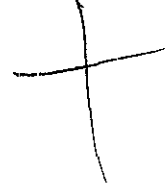


1704



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



AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**DİYABETİK SIÇANLARDA ALFA-LİPOİK ASİTİN RETİNA
ANTİOKSİDAN SİSTEMİ VE LİPİD PEROKSİDASYONU
ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Mehmet GÜNERLİ

Uzmanlık Tezi

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Güler AKSU

‘ Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir’

Antalya, 2004

TEŞEKKÜR

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı'nda 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 Duranođlu'na ve Sayın Yard.Doç.Dr. Yusuf Akar'a ve ayrıca projelerine dahil etmek suretiyle tezime katkıda bulunan Sayın Prof.Dr. Tefvik Aslan Aksu'ya;

İhtisasım boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarım ile anabilim dalımız personeline teşekkür ederim.

Dr. Mehmet GÜNERLİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ÇİZELGELER DİZİNİ	v
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DIABETES MELLİTUS	2
2.1.1. Diabetes Mellitus Patogenezi	3
2.1.2. Diabetes Mellitus Komplikasyonları	5
2.1.3. Komplikasyonların Patogenezindeki Mekanizmalar	6
2.2. DIABETES MELLİTUS'DA SERBEST RADİKALLER	7
2.2.1. Önemli Oksijen Radikalleri	9
2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Etkisi	11
2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	13
2.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar	14
2.3.2. Membran Antioksidanları	14
2.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar	15
2.3.4. Önemli Antioksidan Enzimler	15
2.4. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖNEMİ	17
2.4.1. Lipid Peroksidasyonunun Son Ürünü Olarak Malondialdehit	17
2.5. DİYABETİN RETİNAL OLMAYAN GÖZ KOMPLİKASYONLARI	18
2.5.1. Görme Fonksiyonu	18
2.5.2. Kornea	18
2.5.3. Glokom	19
2.5.4. Kraniyel Nöropatiler	19
2.5.5. İskemik Optik Nöropati	19
2.5.6. Lens	20
2.6. RETİNA	21
2.7. DİYABETİK RETİNOPATİ	26
2.7.1. Etyopatogenez	26
2.7.2. Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması	27
2.7.3. Diyabetik Retinopati Oluşum Mekanizmaları	28

2.8. LIPOİK ASİT	30
2.8.1. Antioksidan Aktivite	30
2.8.2. Diyabet ve α -Lipoik Asit	31
3. MATERYAL METOD	32
3.1. DENEY HAYVANLARI	32
3.2. DENEY VE DENEY GRUPLARI	32
3.2.1. Taşıyıcılar	32
3.2.2. Deney Grupları	32
3.2.3. Cerrahi İşlem	33
3.3. METODLAR	33
3.3.1. Protein Tayini	33
3.3.2. Cu/Zn Bağımlı Süperoksit Dismutaz Tayini	35
3.3.3. Katalaz Aktivitesinin Tayini	37
3.3.4. Malondialdehit Tayini	38
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
3.5. KULLANILAN LABORATUVAR MALZEMELERİ	40
3.5.1. Gereçler	40
3.5.2. Kimyasal Malzemeler	40
4. BULGULAR	41
4.1. KAN ŞEKERİ DÜZEYLERİ	41
4.2. KİLO DEĞİŞİMLERİ	41
4.3. RETİNA MATERYALİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	42
4.3.1. Retina SOD Aktiviteleri	42
4.3.2. Retina CAT Aktiviteleri	43
4.3.3. Retina MDA Değerleri	43
5. TARTIŞMA	44
SONUÇLAR	51
ÖZET	52
KAYNAKLAR	54

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	α -Lipoik Asit
IDDM	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM	İnsüliniden Bağımsız Diabetes Mellitus
ICA	Adacık Hücre Antikorları
GAD	Glutamik Asit Dekarboksilaz
GLUT	Glukoz Taşıyıcı Protein
MODY	Maturity-onset diabetes of the young
AGE	İleri Glikasyon Son Ürünü
AR	Aldoz Redüktaz
SDH	Sorbitol Dehidrogenaz
OH $\cdot$	Hidroksil Radikali
O $_2^{\cdot-}$	Süperoksit Anyon Radikali
H $_2$ O $_2$	Hidrojen Peroksit Molekülü
HO $_2^{\cdot}$	Hidroperoksit
1 O $_2$	Tekil Oksijen
O $_3$	Ozon
NO $\cdot$	Nitrik Oksit Radikali
HOCl	Hidroklorik Asit
O $_2^{2-}$	Peroksil Anyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
NO	Nitrik Oksit
NO $_2$	Nitrojen Dioksit
ONOO $\cdot$	Peroksinitrit
L $\cdot$	Lipid Radikali
LOO $\cdot$	Lipid Peroksiradikali
LOOH	Lipid Hidroperoksit
MDA	Malondialdehit
Cu/Zn-SOD	Bakır ve Çinko içeren Süperoksit Dismutaz
Mn-SOD	Manganez içeren Süperoksit Dismutaz
CAT	Katalaz

ERG

ATPaz

VEGF

GK

DAG

PKC

DHLA

TBARS

STZ

BSA

FCF

NGF

Elektroretinogram

Adenozintrifosfataz

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Goto-Kakizaki

Diaçilgliserol

Protein Kinaz-C

Dihidrolipoik Asit

Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri

Streptozotosin

Bovin Serum Albümin

Folin-Ciocalteu-Fenol

Nöronal Büyüme Faktörü

ÇİZELGELER DİZİNİ

sayfa

Tablo 2.1	Diabetes mellitus'da görülen oküler komplikasyonlar	18
Tablo 4.1	Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri (mg/dl)	41
Tablo 4.2	Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)	42
Tablo 4.3.1	Grupların retinadaki SOD değerleri (U/mg protein)	42
Tablo 4.3.2	Grupların retinadaki CAT değerleri (k/mg protein)	43
Tablo 4.3.3	Grupların retinadaki MDA değerleri (nmol/mg protein)	43

1. GİRİŞ VE AMAÇ

En sık görülen endokrin hastalığı olan diabetes mellitusun en çok rastlanan göz komplikasyonları olan diyabetik retinopati ve katarakt argon lazer tedavisi ve katarakt ekstreksiyonu ile tedavi edilmekle birlikte araştırmalar bu komplikasyonların oluşumunun önlenmesine yöneliktir. Komplikasyonların önlenmesinde en etkili yol hipergliseminin kontrolü olarak görülmekle birlikte bazı olgularda hiperglisemi kontrolüne rağmen komplikasyonlar meydana gelmekte veya mevcut durum ilerlemektedir (1).

Diyabetik komplikasyonlardan; polyol metabolizmasında artış, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu, protein kinaz C aktivasyonu ve oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır. Çalışmalar hiperglisemiye bağlı artmış serbest radikal düzeyi ve buna bağlı gelişen oksidatif stresi önlemede antioksidan ajanların etkinliğinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Son yıllarda araştırmalar evrensel antioksidan olduğu düşünülen alfa-lipoik asit (ALA) üzerinde yoğunlaşmıştır (2,3,4).

Bu çalışmalar göz önüne alınarak, sıçanlarda oluşturulan deneysel diyabet modelinde ALA'nın retina antioksidan enzim sistemi ve lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla oksidatif hasar üzerine etkisini incelemek üzere bu çalışma planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

En önemli bulgusu hiperglisemi olan bir endokrin hastalığıdır. Klinik ve genetik olarak heterojen bir gruptur. Pankreastan insülin salınmasında tam veya kısmi azalma veya insülinin hedef dokuda etkili olamaması olarak tanımlanabilecek insülin direnci ile görülür. Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkiler. Prevalansı ortalama % 1-2 olarak tahmin edilmektedir son evre böbrek yetmezliklerinin % 25'inden, alt ekstremitte amputasyonlarının % 50'sinden sorumludur. Diyabet, körlüğün bir numaralı nedenidir ve her yıl 5000 yeni olgu ortaya çıkmaktadır (5,6).

Diabetes Mellitus sınıflaması:

Dünyada en çok kullanılan diyabet sınıflandırması, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1979 yılında belirlenmiştir (7) :

1. İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus (IDDM, tip I)
2. İnsülin bağımsız Diabetes Mellitus (NIDDM, tip II)
 - a) Şişman olmayan insülin bağımsız Diabetes Mellitus
 - b) Şişman insülin bağımsız Diabetes Mellitus
3. Gestasyonel Diabetes Mellitus
4. Diğer spesifik nedenler
 - a) Pankreas hastalıkları
 - b) Hormonal anormallikler
 - c) İlaç veya kimyasal maddelerin neden olduğu Diabetes Mellitus
 - d) İnsülin reseptör anormallikleri
 - e) Çeşitli genetik sendromlar
 - f) Diğerleri

Diyabet olgularının büyük kısmını Tip I insüline bağımlı diyabet ve Tip II insülden bağımsız diyabet oluşturur.

Tip I Diyabet: İnsüline bağımlı diyabet olarak da adlandırılır. Diyabetik olguların %5-10'unu oluşturur. Prevalansı %0.5'dir. Erken yaşlarda ortaya çıkar. İnsülin salgılayan beta (β) hücrelerinde harabiyet vardır ve doğal olarak insülin salgılanması hastalığın ilk evreleri hariç yoktur. Hastanın yaşamını sürdürmek için dışarıdan insülin verilerek mutlak insülin eksikliğinin giderilmesi gerekir (1,5-7).

Tip II Diyabet: İnsülden bağımsız diyabet olarak da adlandırılır. Diyabetik olguların %90-95'ini oluşturur. Tip I diyabete oranla daha ileri yaşlarda ortaya çıkma eğilimindedir. Diyabetin bu tipinde β hücrelerinde insülin yapılması ve depolanması genellikle bozulmamıştır. İnsülin salınımı hafif azalmış, normal veya insülin direncine bağlı olarak artmış bulunabilir. Temel bozukluk insülin reseptör sıklığının azalması veya hücre içi reseptör sonrası insülin etkinliğinin azalmasıdır. (1,5-7).

2.1.1. Diabetes Mellitus Patogenezi:

Tip I Diyabetin Patogenezi:

Tip I diyabet, genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin sinerjik etkileri nedeniyle pankreatik beta hücrelerinin büyük ölçüde harabiyeti sonucunda ortaya çıkar. Genetik yatkınlığı olan vakalarda beta hücre sayısı doğumda normal iken aylar ve yıllar içerisinde otoimmün harabiyete bağlı olarak azalma görülür. Diyabetin belirtileri beta hücrelerinin %80'inin harabiyeti sonrası ortaya çıkar. Klinik belirtilerin ortaya çıktığı ilk dönemler "balayı" dönemi olarak adlandırılır. Kan şekeri kontrolü için hastalar çok az miktarda endojen insüline ihtiyaç duyarlar veya insülin kullanımı gerekmez. Kalan beta hücrelerinin tahrip olması sonrasında ise hastalar tamamen insüline bağımlı hale gelirler (8).

Son alışmalar tip I diyabetin ailesel geçiş oranı yüksek bir hastalık olduğunu göstermektedir. Tip I diyabetin riskini arttıran 14 gen saptanmıştır. Bu genler içinde en önemlisi IDMM 1 ve IDMM 2'dir IDMM 1 geni 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p21) HLA bölgesinde bulunan Class II molekülleri ile ilişkilidir (8-11).

Tip I diyabet ile birlikte bulunduğu saptanabilmiş önemli antikrılar; adacık hücre antikrılar (ICA= Islet Cell Antibodies), insülin antikrılar, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) antikrılar, insülin reseptör antikrılar, karboksipeptidaz antikrılar (8).

Tip II Diyabetin Patogenezi:

Tip II diyabetin genetik ve çevresel bileşenleri bulunmaktadır ve aynı anda birkaç anormal gen ya da polimorfizmin varlığının hastalık oluşumu için gerekli olduğu düşünülmektedir. Genetiksel bir geçiş özelliği varsa da, tip II diyabetin nadir görülen ve genetik bir bozukluğa bağlı MODY (Maturity-onset diabetes of the young= genç hastada gözlenen erişkin tipi diyabet) tipi gibi bazı özel türleri hariç, bu genetiksel geçişin özellikleri belli değildir (6,8).

Tip II diyabet,  patofizyolojik anomali ile açıklanır:

1) Anormal insülin sekresyonu

2) Periferik insülin direnci: İnsüline olan rezistans özellikle iskelet kası, yağ dokusu ve karaciğerde gözlenir. İnsülin rezistansı, reseptör öncesinde, reseptör düzeyinde veya reseptör sonrası düzeyde olabilir

3) Aşırı hepatik glukoz retimi (8).

2.1.2. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

Diabetes Mellitus komplikasyonları, akut ve kronik olarak iki grupta incelenir:

Akut Komplikasyonlar:

1. Diyabetik ketoasidoz
2. Hiperosmolar hiperglisemik nonketotik koma
3. Laktik asidoz
4. Hipoglisemi

Kronik Komplikasyonlar:

1. Vasküler komplikasyonlar:
 1. Mikrovasküler komplikasyonlar,
 2. Makrovasküler komplikasyonlar
2. Diyabetin göz komplikasyonları
3. Diyabet nöropatisi:
 1. Mononöropati
 2. Simetrik periferik nöropati
 3. Otonom nöropati
4. Diyabet nefropatisi:
 1. Diffüz glomeruloskleroz
 2. Nodüler glomeruloskleroz
 3. Eksudatif lezyon
5. Diyabetik ayak
6. Diyabet dermopatisi
7. Diyabet gastroenteropatisi (6,8).

2.1.3. Komplikasyonların Patogenezindeki Mekanizmalar:

Diabetes mellitusun komplikasyonlarının gelişiminden sorumlu bir çok mekanizma vardır. Bunlar içinde önemlileri:

1. Proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu: Enzimatik glikozilasyon, proteinlerin translokasyon sonrası geçirdikleri fizyolojik süreçtir. Eğer protein yüksek glukoz konsantrasyonu ile karşılaşır, glukoz bir enzime ihtiyaç göstermeksizin proteine bağlanabilir. Bu reaksiyonlar kan glukozu yüksek olduğu müddetçe devam eder ve kan glukozunun normale indirilmesi bu ürünlerin de azalmasına neden olur (12).

Myelin, tubulin, kollajen gibi uzun ömürlü yapısal proteinler glikasyona uğrayarak İleri Glikasyon Son Ürünlerine (Advanced Glycosylation End Product=AGE) dönüşürler. AGE'ler hiperglisemi süresince giderek artarak, damar endoteli, ekstraselüler matriks, glomerüler bazal membran gibi yerlerde birikerek patolojik süreçleri başlatırlar (13,14).

2. Anormal Polyol-Inositol Metabolizması: Hiperglisemiye bağlı olarak sorbitol ve myoinositol metabolizmasında ortaya çıkan değişiklikler, diyabetteki çeşitli komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Sorbitol bir alkol-şeker bileşiği olup, periferik sinirler, lens, perisitler, böbrek papillası gibi çeşitli dokularda bulunan aldoz redüktaz (AR) ile glukozdan sentezlenir. Sorbitol dehidrogenaz (SDH) tarafından fruktoza dönüştürülür (15-18).



