,92,111-118).

Diyabete bağlı hiperglisemi oksidatif stresi artırmaktadır. Hiperglisemi glikooksidasyon denilen glukozun otoksidasyonu ve enzimatik olmayan glikasyon ile diyabetik dokularda serbest radikallerin artışına katkıda bulunur. Oksidatif strese artışın diğer nedenleri ise düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların doku konsantrasyonunda azalma ve antioksidatif savunma enzimlerinin aktivasyonunda zayıflamadır (58,119-122).

Glikooksidasyonda oksijen atomu elektronlarından birini kaybederek negatif yüklü ve dengesiz bir molekül olarak serbest radikal haline gelir. Oluşan bu serbest radikal, çok reaktiftir ve ortamdaki başka molekülden bir elektron alarak yeni bir serbest radikal oluşumuna neden olur. İlk oluşan serbest radikal süperoksit anyonu (O_2^-), dur ve daha protonlu formu olan perhidroksil radikali (HO_2^-) bunu takip edebilir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ortamda demir iyonu olduğu durumlarda hücreler ve dokular için en zararlı serbest radikal formu olan hidroksil radikaline (OH^-) dönüşür. Oksidatif hasardan korunmak için çeşitli antioksidan mekanizmalar mevcuttur. Oksidatif stresi kompanse etmek için en basit yol vücutta süperoksit dismutaz ve katalazı içeren antioksidan seviyelerini arttırmaktır. Oksidatif durumu ve doku hasarını göstermek için en geçerli bulgular bu enzimlerin enzimatik aktivitelerindeki değişimdir (123).

Dokularda oksijen radikallerinin varlığını göstermek için birçok metod geliştirilmiştir. Artmış oksijen radikallerinin direkt olarak tespiti yüksek oranda reaktif ve kısa ömürlü olmaları ve hızla katalize edilmeleri nedeniyle oldukça zordur. Bu nedenle metodların çoğunda, oksijen radikallerinin varlığı, neden oldukları doku hasarının antioksidanların kullanımı ile azalmasının gösterilmesi ile birlikte indirekt olarak tespit edilmektedir (124).

Antioksidan enzimler, lenste oksijen radikalleri ile oluşan hasarlardan korumada hayati bir öneme sahiptir. Süperoksit dismutaz enziminin bakır-çinko ve manganez içeren iki türü, süperoksit iyonunu hidrojen peroksite çevirir. Hidrojen peroksit iyonu daha reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikaline dönüşebilir. Bu nedenle, süperoksit dismutaz enzimi, aktivitesinin etkili olabilmesi için katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte reaksiyon gösterirler. Bu iki enzim, hidrojen peroksit radikalini toksik olmayan ürünler olan su ve moleküler oksijene çevirirler. Bu üç enzimin kombine etkisi, oksidatif hasarı engellemede önemli bir metabolik yolu oluştururlar (69).

Diyabetik katarakt gelişiminde ozmotik yol ve oksidatif stres mekanizmaları 1980 'den önce bilinmelerine karşın iki mekanizmadan hangisinin etkin olduğu halen tartışmalıdır. Seksenli ve 90'lı yıllarda yapılan bazı çalışmalar, diyabette artmış sorbitol yolu aktivitesi ile oksidatif hasar arasındaki ilişkiye işaret etmiştir (45,121,125-128).

Fruktoz ve sorbitol yolu deriveleri olan fruktoz -3- phaospahate, 3 deoksiglukozon reaktif oksijen ürünlerinin oluşmasına sebep olan glikasyon ajanlarıdır. Oksidatif zedelenme GSH, E ve C vitaminleri gibi nonenzimatik antioksidanların tüketilmesine sebep olur. Başka bir teoriye göre sorbitol birikimi oksidatif hasara katkıda bulunmaz ancak AR ve indirgenmiş glutatyonun kullandıkları NADPH'ın azalmasına sebep olur. Sonuçta sorbitol birikimi ve ozmotik stres oksidatif hasarı ve dolayısı ile lipid peroksidasyonunu arttırarak diyabetik katarakta gelişimine neden olur. Oksidatif strese bağlı hasar diyabetik katarakt gelişiminde tek başına etkili olduğu gibi öne sürülen diğer mekanizmalardaki hasara da aracılık etmektedir (23,121,127-132).

Swamy-Mruthinti ratlarda lens opsisifikasyonu ile glukoz düzeyi arasındaki ilişkiyi incelemişler ve yaklaşık 180 mg/dl'lik glukoz değerinden büyük değerlerde glikozillenme ve glikooksidasyonun artmaya başladığını ve katarakt geliştiğini bulmuşlardır (133).

Diyabetik ve ve senil katarakt gelişiminde artmış oksidatif stresin ve azalmış antioksidan savunma sistemlerinin diğer yollara oranla daha önemli rolü olduğunu belirtilmektedir. Malon ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada diyabetik katarakt gelişiminde H_2O_2 birikimi, lipid peroksidasyonunun indüklediği suda erir proteinlerin agregasyonu ve mebran yapılarında parçalanmanın katarakt proçesinde ozmotik fenomenden daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Ozmen ve arkadaşları diyabetik kataraktlı lensler ile senil kataraktlı lensleri karşılaştırmışlar, diyabetik grupta SOD ve katalaz aktivitesini düşük bulmuşlardır (45,55).

Yarat ve arkadaşları diyabetli ratların lenslerinin lovry yöntemi ile nonenzimatik glikasyon ve glutatyon seviyelerine bakmışlar glutatyon miktarını azalmış, nonenzimatik glikolizlenmiş protein oranını ve elektroforezle yüksek molekül ağırlıklı protein oranını yüksek bulmuşlardır (53).

