

T1498



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

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
MERKEZ KÜTÜPHANESİ

**DIYABETİK SIÇANLARDA ALFA-LİPOİK ASİTİN
VİTREUSUN ANTİOKSİDAN SİSTEMİ VE LİPİD
PEROKSİDASYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Onursal GÖZKAYA

Uzmanlık Tezi

T1498

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

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir.”

Antalya, 2003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGELER VE KISALTMALAR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. DİABETES 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. DİABETES MELLİTUS'DA SERBEST RADİKALLER	8
2.2.1. Önemli Oksijen Radikalleri	9
2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Etkisi	12
2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	14
2.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar	15
2.3.2. Membran Antioksidanları	15
2.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar	15
2.3.4. Önemli Antioksidan Enzimler	15
2.4. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖNEMİ	18
2.4.1. Lipid Peroksidasyonunun Son Ürünü Olarak Malondialdehit	19
2.5. DİYABETİN RETİNAL OLMAYAN GÖZ KOMPLİKASYONLARI	19
2.5.1. Görme Fonksiyonu	20
2.5.2. Kornea	20
2.5.3. Glokom	21
2.5.4. Kraniyel Nöropatiler	21
2.5.5. İskemik Optik Nöropati	22
2.5.6. Lens	22
2.6. DİYABETİK RETİNOPATİ	23
2.6.1. Etyopatogenez	24
2.6.2. Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması	25
2.6.3. Diyabetik Retinopati Oluşum Mekanizmaları	26
2.7. VİTREUS	29
2.8. LİPOİK ASİT	30
2.8.1. Antioksidan Aktivite	30
2.8.2. Diyabet ve α -Lipoik Asit	31
3. MATERYAL VE METOD	33
3.1. DENEY HAYVANLARI	33
3.2. DENEY VE DENEY GRUPLARI	33
3.2.1. Taşıyıcılar	33
3.2.2. Deney Grupları	33

3.2.3. Cerrahi İşlem	34
3.3. METODLAR	34
3.3.1. Protein Tayini	34
3.3.2. Cu/Zn Bağımlı Süperoksit Dismutaz Tayini	36
3.3.3. Katalaz Aktivitesinin Tayini	37
3.3.4. Malondialdehit Tayini	39
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	40
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	42
4.3. VİTREUS SIVISININ DEĞERLENDİRİLMESİ	43
4.3.1. Vitreus Sıvısının SOD Aktiviteleri	43
4.3.2. Vitreus CAT Aktiviteleri	44
4.3.3. Vitreus MDA Değerleri	45
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇLAR	54
7. ÖZET	55
8. KAYNAKLAR	56

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	α -Lipoik Asit
IDDM	İnsüline Bağımlı Diabetes Mellitus
NIDDM	İnsüliniden Bağımsız Diabetes Mellitus
ICA	Islet Cell Antibodies
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 $_2^{2\cdot-}$	Peroksil Anyonu
SOD	Süperoksit Dismutaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
NO $\cdot$	Nitrik Oksit
NO $_2^{\cdot}$	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	Elektroretinogram
ATPaz	Adenozintrifosfataz
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
GK	Goto-Kakizaki
DAG	Diaçilgliserol
PKC	Protein Kinaz-C
DHLA	Dihidrolipoik Asit
TBARS	Tiyobarbitürik Asit Reaktif Ürünleri
STZ	Streptozotosin
BSA	Bovin Serum Albümin
FCF	Folin-Ciocalteu-Fenol

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
4.1. Sıçanların son açlık kan şekeri düzeyleri	41
4.2. Sıçanların ilk ve son ağırlıkları arasındaki fark	42
4.2.1. Grupların vitreustaki SOD değerleri	43
4.3.2. Grupların vitreustaki CAT değerleri	44
4.3.3. Grupların vitreustaki MDA değerleri	45

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut ve kronik komplikasyonları ile birlikte Diabetes Mellitus en sık görülen endokrin hastalıdır. Göz Hastalıkları açısından neden olduğu bir çok komplikasyonun yanında en sık görülenleri katarakt ve diyabetik retinopatidir (1).