Yüksek glukoz konsantrasyonunda aldoz redüktaz aktivitesi artarken, sorbitol dehidrogenaz aktivitesi azalır. Bunun sonucunda hücre içi sorbitol düzeyi artar. Çok yüksek su çekici özelliği olan sorbitol, biriktiği dokularda hücre ödemi ve hasarına neden olur (6,16,19).

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, fosfoinositid metabolizmasını bozarak protein kinaz C aktivitesinde ve Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya neden olur. Azalmış Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi sinir hücresinde sodyum artışına neden olur ki bu da sinir hücresi uyarılmasının güçleşerek ileti hızının yavaşlaması anlamına gelir. Ayrıca hücre içi düzeyi artan sodyum bir yandan da lokal ödeme neden olarak aksogliaal ayrılmaya sebebiyet verir. Sinir sistemi dışında retina, glomerül ve aortada da sorbitolün arttığı, myoinozitol azalışına bağlı olarak Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin azaldığı rapor edilmiştir (16,20,21).

3. Hemodinamik değişiklikler: Tip I diyabetin gelişmesinden kısa bir süre sonra kan akımı kan basıncı normal olduğundan, muhtemelen damar direncinin azalmasına bağlı olarak artar. Kapiller yatakta artan hidrostatik basınç proteinlerin, makromoleküllerin ve immün komplekslerin damar dışına filtrasyonunun artmasına neden olur. Bu durum mezengial ve bazal membran elemanlarının sentezlenmesini uyarır. Bu da giderek kapiller geçirgenliğin artması, kapiller geçirgenliğin artması ise bahsedilen olumsuz gelişmelerin devam etmesine neden olur (22)

4. Otoimmünite: Son yıllarda diyabetik nöropati gelişiminde, klasik olmayan bir otoimmün sürecin neden olduğu düşünülmektedir (16,23).

2.2. DİABETES MELLİTUS'DA SERBEST RADİKALLER

Alloksan deney hayvanlarına verildiğinde, hızlı bir şekilde dialürik aside bu da otookside olarak süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerine dönüşmektedir. Serbest radikal düzeyindeki artış beta hücrelerini tahrip etmekte ve deneysel tip I diyabet gelişmektedir. Aynı mekanizmanın insanlarda da geçerli olabileceği düşünülmüştür. Değişik antioksidan terapilerin uygulanması pankreas beta hücrelerini alloksanın toksik etkisinden korumakta ve deneysel alloksan diyabetini, düşük dozda alloxan kullanılması durumunda, tamamen engellemektedir (24-28).

Normal oksijen metabolizması esnasında oluşan reaktif oksijen ürünleri aerobik organizmalar üzerinde hücresel düzeyde yapı ve fonksiyon bozukluklarından sorumludurlar. Fakat aerobik organizmalar bu zararlı ürünlerin etkilerinden kendilerini koruyacak savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Buna antioksidan defans sistemi denir (25).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller olarak tanımlanabilir. Elektronların çoğu, atomların yörüngelerinde bulunurken sözü edilen eşleşmemiş elektron ise bir orbitalde tek başına bulunan elektronu simgelemektedir. Serbest radikallerin bu şekilde açık bir bağ içermeleri kendilerini oldukça reaktif kılar. Bir serbest radikalın reaktivitesi yarı ömründen anlaşılabilir. Bilindiği gibi en güçlü oksijen radikali olan hidroksil radikali en kısa yarı ömre sahiptir (29,30).

Oksijenin aerobik hücrelerde metabolizması esnasında oluşan en önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali ($OH\cdot$), hidrojen peroksit molekülü (H_2O_2), hidroperoksit ($HO_2\cdot$) ve tekil (singlet) oksijen (1O_2)'dir. Ayrıca atmosferik bir bileşik olan ozon (O_3), nitrik oksit radikali ($NO\cdot$) ve hipoklorik asit ($HOCl$) gibi çeşitli moleküller de güçlü oksidan etkisi olan moleküllerdir. Bu radikaller organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve bazı toksikolojik ajanların etkisiyle oluşabilmektedir (25,30,31).

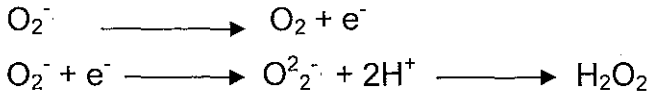
Serbest radikallerin hücresel kaynakları:

- Çevresel etkenler: Toksik maddeler, ilaçlar, radyasyon, hava kirleticisi ajanlar
- Enzim ve proteinler: Hemoglobin, ksantin oksidaz, triptofan dehidrogenaz
- Plazma membranı: Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, NADPH oksidaz
- Mitokondriler: Ubikinon, NADH dehidrogenaz, dihidrooratat dehidrogenaz
- Endoplazmik retikulum: Sitokrom P- 450, sitokrom b-5
- Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler (30).

2.2.1. Önemli Oksijen Radikalleri:

1. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$):

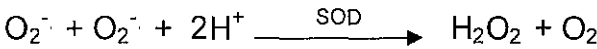
Moleküler oksijen (O_2), dış orbitallerinde eşleşmemiş iki elektron içeren ve bu şekli ile zararlı etkisi olmayan bir moleküldür. Bu moleküldeki orbitallerden birinin herhangi bir şekilde elektron alması ile süperoksit radikali oluşur. Süperoksit anyonu elektronunu vererek oksitleyici (redüktör) gibi davranabilir. Veya bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O_2^{2-}) oluşturur, ortamdan iki proton (H^+) alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (25,29).



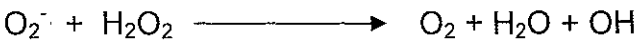
Oksijenin metabolizması esnasında ilk oluşan serbest radikal olan süperoksit anyonundan, hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksitler ($HO_2^{\cdot}$) gibi diğer zararlı oksijen metabolizması ürünleri oluşur. Hücre membranından kolayca geçemediği için zararlı etkisi düşük düzeydedir. Çoğunlukla redüktif ve H_2O_2 kaynağı olarak görev yapar. Süperoksit anyonu çeşitli reaksiyonlara girerek dismutasyon adı verilen bir olayla ortamdan temizlenir. Süperoksit anyonu ortamdan spontan dismutasyon denilen, enzimatik olmayan bir yol ile temizlenebileceği gibi,



süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile enzimatik olarak da 10^4 kez daha hızlı olarak dismutasyona uğratılır.

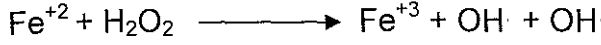


Süperoksit radikali, ayrıca H_2O_2 ile birlikte Haber Weis reaksiyonu adı verilen bir reaksiyona girerek daha potent bir radikal olan $OH^{\cdot}$ radikalini oluşturur (25).

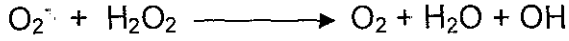


2. Hidroksil radikali (OH·):

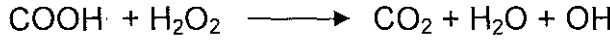
İlk olarak 1934 yılında Haber ve Weis adlı araştırmacıların gösterdikleri ve kendi adlarını taşıyan reaksiyon ile ortaya konmuştur. En potent oksidan olarak bilinir. Yüksek bir reaktiviteye sahip olan hidroksil radikalının iki önemli biyolojik kaynağı vardır. Birincisi H_2O_2 'nin, ortamdaki iki değerlikli demir (Fe^{+2}) katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile ayrışmasından oluşur.



İkincisi ise daha önce bahsedilen Haber Weis reaksiyonu iledir.



Ayrıca radikal tepkimesi sonucu oluşmuş organik bir radikal de, H_2O_2 ile tepkimeye girerek OH radikali oluşumuna neden olabilir (25,32).



3. Hidrojen peroksit (H_2O_2):

H_2O_2 temel olarak iki süperoksit anyonunun spontan veya enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Oksijen metabolizması esnasında oluşan ara üründür. Organik molekülleri okside etmek için yeteri kadar bir reaktivitesi olmasa da biyolojik olarak önemli bir oksidandır. Süperoksit anyonuna nazaran, biyolojik membranlardan, düşük elektriksel yükü ve iyonize olmayan özelliklerinden dolayı daha kolay geçebilmesi ve direkt kendisinin sitotoksitesinden ziyade OH· radikalleri gibi daha reaktif radikallerin üretimine katkıda bulunmasından dolayı olması nedeniyle önemli bir oksijen metabolizması ara ürünüdür (25,33).

4. Tekil oksijen (1O_2):

Eşleşmemiş elektron içermediğinden tekil oksijen serbest radikal değildir. Ancak oksijenin oldukça reaktif bir formudur. Tekil oksijenin oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda önemlidir (34).

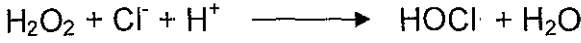
5. Ozon (O_3):

Soluk mavi bir gaz olan ozon güneş ışınlarına karşı önemli bir stratosferik koruyucu kalkandır. Ancak ozon, toprak düzeyinde toksik ve

istenmeyen oksidize edici bir ajandır. Ozon kirli şehir havasında ve bazı bilimsel cihazlarla, fotokopi makinelerinde kullanılan aşırı ışık kaynakları tarafından oluşturulur. Akciğerleri aşırı derecede tahrip eder. Deoksiribonükleik asit (DNA), lipid ve proteinleri kolayca okside etmektedir (34).

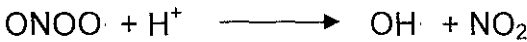
6. Hipokloröz Asit (HOCl):

Aktive nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidandır. Fagosit sitoplazmasındaki hem içeren bir enzim olan myeloperoksidaz sayesinde, H_2O_2 ve Cl iyonlarından sentezlenebilir (34).



7. Nitrojen Oksitleri:

Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2) tek sayıda elektron içermeleri nedeniyle serbest radikaldirler. Oysa anesteziye kullanılan bir gaz olan nitroz asit (N_2O) böyle değildir. Zehirli bir gaz olan NO , güçlü bir oksidize edici ajandır. İn-vivo ortamda salınan NO , nitrit (NO_2^-) veya nitrata (NO_3^-) otookside olabilir. NO_2 ise zayıf redükte edicidir. NO endotel kökenli vazodilatör faktörle aynı maddedir ve bir reaktif ara ürün olan peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturmak üzere, bir diğer endojen serbest radikal olan süperoksitle reaksiyona girebilir. $ONOO^-$ güçlü oksidandır. Pekçok biyolojik molekülü zedeleyebilir ve asit pH'da, küçük miktarlarda hidroksil radikali salıvererek dekompoze olabilir (34).



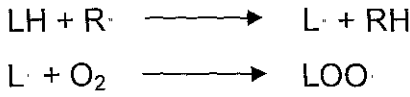
2.2.2 Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Etkisi:

Serbest radikallerin hücre yapı ve fonksiyonlarına zararlı etkileri vardır. Lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler serbest radikaller için hedef yapılardır.

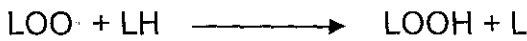
1. Lipidlere Olan Etkileri:

Lipid peroksidasyonu, poliansature lipidlerin oksidatif bozulması reaksiyonudur. Bu reaksiyon başlama, çoğalma ve sonlanma şeklinde üç basamakta gerçekleşir (34-36).

a. Başlangıç basamağı: Peroksidasyon, serbest radikallerin poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirindeki metilen grubundan ($-CH_2$) bir hidrojen (H^+) atomunu çıkarmasıyla başlar. Bu atak sonucu karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron olduğundan karbon merkezli bir radikal ($L\cdot$) oluşur. Bu lipid radikalının aerobik hücrelerde en sık görülen akıbeti, bu radikalın moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikalini ($LOO\cdot$) oluşturmaktır (37).



b. Çoğalma basamağı: Oluşan peroksid radikali, diğer bir peroksid radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksid radikallerinin membrandaki komşu yan zincirlerden hidrojen atomlarını çıkarabilmeleri ve peroksidatif zincir reaksiyonunu yaymalarıdır. Böylece yan zincirlerden hidrojen atomlarının çıkarılması ile her defasında lipid hidroperoksitleri ($LOOH$) ve yeni peroksi radikali ($LOO\cdot$) oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir.



Lipidhidroperoksitlerde ($LOOH$) yıkılarak $LO\cdot$, $LOO\cdot$ gibi radikaller ve aldehitlerin (örn. Malonildialdehit=MDA gibi) oluşmasına neden olurlar.

c. Sonlanma: Demir ve bakır iyonları ya da bu iyonların fosfat esterleri ile oluşturduğu basit şelatları (Fe^{+2} -ADP), hem, hemoglobin ve myoglobini de içeren bazı demir proteinleri, lipidperoksitlerini bozarak peroksidasyonu sonlandırmaktadır. Bu kompleks bozunma reaksiyonlarının pentan, etan gibi hidrokarbon gazları, $ROOH$, $RCOOH$, ROH ve $RCHO$ grupları içeren kısa zincirli yağ asitleridir (30,37,38).

2. Proteinlere Olan Etkileri:

Reaktif oksijen türleri direkt ya da indirekt olarak proteinlerde hasar oluşturabilirler. Reaktif oksijen türlerinin oluşum mekanizmalarından biri metallerle katalizlenen oksidasyon reaksiyonlarıdır. Uygun bir elektron vericisi varlığında (NADH, NADPH, askorbat) metallerle olan bu reaksiyonlar H_2O_2 oluşturma ve süperoksit bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla Fe (III) ve Cu (II)'yi indirgeme yeteneğindedirler. Bu reaksiyonlarla oluşan Fe (II) ve Cu (I)'in proteinler üzerindeki metal bağlayıcı kısımlara bağlanması, OH- oluşumuna yol açar. Bu hidroksil radikalleri metal bağlayıcı amino asitlere özellikle saldırır. Oksidatif olarak modifiye olmuş proteinler proteolitik yıkım için hedeftirler; ancak, bazı okside protein formları sadece proteolize dirençli olmayıp diğer proteinlerin okside formlarının yıkımını sağlayacak proteazları da inhibe edebilme yeteneğindedir (39).

3. Karbonhidratlara Etkileri:

Çalışmalar, alfa-hidroksialdehit yapıya sahip karbohidratların metal iyonlarının varlığında radikallerin etkisi ile ketoaldehitlere dönüştüğünü göstermiştir. Ayrıca bir hidroksil radikal temizleyicisi glukozun da dahil olduğu bir çok monosakkaridin hızlı bir şekilde otooksidasyona uğradığını göstermiştir (25).

4. Nükleik Asitlere Olan Etkileri:

Oksidan stresten DNA ve mitokondriyal DNA zarar görmektedir. Hiperglisemi DNA'nın glikolize olmasını ve DNA'nın tamir süreçlerinin azalmasına neden olur (25).