Babizahev ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kataraktlı insan lenslerini incelemişler ve normal lenslere göre artmış H_2O_2 miktarı bulmuşlardır. Ayrıca lipid peroksidasyon ürünlerini vitreusa injekte etmişler ve indirgenmiş glutatyon azalmasının eşlik ettiği bir arka subkapsüler katarakt gelişimi izlemişlerdir (134).

İlk olarak Reed ve arkadaşları tarafından izole edilen ve son zamanlarda antioksidan özellikleri ile önemli derecede dikkat çeken ALA ve onun redükte formu

olan DHLA'e evrensel antioksidan denmektedir ALA'in Süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, hipokloröz asit, peroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijenleri ile direkt reaksiyona girerek deaktive etme özelliği yanında, şelasyon, lipid peroksidasyonunu azaltıcı, nonenzimatik glikasyonu engelleyici, askorbat ve vitamin E gibi antioksidan vitaminlerin rejenerasyonunu artırıcı, hücre içi katalaz, SOD, glutatyon gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini artırıcı etkileri vardır (79-85).

İnsan çalışmaları olmamasına rağmen hayvan deneylerinde gerek glukoz ortamında inkübe edilmiş lensler gerekse diyabetik hayvan modellerinde ALA diyabetik katarakt gelişimini önlemektedir ALA aköz hümore katılarak, yağ asidi taşıyıcı moleküller yardımı ile lense girer ve DHLA'e dönüşür. DHLA lens içerisinde hidroksil radikali, singlet oksijen, HCl'i detoksiifiye eder. Süperoksit ve H₂O₂ yıkımını sağlar lipid peroksidasyonunu azaltır. Vitamin C, vitamin E ve glutatyon rejenerasyonuna yardımcı olur. Vitaminlerindeki artış GSH yıkımının azalması ile sonuçlanır (135,104).

Alfa lipoik asitin diyabete bağlı kataraktı engellemesinde diğer bir mekanizma ise, aldoz redüktazın inhibisyonudur Borenshtein ve ark ALA tedavisi ile tip II diyabet oluşturulan sıçanlarda aldoz redüktaz aktivitesini azaltarak ve GSH seviyesini arttırarak katarakt gelişiminin engellemişlerdir. Maitra ve ark butionin sülfoksimin ile oluşturulmuş yenidoğan sıçan kataraktında R-ALA ve S-ALA'in etkilerini karşılaştırmışlar ve R-ALA'in katarakt oluşturma yüzdesini %100'den % 55'e indirdiğini ve lens antioksidanlarını koruduğunu görmüşlerdir. Buna karşın S-ALA katarakt oluşumu üzerine etkili değildir (136,137).

Obrosova ve ark Diyabetik ratlarda intraperitoneal 25 ile 100 mg/kg dozda kullandıkları ALA ile katarakt gelişimini azaltmışlardır. Thirunavukkarasu ve ark böbrek ve karaciğerde antioksidan ve lipid peroksidasyonu engelleyici etkiyi ALA'i zeytinyağı ile birlikte intraperitoneal olarak 35 mg/kg ve 70 mg /kg olmak üzere iki farklı dozda kullanarak elde etmişlerdir. Arivazhagan ve ark 7-14 gün intraperitoneal olarak 100 mg/kg dozda uyguladıkları ALA'in lipid peroksidasyonu üzerine etki ettiğini göstermişlerdir. Malarkodi ve ark 'nın yaptığı çalışmada adriyamisine bağlı nefrotoksiteyi önlemede intraperitoneal olarak 35 mg/kg ALA'in etkili olduğunu göstermişlerdir. Maritim ve ark diyabetik ratlarda kullanılan 50

mg/kg ALA ile hepatik katalaz, böbrekte glutatyon peroksidaz, kalpte SOD aktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Nagamatsu ve ark. diyabetik sıçanların sinir liflerinde oluşan oksidatif stresin ALA'in artan dozlarıyla (25, 50, 100 mg/kg) engellendiğini ispatlamışlardır (24,81,84,113,138,139)

ALA'in kalp, karaciğer, böbrek gibi dokulardaki antioksidan özellikleri 25 mg/dl'den başlayarak dozdaki artışa paralel olarak artmaktadır. Bizim çalışmamızda ise, ALA diyabetik ve diyabetik olmayan iki gruba günlük 50 mg/kg dozunda 10 hafta boyunca uygulandı. Bu maddenin antioksidan etkisi, hücre içi antioksidan enzimlerinden süperoksit dismutaz, katalaz ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit kullanılarak belirlemeye çalıştık.

Lens metabolizması yavaş vasküler beslenmesi olmayan braditrofik bir dokudur. Metabolik olarak en aktif yer lensin kapsülüdür. Kapsül epitel hücreleri lensin büyümesinden ve madde alışverişinden sorumludur. Enzim aktivitesinin büyük kısmı lensin kapsülünde yer alır (46).

Biz hiçbir grupta katalaz aktivitesine rastlayamadık. Her ne kadar literatürde lenste katalaz aktivitesi olduğuna dair yayınlar olsa da bu yayınların çoğunda lensin enzim aktivitesi diğer dokulardan daha düşük çıkmaktadır. Çalışmamızdaki bu sonuç yöntemsel bir hatayı akla getirmektedir. Fakat aynı yöntem ile yapılan benzer şekilde dizayn edilmiş Günerli ve Gözkaya'nın çalışmalarında sırası ile rat retina ve vitreusunda katalaz aktivitesi saptanmıştır. Bu çalışmalardaki katalaz aktivitesi SOD aktivitesinden düşük bulunmuştur. Çalışmamızda lenste katalaz aktivitesi saptayamayamızın nedeni lens enzim aktivitesinin ve özellikle katalaz aktivitesinin düşük olması olabilir (140,141).