Günümüze kadar, diyabetik komplikasyonların tedavisi kataraktın ekstraksiyonu ve retinaya argon lazer uygulanması ile sınırlı kalmaktadır. Buna rağmen, komplikasyonların önlenmesi konusunda yapılan çalışmalar hızlanmaktadır. Hipergliseminin sıkı bir şekilde kontrolünün diyabete bağlı komplikasyonların gelişimini önlemedeki başarısı bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Buna karşın, kan glukoz düzeyinin kontrolünün zor olduğu hastalarda çalışmalar biyokimyasal değişikliklere doğru yönelmektedir. Diyabete bağlı komplikasyonların gelişiminden sorumlu tutulmuş olan mekanizmalar içerisinde, polyol metabolizmasında artış, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu, protein kinaz C'nin aktivasyonu ve oksidatif stres en önde gelenleridir (2, 3).

Hipergliseminin neden olduğu artmış serbest radikal düzeyi ve buna bağlı gelişen oksidatif stresi önlemede kullanılacak olan antioksidanlar üzerine yapılan çalışmalar uzun yıllardan beri devam etmesine karşın diyabetik komplikasyonların gelişimini önlemede tam bir başarı elde edilememiştir. Bu nedenden dolayı çalışmalar yeni antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır. İdeal bir antioksidanın bulundurması gereken tüm özellikleri içermesi nedeniyle α -lipoik asit (ALA) "evrensel antioksidan" olarak isimlendirilmiştir. Başta Diabetes Mellitus olmak üzere oksidatif strese neden olan birçok hastalık üzerine yapılan çalışmalarda serbest radikallerin yakalanmasında başarılı olarak bulunmuştur. Göz üzerine yapılan çalışmalar ise daha çok katarakt ve glokom üzerine yoğunlaşmıştır (4).

Vitreus, kendisini çevreleyen dokular için depo olarak görev yapmaktadır. Aynı zamanda, kornea ve lens ile birlikte retinaya olabilecek bir radyasyon hasarını önlemede önemini korumaktadır. Vitreus, bu etkilerini içerdiği antioksidan enzimler ile sağlamaktadır (5). Bu çalışmalar ve bilgiler göz önüne alınarak, sıçanlarda oluşturulan deneysel diyabet modellerinde ALA'nın vitreusta yer alan antioksidan enzimler ve lipid peroksidasyonu ve dolayısıyla oksidatif hasar üzerine olan etkisini araştırmak için bu çalışma planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

Diabetes Mellitus, klinik ve genetik olarak heterojen bir grup oluşturan, en önemli bulgusu hiperglisemi olan ve en sık görülen endokrin hastalığıdır. Pankreasın insülin salgısının mutlak veya kısmi yetersizliği veya insülin etkisinin yetersizliği (insülin rezistansı) ile oluşan, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasındaki bozukluklar ile karakterizedir. Bazı ülkelerde yapılan çalışmalarda, toplum içindeki prevalansının %1-2 olduğu tahmin edilen diyabet, akut ve geç komplikasyonları ile insan yaşamını tehdit eden önemli bir hastalıktır. Diyabet, yeni tanı son evre böbrek yetmezliği hastalarının %25'inden ve tüm alt ekstremité amputasyonlarının %50'sinden fazlasında neden olarak gösterilmektedir. Diyabet, aynı zamanda körlüğün bir numaralı nedenidir ve her yıl 5000 yeni olgu ortaya çıkmaktadır (6,7).

Diabetes Mellitus sınıflaması:

Dünyada en çok kabul gören diyabet sınıflandırması, Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1979 yılında belirlenen aşağıdaki sınıflamadır (8) :

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 insüliniden bağımsız diyabet oluşturur

1. Tip I Diyabet: İnsüline bağımlı diyabet, gençlikte başlayan diyabet, juvenil diyabet veya ketoza yatkın diyabet olarak da adlandırılır. Çocukluk çağıının ve genç erişkin dönemin en sık görülen tipi olmasına karşın tüm diyabet vakalarının sadece %5-10'unu oluşturur. Genel popülasyondaki oranı ise %0.5'dir. En sık 11-13 yaşlarında görülmesine karşın herhangi bir yaşta ortaya çıkabilir. İnsülin salgılayan beta (β) hücrelerinde harabiyet vardır ve doğal olarak insülin salgılanması hastalığın ilk evreleri hariç yoktur. Glisemiye kontrol altına almak, ketozu önlemek, hastanın yaşamını sürdürmek için dışarıdan insülin verilerek mutlak insülin eksikliğinin giderilmesi gerekir (1,6,7,8).