2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Ortamda çok düşük konsantrasyonda bulunduğu halde okside edilebilen bir substratla karşılaştığında, substratın okside olmasını belirgin bir şekilde geciktiren ve önleyen maddelere antioksidan denir.

Antioksidanlar, oksidatif peroksidasyonun farklı aşamalarında işlevlerini görebilirler;

a. Ortamdaki oksijeni uzaklaştırabilir veya konsantrasyonunu azaltabilirler.

b. Katalitik metal iyonlarını ortadan kaldırabilirler.

c. Süperoksit ve hidrojen peroksit gibi önemli reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırabilirler.

d. Hidroksil, alkoksil ve peroksil türleri gibi başlatıcı serbest radikalleri yakalayabilirler.

e. Başlamış bir zincir reaksiyonunu kırabilirler

f. Tekil oksijeni yakalayabilirler.

Antioksidan savunma mekanizmaları:

1. Yöntemlerine göre: koruyucu, zincir kırıcı
2. Yerine göre: hücre içi, hücre dışı, hücre membranı
3. Etkisinin tipine göre: enzimatik, non-enzimatik olarak sınıflandırılabilir (25,31).

2.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar:

Hücre içinde antioksidan savunması; radikal oluşumunun engellenmesi, oluşmuş radikallerin uzaklaştırılması, oluşan oksidatif hasarın tamiri, veya hasarlı moleküllerin eliminasyonunun artırılması şeklinde olur.

SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz toksik oksijen moleküllerine karşı primer enzimatik savunma sistemlerini oluştururlar. Hücre içinde metabolize edildiği esnada oluşan oksijen ara ürünleri ile antioksidanlar enzimatik olarak hızlı ve spesifik bir şekilde etkileşirler (36).

2.3.2. Membran Antioksidanları:

Membranların hidrofobik lipid iç kısımlarında, lipofilik radikaller oluşur. Bunların kaldırılması için hücre içi ortamdakinden daha farklı tip antioksidanlar kullanılır. E vitamini en önemlilerini oluşturmaktadır (34).

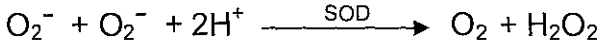
2.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar:

Vücut ekstraselüler sıvılarında, intraselüler antioksidanlar yerine glutatyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz enzimlerinin glikozillenmiş farklı proteinleri bulunmaktadır. Bu enzimler ekstraselüler sıvılarda, O_2^- ve H_2O_2 gibi reaktif oksijen türlerinin yarı ömrünü kısaltır (34).

2.3.4. Önemli Antioksidan Enzimler:

1. Süperoksit Dismutaz (SOD):

SOD (SOD; E.C:1.15.1.1, süperoksit:süperoksit oksidoredüktaz) ilk olarak 1968 yılında McCord ve Fridovich tarafından tanımlanmıştır ve aerobik hücrelerde yaygın olarak bulunan ve O_2^- 'nin dismutasyonunu katalizleyen bir enzimdir (41).

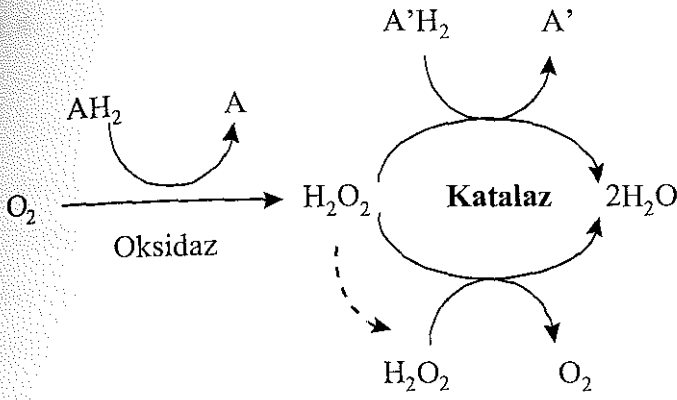


SOD, %16,53 oranında nitrojen, %1,05 oranında kükürt ve az miktarda karbonhidrat içermektedir. Protein kısmında metionin yoktur. Yapısında heksoz, heksozamin ve siyalik asit çok düşük; aspartik asit, glutamik asit ve glisin ise büyük miktarlarda yer almaktadır (42).

Yapı bakımından ve aktif merkezindeki geçiş metal iyonları yönünden enzimin hücre içinde iki değişik formu vardır, bunlar; Cu ve Zn içeren SOD (Cu/Zn-SOD) ve Mn içeren SOD (Mn-SOD) 'dir. ancak bu farklı formlar aynı reaksiyonu katalizler (41).

2. Katalaz (CAT):

CAT (E.C:1.11.1.6. Hidrojen peroksit: hidrojen peroksit oksidoredüktaz) doğada yaygın olarak bulunur ve hem içerir. Yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 'nin, su ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler

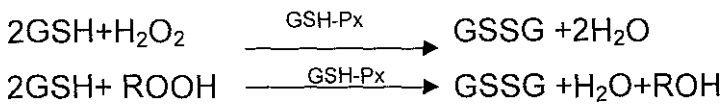


CAT dört subünitten oluşan bir hemoproteindir. Mol başına 4 atom gram Fe içerir. Protohem aktif bölgenin temel komponentidir. Fe^{+3} içeren her alt birimde bir protoporfirin IX bulunmaktadır. Bu enzim peroksidaz aktivitesi dışında bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. Invivo koşullarda baskın olan peroksidaz aktivitesidir.

Memeli dokularında CAT aktivitesi farklı düzeylerde bulunur. En yüksek konsantrasyonlarda karaciğer, eritrosit ve böbreklerde rastlanmaktadır. Enzimin inhibitörleri; asetat, askorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, formik asit, hidroksilamin, metanol, monokloramin, ve nitrittir (43,44).

3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):

GSH-Px (E.C: 1.11.1.9., Glutasyon: H_2O_2 oksidoredüktaz) dokularda ve vücut sıvılarında H_2O_2 'nin ve lipid hidroperoksitlerinin, redükte GSH ile redüksiyonunu katalizler ve hücrenin oksidatif zedelenmeye karşı korunmasını sağlar (45).



2.4. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖNEMİ

Lipid peroksidasyonunun birçok hastalıkta veya toksin maruziyetinde artar. Antioksidan inaktivasyonu veya hücreden ayrılması veya aşırı metal iyonu salınımı (hasarlı lizozomdan salınan metalloproteinazlar ile) gibi faktörler nedeni ile hasarlı dokularda lipid peroksidasyonu daha hızlıdır. Biyolojik membranlardaki yoğun lipid peroksidasyonu, akışkanlığın kaybına, membran potansiyelinin düşmesine, H ve diğer iyonların geçirgenliğinin artmasına ve hücre ve organel içeriklerinin dışarı salınmasına yol açan bir kırılmaya sebep olur. Peroksit fragmentasyonunun bazı son ürünleri aynı zamanda sitotoksiktir.

Peroksidasyon hücre hasarına eşlik eder ve peroksidasyonun antioksidanlarca önlenmesi hücre hasarını önleyebilir. Bu durumda lipid peroksidasyonunun ölçülmesi, doku hasarının iyi bir belirleyicisi olabilir (46-49).

2.4.1. Lipid Peroksidasyonunun Ürünü Olarak Malondialdehid (MDA)

MDA memeli dokularında hem ansatüre lipid peroksidasyonunun bir son ürünü olarak, hem de prostaglandin ve tromboksan biyosentezinin bir yan ürünü olarak büyük miktarlarda üretilir. Aynı zamanda karbohidratların γ-radyasyonu sırasında da (deoksiribozun bir hidroksil radikali ile yıkılması ile) oluşmaktadır. Tiyobarbitürik asid testi ile MDA ölçümü, besinlerde oksidatif kokuşmanın belirlenmesinde ve ansatüre yağ asitlerinin peroksidasyonunun tesbit edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Toksik, karsinogenik ve mutajenik etkileri olduğu bildirilmiştir. Yaşlanma sürecinde de etkilidirler. MDA'nın bu dejeneratif etkileri çeşitli biyolojik makromoleküllerle çapraz bağlar oluşturabilmesine ve bunları kovalent olarak bağlama yeteneğine bağlı olabilir. Örneğin, MDA nükleik asidlere karşı reaktiftir ve bunların aktivitelerinin kaybolmasına neden olur. Lipoproteinlerin MDA ile modifikasyonlarının aterosklerozda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (50-54).

2.5. DİYABETİN RETİNA DIŞI GÖZ KOMPLİKASYONLARI

Diabetes mellitus, sistemik ve oküler (tablo 2.1) birçok komplikasyon ile birlikte seyreder. Bu oküler komplikasyonlar içerisinde en sık görülen ve klinik açıdan en önemli olanı diyabetik hastalarda tüm körlük nedenlerinin %85'ini oluşturan diyabetik retinopatidir (55).

Tablo 2.1: Diabetes Mellitus'ta görülen oküler komplikasyonlar (1).

Lakrimal sistem	Gözyaşı üretiminde azalma
Ekstraoküler kaslar	III., IV., VI. sinir felçleri
Kornea	Korneal abrazyon
Iris	Rubeosis iridis
Lens	Diyabetik katarakt
Retina	Diabetik retinopati, maküler ödem
Refraksiyon	Geçici refraksiyon kusurları
Glokom	Görülme sıklığında artış

2.5.1. Görme Fonksiyonu

Diyabetik hastalarda akomodasyonda zayıflama ve geçici refraksiyon değişimleri (yaşlılarda daha sık) görülmektedir. Akomodasyonda zayıflamanın nedeni siliyer cismin pigment epitelindeki aşırı glikojen depolanmasıdır. Hiperglisemide yakın görme ve hipoglisemide uzak görme daha iyi olmaktadır. Refraksiyon açısından bir hipotez lens içi osmotik basınçta olan değişimlerdir. Hiperglisemi ile birlikte osmotik basınç artar, lens dehidrate olur ve refraktif indeks yükselir. Hiperglisemide ise lens içi sorbitol düzeyi artar ve lens şişer, böylece yakın görme fonksiyonu artar. Diyabetin tedavisi ile birlikte refraksiyon kusuru düzelir (55-57).

2.5.2. Kornea

Diabetes mellitus, korneanın tüm tabakalarını etkiler. Kornea epitel tabakasında, hücre sayısında azalma ve incelme, bazal membranda olan değişimler nedeni ile epitelyal yapışma defektleri ve buna bağlı keratit gelişimi izlenir. Korneal otofloresans, metabolik kontrolün belirleyicisi olarak kullanılabilir. Çünkü, kan glukoz seviyesindeki kısa süreli değişimlere duyarlıdır ve kan-aköz bariyerindeki bozulmayı yansıtır.

Hayvan modellerinde korneal duyarlılıktaki azalma gösterilmiştir. Buna karşın, iki farklı aldoz redüktaz inhibitörünün (CT-112 ve AL-1576) kullanımı ile birlikte korneal duyarlılıkta oluşan azalma daha iyi hale getirilmiştir (58-63).

Endotel hücrelerinde, polimegatizm ve azalmış pleomorfizm saptanır. Diyabetik hastaların %67'sinde endotel fonksiyonu normal kontrol hastalarına oranla daha düşüktür. Buna karşın, akut hiperglisemi sırasında korneal ödem glukoz seviyesinin normal olduğu zamanlara oranla daha azdır (58,64,65).

2.5.3. Glokom

Diyabet ile primer açık açılı glokom arasındaki ilişki halen tartışmalıdır. Birçok çalışmada, diyabet hastalarında primer açık açılı glokom oranında artış saptanırken, bazı çalışmalarda ise bu ilişki gösterilememiştir.

Diyabet, açı kapanması glokomu bulunan hastalarda da daha yüksek oranda saptanmaktadır. Lens kalınlığında artış ve otonomik disfonksiyona bağlı pupil dilatasyonu sorumlu tutulmuştur.

Ağır proliferatif diyabetik retinopatili hastalarda, gözün genel iskemisine bağlı olarak gelişen iris ve iridokorneal açı neovaskülarizasyonu durumlarında gelişen açı kapanması da göz içi basıncının yükselmesi ile sonuçlanır (61,66-70).

2.5.4. Kraniyal Nöropatiler

Diyabetes mellitus'un bir komplikasyonu da ekstraoküler kas felcidir. Çok sık görülmez ancak diyabetin ilk belirtisi olarak da ortaya çıkabilirler. Hastalığın şiddetlinden bağımsızdır. Okülomotor ve abduzens sinirleri, troklear sinire oranla daha fazla etkilenir. Sıklıkla izole tutulum gözlenir. Patogenezi ise tartışmalıdır. Vasküler ve metabolik problemlerin kombinasyonu, aksonal transfer ve vasküler geçirgenliği etkileyerek kraniyal nöropatilere neden olurlar. Fokal beyin sapı lezyonları bazı vakalarda gösterilmiştir (71,72).

2.5.5. İskemik Optik Nöropati

Optik disk kabarıklığı ve hiperemisi ile giden optik nöropati, tip I diyabetik hastalarda ikinci ve üçüncü dekadlarda ortaya çıkmaktadır.

Genellikle bilateralidir. Görme keskinliğinde olan azalma altı ay içerisinde düzelir. İskemik optik nöropati saptanan hastaların %24'ü diyabetiktir (73,74).

2.5.6. Lens

Katarakt gelişimi diabetin en önemli göz komplikasyonlarından biridir. İki tip katarakt gelişir. "Gerçek" diyabetik katarakt osmotik karakterdedir, insüline bağımlı diyabetlilerde ve sıklıkla ilk üç dekada ortaya çıkmaktadır. Juvenil-onset diyabetik katarakt olarak da adlandırılır. Kortikal "karyağdı manzarası" kesafetler, polikromatik kristaller veya kortekste vakuoller şeklinde görülür. Geri dönüşümlüdür.

İkinci tür diyabetik katarakt ise geri dönüşümsüzdür ve her iki diyabet türünde de görülebilir. Gelişimi uzun sürer ve ilk olarak 4 ve 5. dekalarda ortaya çıkar. Kataraktın türü yaşa bağlı olan değişikliklerle benzerdir.

Diyabetik sıçan modelinde lens kesafetlerinin özellikle arka subkapsüler bölgede ve ön korteks merkezinde olduğu ve osmotik hipotezi destekleyecek şekilde bu bölgelerde lens epitel hücre yoğunluğunda ve adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesinde azalma olduğu izlenmektedir (75,76)

Katarakt Oluşumunun Mekanizması:

1. Osmotik stres ve sorbitol yolu:

Yüksek düzeyde glukoz aldoz redüktaz enzimini aktive ederek lens içi sorbitol düzeyini artırır. Sorbitol, hücre içinde birikir ve hipertonic osmotik dengesizlik ile birlikte lens hidrasyonunu artırır. Sıçanlarda aldoz redüktaz inhibitörlerinin kullanımı ile sorbitol birikiminin ve lens kesafeti gelişiminin önlenemediği gösterilmiştir (77-79).