Çalışmamızda lens SOD aktivitesi açısından ALA grubunda kontrol grubuna ve diyabetik gruba göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. Bu sonuç ALA'in antioksidan aktiviteyi arttırdığı izlenimi uyandırsa da istatistiksel olarak ALA diyabetik rat grupları arasında SOD aktivitesi açısından anlamlı bir fark yoktu. ALA grubunun lens SOD aktivitesi diyabet grubundan yüksek çıkmıştı. Buna karşılık kontrol grubu ile diyabet grubu arasında lens SOD aktivite değeri açısından anlamlı bir fark yoktu. Bu durum diyabetin lens SOD aktivitesi üzerindeki net etkisini anlamamızı güçleştirmektedir.

Çalışmamızda lipid peroksidasyon göstergesi olarak değerini ölçtüğümüz malondialdehit değerleri çok düşüktü. Ayrıca rat grupları arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Çalışmamızdaki bu sonucun nedeni lens fibrillerinin çok doymamış yağ asidi oranının çok düşük olması olabilir. Benzer şekilde Apaydın'ın diyabetik rat retina ve lenslerinde MDA incelediği çalışmada lens MDA düzeyi retindan düşüktür (142)

Bizim çalışmamız diyabetin lens antioksidan enzim aktivitesini azalttığını ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'ı arttırdığını ve ALA'nın bunu engellediği tezini desteklememektedir

Lens metabolizması yavaş bir dokudur her ne kadar günlük intraperitoneal 25 mg/kg dozundan itibaren kullanılan ALA bir çok diyabetik dokuda oksidatif stresi engellemede başarılı olsada lensteki antioksidan etkisi daha yüksek dozlarda ortaya çıkmaktadır. Bizim çalışmamızda kullanılan ALA'nın dozu 50 mg/ dl'dir. Bu doz diyabetik lenslerde antioksidan etkisinin ortaya çıkmamasının sebebi olabilir. Daha yüksek ALA dozları çalışmaları yapılması ALA'nın diyabetik lenslerin antioksidan sistemi üzerine etkisinin daha net anlaşılmasını sağlayabilir.

6. SONUÇLAR

1. Streptozotosin uygulanmış hayvanlarda kontrol grubuna göre 10 hafta sonra ölçülen kan şekeri düzeyleri ve kilo kaybı anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuş ve bu grupta yer alan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir.
2. Sıçan gruplarının hiç birinde lens katalaz aktivitesi bulunmamıştır.
3. Sıçan gruplarından sadece ALA verilen grubun lenslerinde SOD aktivitesi diyabet grubu ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.
4. Sıçan gruplarının hepsinde lens MDA düzeyi düşük bulunmuştur. Diyabetin ve ALA'nın MDA düzeylerine istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmamıştır.
5. Evrensel antioksidan olarak tanımlanmış olan ALA'nın 50 mg/kg dozunda 10 hafta boyunca her gün intraperitoneal olarak uygulanması ile hayvanların kan şekeri seviyesinde düzelme görülmemesi insülin yokluğunda ALA'nın glukozun hücre içerisine girişini etkilemediği tezi ile uyumludur.
6. Tedavi amacı ile ALA'nın kullanıldığı sıçan gruplarının lenslerinde malondialdehit seviyesinde azalma ve antioksidan enzimler olan katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artış gösterilmemiş olması 50 mg/kg dozunda kullanılan ALA'nın diyabete bağlı olarak lenste oluşan oksidatif stresin önlenmesinde yetersiz kaldığını ayrıca kullanılan yöntemin yeterince hassas olmadığını düşündürmektedir.

ÖZET

Amaç: Diyabetik kataraktın gelişiminde, hiperglisemiye bağlı oksidatif stres artışı ve antioksidan enzim aktivitesinde azalmanın etkisi vardır. Alfa lipoik asit (ALA) evrensel bir antioksidandır. Diyabetin kronik komplikasyonlarının önlenmesinde antioksidan etkisinden dolayı son zamanlarda deneysel olarak kullanılmaya başlanmıştır. Biz çalışmamızda diyabetin ve ALA'nın diyabetik ve diyabetik olmayan ratların lens antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerini incelemeye çalıştık

Metod: Bunun için toplam 37 adet erkek Wistar sıçanından oluşan 4 rat grubu oluşturduk. Gruplar; 1. kontrol grubu, 2. lipoik asit verilen grup, 3. diyabetik rat grubu, 4. diyabet+lipoik asit verilen grup şeklindeydi. Kontrol grubuna sadece ALA taşıyıcısı verilirken ikinci gruba her gün 50 mg/kg intraperitoneal ALA verildi. Üçüncü ve 4. gruplara streptozosin verilerek diyabet oluşturuldu, 3. gruba sadece ALA taşıyıcısı verilirken 4. gruba intraperitoneal olarak yine 50 mg/kg dozda ALA verildi. 10 hafta sonunda rat gruplarının ağırlıklarını, kan glukoz düzeylerini lenslerindeki SOD, katalaz aktivitelerini ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehid (MDA) miktarını inceledik.