2. Tip II Diyabet: İnsüliniden bağımsız diyabet veya ketoza dirençli diyabet olarak da isimlendirilir. Tüm diyabet vakalarının %90-95'i ile birlikte en sık görülen tipini oluşturmaktadır. 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. Tip II diyabet , şişman ve şişman olmayan insüline bağımsız diyabet olarak iki büyük gruba ayrılır. Hastaların %50-90'ı şişmandır (1,6,7,8).

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. Bu otoimmün olayın viral bir enfeksiyon veya çevresel bir uyarı tarafından başlatıldığı düşünülmektedir. Diyabetin belirtileri ise beta hücrelerinin büyük bir çoğunluğunun (%80) 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 (9).

Son 20 yıldan bu yana tip I diyabetin gelişimine zemin hazırlayan genetik özelliklerle ilişkili birçok çalışma yapılmıştır. Yeni bilgilerin ışığı altında sanılanın aksine tip I diyabetin ailesel geçiş oranı yüksek bir hastalık olduğu saptanmıştır. 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 (9,10,11,12).

Tip I diyabet ile birlikte bulunduğu saptanabilmiş önemli antikorlar:

- a) Adacık hücre antikorları (ICA= Islet Cell Antibodies)
- b) İnsülin antikorları
- c) Glutamik asit dekarboksilaz (GAD) antikorları
- d) İnsülin reseptör antikorları
- e) Karboksipeptidaz antikorları

Ayrıca yeni çalışmalarda proinsülin, 38000 kilo daltonluk insülin sekretuvar granül membran proteini, glukoz taşıyıcı molekül-2 (GLUT-2), yüzey proteini P69, ısı şoku proteini 65'in de otoantijen görevi yaptıkları ve bunlara karşı antikor geliştiği tespit edilmiştir (9,13,14,15,16,17,18,19).

Tip II Diyabetin Patogenezi:

Tip II diyabetin kuvvetli genetik ve çevresel bileşenleri bulunmaktadır ve aynı anda birkaç anormal gen ya da polimorfizmin varlığının hastalık oluşumu için gerekli olduğu düşünülmektedir (9). 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(7,20,21).

Tip II diyabet, üç patofizyolojik anomali ile açıklanır:

- 1) Anormal insülin sekresyonu

- 2) Periferik insülin rezistansı (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 üretimi (9)

2.1.2. Diabetes Mellitus Komplikasyonları

Diabetes Mellitus komplikasyonları, akut ve kronik olarak iki büyük 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 (7,9).

2.1.3. Komplikasyonların Patogenezindeki Mekanizmalar:

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

1. Proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu: Enzimatik glikozilasyon, proteinlerin translokasyon sonrası geçirdikleri normal fizyolojik süreçtir. Eğer bir protein yüksek glukoz konsantrasyonu ile karşılaşır, glukoz bir enzime ihtiyaç göstermeksizin proteine bağlanabilir. Yarılanma ömrü kısa olan proteinler (gün veya haftalar gibi), yüksek glukoz yoğunluğunda kimyasal olarak geri dönüşümlü glikasyon ürünlerine çevrilirler. Bu olay, glukozun proteindeki NH_2 grupları ile reaksiyona girmesi ile başlar. Hızlı olan bu birleşmenin neticesinde, labil Schiff bazları oluşur. Bu bazlar haftalar içerisinde yavaş olarak stabil bir bileşik olan, Amadori (Ketoamin türevi) ürününe döner. Bu reaksiyonlar kan glukozu yüksek olduğu müddetçe devam eder ve kan glukozunun normale indirilmesi bu ürünlerin de azalmasına neden olur (22)

Myelin, tubulin, kollajen gibi uzun ömürlü yapısal proteinler ise daha yavaş olarak, Amadori sonrası glikasyona uğrayarak İleri Glikasyon Son Ürünlerine (Advanced Glycosylation End Product=AGE) dönüşürler (23). AGE'ler hiperglisemi süresince giderek artarak, damar endoteli, ekstraselüler matriks, glomerüler bazal membran gibi çeşitli yerlerde birikerek patolojik süreçleri başlatırlar (24)

2. Anormal Polyol-Inositol Metabolizması: Hiperglisemiye bağlı olarak sorbitol ve myoinositol metabolizmasında ortaya çıkan değişiklikler, diyabette gelişen çeşitli komplikasyonlardan sorumlu tutulmaktadır (25). 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 (26,27,28)



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 (7,26,29)

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 (26).

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 (26,30,31).