2. Protein Modifikasyonu:

Özellikle tip II diyabette görülen bir diğer mekanizma ise ileri glikasyon son ürünleri (AGE) ile sonuçlanan protein modifikasyonlarıdır. AGE, proteinler ile geniş çapraz bağlara sahiptir ve kataraktın nedeni olarak gösterilirler (61).

3 Oksidasyon:

AGE ürünlerinin direkt oksidasyonu veya hücrenin redoks siklusunda olan değişiklikler sonucu protein birikimi ve katarakt gelişimi meydana gelir.

Oksidatif hasar ile diyabetik lenslerde proteine bağlı serbest sülfidril ve karbonil proteinleri artar ve aynı zamanda antioksidan mekanizmalar da

baskılanır. Diyabetik sıçanlarda antioksidan mekanizmanın baskılanması ise hidrasyon değişikliklerine ve vakuol oluşumuna neden olur. İnsan lenslerinde yapılan çalışmalarda ise lipid peroksit seviyesinde artış saptanmıştır (61,80-82).

4. Elektrolit Dengesizliği:

Osmotik katarakt, elektrolit seviyesindeki değişiklikler sonucunda da ortaya çıkabilir. Lentiküler kalsiyum, magnezyum ve demir üzerinde yapılan bir çalışmada diyabetik sıçanlarda bir kalsiyum antagonisti olan verapamil kullanımının katarakt oluşumunu engellediği gösterilmiştir (83).

2.6 RETİNA

Retina, içte duyuşal retina ve dışta pigment epiteli olmak üzere iki esas bölümden oluşan ve optik sinirden ora serrataya kadar uzanarak vitreus boşluğunun arka bölümünü çevreleyen transparan bir membrandır. Ön tarafta silyer cisim epiteli olarak devam eder. Kalınlığı optik disk kenarında 0.56 mm, ora serratada 0.1 mm olup fovea merkezinde en incedir. Geleneksel olarak ve ışık mikroskobu bulgularına dayanarak retina dıştan içe doğru 10 ayrı kat şeklinde incelenmektedir.

1. Retina pigment epiteli (RPE)
2. Koni ve basiller
3. Dış limitan membran (fotoreseptörler arası zonula adherensler ve Müller hücreleri radyer çıkıntıları)
4. Dış nükleer kat (fotoreseptör nükleusları)
5. Dış pleksiform kat (fotoreseptör, bipolar, horizontal hücre sinaptik bağlantıları)
6. İç nükleer kat (bipolar, horizontal, amakrin ve Müller hücre nükleusları)
7. İç pleksiform kat (bipolar, amakrin, ganglion hücre sinaptik bağlantıları)
8. Ganglion hücre katı (ganglion hücre nükleusları)
9. Sinir lifleri katı (ganglion hücre aksonları)
10. Müller hücre terminal uzantıları ve bazal membran (iç limitan membran)

Ancak elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerden sonra retinanın farklı fonksiyonel oluşumlarını değerlendirmek daha uygun görülmektedir (84).

Retina pigment epiteli (RPE):

Tek katlı bir hücre tabakası olup, ön tarafta silyer epitelin pigmentli katı olarak devam eder. Hücreler çoğunlukla hekzagonal olup, santral retinada daha uzun ve silindirik, periferik retinada ise daha düzensiz ve küboidaldir. Bazal membranları, Bruch membranına sıkıca yapışık olup apekslerinde villöz uzantıları vardır. Bu uzantılar mukoid bir ortamda koni ve basil dış segmentlerini çevreler. Hücrelerin apeks kısımları hem zonüla okludens hem de zonüla adherenslerle sıkı sıkıya birbirine bağlıdır ve kan-retina bariyerinin oluşmasına katkıda bulunur. Apikal sitoplazma ve mikrovilluslarda çok sayıda yuvarlak ve oval melanin granülleri izlenir. Gövde kısmında nükleus ve lipofüsin granülleri vardır ve özellikle de bu granüller santral maküler alanda daha yoğun olarak gözlenirler. Fundus floresein anjiyografide (FFA) koroid floresansını engelleyerek bu alanın karanlık görülmesine yol açarlar. Hücrelerin taban kısmında da bol miktarda mitokondriler, lizozomlar ve golgi cisimciği vardır. Melanin pigmentinin en az olduğu hücre bölümüdür. RPE hücrelerindeki melanin, göz dibine granüler bir oftalmoskopik görüntü kazandırır (84).

Duyusal retina:

Duyusal retina (pars optika retina) fotoreseptör hücreler ile bunların çeşitli bağlantılarını içerir. Koni ve basiller retinanın ışığa duyarlı hücreleri olup, sinir sisteminin diğer duyuşal son organları gibi davranırlar. Bu hücrelerin aksonları görsel cevapları düzenleyen modülatör hücrelerle, bu hücreler de pik deşarjları beyne aktaran hücrelerle sinaps yaparlar. Retinanın destek yapısını da Müller hücreleri gliyal sistemi oluşturmaktadır (84).

Fotoreseptör hücreler:

Fotoreseptör hücreler altı bölümden oluşmaktadır:

1. **Dış segment:** Pigment epiteli ile ilişkili olan ve aralarında görme pigmenti bulunan disklerden oluşan kısımdır. İnsanda çoğunlukla silindirik yapıda (basil) olup sayıları 110-130 milyondur. Diğerleri ise konik şekildedir (koni) ve sayıları 6.3 ile 6.8 milyon arasındadır.

2. **Silyum:** dış segmenti, iç segmente bağlayan tüp şeklindeki bölümdür.
3. **İç segment:** Dış kısmına elipsoid denir ve mitokondriler içerir. İç kısmına myoid denir ve ribozomlar, golgi kompleksi ile çeşitli vezikül ve vakuoller ihtiva eder.
4. **Dış segment:** İç segmenti hücre gövdesine bağlar.
5. **Hücre gövdesi:** Hemen tamamını nükleus kaplar ve dış nükleer katta yer alır.
6. **İç lif:** Dış pleksiform katta yer alır ve basillerde sferül, konilerde pedikül denen özel sinaptik bir genişleme ile sonlanır (84).

Modülatör (düzenleyici) hücreler:

Fotoreseptör dış segmentlerinin uyarılması ile başlayan görme sinyalleri üç ayrı tip hücre ile düzenlenir ve aktarılır. Bunlar; bipolar, horizontal ve amakrin hücrelerdir.

Bipolar hücrelerin nükleusları iç nükleer kattadır. Dış dendritik kısımları dış pleksiform katta koni ve basil sinaptik vezikülleri ile, iç aksonal kısımları da iç pleksiform katta ganglion hücre dendritleri ile sinaps yapar.

Horizontal hücrelerin nükleusları iç nükleer katta, akson ve dendritleri dış pleksiform katta bulunur. Dendritleri çok sayıda yakın fotoreseptörlerle, aksonları da uzak fotoreseptör ve bipolar hücrelerle sinaps yapar. Görsel uyarıların düzenlenmesinden sorumludurlar.

Amakrin hücrelerin nükleusları iç nükleer kattadır. Bu hücrelerin prosesleri ganglion hücresi ve bipolar hücrelerle sinaps yapar. Görme impulslarının integrasyonunda inhibe edici bir fonksiyonu olduğu sanılmaktadır (84).

Taşıyıcı (iletim sağlayan) hücreler:

Bunlar, pik deşarjları aksonları boyunca orta beyine ileten ganglion hücreleridir. Nükleusları, retinanın en iç sellüler katını oluşturur. Fovea santralisin çevresinde 5-7 kat, perifer retinada tek kat olarak gözlenirler. Dendritleri bipolar hücre aksonları ve amakrin hücre prosesleri ile iç

pleksiform katta sinaps yapar Aksonları ise sinir lifleri katını oluşturur. Fovea santralisin ganglion hücrelerinden çıkan aksonlar direkt mediyale uzanarak optik sinire hemen hemen düz bir çizgi halinde katılırken, temporal retinanın diğer lifleri bu liflerin alt ve üst kısmından dolanarak, ancak retina horizontal çizgisini çaprazlamaksızın ve radyal bir tarzda optik sinire girerler. Diskin nazal tarafındaki lifler ise dikeye yakın bir radyal uzanım gösterirler. Bu dağılım glokoma bağlı görme alanı defektlerini anlamada önem kazanır. Santral retinal arter ve venin majör dalları sinir lifleri katı içinde yer alır (84).

Destek astroglia:

Retinanın iskelet desteğini Müller hücreleri sağlar Astrosit ve oligodendroglia benzeri hücrelerin de kısmi katkısı vardır. Müller hücrelerinin nükleusları iç nükleer katta yerleşmiştir. Bu hücrelerin iç ve dış retinaya ilerleyen uzantıları bal peteği görünümünde retinal çatı oluşturur ve iç limitan membranda sonlanır (84).

Retina bölgeleri:

Retina histolojik olarak üç farklı bölgeye ayrılır:

Ora serrata: Retinanın ön ucudur. Limbua yaklaşık olarak 6-8 mm mesafede yerleşmiştir. Nazal tarafta temporalden 1 mm daha yakındır. Burada duyuusal retinanın çok katlı yapısı aniden pigmentsiz silyer epitele dönüşür.

Santral retina (makula): Retinanın 6 mm çapında merkezi bölümüdür. Bu bölümde dış nükleer kattan itibaren iç katlarda sarı karotenoid bir pigment olan ksantofil (makula lutea) bulunur. Ayrıca ganglion hücreleri de birden fazla kat oluşturur.

Makula santralindeki 1.5 mm çaplı çukur alana fovea santralis adı verilir. Optik diskin 3 mm temporal ve 0.8 mm inferiorunda yer alır. Merkezindeki 400 mikron çaplı alan ise foveola olarak bilinir. Bu bölgede fotoreseptörler esas olarak konilerdir. Kapiller yapı içermez ve sadece koryokapillaristen beslenir

Perifer retina: Fotoreseptörler esas olarak basil hücreleridir.

Koniler santral retinadakilerden daha kalın ve ganglion hücreleri de daha geniş ve tek kat olarak düzenlenmiştir.

Fonksiyonel olarak da retina, fovea merkezinden geçen dikey bir çizgi ile temporal ve nazal iki bölüme ayrılır. Bu çizginin temporalindeki sinir lifleri aynı taraftaki corpus geniculatum lateraleye uzanırken, nazalindeki ganglion hücrelerinden gelen aksonlar kiyazmada çaprazlaşarak karşı tarafa geçmektedir (84).

Retina kan dolaşımı:

Retinanın dış pleksiform kata kadar uzanan dış bölgesini koryokapillaris ile koroidal dolaşım beslerken, iç kısmını da santral retinal arter ve dalları kanlandırır.

Santral retinal arter, lamina kribrozayı geçerken damar duvarının kalınlığı % 50 kadar azalır. İç elastik lamel kaybolur ve orta kas katı incelir. Böylece üst ve alt papiller ana dallar da dahil olmak üzere retinada gözlenen temporal ve nazal tüm dallanmalar artık arteriyoldür.

Retina kapillerleri çoklu arteriyoler bağlantılar içerir. Böylece bir besleyici damarın kapanması ile kapiller yatakta dolaşım durmaz. Kapillerler, sinir lifleri katında yüzeyel ağ ve iç nükleer katta intraretinal ağ olmak üzere birbiriyle ilişkili iki kat oluştururlar. Arteriyel anomaliler (hipertansiyon) daha çok sinir lifleri katındaki yüzeyel ağı etkilerken, venöz anomaliler (DM) iç pleksusu tutmaya meyillidir. Arterler etrafında geniş bir bölgede kapiller yapı bulunmaz. Retina kapillerlerinde endotel hücreleri düzenli bir dizilim gösterir ve terminal barlarla birbirine bağlı olup kan-retina bariyerini oluştururlar. Bu hücrelerden bazal membranları ile ayrılan ve perisit denen intramural hücrelerin de bu bariyerin korunmasında önemli rolleri vardır.

Retina venleri de esas olarak arterlerin dağılımını izler. Az miktarda bağ doku ile desteklenen bir endotel katından oluşurlar. Arterlerin çaprazladığı bölgelerde aynı adventisyayı paylaşırlar. Arteriyoller çapraz yerlerinde genel olarak vitreus tarafındadır. Santral retinal ven de arterin girdiği yerden optik sinir terk eder. Optik sinir etrafındaki meningeal kılıfları

geçtiği için, kafa içi basınç artışlarına hassastır ve papilödem oluşmasında önemli bir anatomik özelliktir (84).

2.7. DİYABETİK RETİNOPATİ

20-65 yaş arası bireylerde en sık körlük nedenidir. Retinanın prekapiller arteriollerini, kapillerlerini ve venüllerini tutan bir mikroanjiyopati tablosudur. Diyabetlinin yaşam süresinin uzaması, görülme sıklığını da arttırmıştır. 10 yıllık diyabetlide %20, 25 yıllık diyabetlide %85 oranında görülür. Diyabetik retinopati, insüline bağımlı diyabetlilerde (%40) bağımlı olmayanlara (%20) oranla daha sık görülür. Retinopatinin gelişimini hızlandıran faktörler; diyabetin süresinin uzaması, metabolik kontrolün kötü olması, gebelik, hipertansiyon, renal hastalık, şişmanlık, hiperlipidemi, tütün kullanımı ve anemidir (85,86).

2.7.1 Etyopatogenez:

Retinopatiyi oluşturan olayların tümünden mikrovasküler tıkanma ve sızıntı sorumludur.

1. Mikrovasküler oklüzyon: Kapiller bazal membranda kalınlaşma, endotelial hücre hasarı ve proliferasyonu, kırmızı kan hücrelerinde deformasyon ve trombositlerde olan değişikliklere bağlı gelişen adhezyon ve agregasyon mikrovasküler tıkanmanın patogenezinin sorumludurlar. Retinadaki kapiller perfüzyonun kapanması hipoksi ile sonuçlanır. Retina hipoksisinin iki önemli etkisi arteryovenöz şantlar ve neovaskülarizasyondur (85,86).
2. Mikrovasküler sızıntı: Retina kapillerinde bulunan endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantılar iç kan-retina bariyerini meydana getirir. Perisitler, kapillerin etrafını çepeçevre sarar ve bunların damar duvarının yapısal bütünlüğünden sorumlu oldukları düşünülür. Sağlıklı bir retinada kapiller duvarda her bir endotele bir perisit eşlik ederken diyabetik hastalarda perisit sayısında azalma görülür. Perisitlerin sayısındaki bu azalış kapiller duvarda distansiyonla

birlikte kan retina bariyerinde bozulma ile sonuçlanır. Mikroanevrizmalar, lokal kapiller distansiyon neticesinde meydana gelebilen kese şeklindeki küçük ceplerdir. Bunlar ya sızdırır ya da tromboze olur. Vasküler geçirgenliğin artması intraretinal hemoraji veya retinal ödem ile sonuçlanır (85,86).