Sonuçlar: Diyabetik olan 3. ve 4. gruplarda ratların kan şeker düzeyi ilk iki gruptan anlamlı derecede yüksekti, fakat istatistiksel olarak ALA'nın kan şeker düzeyine bir etkisi olmadı. Rat grupları ağırlık olarak değerlendirildiğinde aynı şekilde diyabetik olan 3. ve 4. gruplarda ratların ağırlıkları ilk iki gruptan anlamlı derecede yüksek çıktı ancak ALA'nın kilo değişimlerine bir etkisi olmadı. Rat gruplarının hepsinde katalaz aktivitesi ihmal edilecek kadar düşüktü veya hiç yoktu. Gruplarda SOD aktivitesi açısından diyabet olmayıp ALA verilen 2. grupta diyabet olan 3. gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede aktivite artışı vardı. Bunun dışında SOD aktivitesinde gruplar arasında anlamlı farklılıklar yoktu. Gruplar arasında MDA düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

Yorum: Biz literatürün aksine ALA'nın diyabete bağlı lensteki antioksidan aktivite ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA miktarı açısından herhangi bir etkisini gözlemlemedik. Ayrıca ratların kan şeker düzeyleri ve ağırlıklarına da bir

etkisi yoktu. Rat lenslerinde katalaz aktivitesini saptayamamızın sebebi, lens dokusunun braditrofik yapısı dolayısı ile enzim miktarının çok az olması olabilir. SOD aktivitesi ve MDA miktarı üzerine ALA'nın bir etkisinin olmamasının sebebi kullandığımız dozun yetersiz kalması olabilir

KAYNAKLAR

1. Kurt M, Atmaca A, Gürlek A; Diyabetik nefropati Hacettepe Tıp Dergisi, 2004 35:12-7.
2. Güllinaz Alper ; Diyabet , Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Sözmen ; İnsan Biyokimyası 2002 S : 248-253.
3. Wilson JD, Foster DF; Williams Textbook of Endocrinology , 1992. s: 1255-333
4. İdil A. Çalışkan D., Ocaktan E; The prevalence of blindness and vision in oder onset Diabetes mellitus and associated: a community-based study Eur J Ophtalmol. 2004 Jul-Aug, 14(4):298-305
5. Akhter J. ;The American Diabetes Association's Clinical Practice Recommendations and the developing world Diabetes Care 1997 Jun;20(6):1044-5.
6. Andeoli, Bennet, Carpenter, Pulm, Smith ; CECİL Essential of Medicine 3. baskı 1995 s:513-521
7. Tiberti C, Buzzetti R, Anastasi E, Dotta F, Vasta M, Petrone et al ; Autoantibody negative new onset type 1 diabetic patients lacking high risk HLA alleles in a caucasian population: are these type 1b diabetes cases? Diabetes Metab Res Rev. 2000Jan-Feb;16(1):8-14
8. Kumar, Cotran, Robbins; Pankreas, Diyabetes Mellitus Basic Pathology 1995 S:569-580.
9. Jaeger C, Hatzigelaki E, Petzoldt R, Bretzel RG; Comparative analysis of organ-specific autoantibodies and celiac disease--associated antibodies in type 1 diabetic patients, their first-degree relatives, and healthy control subjects Diabetes Care 2001Jan;24(1):27-32
10. Zanone MM, Catalfamo E, Pietropaolo SL, Rabbone I, Sacchetti C, Cerutti F, Trucco M, Cavallo-Perin P. ; Glutamic acid decarboxylase and ICA512/IA-2 autoantibodies as disease markers and relationship to residual beta-cell function and glycemic control in young type 1 diabetic patients. Metabolism. 2003 Jan;52(1):25-29
11. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L: Advanced glycation end-productes: a review.Diabetologia, 2001 44:129-146.
12. Ulrich P, Cerami A: Protein glycation, diabetes, and aging. Recent Prog Horm Res, 2001,56:1-21.
13. Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF: Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability. Diabetes, 1982, 31:743-748.

14. Wu JT, Tu MC, Zhung P: Advanced glycation end product (AGE): characterization of the products from the reaction between D-glucose and serum albumin. *J Clin Lab Anal*, 1996;10:21-34
15. Horiuchi S, Araki N, Morino Y: Immunochemical approach to characterize advanced glycation end products of the Maillard reaction. Evidence for the presence of a common structure. *J Biol Chem*, 1991; 266: 7329-32.
16. Monnier VM, Sell DR, Nagaraj RH, Miyata S, Grandhee S, Odetti P, Ibrahim SA: Maillard reaction-mediated molecular damage to extracellular matrix and other tissue proteins in diabetes, aging, and uremia. *Diabetes*, 1992;41 S: 2:36-41.
17. Wisotzky J, Sommer M, Schubert K, Stein G: Accumulation of AGE (advanced glycosylation end-products) in the aging process, in diabetes mellitus and in chronic renal failure. *Med Klin*, 1996; 91:454-457.
18. Bierhaus A, Ziegler R, Nawroth PP: Molecular mechanisms of diabetic angiopathy--clues for innovative therapeutic interventions. *Horm Res*, 1998; 50 S: 1:1-5.
19. Winegrad AL: Banting lecture 1986. Does and common mechanism induce the diverse complications on diabetes. *Diabetes* 1987; 36(39): 396-406
20. Greene DA, Lewis RA, Lattimer SA, Brown MJ: Selective effects of myo-inositol administration on sciatic and tibial motor nerve conduction parameters in the streptozocin-diabetic rat. *Diabetes* 1982; 31(7): 573-581.
21. Greene DA, Lattimer SA: Action of sorbinil in diabetic peripheral nerve. Relationship of polyol (sorbitol) pathway inhibition to a myo-inositol-mediated defect in sodium-potassium ATPase activity. *Diabetes* 1984; 33(8): 712-716
22. Lattimer SA, Sima AAF, Greene DA: In vitro correction of impaired $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase in diabetic nerve by protein kinase C agonists. *Am J Physiol* 1989; 256(19): E264-269
23. M. Brownlee, Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15: 1835-1843.
24. Thirunavukkarasu V, Anitha Nandhini AT, Anuradha CV. ; Lipoic acid restores antioxidant system in tissues of hyperinsulinaemic rats. *Indian J Med Res*. 2003 Sep;118:134-40.
25. Kocak G, Karasu C. ; Elimination of $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{H}_2\text{O}_2$ by alpha-lipoic acid mediates the recovery of basal EDRF/NO availability and the reversal of superoxide dismutase-induced relaxation in diabetic rat aorta. *Diabetes Obes Metab*. 2002 Jan;4(1):69-74
26. Niffenegger JH, Fong DD, Cavallerano J, Aiello LM. Diabetes Mellitus. Albert DM, Jakobiec FA (ed): Principles and Practice of Ophthalmology Vol V. WB Saunders, Philadelphia, 1994: 2925-2936.