3. Hemodinamik değişiklikler: Diyabetik mikroangiopati komplikasyonlarının gelişmesinde ileri sürülen bir mekanizma da hemodinami hipotezine dayanır. Tip I diyabetin ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra kan akımı artmaktadır. Bu hastalarda kan basıncı normal olduğundan, kan akımının artması damar direncinin azalmasına bağlı olabilir. Bu şekilde kapiller yatakta artan hidrostatik basınç proteinlerin, makromoleküllerin ve immün komplekslerin damar dışına filtrasyonunun artmasına neden olur. Bu durum mezengial ve bazal membran elemanlarının sentezlenmesi için uyarı niteliği taşımaktadır, bu da giderek kapiller geçirgenliğin artması, kapiller geçirgenliğin artması ise bahsedilen olumsuz gelişmelerin devam etmesi anlamına gelmektedir (32).

4 Otoimmünite: Son yıllarda diyabet nöropatisinin gelişiminde, otoimmünitenin ağırlıklı olduğu görüşü önem kazanmıştır. Diyabette gelişen nöropati her ne kadar klasik bir otoimmün bir süreç gibi görünmese de çeşitli bulgular bu patolojik süreçte immünitenin önemli rol oynadığını göstermektedir (13,14,15,16,19,26,33).

2.2. DİABETES MELLİTUS'DA SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, komplikasyonların gelişiminin yanında diyabetin ortaya çıkışında da önemli bir rol oynamaktadır (34). Kararsız bir madde olan alloksan deney hayvanlarına verildiğinde, hızlı bir şekilde dialurik aside dönmekte, bu da otookside olarak süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini oluşturmaktadır (35). Artan serbest radikal düzeyi selektif olarak, antioksidan savunma sistemi zayıf olan pankreasın beta hücrelerini tahrip etmekte ve sonuç olarak deneysel tip I diyabet gelişmektedir (36). Bu da insanlarda sebebi ne olursa olsun artmış serbest radikal düzeyinin tip I diyabete neden olabileceğini düşündürmektedir. Çeşitli antioksidan terapilerin uygulanması pankreas beta hücrelerini alloksanın toksik etkisinden korumakta ve deneysel alloksan diyabetini, düşük dozda alloxan kullanılması durumunda, tamamen engellemektedir (37,38).

Aerobik organizmalarda reaktif oksijen ürünleri önemli bir tehdit unsurudur. Normal oksijen metabolizması esnasında oluşan bu ürünler, vital hücresel yapılar ve fonksiyonlar üzerinde önemli hasarlar meydana getirebilirler. Fakat aerobik organizmalar oksijenin metabolizması esnasında oluşan bu zararlı ürünlerin etkilerinden kendilerini koruyacak savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Bu koruyucu mekanizmalara antioksidan defans sistemi denir (35).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller ($O_2^{\cdot-}$, CCL_3) olarak tanımlanabilir (39). 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 potent oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) en kısa yarı ömre sahiptir (40).

Oksijenin aerobik hücrelerde metabolizması esnasında oluşan en önemli serbest oksijen radikalleri; süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$), 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 etkiye sahip

moleküllerdir. Bu radikaller organizmada hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak hem de iyonlaştırıcı radyasyon, ilaçlar ve bazı toksikolojik ajanların etkisiyle oluşabilmektedir (35,40,41)

Serbest radikallerin hücresel kaynakları:

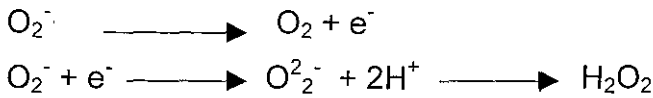
- Çevresel etkenler: Radyasyon, ilaçlar, toksik maddeler, hava kirletici ajanlar
- Plazma membranı: Lipooksijenaz, prostaglandin sentetaz, NADPH oksidaz
- Enzim ve proteinler: Hemoglobin, ksantin oksidaz, triptofan dehidrogenaz
- Mitokondriler: Ubikinon, NADH dehidrogenaz, dihidrooratat dehidrogenaz
- Peroksizomlar: Oksidazlar, flavoproteinler
- Endoplazmik retikulum: Sitokrom P- 450, sitokrom b-5
- Küçük moleküller: İndirgenmiş flavinler, iki değerlikli metaller, epinefrin (40).