2.7.2 Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması:

Diyabetik retinopati klinik olarak nonproliferatif ve proliferatif olmak üzere iki ana grupta incelenir:

1. Nonproliferatif diyabetik retinopati:

- a. Zemin diyabetik retinopati: Retinanın iç nükleer tabakasında yerleşmiş mikroanevrizmalar, kapillerin venöz sonlanmalarından kökenini alan intraretinal hemorajiler, retinanın iç pleksiform ve iç nükleer tabakaları arasında bulunan sert eksudalar ve retinal ödem bu tip retinopatinin kliniğini oluşturur.
- b. Preproliferatif diyabetik retinopati: Tesbihlenme, kıvrım artışı ve segmentasyon tarzında venöz değişiklikler, retina sinir liflerinin oklüzyonuna bağlı gelişen yumuşak eksudalar, koyu leke biçiminde hemorajiler ve intraretinal mikrovasküler anomaliler (IRMA) görülmektedir (85,86).

2. Proliferatif diyabetik retinopati:

Diyabetik olguların % 5-10'unda izlenir. İnsüline bağımlı diyabetli olgularda otuz yıl içinde %60 oranında proliferatif diyabetik retinopati görülür. En önemli bulgusu neovaskülarizasyondur. Başlangıçta yeni damarlar, en sık olarak venüllerden doğan endotelial proliferasyonlar olarak ortaya çıkar. Sonrasında ise internal limitan membrandaki defektlerden geçerek retina ile posterior kortikal vitreus arasındaki potansiyel düzleme uzanırlar. Vitreus

ayrışması ve vitreus jeli içine ve preretinal bölgeye olan hemorajiler diğer önemli bulgularıdır. Görmeyi tehdit eden ciddi komplikasyonlar tedavinin yapılamadığı veya yetersiz olduğu gözlerde ortaya çıkar Bunlar; persistan vitreus içi hemoraji, traksiyonel retina dekolmanı, opak membranlar, sönmüş göz evresi ve rubeosis iridis ve neovasküler glokomdur (85,86).

2.7.3. Diyabetik Retinopati Oluşum Mekanizmaları:

1. İleri glikasyon son ürünleri (AGE): AGE ve reseptörlerinin lokalizasyonu diyabetik mikrovasküler hasar alanlarında retinada iç pleksiform tabakada ve iç limitan membranda gösterilmiştir. Vitreus içerisinde AGE seviyesinin artması Müller hücrelerinde vasküler endotelyal büyüme faktör (VEGF) yapımını artırarak intraoküler neovaskülarizasyon oluşumunu uyarır. AGE inhibitörü olarak aminoguanidine ve monoklonal antikolar ile yapılan çalışmalarda, AGE seviyesinde düşüş gösterilmiştir. Perisit kaybı ve aselüler kapiller formasyon kan glukoz ve AGE seviyesinde orta derecede artış ile birlikte iken endotelyal hücre proliferasyonu için yüksek miktarda glukoz ve AGE gereklidir (87-90).
2. Oksidasyon: Birçok çalışmada, diyabetik retinopati durumlarında proteinlere olan oksidatif hasar ve antioksidanların fonksiyonlarında olan değişiklikler gösterilmiştir. Goto-Kakizaki (GK) sıçanları, hereditör insüline bağımlı olmayan diyabet için model olarak kullanılmaktadır. GK sıçanları üzerinde yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna göre glutatyon seviyesinde ve endotel/perisit oranında değişiklikler saptanmıştır. Aminoguanidin kullanımı ile birlikte hiperglisemi derecesinde ve endotel/perisit oranında düzelme görülmemiştir. Artmış sitoplazmik laktat/pyruvate oranındaki artış ile birlikte NAD⁺/NADH oranında progresif azalma deneysel diyabet hayvanlarında erken dönemlerde gösterilmiştir. Amin oksidaza bağlı deaminasyon sonrasında, endotelyal hasar ve plak formasyonu, oksidatif glikasyona veya LDL oksidasyonuna neden olabilecek

artmış oksidatif stres ve vasküler sistem hasarı görülmektedir. Formaldehit uygulaması da, ileri glikasyon ve protein hasarı ile sonuçlanır. Birçok ekzojen antioksidan uygulamaları, hiperglisemiye bağlı gelişen oksidatif hasarı önlemede başarılı olmuştur. C ve E vitaminleri bunlar arasında en sık uygulanan antioksidanlardır (91-95).

3. Büyüme Faktörleri: Vasküler geçirgenlik artışı ve neovaskülarizasyon, diyabetik maküler ödem ve proliferatif diyabetik retinopati ile sonuçlanır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ise oküler neovaskülarizasyon ve oküler olmayan dokulardaki damar geçirgenliğinin önemli uyarılarından biridir. İntravitreal VEGF'un kaynağı iskemik retina olmakla birlikte serumdaki düzeyi de artmış gözden bulunur. VEGF lokalizasyonu ve konsantrasyonu kesin olarak belirlenememiştir. Ancak intraoküler vasküler geçirgenlikteki artış, bu olaya neden olan protein kinaz C'nin inhibitörlerinin kullanımı ile birlikte oluşan oküler hastalıkların geriye dönüşünün gösterilmesi ile birlikte ispatlanmıştır. İnsülin benzeri büyüme faktörü, proliferatif diyabetik retinopatili hastalarda retinal kapiller perfüzyonun bozulmasına bağlı gelişen retinal iskeminin bulunduğu hastalara oranla daha yüksek seviyede bulunur (95-97).

4. Diğer faktörler:

- a. Aldo redüktaz aktivasyonu ile sorbitol ve fruktoz düzeylerinde artış.
- b. Hiperglisemiye bağlı diaçilgliserol (DAG) ve protein kinaz C (PKC) aktivasyonu. PKC ve DAG, ekstraselüler matriks ve sitokin üretiminde artışa neden olur ve vasküler geçirgenlik ve vasküler hücre proliferasyonu artar.
- c. Diyabetik retinada nitrik oksit sentetaz aktivitesinde artış, amino asitlerin bazal seviyesinde azalma ve L-arginine alımında artış.
- d. Serum trigliserid seviyesi ile mikrosirküler damarlarda olan değişimler.
- e. Glial reaktivite.
- f. Diyabetik retina hücrelerinde proteinlerin mono-ADP-ribosilasyonu.

- g. Kallikrein-bağı proteinlerin varlığı.
- h. Prostanoid metabolizmasındaki değişimler.
- i. Endotel hücre ölümüne bağlı olarak, damarların ve mikroanevrizmaların lökosit tıkaçı ile kapanması.
- j. Retinada lökosit birikiminde artış ve buna bağlı mikrovasküler oklüzyon ve disfonksiyon.
- k. Endotelin miktarında artış.
- l. Trombosit hiperaktivasyonu.
- m. Retinada nöral hücre apoptosisinde artış (98-115).

2.8 LİPOİK ASİT

İlk olarak Reed ve arkadaşları tarafından izole edilen α -lipoik asit (ALA) suda erimeyen, organik çözücülerde eriyebilen bir maddedir. Piruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz enzim komplekslerinde önemli rol oynayan bir kofaktördür. Önce vitaminler sınıfına dahil edilmesi önerilmiş fakat daha sonra hayvanlar ve insanlar tarafından da sentezlenebildiği gözlenmiştir. ALA ve DHLA, ideal antioksidanın tüm kriterlerini içermeleri nedeniyle "evrensel antioksidanlar" olarak adlandırılmışlardır. ALA, oral yolla alındığında hızlı absorbe olur ve bazı dokular tarafından DHLA'e çevrilir. Her iki form, lipid ve aköz ortamlarda serbest radikallerin aktivitesini azaltır ve metal bağlayıcı etki gösterir. Ek olarak, DHLA diğer antioksidanların rejenerasyonunda rol alır (4,116-118).

2.8.1 Antioksidan Aktivite:

ALA'nın antioksidan etkileri ilk olarak 1959 yılında Rosenberg ve Culik tarafından gösterilmiştir. Antioksidan etkilerini aşağıda yer alan mekanizmalar ile gösterir:

1. Reaktif oksijen türleri ile reaksiyon ve metal bağlama:

Lipoik Asit: Hidroksil radikali, hipokloröz asit ve tekil oksijen ile reaksiyon gösterir. Buna karşın, hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve

peroksil radikallerini ise etkilemez. Ayrıca metaller (kadmiyum, demir, manganez, çinko, bakır) ile bağlayıcı etki gösterir.

Dihidrolipoic asit: Hipokloröz asit, peroksil radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerken, hidrojen peroksit ve tekil oksijen üzerinde etkisizdir. Lipoik asit gibi bağlayıcı etkisi mevcuttur.

2. Diğer antioksidanlar ile reaksiyon: DHLA, askorbik asit ve E vitamininin radikal formlarından yeniden oluşumunu sağlar. Hücre içi glutatyon seviyesini artırarak da antioksidan etki gösterirler.

3. Proteinlerin ayarlanması: Ekzojen olarak verilen α -lipoik asit, intraselüler fonksiyonları sadece antioksidan aktivite ile değil aynı zamanda thiorredoksin, enzimler ve taşıyıcı proteinler gibi tiol içeren proteinleri etkileyerek ayarlar.

4. Genler üzerine olan etki: NF-KB ve c-fos genleri üzerine olan etkileri araştırılmaktadır (119).

Antioksidan etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, α -lipoik asidin, diyabet, iske-mi-reperfüzyon hasarı, metal zehirlenmesi, radyasyon hasarı, ve HIV enfeksiyonu tedavisinde etkili olabileceği saptanmıştır (121-124).

2.8.2 Diyabet ve α -Lipoik Asit:

Çoğu diyabetik komplikasyonun, oksidatif serbest radikal oluşumu ile ilgili olduğu gösterilmiştir. ALA ve DHLA hem Tip I hem de Tip II diyabette koruyucu ve iyileştirici etkilere sahiptir. Diyabetik hastaların serum tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) seviyeleri diyabetik olmayanlara oranla daha yüksek bulunmuştur. Hayvan deneyleri ALA'nın diyabette sadece antioksidan özelliklerinden dolayı değil başka endikasyonlarla da kullanıldığını göstermektedir. Örneğin; intraperitoneal ALA uygulamasının, streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş sıçanların fetüslerini nöral tüp hasarından koruduğu, glisemi-yi düşürdüğü ve kas GLUT-4 seviyelerini artırdığı ve gentamisin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu bildirilmiştir (125-130).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. DENEY HAYVANLARI

Bu çalışmada, ağırlıkları 230-300 gram arasında değişen, 37 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. Her kafeste 6 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 GRUPLARI

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: Bu gruba deney başlangıcında 1 kez STZ taşıyıcısı intraperitoneal olarak enjekte edildikten sonra, 10 hafta süresince her gün intraperitoneal olarak ALA taşıyıcısı enjeksiyonu uygulandı. Bu grupta 10 sıçan vardı.

2. Lipoik asit grubu: 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. Bu grupta 10 sıçan vardı.

3. Diyabet grubu: Başlangıçta 20 sıçan ile başlanan, fakat diyabet nedeni ile ölümlerden dolayı 9 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 şekeri ölçüldü ve 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 8 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. 22 G iğne ile globun posterioruna optik sinir komşuluğuna insizyon uygulandı. Bu insizyondan makas ile kesi uygulanıp glob üzerine bastırmak suretiyle retina çıkartıldı. Alınan bu retina 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 retinadaki biyokimyasal tetkikler aynı gün içerisinde uygulandı ve bu süre içerisinde buz içinde saklandı.

3.3. METODLAR

3.3.1. Protein Tayini

Retina içerisinde yer alan protein içerikleri, Lowry'nin metoduna göre bovine serum albümin (BSA) standardı kullanılarak ölçüldü (131).

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 absorbansı 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 hazırlanır ve protein standardı olarak kullanılır.

Yöntem:

Numunelerdeki protein tayini, 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. Deney hayvanlarından alınan retina miktarı çok düşük olduğu için protein miktarları konusunda kesin bir değer elde edilememiştir. Buna karşın, SOD, CAT ve MDA düzeyleri 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 (132).

Prensip:

Epinefrinin otooksidasyonu sonucu adrenokrom oluşur. Bu otooksidasyonun, Cu/Zn-SOD ile inhibisyonunun yüzdesine göre, enzim aktivitesi hesaplanır. Adrenokromun 480 nm'de vermiş olduğu maksimum absorbands 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 körüne karşı, kontrol ve numune tüplerindeki absorbans artışları 3 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) numuneye benzer 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 inhibisyon yüzdesi sıfırdır. Standart ve numune tüplerindeki inhibisyon yüzdeleri, Cu/Zn-SOD konsantrasyonuna bağlı olarak değişir.

$\Delta OD / dk$ (kontrol)	100 aktif birim
$\Delta OD / dk$ (standart)	X

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

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

$\Delta OD / dk$ (kontrol)	100 aktif birim
$\Delta OD / dk$ (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 (CAT) Aktivitesinin Tayini

CAT aktivitesi, Aebi'nin yöntemine göre ölçüldü (133).

Prensip:

CAT 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.

Ayırıcılar:

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:

CAT 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:

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

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

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

Litredeki değeri hesaplanacağı için çıkan sonuç 1000 ile çarpılır

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

k : birinci dereceden reaksiyon hız sabiti

A₀ : 0. saniyedeki absorbans değeri

A₁₅ : 15. saniyedeki absorbans değeri

Anormal kinetiği nedeni ile CAT 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 (MDA) Tayini

MDA düzeyleri, Gümüşlü ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wasowicz ve arkadaşlarının yöntemleri kullanılarak ölçüldü (134,135).

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 (µl)
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 spektrofloreometrede ölçüldü. MDA konsantrasyonları, grafikten nmol / ml olarak hesaplandı. MDA sonuçları, nmol / mg protein şeklinde verildi.

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

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

3.5. KULLANILAN LABORATUVAR MALZEMELERİ

3.5.1. Gereçler

1. Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601
2. Spektrofluorometre: Shimadzu RF-5000
3. Su banyosu: Precitherm PFV-Boehringer Mannheim
4. Santrifüj: Heraeus Sepatech Labofuge 200
5. Hassas terazi: Sartorius 2472
6. Test tüpleri: 16×160 mm
7. Ependorflar
8. Otomatik pipetler: Biohit marka; 5-50, 50-200, 200-1000 µL'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 ŞEKERİ DÜZEYLERİ

Dört grupta yer alan hayvanların son açlık kan şekeri düzeyleri tablo 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 ($p>0.05$).

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

Grup	Kan Şekeri Düzeyleri (ortalama $\pm$ standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	155.20 $\pm$ 13.92	
Lipoik asit grubu (LA)	141.40 $\pm$ 15.19	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	409.33 $\pm$ 53.53	b: $p<0.001$ c: $p<0.001$
Diyabet + Lipoik asit grubu (D+LA)	395.25 $\pm$ 34.82	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 D+LA'nın, e: LA ve D+LA'nın, f: D ve D+LA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

4.2. KİLO DEĞİŞİMLERİ

Dört grupta yer alan sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki farklar tablo 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 ($p>0.05$).