27. Sanchez Thorin JC The cornea in Diabetes mellitus *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 19-36.
28. Ruben SI. Corneal sensation in insulin dependent and non-insulin dependent diabetics with proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 1994; 72: 576-580
29. Yoon KC, Im SK, Seo MS: Changes of tear film and ocular surface in diabetes mellitus. *Korean J Ophthalmol* 2004 Dec;18(2):168-74.
30. Saini JS, Mittal S, Anand M. Cornea stres test-evaluation of corneal endothelial function in vivo by contact lens induced stress. *Indian J Ophthalmol* 1997; 45: 19-24
31. Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology* 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000: 465-479.
32. Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes. *Ophthalmology* 1997; 104: 712-718.
33. Bonovas S, Peponis V, Filioussi K ; Diabetes mellitus as a risk factor for primary open-angle glaucoma: a meta-analysis *Diabet Med.* 2004 Jun;21(6):609-14
34. Kanamori A, Nakamura M, Mukuno H, Maeda H, Negi A ;Diabetes has an additive effect on neural apoptosis in rat retina with chronically elevated intraocular pressure *Curr Eye Res.* 2004 Jan;28(1):47-54.
35. Schertzer RM, Wang D, Bartholomew LR. Diabetes mellitus and glaucoma. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 69-87.
36. Boschi A. ;Neuro-ophthalmological problems in the diabetic patient. *Bull Soc Belge Ophtalmol* 1995;256:145-50.
37. Albareda M M, Mariages M T,Corcoy R ;Bilateral ischemic optic neuropathy in a diabeticpatient. *RevClinEsp* 1998Apr;198(4):258-9
38. Varga M. ; Clinical aspects in ischemic optic neuropathy. *Oftalmologia.* 2002;53(2):46-51.
39. West PD, De Wyt CN, Strakosch CR. ;Optic disc oedema and diabetes mellitus: a case report with review. *Aust N Z J Med.* 1991 Apr;21(2):248-50.
40. Apaydın C, Oğuz Y, Açar A, Yargıçoğlu P, Demir N, Aksu G; Visual evoked potentials and optic nevre histopatology in normal and diabetic rats and effect of ginkgo biloba extract. *Acta Opht* 1993, 71:623-628.
41. Saxena S, Mitchell P, Rohtchina E Five-year incidence of cataract in older persons with diabetes and pre-diabetes: *Ophthalmic Epidemiol.* 2004 Oct;11(4):271-7
42. Swan PG. Non-retinal ocular changes in Diabetes. *Clin Exp Optom* 1999; 82(2-3): 43-46.
43. Bron AJ, Brown NAP, Harding JJ, Ganea E. The lens and cataract in Diabetes. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 37-67.

44. Garcia CA, Ruiz RS. Ocular Complications of Diabetes. Clinical Symposia 1992; 44(1): 1-32
45. Malone JJ, Lowitt S, Cook WR.; Nonosmotic diabetic cataracts. *Pediatr Res.* 1990 Mar; 27(3): 293-306
46. Tunç Ovalı, ;Göz Fizyolojisi Pınar Aydın, Yonc A. Akova, Temel Göz Hastalıkları 2001 S: 42-44
47. Kubo E, Maekawa K, Tanimoto T, Fujisawa S, Akagi Y ; Biochemical and morphological changes during development of sugar cataract in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty (OLETF) rat. *Exp Eye Res.* 2001 Sep; 73(3): 375-81
48. Ashizawa N, Yoshida M, Sugiyama Y, Akaike N, Ohbayashi S, Aotsuka T, Abe N, Fukushima K, Matsuura A. Effects of a novel potent aldose reductase inhibitor, GP-1447, on aldose reductase activity in vitro and on diabetic neuropathy and cataract formation in rats. *Jpn J Pharmacol* 1997; 73: 133-144.
49. Horie S, Nagai H, Yuuki T, Narita Y, Tsuda Y, Nakajima T, Nakamura N. Effect of SG- 210, a novel aldose reductase inhibitor, on impaired polyol pathway in rats received diabetic manipulations. *J Diab Complic* 1998; 12: 163-169.
50. Cameron NE, Cotter MA, Basso M, Hohman TC. Comparison of the effects of inhibitors of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase on neurovascular function, nerve conduction and tissue polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1997; 40: 271-281.
51. Kador PF, Inoue J, Blessing K. ;Anticataract activity of analogs of a sorbitol dehydrogenase inhibitor. *JOculPharmacol Ther* 2004 Aug; 20(4): 333-44.
52. Khanna P, Wang L, Perez-Polo RJ, Ansari NH ;Oxidative defense enzyme activity and mRNA levels in lenses of diabetic rats. *J Toxicol Environ Health.* 1997 Aug 29; 51(6): 541-55.
53. Yarat A, Uguz Z, Ustunel A, Emekli N. ;Lens glutathione, lens protein glycation and electrophoretic patterns of lens proteins in STZ induced diabetic rats. *Glycoconj J.* 1995 Oct; 12(5): 622-6.
54. Stevens A. A review of current research on the effect of diabetes mellitus on the eye. *Clin Exp Optom* 1999; 82(2-3): 84-97
55. Ozmen B, Ozmen D, Erkin E, Guner I, Habif S, Bayindir O. ;Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. *Clin Biochem.* 2002 Feb; 35(1): 69-72.
56. [Antioxidative enzyme activity and metabolism of peroxide compounds in the crystalline lens during cataractogenesis] *Biull Eksp Biol Med.* 1987 Feb; 103(2): 143-156
57. Naziroglu M, Dilsiz N, Cay M. ;Protective role of intraperitoneally administered vitamins C and E and selenium on the levels of lipid peroxidation in the lens of