2.2.1. Önemli Oksijen Radikalleri:

“

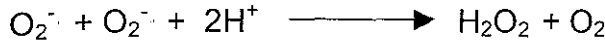
1. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$):

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 elektron fazlasını bir başka elektron alıcısına vererek tekrar moleküler oksijene oksitlenebilir yani bir oksitleyici (redüktör) gibi davranabilir. Ya da önceden bahsedildiği gibi bir elektron daha alarak peroksil anyonunu (O_2^{2-}) oluşturur, bu da ortamdan iki proton (H^+) alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşumuna neden olur (35,39).

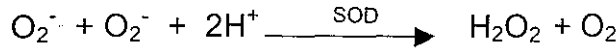


Oksijenin metabolizması esnasında ilk oluşan serbest radikal olan süperoksit anyonundan, hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroperoksitler ($HO_2^{\cdot}$) gibi diğer zararlı oksijen metabolizması ürünleri oluşur. Süperoksit anyonu, hücre membranlarından, kolayca geçemediği için zararlı etkisi oldukça düşük düzeyde bir radikaldir. Çoğunlukla redüktif ve H_2O_2 kaynağı olarak görev yapar. Süperoksit anyonu çeşitli reaksiyonlara girerek dismutasyon adı verilen bir olayla

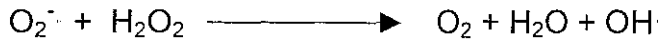
ortamdan temizlenir. Süperoksit anyonu ortamdan spontan dismutasyon denilen, enzimatik olmayan bir yol ile temizlenebileceği gibi,



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



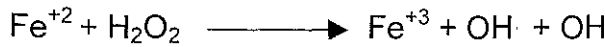
Süperoksit radikali, ayrıca H_2O_2 ile birlikte Haber Weis reaksiyonu adı verilen bir reaksiyona girerek daha potent bir radikal olan OH radikalini oluşturur (35).



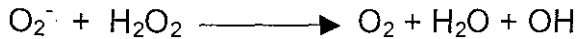
"

2. Hidroksil radikali (OH):

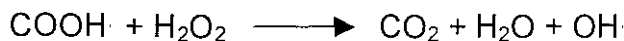
Bu radikal ilk olarak 1934 yılında Haber ve Weis adlı araştırmacıların gösterdikleri ve kendi adlarını taşıyan reaksiyon ile ortaya konmuştur. Bu radikal biyolojik sistemlerde rastlanılan en potent oksidan olarak bilinir. Yüksek bir reaktiviteye sahip olan hidroksil radikali, çeşitli moleküller ile kolayca reaksiyona girer. Hidroksil radikali hücrede çeşitli yollarla oluşuyor ise de yaygın olarak iki önemli biyolojik kaynağı vardır. Bunlardan ilki H_2O_2 'nin, ortamdaki iki değerlikli demir (Fe^{+2}) katalizörlüğünde Fenton reaksiyonu ile ayrışmasından oluşur (42).



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 (35).



3. Hidrojen peroksit (H_2O_2):

H_2O_2 temel olarak iki süperoksit anyonunun spontan veya enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Oksijen metabolizması esnasında oluşan bir ara üründür. Genellikle tek başına 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 (35,43).

4. Tekil oksijen (1O_2):

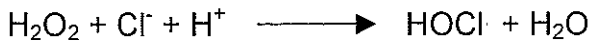
Eşleşmemiş elektron içermediğinden tekil oksijen serbest radikal değildir. Ancak oksijenin oldukça reaktif bir formudur. Tekil oksijenin oluşumu fotokimyasal reaksiyonlarda önemlidir (44).

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. Deoksiribonukleik asit (DNA), lipid ve proteinleri kolayca okside etmektedir (44).

6. Hipokloröz Asit ($HOCl$):

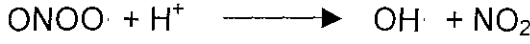
Aktive nötrofiller tarafından üretilen güçlü bir oksidandır. Fagosit sitoplazmasındaki hem içeren bir enzim olan myeloperoksidaz sayesinde, H_2O_2 ve Cl^- iyonlarından sentezlenebilir (44).