Tablo 4.2. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark (g)

Grup	Kilo Değişimleri (ortalama $\pm$ standart hata)	p
Kontrol grubu (K)	41.00 $\pm$ 2.08	
Lipoik asit grubu (LA)	32.00 $\pm$ 4.84	a: p>0.05
Diyabet grubu (D)	-56.56 $\pm$ 7.13	b: p<0.001 c: p<0.001
Diyabet + Lipoik asit grubu (D+LA)	- 63.75 $\pm$ 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 D+LA'nın, e: LA ve D+LA'nın, f: D ve D+LA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

4.3. RETİNA ÖRNEĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.3.1. Retina SOD Aktivitesi:

Retinadaki SOD aktiviteleri tablo 4.3.1'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasındaki SOD aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p>0.05).

Tablo 4.3.1. Grupların retinadaki SOD değerleri (U/mg protein)

Grup	SOD (ortalama $\pm$ standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	149.32 $\pm$ 24.53	
Lipoik asit grubu (LA)	169.86 $\pm$ 38.33	a: p>0.05
Diyabet grubu (D)	168.47 $\pm$ 42.08	b: p>0.05 c: p>0.05
Diyabet + Lipoik asit grubu (D+LA)	177.98 $\pm$ 22.64	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 D+LA'nın, e: LA ve D+LA'nın, f: D ve D+LA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.2. Retina CAT Aktivitesi:

Retinadaki CAT aktiviteleri tablo 4.3.2'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasındaki CAT aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$)

Tablo 4.3.2. Grupların retinadaki CAT değerleri (k/mg protein)

Grup	CAT (ortalama $\pm$ standart hata)	p
Kontrol grubu (K)	4.02 $\pm$ 1.19	
Lipoik asit grubu (LA)	3.36 $\pm$ 0.74	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	3.91 $\pm$ 0.64	b: $p>0.05$ c: $p>0.05$
Diyabet + Lipoik asit grubu (D+LA)	3.12 $\pm$ 0.89	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 D+LA'nın, e: LA ve D+LA'nın, f: D ve D+LA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

4.3.3. Retina MDA Değerleri:

Retinadaki MDA değerleri tablo 4.3.3'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasındaki MDA aktiviteleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$).

Tablo 4.3.3. Grupların retinadaki MDA değerleri (nmol/mg protein)

Grup	MDA (ortalama $\pm$ standart hata)	p
Kontrol grubu (K)	0.47 $\pm$ 0.20	
Lipoik asit grubu (LA)	0.31 $\pm$ 0.97	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	0.51 $\pm$ 0.14	b: $p>0.05$ c: $p>0.05$
Diyabet + Lipoik asit grubu (D+LA)	0.36 $\pm$ 0.90	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 D+LA'nın, e: LA ve D+LA'nın, f: D ve D+LA'nın istatistiksel karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Diyabet, oluşturduğu göz komplikasyonları ile, çalışan yaş grubunda gözlenen görme kayıplarının en sık nedenidir. Bu görme kayıplarının en ağır ve dönüşümsüz olanları da retinopati nedeniyle meydana gelir.

Diyabetik retinopatide mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde birincil neden hiperglisemidir. Hipergliseminin bu etkisi, diyabetik olmayan hayvan gruplarına galaktozla zenginleştirilmiş diyet verilmesi ve sonucunda diyabetik hayvanlarda insanlarda rastlanan retinal kapiller lezyonların görülmesi ile kanıtlanmıştır. Hipergliseminin retinopati geliştirmesi; poliol metabolizmasındaki artış, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu, protein kinaz C'nin aktivasyonu veya oksidatif stres ile yakından ilişkilidir (2,3).

Serbest radikallerin salınımında artış ve antioksidan sistemde oluşan azalma, kontrolü zor olan diyabetik vakalarda lipid peroksidasyonunda ve diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli bir rol oynamakta ve retinal hastalık ile birlikte ortaya çıkan katarakt gelişim oranında artış ile sonuçlanmaktadır (136).

Diabetes mellitusa bağlı komplikasyonların gelişiminde en sık suçlanan mekanizma oksidatif strese bağlı olarak serbest radikal oluşumu ve bunların lipid peroksidasyonuna yol açması ile hücre hasarı oluşumudur. Serbest radikal terimi; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atom veya moleküller için kullanılır. Oksidatif strese bağlı olarak serbest radikal oluşumu ve artmış lipid peroksidasyonu, reaktif oksijen metabolitleri oluşturarak yaşlanma ile birlikte görülen katarakt, ateroskleroz, neoplazm, diabetes mellitus, diyabetik retinopati, gastrointestinal sistemin kronik enflamatuvar hastalıkları, cilt yaşlanması, eklem hasarı, Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulmuştur. Oksidatif hasara karşı olarak serbest radikal oluşumunu azaltmak veya kompanze etmek için hücre içi ve hücre dışı enzimatik ve enzimatik olmayan koruma mekanizmaları mevcuttur. Oksidatif stresi kompanze 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 (137)

Oküler dokuları oksijen radikalleri ile oluşan hasarlardan korumada antioksidan enzimler önemli görev yaparlar. Süperoksit dismutaz enziminin bakır-çinko ve manganez içeren iki türü, süperoksit iyonunu hidrojen peroksit çevirir. Hidrojen peroksit iyonu daha reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikaline dönüşebilir. Süperoksit dismutaz enzimi, bu nedenle aktivitesinin etkili olabilmesi için katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte reaksiyon gösterir. 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 oluşturmaktadırlar (138).

Retina vücut dokuları içerisinde oksidatif strese olan duyarlılık açısından ilk sıralarda yer almaktadır. Bu durumdan retinanın bol miktarda mitokondri içermesi nedeniyle oksijene daha fazla maruz kalması veya ışığa duyarlı retinal pigmentlerin varlığı sorumlu tutulmuştur (139).

Hücre zarları, yüksek oranda çoklu doymamış yağ asitleri içermeleri nedeni ile oksidatif atak sonrasında lipid hidroperoksit seviyesinde artışa neden olurlar. Lipid peroksidasyonu doku hasarı ve hastalıklarının oluşumunda serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma mekanizmasındaki dengenin bozulması sonucunda artan önemli bir mekanizmadır. Diyabetik retinopatide oluşan neovaskülarizasyonlardan lipid serbest radikalleri sorumlu tutulmuştur (137,140).

Bir bileşiğin antioksidan olarak kabul edilebilmesi için gerekli kriterler; serbest radikal yakalanması için spesifik olması, metal bağlayıcı etkisinin bulunması, diğer antioksidanlar ile ilişkiye girebilmesi ve gen iletimini etkilemesi şeklinde özetlenebilir. 1951'de Reed ve ark. Tarafından tanımlanan α -lipoik asit ve son yıllarda tanımlanan dihidrolipoik asit çifti bu kriterler açısından ideale yakındırlar ve "evrensel antioksidanlar" olarak kabul edilmektedirler. ALA kan-retina bariyerini geçerek oküler dokular üzerinde etki gösterir. Son yıllarda ALA'nın ve redükte formu dihidrolipoik asitin (DHLA)

olası antioksidan etkilerine yönelik olan çalışmalar yoğunluk kazanmıştır (116,117,141-143).

ALA GLUT-1 ve GLUT-4 üzerinden ve insüline bağlı glukoz taşınması üzerinde aditif etki ile izole sıçan diaframı, kalbi ve myotübüllerinde glukozun hücreye geçişini artırır. Henriksen ve ark. insüline dirençli obez Zucker sıçan modelinde insülin varlığı veya yokluğu durumlarında ALA'nın glukoz alımını arttırdığını göstermişlerdir. Obrosova ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdıkları sıçan gruplarında ALA kullanımı ile kan glukoz konsantrasyonları ve kilo kaybında düzelme saptamamışlardır. Bizim çalışmamızda yer alan hayvanlarda da lipoik asit kullanımı ile birlikte kan glukoz seviyesinde azalma görülmemiştir. Bu sonuçlar insülin yokluğu durumunda glukozun hücre içerisine geçişinde ALA'nın etkisinin olmadığını desteklemektedir (144-148).

Obrosova ve ark. tip I diyabet oluşturulan sıçan gruplarında 6 hafta boyunca her gün intraperitoneal olarak 100 mg/kg dozunda uygulanan ALA'nın retinal malondialdehit seviyesinde belirgin bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Yazarlar bu etkiyi ALA'nın serbest radikal indirgeyici ve metal şelatlayıcı etkisine bağlamışlardır. Bu çalışma grubunun yaptığı bir diğer çalışmada da, sıçan retinasında diyabet ile birlikte artmış lipid peroksidasyonunun ve azalmış süperoksit dismutaz seviyesinin ALA ile engellendiği gösterilmiştir (143,148).

Ansari NH ve arkadaşları hiperglisemiye bağlı gelişen serbest radikallerin poliansatüre yağ asitlerine dönüşerek retinada harabiyete neden olduklarını ve antioksidan bir ajan olan Trolox'un perisit kaybını engelleyip fonksiyonunu düzenleyerek diabetik retinopati gelişimini engellediğini göstermiştir. Kowluru RA ve arkadaşları; diabetik ve galaktozemili rat retinalarında antioksidan enzim düzeylerinde belirgin bozulma olduğunu ve ekzojen antioksidan takviyesinin bu enzimlerin aktivitesini normale döndürebildiğini göstermiştir. Yine Kowluru RA ve arkadaşları; diabet ve galaktozemide retinadaki glutatyon redüktaz, glutatyon peroksidaz, SOD ve katalaz aktivitelerinin azaldığını; MDA aktivitesinin ise arttığını göstermişlerdir (149,150).

Hammes ve arkadaşları; Streptozosin ile indüklenmiş diabetik rat modelinde Nicaratin ile antioksidan tedavinin yararını sınırlı görmüşlerdir (151).

Kowluru RA; antioksidan ajanların diabetik retinopati gelişimini, mikrovasküler apoptozisi inhibe ederek engellediklerini göstermişlerdir (152).

Szabo ME ve arkadaşları; antioksidan bir ajan olan kalsiyum dobesilat (DOXİUM) ile oral tedavinin diabetik rat retinasında iskemi/reperfüzyona bağlı oksidatif strese karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir (153).

Maejima K; diabetik ratlarda artmış oksidatif strese bağlı olarak NO aktivitesinin düşmesinin (ekspresyonunda artma veya anormal metabolizması sonucu) endotel bağımlı vazodilatasyonu azaltarak diabetik mikrovasküler komplikasyonlara neden olduğunu göstermişlerdir. Du Y ve arkadaşları; hipergliseminin retina hücrelerinde NO üretimini arttırdığını ve aminoguanidinein bunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir (154,155).

Armstrong D ve arkadaşları; streptozosin ile oluşturulmuş diabetik rat modelinde lipid peroksidasyon ürünlerinin indirekt göstergesi olan TBARS seviyelerini plazmada ölçmüşlerdir. TBARS diabetik rat plazmasında anlamlı olarak yüksek izlenmiştir. Retina hasarı iç ve dış nükleer katta hücre sayısında azalma, fotoreseptörlerde kayıp ve organizasyon bozukluğu, retina pigment epiteli bazal membranında kalınlaşma olarak izlenmiştir. Retina hasarı ile lipid peroksidasyon ürünleri miktarları uyumlu idi. Koruyucu enzimlerdeki miktar değişiklikleri serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonunun etyolojide rol oynadığını göstermektedir. Bu çalışma TBARS'ın oksidatif durumdaki değişiklikleri göstermede ve diabetik hastaların takibinde ucuz ve duyarlı bir laboratuvar yöntemi olabileceğini göstermektedir. Kowluru RA ve arkadaşları diabete bağlı olarak artan glutamat, TBARS ve NO düzeylerinin antioksidan ajan kullanımı ile normale döndüğünü göstermişlerdir. Hartnett ME ve arkadaşları; diabetik olgularda TBARS seviyesinin arttığını, SOD ve GSH-Px miktarının azaldığını gösterdi. Ancak bunların miktarları ile retinopati şiddeti arasında ilişki yoktu (156-158).

Kowluru RA ve arkadaşları; diabeti ve galaktozemisi olan ratlarda retina gama-glutamil transpeptidaz aktivitesini ve glutatyon seviyelerini belirgin olarak düşük izlerken; serebral korteksde bu parametrelerde değişiklik izlememişlerdir. Ayrıca antioksidan ajanlar olan askorbik asit ve alfa-tokoferol takviyesi ile retina gama-glutamil transpeptidaz aktivitesinin ve glutatyon seviyesindeki düşüşün inhibe olması ve yine serebral korteksde bu parametrelerin değişmemesi düşüş nedeni olarak hiperglisemiye bağlı oksidatif stresi düşündürmüştür. Kunisaki M ve arkadaşları da; D-alfa-tokoferol kullanımı ile hiperglisemiyle indüklenmiş DAG-PKC yolunun düzeltilerek diabetik retinadaki anormal kan akımının düzeldiğini göstermişlerdir (159,160).

Nishida T ve arkadaşları; diabetik rat retinasında SOD aktivitesinin azaldığını, artan süperoksitlerin doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girip lipid peroksidasyon ürünlerini arttırdığını göstermişlerdir. Rema M ve arkadaşları; diabetik olgularda SOD, E ve C vitamini seviyelerinin azaldığını; bunu kompanze etmek içinse katalaz ve glutatyon peroksidaz seviyelerinin arttığını göstermişlerdir (161,162).

Thornalley PJ ve arkadaşları; diabetik komplikasyonları ortaya çıkışını diabetin süresi ve hastanın yaşı ile doğru orantılı bulurken, eritrositlerdeki redükte glutatyon seviyeleri ile ters orantılı bulmuşlardır (163).

Sözmen EY; katalaz/süperoksit dismutaz ve katalaz/paraxonaze oranlarının HbA1c düzeyleri ile orantılı olduğunu ve zayıf glisemik kontrolün gösterilmesinde yararlı olduğunu ve diabetik komplikasyon gelişiminde risk faktörü olduğunu göstermişlerdir (164).

Glial hücreler retinal nöronlara ve kan hücrelerine yapısal ve metabolik destek sağlar. Lieth E ve arkadaşları; streptozosin ile indüklenmiş diabeti olan rat modelinde ELİSA ile glial fibriller asidik protein ekspresyonunu incelediler. 1. ayda GFAP düzeyi normal iken 3. ayda beş kat artış izlenmiştir. Bu artış hem astrositlerde hem de Müler hücrelerinde izlendi. Glial hücre fonksiyonundaki bozukluk retinanın glutamatı glutamine dönüştürme yeteneğini azaltır bu da glutamat eksitotoksitesine neden olur (165).