- rats made diabetic with streptozotocin. *Biol Trace Elem Res*. 1999 Dec;70(3):223-32.
58. Fecondo JV, Augusteyn RC ;Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in the human cataractous lens *Exp Eye Res*. 1983 Jan;36(1):15-23.
 59. Obrosova IG, Fathallah L, Lang HJ ;Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens: studies with a sorbitol dehydrogenase inhibitor *Biochem Pharmacol*. 1999 Dec 15;58(12):1945-54.
 60. Simonelli F, Cotticelli L, Pensa M, Teramo P, Acampora A, Rinaldi E ;Lipid peroxidation and cataract formation in experimental Diabetes. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1989 Aug;65(8):759-65
 61. Cekic O, Bardak Y Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect *Ophthalmic Res* 1998; 30: 107-112.
 62. Ramana KV, Chandra D, Wills NK, Bhatnagar A, Srivastava SK ;Oxidative stress-induced up-regulation of the chloride channel and Na⁺/Ca²⁺ exchanger during cataractogenesis in diabetic rats. *J Diabetes Complications*. 2004 May-Jun;18(3):177-82
 63. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25.
 64. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxydant therapy. *Lancet* 1984; i1396-i1398.
 65. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995; 41 (12): 1819-1828
 66. Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* 1986; 21: 6-9.
 67. Ohya T Reactivity of alkanals towards malondialdehyde (MDA) and the effect of alkanals on MDA determination with a thiobarbituric acid test *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 1078-1092
 68. Obrosova IG, Stevens MJ ;Effect of dietary taurine supplementation on GSH and NAD (P)redox status, lipid peroxidation, and energymetabolism in diabetic precataractous lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Mar;40(3):680-8.
 69. Eser Yıldırım Sözmen; Yaşlanma Biyokimyası : Taner Onat, Kaya Emerk, Eser Y. Sözmen *İNSAN BİYOKİMYASI* 2002 S : 665-673.
 70. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(Suppl 3C): 14S-22S.
 71. Sun Y, Oberley LW, Lu Y. A simple method for clinical assay superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500
 72. Kimmel JR, Markowitz H, Brown DM. Some chemical and physical properties of erythrocuprein. *J Biol Chem* 1989; 234: 46-57.

73. Rotilio G, Calabrrese L, Bossa F, Barra D. Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzym activity of bovine superoxide dismutase. *Biochem* 1972; 11: 2182-2187.
74. Hartz JW, Deutsch HF. Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 7043-50.
75. Bray RC, Cockle SA, Fielden EW, Roberts PB, Rotilio G. Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide. *Biochem J* 1974; 139: 43-48
76. Saik LA, Hsieh HL, Baricos WH, Shapira E. Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestasyonel ages. *Pediatr Res* 1982; 16: 933-937.
77. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanism toxicity. *CRC Critical Reviews In Toxicology* 1987; 18(1):27-73.
78. Aebi HE. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987: 273-85.
79. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Muller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP: Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997., 46:1481-90
80. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Rad Res Comms* 1991; 15: 255-263.
81. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, van der Vliet A, Cross CE, Tritschler H, Halliwell B. Lipoic and dihydrolipoic acids as antioxidants: A critical evaluation. *Free Rad Res* 1994; 20: 119-133
82. SivaprasadR, NagarajM, VaralakshmiP; Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney. *Arch Toxicol* 2002 Aug; 76(8):437-41
83. Ou P, Nourooz-Zadeh J, Tritschler HJ, Wolff S: Activation of aldose reductase in rat lens and metal-ion chelation by aldose reductase inhibitors and lipoic acid. *Free Radic Res* 1996., 25:337-46
84. Malarkodi KP, Balachandar AV, Varalakshmi P ;Protective effect of lipoic acid on adriamycin induced lipid peroxidation in rat kidney. *Mol Cell Biochem*. 2003 May; 247(1-2):9-13
85. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ: alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*, 1995; 19:227-50.
86. Jain SK, Lim G: Lipoic acid decreases lipid peroxidation and protein glycosylation and increases (Na(+) + K(+))- and Ca(++)-ATPase activities in