7. Nitrojen Oksitleri:

Nitrik oksit (NO) ve nitrojen dioksit (NO_2) tek sayıda elektron içermeleri nedeniyle serbest radikaldirler. Oysa anestezide kullanılan bir gaz olan nitroz asid

(N₂O) böyle değildir. Zehirli bir gaz olan NO[·], güçlü bir oksidize edici ajandır. İn-vivo ortamda salınan NO[·] nitrit (NO₂[·]) veya nitrata (NO₃[·]) otookside olabilir. NO₂ 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 (44)



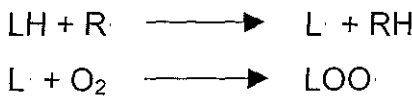
2.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücrelere Etkisi:

Serbest radikallerin hücre yapı ve fonksiyonlarına zararlı etkileri olduğu bilinen bir gerçektir. Lipidler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler serbest radikaller için hedef teşkil eden yapılardır.

1. Lipidlere Olan Etkileri:

Lipid peroksidasyonu, poliansature lipidlerin oksidatif bozulması reaksiyonudur (44,45). Bu reaksiyon başlama, çoğalma ve sonlanma şeklinde üç basamakta gerçekleşir (46)

a Başlangıç basamağı: Peroksidasyon, serbest radikallerin poliansatüre yağ asitlerinin yan zincirindeki metilen grubundan (-CH₂) bir hidrojen (H⁺) atomunu çıkarmasıyla başlar. Bu atak sonucu karbon atomu üzerinde eşleşmemiş bir elektron olduğundan karbon merkezli bir radikal (L[·]) oluşur. Bu lipid radikalinin aerobik hücrelerde en sık görülen akıbeti, bu radikalın moleküler düzenlenme ile konjuge dien şekline çevrildikten sonra moleküler oksijen ile reaksiyona girerek peroksi radikalini (LOO[·]) oluşturmasıdır (47).



b Çoğalma basamağı: Oluşan peroksi radikali, diğer bir peroksi radikali ile birleşebilir ya da membran proteinleri ile etkileşebilir. Fakat en önemlisi peroksi

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·) oluşmaktadır. Peroksidasyon bir kere başladıktan sonra otokatalitik olarak yayılabilmekte ve yüzlerce yağ asidi zinciri lipid hidroperoksitlerine çevrilebilmektedir (40,47)



Lipidhidroperoksitlerde (LOOH) yıkılarak LO·, LOO· gibi radikaller ve aldehytlerin (örn Malonildialdehit=MDA gibi) oluşmasına neden olurlar (40,48).

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 (40,47)

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 hem süperoksit bağımlı hem de bağımsız mekanizmalar yoluyla Fe (III) ve Cu (II)'yi indirgeyebilme 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 aynı zamanda diğer proteinlerin okside formlarının yıkımını sağlayacak proteazları da inhibe edebilme yeteneğindedir (49)

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 (35).

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 (35).

2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Antioksidan, ortamda çok düşük konsantrasyonda bulunduğu halde okside edilebilen bir substratla karşılaştığında, substratın okside olmasını belirgin bir şekilde geciktiren ve önleyen madde anlamına gelmektedir (44).

Antioksidanlar, oksidatif peroksidasyonun farklı aşamalarında işlevlerini görebilirler. Bu aşamalarda;

- 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 yöntemlerine (koruyucu, zincir kırıcı), yerine (hücre içi, hücre dışı, hücre membranı) veya etkisinin tipine (enzimatik, non-enzimatik) göre sınıflandırılabilir (50).

2.3.1. Hücre İçi Antioksidanlar:

Hücreler, oksidatif hasara karşı oldukça iyi savunmaya sahiptirler. Hücre içinde antioksidan savunması farklı şekillerde gerçekleşebilir;

- a Radikal oluşumunun engellenmesi,
- b Oluşmuş radikallerin uzaklaştırılması,
- c Radikaller tarafından oluşturulan oksidatif hasarın tamiri,
- d Hasarlı moleküllerin eliminasyonunun artırılması.

Hücre içinde metabolize edildiği esnada oluşan oksijen ara ürünleri ile antioksidanlar enzimatik olarak hızlı ve spesifik bir şekilde etkileşirler SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz toksik oksijen moleküllerine karşı primer enzimatik savunma sistemlerini oluştururlar (46).

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 (44).

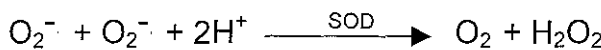
2.3.3. Hücre Dışı Antioksidanlar:

Vücut ekstraselüler sıvılarında, intraselüler antioksidanlar olan enzimleri içermemelerine rağmen, 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 (44).

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 (51).



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 (52).