Hammes HP ve arkadaşları; 15 yıldan uzun süreli diabeti olan tüm olgularda retina kapillerlerinde yapısal değişikliklerin geliştiğini göstermişlerdir. Asellüler tıkalı damarlar hipoksi yaratarak anormal anjiogenezisi uyarak görmeyi tehdit eden komplikasyonların ortaya çıkışına neden olur. Diabetik komplikasyonların gelişiminde farklı bir teori olan apoptozis yani programlı hücre ölümü erken evrede Müller ve ganglion hücrelerini etkiler. Bunlardan salınan glial fibriller asidik protein NGF reseptörlerinde upregülasyona neden olur. Bu diabetik ratlarda NGF verilmesi apoptozisi azaltarak perisit kaybını ve asellüler tıkalı damarların oluşumunu önlemiştir. Augustine AJ ve arkadaşları; diabetik olgularda sıkı kan glukoz seviyesi kontrolünün oksidatif doku hasarını ve proliferatif aktiviteyi sistemik olarak ve gözde azalttığını gösterdiler. Oksidatif metabolitler, VEGF gibi GF'lerin ve sitokinlerin miktarını artırarak proliferasyonu stimüle ederler. Hiperglisemide oksidatif metabolitlerin rölatif artışı retina damarlarını harap eder ve proliferatif aktiviteyi artırarak diabetik retinopati tablosunu oluşturur (166,167)

Lightmann S; intrasellüler bir enzim olan aldoz redüktazın glukozu sorbitole dönüştürerek hücrede hasara yol açtığını göstermiştir. Lens ve retinada sorbitol birikimi diabetin majör komplikasyonları olan katarakt ve retinopatinin patogeneğinde önemli rol oynar. Aldoza redüktaz inhibitörlerinin kullanımının bu komplikasyonları önleyebildiği deneysel modellerde gösterilmiştir. Robinson WG Jr ve arkadaşları; galaktozemili ratlarda retina kapillerlerindeki bazal membran kalınlaşmasının aldoz redüktaz inhibitörleri ile önlenemediğini göstermişlerdir (168,169)

Tüm deneysel ve klinik çalışmalar diabetik komplikasyonların önlenmesinde esas olanın kan glukoz seviyesinin kontrolü olduğunu göstermektedir. Ancak Alder VA ve arkadaşları; diabetik kaskad belli bir aşamayı geçtiği zaman glukoz kontrolünün de artık komplikasyon gelişimini önleyemediğini veya yavaşlatamadığını göstermişlerdir (170)

Diabetik rat modelimizde antioksidan bir ajan olan alfa-lipoik asit'in 10 hafta boyunca 50 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal kullanımının retina katalaz ve süperoksit dismutaz enzim düzeyleri ile malondialdehid oluşumu üzerinde

etkili olmaması belki aldığımız retina materyalinin az olması ile belki de kullanılan ALA dozunun yetersiz kalması ile açıklanabilir. Alfa lipoik asidin bir antioksidan ajan olarak klinikte rutin kullanıma geçebilmesi için daha geniş ve kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır.

SONUÇLAR

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.

Streptozotosin ile oluşturulmuş deneysel diyabet gruplarında katalaz düzeyleri retinada kontrol gruplarına oranla düşük olarak bulunmuştur. Ancak bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir. Süperoksit dismutaz düzeyleri ise kontrol gruplarına göre yüksek bulunmuş olup bu sonuç da istatistiksel anlamlılık taşımamaktadır.

Diyabet gruplarında yer alan hayvanların enükleasyon sonrası alınan retinalarında lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit düzeylerinin kontrol gruplarına oranla yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yükseklik de istatistiksel olarak anlamlı değildir.

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 literatür bilgilerinin ışığında insülin yokluğunda ALA'nın; glukozun hücre içerisine girişini etkilemediğini ispatlamaktadır.

Tedavi amacı ile ALA'nın kullanıldığı sıçan gruplarının retinalarında malondialdehit seviyesinde azalma ve antioksidan enzimler olan katalaz aktivitesinde azalma ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artma gösterilmesi ve bunların istatistiksel anlamlılık taşımaması; 50 mg/kg/gün dozunda kullanılan ALA'nın diyabete bağlı olarak retinada oluşan oksidatif stresin önleminde yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

ÖZET

Son yıllarda diabetes mellitus ile ilgili çalışmalar; komplikasyonlard an sorumlu tutulan serbest radikaller ve bunların olumsuz etkilerini önleyebilecek ajanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu çalışmamızda amaç; alfa lipoik asidin retina antioksidan sistemi ve lipid peroksidasyonu üzerine olan etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 37 adet erkek Wistar sıçanı 4 gruba ayrılarak kullanıldı. İlk iki grup kontrol grubu olarak alındı. İkinci gruba intraperitoneal olarak her gün 50 mg/kg dozunda ALA uygulanırken birinci gruba sadece ALA taşıyıcısı verildi Streptozotosin verilerek diyabet oluşturulan diğer iki gruptaki sıçanların birincisine intraperitoneal olarak ALA taşıyıcısı ve ikincisine ise ALA her gün 50 mg/kg dozunda uygulandı. 10 haftalık deney süresinin sonunda hayvanlar tartıldıktan ve son kan glukoz düzeyleri belirlendikten sonra tüm sıçanların gözleri enükle edildi. Sıçanların vitreuslarında lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit (MDA) düzeyi ve antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) aktiviteleri ölçüldü.

Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde;

1. Diyabetik sıçanlarda kan glukoz seviyesinde artış ve ağırlığında azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

2. Diyabetik sıçanlarda retina katalaz aktiviteleri diyabetik olmayan gruptaki sıçanlara oranla düşük olarak saptandı. Superoksit dismutaz aktivitesi ise kontrol gruplarına göre yüksek izlendi. Bu iki değişiklik de istatistiksel olarak anlamlı değildi.

3. Retinada lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malonildealdehid düzeylerinde diyabetik sıçanlarda kontrol gruplarına göre izlenen artış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

4 ALA tedavisinin uygulanması ile birlikte sıçanların kan glukoz seviyeleri, ağırlıkları ve retina malonildealdehid düzeyinde ve superoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinde düzelme görülmedi.

Bu sonuçlar ışığında daha önce yapılan çalışmalarda antioksidan etkisi birçok kez ispatlanmış olan ALA'in retina üzerinde beklenen etkisinin tespit edilememiş olması uygulanan dozun yetersiz olması olasılığını düşündürmektedir. Bu nedenle, farklı dozlarda uygulanacak ALA'in etkisini belirleyecek daha geniş seride çalışmaların yapılmasının uygun olacağı izlenimi alındı

KAYNAKLAR

1. 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
2. Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of Caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. Free Rad Res 2002; 36(9): 993-999.
3. Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis. Diabetes 1998; 47: 1114-1120.
4. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. Free Radic Biol Med 1995; 19: 227-250.
5. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH. Cecil Essentials of Medicine. 3rd edition, WB Saunders, Philadelphia, 1993: 513-523
6. Wilson JD, Foster DF. Diabetes Mellitus. Williams Textbook of Endocrinology, 1992: 1255-1333
7. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. Diabetes 1979; 28(12):1039-57
8. Wilson JD, Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, Martin JB, Fauci AS, Root RK. Diabetes Mellitus. Harrison's Principles of Internal Medicine, 1991: 1739-1758
9. Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme-de-Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, Nepom BS. A diabetes-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles. J Clin Invest 1989; 83(3): 830-5
10. Tattersall RB, Pyke DA. Diabetes in identical twins. Lancet 1972; 25: 2(787): 1120-5
11. Todd JA, Bell JI, McDevitt HO. HLA-DQ beta gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. Nature 1987; 15-21;329(6140): 599-604
12. Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells. Role of glucose permeability. Diabetes 1982; 31(9): 743-8
13. Horiuchi S, Shiga M, Araki N, Takata K, Saitoh M, Morino Y. Evidence against in vivo presence of 2-(2-furoyl)-4(5)-(2-furanyl)-1H-imidazole, a major fluorescent advanced end product generated by nonenzymatic glycosylation. J Biol Chem 1998; 263(35): 18821-6
14. Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, Elmets CA, Dauchot P, Kohn RR. Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagen-linked fluorescence. New Eng J Med 1986; 314(7): 403-8
15. Winegrad AL. Banting lecture 1986. Does and common mechanism induce the diverse complications on diabetes. Diabetes 1987; 36(39): 396-406

- 16 Koloğlu S. Diabetes Mellitus. Endokrinoloji ve Temel Klinik Medikal Network, Ankara; 1996: 359-499
- 17 Cameron NE, Cotter NA, Robertson S. The effect of aldose reductase inhibition on the pattern of nerve conduction deficits in diabetic rats. *Quarter J Exp Phys* 1989; 74: 917-26
- 18 Kamijo M, Cherian PV, Sima AAF. The preventive effect of aldose reductase inhibition on diabetic optic neuropathy in the BB/W-rat. *Diabetologia* 1993; 36: 893-98
- 19 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): 573-8
- 20 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): 712-6
- 21 Lattimer SA, Sima AAF, Greene DA. In vitro correction of impaired Na^+ - K^+ -ATPase in diabetic nerve by protein kinase C agonists. *Am J Physiol* 1989; 256(19): E264-69
- 22 Jaap AJ, Shore AC, Gartside JB, Gamble J, Tooke JE. Increased microvascular fluid permeability in young Type I (insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia* 1990; 36: 648-52
- 23 Briggs BR, Jackson WPU, Dutoit ED, Botha MC. The histocompatibility (HLA) antigen distribution in diabetes in Southern African blacks (Xhosa). *Diabetes* 1981; 29: 68-71
- 24 Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998; 5(2): 113-24
- 25 Yu PB. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74(1): 139-162
- 26 Bottazzo GF. Beta cell damage in diabetic insulinitis: are we approaching a solution. *Diabetologia* 1984; 26 (4): 241-9
- 27 Cowden WB, Lewis-Hughes PH, Clark IA. Protection against alloxan-induced diabetes in mice by the free radical scavenger butylated hydroxynisole. *Biochem Pharmacol* 1985; 34(19): 3601-3
- 28 Fischer LJ, Hamburger CA. Inhibition of alloxan action in isolated pancreatic islets by superoxide dismutase, catalase and a metal chelator. *Diabetes* 1980; 29: 213-16
- 29 Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 19 (6): 598-620
- 30 Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease- Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-26
- 31 Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 79-110
- 32 Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW. Hemoglobin and biologic fenton reagent. *J Biol Chem* 1984; 259(23): 14354-6

33. Auroma OL, Halliwell B, Gajewski E, Dizdaroğlu M. Copper-ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem J* 1994; 273 (Pt 3): 601-4
34. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995 Dec; 41(12 Pt 2): 1819-28
35. Tappel AL. Lipid peroxidation damage to cells components. *Fed Proc* 1973; 32: 1870-74
36. Chiu D, Kuypers F, Lubin Bertram. Lipid peroxidation in human red cells. *Sem Hematol* 1989; 26: 257-76
37. Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system. *Trends Biochem Sci* 1990; 15(4): 129-35
38. Winyard P, Lunec J, Brailsford S, Blake D. Action of free radical generating systems upon the biological and immunological properties of caeruloplasmin. *Int J Biochem* 1984; 16(12): 1273-8
39. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Drug Metabol Rev* 1998; 30(2): 225-43
40. Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(Suppl 3C): 14S-22S
41. Sun Y, Oberley LW, Lu Y. A simple method for clinical assay superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500
42. Kimmel JR, Markowitz H, Brown DM. Some chemical and physical properties of erythrocyte. *J Biol Chem* 1989; 234: 46-57
43. Horton AA, Fairhurst S. Lipid peroxidation and mechanism toxicity. *CRC Critical Reviews In Toxicology* 1987; 18(1):27-73
44. Aebi HE. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987: 273-85
45. Fairbanks, V.F., Klee, G.G.: *Biochemical aspects of hematology*. Tietz N.W: (ED), *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986.
46. Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25
47. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995; 41 (12): 1819-1828
48. Stocks J, Gutteridge JMC, Sharp RJ, Dormandy TL. Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin Sci Mol Med* 1974; 47: 215-222
49. Halliwell B, Gutteridge JMC. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet* 1984; i1396-i1398
50. Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA. The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde. *Lipids* 1986; 21: 6-9
51. Brooks BR, Klammerth OL. Interaction of DNA with bifunctional aldehydes. *Eur J Biochem* 1968; 5: 178-182
52. Summerfield FW, Tappel AL. Determination of malondialdehyde-DNA crosslinks by fluorescence and incorporation of tritium. *Anal Biochem* 1981; 111: 77-82

53. 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
54. Esterbauer H: Estimation of peroxidative damage. *Path Biol* 1996; 44 (1): 25-8
55. Garcia CA, Ruiz RS. Ocular Complications of Diabetes. *Clinical Symposia* 1992; 44(1): 1-32
56. Swan PG. Non-retinal ocular changes in Diabetes. *Clin Exp Optom* 1999; 82(2-3): 43-46
57. Bron AJ, Brown NAP, Harding JJ, Ganea E. The lens and cataract in Diabetes. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 37-67
58. Sanchez Thorin JC. The cornea in Diabetes mellitus. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 19-36
59. Ishiko S, Yoshida A, Mori F, Abiko T, Kitaya N, Konno-S, Kato Y. Corneal and lens autofluorescence in young insulin-dependent diabetic patients. *Ophthalmologica* 1998; 212: 301-305
60. Mori F, Ishiko S, Abiko T, Kitaya N, Kato Y, Kanno H, Yoshida A. Changes in corneal and lens autofluorescence and blood glucose levels in diabetics: parameters of blood glucose control. *Curr Eye Res* 1997; 16: 534-538
61. 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
62. Jacot JL, Hosotani H, Glover JP, Lois N, Robison WG Jr. Diabetic-like corneal sensitivity loss in galactose-fed rats ameliorated with aldose reductase inhibitors. *J Ocul Pharmacol Ther* 1998; 14: 169-180
63. Ruben ST. Corneal sensation in insulin dependent and non-insulin dependent diabetics with proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 1994; 72: 576-580
64. Saini JS, Mittal S, Anand M. Cornea stress test-evaluation of corneal endothelial function in vivo by contact lens induced stress. *Indian J Ophthalmol* 1997; 45: 19-24
65. McNamara NA, Brand RJ, Polse KA, Bourne WM. Corneal function during normal and high serum glucose levels in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 3-17
66. Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains eye study, Australia. *Ophthalmology* 1997; 104: 712-718
67. Konstas AG, Tsatsos I, Kardasopoulos A, Bufidis T, Maskaleris G. Preoperative features of patients with exfoliation glaucoma and primary open-angle glaucoma. The AHEPA study. *Acta Ophthalmol Scand* 1998; 76: 208-212
68. Schertzer RM, Wang D, Bartholomew LR. Diabetes mellitus and glaucoma. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 69-87
69. Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR. Open-angle glaucoma and diabetes. *Ophthalmology* 1997; 104: 712-718
70. Georgopoulos G, Andreanos D, Liokis N, Papakonstantinou D, Vergados J, Theodossiadis G. Risk factors in ocular hypertension. *Eur J Ophthalmol* 1997; 7: 357-363

71. Pardo G. Neuroophthalmological manifestations of diabetes mellitus. *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 213-226.
72. Hovelson SA, Renta VL. Diabetes Mellitus and cranial neuropathies: a case report. *Optom Vis Sci (suppl)* 1998; 75: 151.
73. Kritzinger EE, Beaumont HM. A Colour Atlas of Optic Disc Abnormalities. London: Wolfe Medical Publications, 1987: 63-64.
74. Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial Study Group. Characteristics of patients with nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy eligible for the Ischemic Optic Neuropathy Decompression Trial. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 1366-1374.
75. Miyamura N, Amemiya T. Lens and retinal changes in the WBN/Kob rat (spontaneously diabetic strain). Electron microscopic study. *Ophthalmic Res* 1998; 30: 221-232.
76. Struck HG, Hammer U, Seydewitz V. [Effect of diabetes mellitus on anterior central lens epithelium in cataract patients.] *Ophthalmologie* 1997; 94: 327-331.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. Altomare E, Grattagliano I, Vendemaile G, Micelli Ferrari T, Signorile A, Cardia L. Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 141-147.
81. Mitton KP, Dzialoszynski T, Sanford SE, Trevithick JR. Cysteine and ascorbate loss in the diabetic rat lens prior to hydration changes. *Curr Eye Res* 1997; 16: 564-571.
82. Ozmen D, Mutaf I, Ozmen B, Menten J, Bayindir O. Lens lipid peroxides and glutathione concentrations in diabetic cataract. *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 190-192.
83. Cekic O, Bardak Y. Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect. *Ophthalmic Res* 1998; 30: 107-112.
84. Apaydın C. Anatomi. İçinde: Aydın P, Akova YA (ed): *Temel Göz Hastalıkları*. Güneş Kitapevi, Ankara, 2001: S. 18.
85. Kanski JJ. *Clinical Ophthalmology* 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000: 465-479.
86. Müftüoğlu G. Retinanın vasküler hastalıkları. Aydın P., Akova Y. (ed.): *Temel Göz Hastalıkları*. Güneş Kitapevi, Ankara, 2001: 297-300.