- high glucose- treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med*, 2000;29:1122-8.
87. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L: Lipoate prevents glucose-induced protein modifications. *Free Radic Res Commun*, 1992;17:211-7
 88. Androne L, Gavan NA, Veresiu IA, Orasan R: In vivo effect of lipoic acid on lipid peroxidation in patients with diabetic neuropathy. *In Vivo*, 2000;14:327-30.
 89. Cakatay U, Telci A, Kayali R, Sivas A, Akcay T: Effect of alpha-lipoic acid supplementation on oxidative protein damage in the streptozotocin-diabetic rat. *Res Exp Med (Berl)*, 2000;199:243-51
 90. Haak E, Usadel KH, Kusterer K, Amini P, Frommeyer R, Tritschler HJ, Haak T: Effects of alpha-lipoic acid on microcirculation in patients with peripheral diabetic neuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2000;108:168-74.
 91. Wiznitzer A, Ayalon N, HersHKovitz R, Khamaisi M, Reece EA, Trischler H, Bashan N: Lipoic acid prevention of neural tube defects in offspring of rats with streptozocin-induced diabetes. *Am J Obstet Gynecol*, 1999;180:188-93.
 92. Khamaisi M, Potashnik R, TirosH A, Demshchak E, Rudich A, Tritschler H, Wessel K, Bashan N: Lipoic acid reduces glycemia and increases muscle GLUT4 content in streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism*, 1997;46:763-8
 93. Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P: Role of DL alpha-lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. *Mol Cell Biochem*, 1995;145:11-7.
 94. Obrosova I, Cao X, Grene DA, Stevens MJ: Diabetes-induced changes in lens antioxidant status, glucose utilization and energy metabolism: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Diabetologia*. 1998 Dec;41(12):1442-1450.
 95. Baydas G, Donder E, Kiliboz M, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Nedzvetskii VS: Neuroprotection by alpha-lipoic acid in streptozotocin-induced diabetes. *Biochemistry(Mosc)* 2004 Sep;69(9):1001-1005
 96. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ: Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275
 97. Misra HP, Fridovich I: The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972;247:3170-3175.
 98. Aebi HE: Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis*. Volume III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases. Ed. Bergmeyer, H.U., V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987;273-85.
 99. Gumuslu S, Serteser M, Ozben T, Balkan S, Balkan E: Inhibitory role of N-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), a potent nitric oxide synthase inhibitor on brain malondialdehyde and conjugated diene levels during focal cerebral ischemia in rats. *Clinica Chimica Acta* 1997;267:213-223.

100. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substances in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39 (12): 2522-2526.
101. Carraro M, Mancini W, Artero M, Zennaro C, Faccini L, Candido R, Armini L, Calci M, Carretta R, Fabris B: Albumin permeability in isolated glomeruli in incipient experimental diabetes mellitus. *Diabetologia*, 2000. 43:235-41
102. Fabris B, Candido R, Carraro M, Fior F, Artero M, Zennaro C, Cattin MR, Fiorotto A, Bortoletto M, Millevoi C, Bardelli M, Faccini L, Carretta R: Modulation of incipient glomerular lesions in experimental diabetic nephropathy by hypotensive and subhypotensive dosages of an ACE inhibitor. *Diabetes*, 2001 50:2619-24.
103. Haugaard N, Haugaard ES. Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1970; 222: 583-586.
104. Packer L. Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataract. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 257-264.
105. Singh HPP, Bowman RH. Effect of D,L-alpha lipoic acid on the citrate concentration and phosphofructokinase activity of perfused hearts from normal and diabetic rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1970; 41: 555-561.
106. Bashan N, Burdett E, Guma A, Klip A. Effect of thioctic acid on glucose transport. In: Gries FA, Wessel K (eds). *The role of antioxidants in diabetes mellitus*. PMI-Verl-Gruppe 1993: 221-229.
107. Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Clancy DE, Simon I, Schiemann AL, Ulrich H, Jung I, Dietze GI, Augustin HJ. Thioctic acid enhances glucose-disposal in patient with Type 2 diabetes. *Horm Metab* 1994 S:452-9
108. Fabris B, Candido R, Carraro M, Fior F, Artero M, Zennaro C, Cattin MR, Fiorotto A, Bortoletto M, Millevoi C, Bardelli M, Faccini L, Carretta R: Modulation of incipient glomerular lesions in experimental diabetic nephropathy by hypotensive and subhypotensive dosages of an ACE inhibitor. *Diabetes*, 2001. 50:2619-24.
109. Ha H, Kim KH: Amelioration of diabetic microalbuminuria and lipid peroxidation by captopril. *Yonsei Med J*, 1992, 33:217-23
110. Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, Fathallah L, Kennedy A, Stockert CM, Frank RN, Stevens MJ. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozocin-diabetic rat. *Diabetologia* 2001; 44: 1102-1110.
111. Peter G, Borbe HO: Absorption of [7,8-14C]rac-a-lipoic acid from in situ ligated segments of the gastrointestinal tract of the rat. *Arzneimittelforschung*, 1995.45:293-9

112. Teichert J, Kern J, Tritschler HJ, Ulrich H, Preiss R: Investigations on the pharmacokinetics of alpha-lipoic acid in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 1998; 36:625-8.
113. Arivazhagan P, Panneerselvam C: Effect of DL-alpha-lipoic acid on neural antioxidants in aged rats. *Pharmacol Res*, 2000; 42:219-22.
114. Anuradha B, Varalakshmi P: Protective role of DL-alpha-lipoic acid against mercury-induced neural lipid peroxidation. *Pharmacol Res*, 1999; 39:67-80.
115. Haak ES, Usadel KH, Kohleisen M, Yilmaz A, Kusterer K, Haak T: The effect of alpha-lipoic acid on the neurovascular reflex arc in patients with diabetic neuropathy assessed by capillary microscopy. *Microvasc Res*, 1999; 58:28-34.
116. Podda M, Rallis M, Traber MG, Packer L, Maibach HI: Kinetic study of cutaneous and subcutaneous distribution following topical application of [7,8-¹⁴C]rac-alpha-lipoic acid onto hairless mice. *Biochem Pharmacol*, 1996; 52:627-33.
117. Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP: Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol*, 2000; 86:234-41.
118. Streeper RS, Henriksen EJ, Jacob S, Hokama JY, Fogt DL, Tritschler HJ: Differential effects of lipoic acid stereoisomers on glucose metabolism in insulin-resistant skeletal muscle. *Am J Physiol*, 1997; 273:E185-91.
119. Yan D, Schmidt A.M., Anderson G.M., Zhang J., Brett J., Zou Y.S., Pinsky D and Stern D., Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding proteins. *J Biol Chem* 1994, 269 pp 9889-9897.
120. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001; 50: 1938-1942.
121. Lou MF, Dickerson JE, Garadi Jr, R. and York, Jr B.M., Glutathione depletion in the lens of galactosemic and diabetic rats. *Exp Eye Res* 46 1988, pp. 517-530
122. Kyselova Z, Garcia SJ, Gajdosikova A, Gajdosik A, Stefek M. Temporal relationship between lens protein oxidation and cataract development in streptozotocin-induced diabetic rats. *Physiol Res* 2005;54(1):49-56
123. Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD. Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies. *Eye* 1999; 13: 183-188.
124. Taguchi H, Ogura Y, Takanashi I, Hashizoe M, Honda Y. In vivo quantitation of peroxides in the vitreous humor by fluorophotometry. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(7): 1444-1450

125. Kuriyama H., Sasaki K. and Fukuda M., Studies on diabetic cataract in rats induced by streptozotocin. II. Biochemical examination of rat lenses in relation to cataract stages *Ophthalmic Res* 15 1983, pp 191–197.
126. Kador P.F. and Kinoshita J.H., Diabetic and galactosaemic cataracts. *Ciba Found Cymptol* 106 1984, pp 110–131.
127. Gonzalez A.M., Sochor M. and McLean P., The effect of an aldose reductase inhibitor (Sorbitol) on the level of metabolites in lenses of diabetic rats *Diabetes* 32 1983, pp. 482–485.
128. Wolff S.P. and Crabbe M.J.C., Low apparent aldose reductase activity produced by monosaccharide autoxidation *Biochem J* 226 1985, pp 625–630.
129. Mitton K.P. and Trevithick J.R., High-performance liquid chromatography-electrochemical detection of antioxidants in vertebrate lens: Glutathione, tocopherol, and ascorbate. *Methods Enzymol* 233 1994, pp. 523–539.
130. Lee A.Y.W. and Chung S.S.M., Contribution of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 13 1999, pp 23–30.
131. Hohman I.C., Banis D., Basso M., Cotter M.A. and Cameron N.E., Resistance to increased oxidative stress is decreased in experimental diabetic neuropathy. *J Periph Nerv Syst* 2 1997, p. 272.
132. Irina G. Obrosova, Lamia Fathallah and Hans-Jochen Lang ;Interaction between osmotic and oxidative stress in diabetic precataractous lens Studies with a sorbitol dehydrogenase inhibitor *Chemotherapy and Metabolic Inhibitors: Diabetologia* 2000; 34: 502-510
133. Swamy-Mruthinti S, Shaw SM, Zhao HR, Green K, Abraham EC. Evidence of a glycemic threshold for the development of cataracts in diabetic rats *Curr Eye Res.* 1999 Jun;18(6):423-9.
134. Babizhaev M, Arkhipenko IuV, Kagan VE [Antioxidative enzyme activity and metabolism of peroxide compounds in the crystalline lens during cataractogenesis] *Biull Eksp BiolMed* 1987 Feb;103(2):143-6
135. Sun L, Zhang JS. [Effects of DL-alpha-lipoic acid on the experimentally induced diabetic cataract in rats] *Zhonghua Yan Ke Za Zhi.* 2004 Mar;40(3):193-6.
136. Borenshtein D, Ofri R, Werman M, Stark A, Tritschler HJ, Moeller W, Madar Z. Cataract development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linoleic acid conjugate. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17(1): 44-50.
137. Maitra I, Serbinova E, Tritschler HJ, Packer L. Stereospecific effects of R-lipoic acid on buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(2): 422-9.

138. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Nutr Biochem* 2003 May;14(5):288-94.
139. Nagamatsu M, Nickander K K, Schmelzer J D, Raya A, Wittrock D A, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995 ; 18(8): 1160-7.
140. Günerli M. Diyabetik sıçanlarda alfa-lipoik asitin retina antiokidan sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi Akd. Üni. Tıp Fak. Göz Hastalıkları A.B.D Uzmanlık tezi 2004
141. Gözkaya O. Diyabetik sıçanlarda alfa-lipoik asitin vitreus antiokidan sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerine etkisi Akd. Üni. Tıp Fak. Göz Hastalıkları A.B.D Uzmanlık tezi 2004.
142. Apaydın C, Yücel G, Ağar A, Aksu A: Diyabetik sıçanların retina ve lenslerinde lipid peroksidasyonu ve serbest oksijen radikallerinin etkisi; *T Oft. Gaz* 221992, 178-192.