87. Hirata C, Nakano K, Nakamura N, Kitagawa Y, Shigeta H, Hasegawa G, Ogata M, Ikeda T, Sawa H, Nakamura K, Ienaga K, Obayashi H, Kondo M. Advanced glycation end products induce expression of vascular endothelial growth factor by retinal Müller cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 712-715
88. Soulis T, Thallas V, Youssef S, Gilbert RE, McWilliam BG, Murray McIntosh RP, Cooper ME. Advanced glycation end products and their receptors co-localise in rat organs susceptible to diabetic microvascular injury. *Diabetologia* 1997; 40: 619-628.
89. Clements RS Jr, Robison WG Jr, Cohen MB. Anti glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice. *J Diab Complic* 1998; 12: 28-33
90. Hammes HP, Wellensiek B, Kloting I, Sickel E, Bretzel RG, Brownlee M. The relationship of glycaemic level to advanced glycation end-product (AGE) accumulation and retinal pathology in the spontaneous diabetic hamster. *Diabetologia* 1998; 41: 165-170.
91. Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 369-372.
92. Agardh CD, Agardh E, Hultberg B, Qian Y, Ostenson CG. The glutathione levels are reduced in Goto-Kakizaki rat retina, but are not influenced by aminoguanidine treatment. *Curr Eye Res* 1998; 17: 251-256.
93. Salceda R, Vilchis C, Coffe V, Hernandez Munoz R. Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats *Neurochem Res* 1998; 23: 893-897.
94. Yu PH. Deamination of methylamine and angiopathy, toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycoxidation in diabetes. *J Neural Transm (suppl)* 1998; 52: 201-216.
95. 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
96. Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Wasy K, Jirousek M, Smith LE, King GL. Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 1997; 46: 1473-1480.
97. Pfeiffer A, Spranger J, Meyer Schwicklerath R, Schatz H. Growth factor alterations in advanced diabetic retinopathy: a possible role of blood retina barrier breakdown. *Diabetes* 1997; 46 (suppl 2): S26-30
98. 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.
99. Hotta N, Nakamura J, Sakakibara Hamada Y, Hara T, Mori K, Nakashima E, Sasaki H, Kasama N, Inukai S, Koh N. Electroretinogram in sucrose-fed diabetic rats treated with an aldose reductase inhibitor or an anticoagulant. *Amer J Physiol* 1997; 273: E965-971

100. Bursell SE, Takagi C, Clermont AC, Takagi H, Mori F, Ishii H, King GL. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2711-2720.
101. Kowluru RA, Jirousek MR, Stramm L, Farid N, Engerman RL, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and ATPases. *Diabetes* 1998; 47: 464-469.
102. Ishii H, Koya D, King GL. Protein kinase C activation and its role in the development of vascular complications in Diabetes mellitus. *J Mol Med* 1998; 76: 21-31.
103. do Carmo A, Lopes C, Santos M, Proenca R, Cunha Vaz J, Carvalho AP. Nitric oxide synthase activity and L arginine metabolism in the retinas from streptozotocin induced diabetic rats. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 319-324.
104. Sorokin EL, Smoliakova GP. [Structural and functional disorders of transcapillary metabolism if retina in patients with diabetic retinopathy.] *Vestn Oftalmol* 1997; 113: 16-19.
105. Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D, Strother JM. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. *Penn State Retina Research Group Diabetes* 1998; 47: 815-820.
106. Gorio A, Donadoni ML, Finco C, Di Giulio AM. Endogenous mono-ADP-ribosylation in retina and peripheral nervous system effects of diabetes. *Adv Exp Med Biol* 1997; 419: 289-295.
107. Hatcher HC, Ma JX, Chao J, Chao L, Ottlecz A. Kallikrein-binding protein levels are reduced in the retinas of streptozotocin-induced diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 658-664.
108. Fang C, Jiang Z, Tomlinson DR. Expression of constitutive cyclooxygenase (COX-1) in rats with streptozotocin-induced diabetes, effects of treatment with evening primrose oil or an aldose reductase inhibitor on COX-1 mRNA levels. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1997; 56: 157-163.
109. Linsenmeier RA, Braun RD, McRipley MA, Padnick LB, Ahmed J, Hatchell DL, McLeod DS, Luttly GA. Retinal hypoxia in long-term diabetic cats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1647-1657.
110. Miyamoto K, Hiroshiba N, Tsujikawa A, Ogura Y. In vivo demonstration of increased leukocyte entrapment in retinal microcirculation of diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 2190-2194.
111. Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, Douglas A. Endothelin expression in ocular tissues of diabetic and insulin-treated rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2144-2151.
112. Chakrabarti S, Gan XT, Merry A, Karmazyn M, Sima AA. Augmented retinal endothelin-1, endothelin-3, endothelinA and endothelinB gene expression in chronic diabetes. *Curr Eye Res* 1998; 17: 301-307.

113. De la Cruz JP, Moreno A, Munoz M, Garcia Campos JM, Sanchez de la Cuesta F. Effect of aspirin plus dipyridamole on the retinal vascular pattern in experimental diabetes mellitus. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 454-459.
114. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998; 102: 783-791.
115. Yargicoglu P, Agar A, Edremittiloglu M, Kara C. The effects of cadmium and experimental diabetes on VEP spectral data and lipid peroxidation. *Int J Neurosci* 1998; 93: 63-74.
116. Reed LJ, DeBusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS. Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1951; 114: 93-94.
117. Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Powell R, Packer L. Dihydrolipoic acid: A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. *Biochem Pharmacol* 1992a; 44: 1637-1649.
118. Podda M, Han D, Koh B, Fuchs J, Packer L. Conversion of lipoic acid to dihydrolipoic acid in human keratinocytes. *Clin Res* 1994; 42: 41A.
119. Rosenberg HR, Culik R. Effect of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch Biochem Biophys* 1959; 80: 86-93.
120. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Rad Res Comms* 1991; 15: 255-263.
121. 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.
122. Stary FE, Jindal SJ, Murray RW. Oxidation of α -lipoic acid 1975; 40: 58-62.
123. Bacuerle PA. The inducible transcription activator NF- κ B regulation by distinct protein subunits. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1072: 63-80.
124. Mizuno M, Packer L. Effects of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid on expression of the proto-oncogene c-fos. *Biochem Biophys Res Comm* 1994; 220: 1136-1142.
125. Androne L, Gavan NA, Veresiu IA, Orasan R. In vivo effect of lipoic acid on lipid peroxidation in patients with diabetic neuropathy. *In Vivo* 14: 327-330, 2000.
126. 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)* 199; 243-251, 2000.
127. 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* 108: 168-174, 2000.
128. 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: 188-193.
129. 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: 763-768.
 130. Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P. Role of DL alpha-lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity. *Mol Cell Biochem* 1995; 145: 11-17.
 131. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ. Protein measurement with folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
 132. 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
 133. Aebi HE. Catalase. *Methods of Enzymatic Analysis. Volume III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases*. Ed. Bergmeyer, H.U., V.C.H. Verlagsgesellschaft, Weinheim, 273-85, 1987
 134. 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
 135. 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
 136. Altomare E, Grattagliano I, Vendemiale G, Micelli-Ferrari T, Signorile A, Cardia L. Oxidative protein damage in human diabetic eye: evidence of a retinal participation. *Euro J Clin Invest* 1997; 27: 141-147
 137. Stohs SJ. The role of free radicals in toxicity and disease. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 1995; 6 (3-4) : 205-28
 138. Liles MR, Newsome DA, Oliver PD. Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1285-1288
 139. Sulochana KN, Biswas J, Ramakrishnan S. Eales' disease: increased oxidation and peroxidation products of membrane constituents chiefly lipids and decreased antioxidant enzymes and reduced glutathione in vitreous. *Curr Eye Res* 1999; 19(3): 254-259.
 140. Armstrong D, Harnett M, Browne R, Ueda T, Jenis E, Aljada A, Buch P, Bofinger D, Stockton R. Lipid peroxide induced synthesis of cytokines, growth factors during neovascularization in the retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; Suppl 36: 455.
 141. Rosenberg R, Culik R. Effect of α -lipoic acid on vitamin C and E deficiencies. *Arch Biochem Biophys* 1959; 80: 86-93.
 142. Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Meth Enzymol* 1979; 62: 152-158
 143. Obrosova IG, Fathallah L, Grene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL- α -lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000; 398: 139-146.

144. Haugaard N, Haugaard ES. Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1970; 222: 583-586.
145. 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.
146. 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.
147. Henriksen EJ, Jacob S, Tritschler H, Wellel K, Augustin HJ, Dietze GJ. Chronic thioctic acid treatment increases insulin-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Diabetes* 1994; suppl 1: 122A abstr.
148. 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.
149. Ansari NH, Zhang W, Fulep E, Mansour A. Prevention of pericyte loss by trolox in diabetic rat retina. *J Toxicol Environ Health A* 1998 Jul 24;54 (6) : 467-75
150. Kowluru RA, Kern TS, Engermann RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia. IV. Antioxidant defense system. *Free Radic Biol Med* 1997; 22 (4) : 587-92.
151. Hammes HP, Bartmann A, Engel L, Wulfroth P. Antioxidant treatment of experimental diabetic retinopathy in rats with nicanartine. *Diabetologia* 1997 Jun; 40 (6): 629-34.
152. Kowluru RA, Koppolu P. Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radic Res* 2002 Sep; 36 (9) : 993-9.
153. Szabo ME, Haines D, Garay E, Chiavaroli C, Farine JC, Hannaert P, Berta A, Garay RP. Antioxidant properties of calcium dobesilate in ischemic/reperfused diabetic rat retina. *Eur J Pharmacol* 2001 Oct 5 ; 428 (2): 277-86.
154. Maejima K, Nakano S, Himeno M, Tsuda S, Makiishi H, Ito T, Nakagawa A, Kigoshi T, Ishibashi T, Nishio M, Uchida K. Increased basal levels of plasma nitric oxide in type 2 diabetic subjects. Relationship to microvascular complications. *J Diabetes Complications* 2001 May-Jun; 15 (3) :135-43.
155. Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* 2002 Mar; 80 (5) : 771-9.
156. Armstrong D, al-Awadi F. Lipid peroxidation and retinopathy in streptozotocin-induced diabetes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11 (4) : 433-6.
157. Kowluru RA, Engerman RL, Case GL, Kern TS. Retinal glutamate in diabetes and effect of antioxidants. *Neurochem Int* 2001 Apr; 38 (5) : 385-90.

158. Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D. Serum markers of oxidative stres and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes Care* 2000 Feb; 23(2): 234-40.
159. Kowluru RA, Kern TS, Engermann RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia. II. Comparison of gamma-glutamyl transpeptidase in retina and cerebral cortex, and effects of antioxidant therapy. *Curr Eye Res* 1994 Dec; 13 (12) : 891-6.
160. Kunisaki M, Bursell SE, Umeda F, Nawata H, King GL. Prevention of diabetes-induced abnormal retinal blood flow by treatment with d-alpha-tocopherol. *Biofactors* 1998; 7(1-2): 55-67.
161. Nishida T, Nakagawa S, Manabe R. Superoxide dismutase activity in diabetic rat retina. *Jpn J Ophtalmol* 1984; 28(4): 377-382.
162. Rema M, Mohan V, Bhaskar A, Shanmugasundaram KR. Does oxidant stress play a role in diabetic retinopathy ?. *Indian J Ophtalmol* 1995 Mar; 43(1): 17-21.
163. Thornalley PJ, McLellan AC, Lo TW, Benn J, Sonksen PH. Negative association between erythrocyte reduced glutathione concentration and diabetic complications. *Clin Sci (Lond)* 1996 Nov; 91(5): 575-82.
164. Sozmen EY, Sozmen B, Delen Y, Onat T. Catalase/superoxide dismutase (SOD) and catalase/paraoxonase (PON) ratios may implicate poor glycemic control. *Arch Med Res* 2001 Jul-Aug; 32(4): 283-7.
165. Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D, Strother JM. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. *Penn State Retina Research Group. Diabetes* 1998 Jul; 47(7): 1170.
166. Hammes HP, Federoff HJ, Brownlee M. Nerve growth factor prevents both neuroretinal programmed cell death and capillary pathology in experimental diabetes. *Mol Med* 1995 Jul; 1(5): 527-534.
167. Augustine AJ, Dick HB, Koch F, Schmidt-Erfurth U. Correlation of blood-glucose control with oxidative metabolites in plasma and vitreous body of diabetic patients. *Eur J Ophthalmol* 2002 Mar-Apr; 12 (2) : 94-101.
168. Lightmann S. Does aldose reductase have a role in the development of the ocular complications of diabetes ? *Eye* 1993; 7 (Pt 2): 238-241.
169. Robinson WG Jr, Kador PF, Kinoshita JH. Retinal capillaries: basement membran thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* 1983 Sep 16; 221(4616): 1177-1179.
170. Alder VA, Su EN, Yu DY, Cringle SJ, Yu PK. Diabetic retinopathy: early functional changes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1997 Sep; 24 (9-10):785-788.