Yapı bakımından ve aktif merkezindeki geçiş metal iyonları yönünden enzimin hücre içinde iki değişik formu vardır ancak bu farklı formlar aynı reaksiyonu katalizler:

a. Cu ve Zn içeren SOD (Cu/Zn-SOD): Primer olarak ökaryotik hücrelerin plazmasında bulunur. Bunun yanısıra mitokondride de yer almaktadır. 32000 Dalton (D) molekül ağırlığında bir enzimdir. Disülfid köprüsü ile bağlanmış, birbirinin aynı olan iki alt üniteden oluşmuştur. Her bir alt ünite birer adet bakır (Cu^{+2}) ve çinko (Zn^{+2}) içermektedir (53). Enzim aktivitesi için Cu^{+2} mutlaka gereklidir. Zn^{+2} 'nin ise olasılıkla enzimin stabilitesini sağladığı, yerine kobalt (Co^{+2}), civa (Hg^{+2}) ve kadmiyum (Cd^{+2}) geçmesi durumunda da enzimin aktivitesini kaybetmediği gösterilmiştir. Süperoksit anyon dismutasyonu Cu^{+2} ile sağlanır (54).

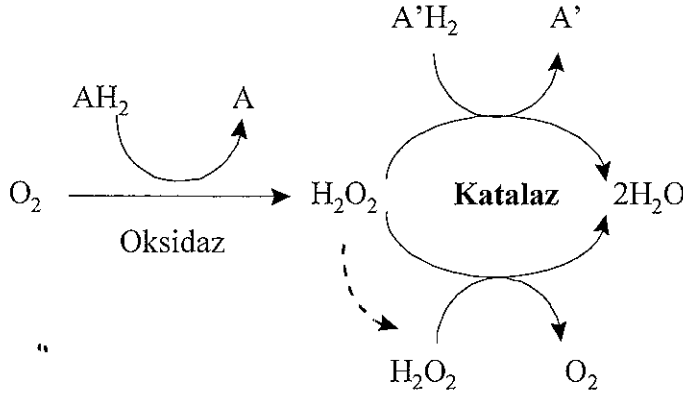
Cu/Zn-SOD oldukça kararlı bir enzimdir. Saflaştırılması esnasında kullanılan organik çözücüler (üre ve sodyum dodesil sülfat gibi) ile aktivitelerini kaybetmedikleri gösterilmiştir. Cu/Zn-SOD, siyanid (KCN) (5 mM) tarafından tersinir olarak inhibe edilir. Siyanidin C atomu, enzimin Cu^{+2} atomuna bağlanarak enzimi inhibe etmektedir. H_2O_2 ise enzimin Cu^{+2} 'yu redükleyebilir. Ancak 10 μM 'ün üzerindeki H_2O_2 konsantrasyonlarında enzim irreversible olarak inhibe olmaktadır. İn-vivo koşullarda süperoksit radikalinin kendisi H_2O_2 ile yarışa girerek bu inhibisyonu önlemektedir (55).

b. Mn içeren SOD (Mn-SOD): Prostetik grup olarak manganez (Mn) içerirler. Ökaryotik hücrelerin mitokondri matrislerinde ve çeşitli bakterilerde bulunan bir enzimdir. Bakteriyel enzim eşit büyüklükte iki alt birimden oluşur ve her alt birim bir Mn^{+2} içermektedir. Molekül ağırlığı 40000 D civarındadır. Mitokondriyal enzim ise dört alt birim içeren ve molekül ağırlığı 80000 D olan bir tetramerdir (56).

Enzim kloform, etanol ve %2'lik sodyum dodesil sülfat tarafından inhibe olur. Siyanür ise bu tür bir etki göstermez (56).

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 (57).



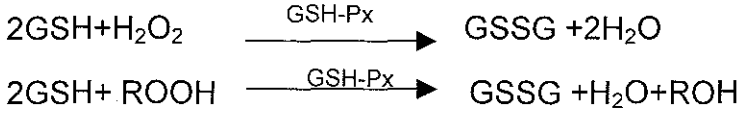
CAT dört subünitten oluşan bir hemoproteindir. Mol başına 4 atom gram Fe içerir. Protohem aktif bölgenin temel componentidir. Fe^{+3} içeren her alt birimde bir protoporfirin IX bulunmaktadır. Bu enzim peroksidaz aktivitesi dışında bir molekül hidrojen peroksiti elektron verici bir substrat olarak, diğerini de oksidan veya elektron alıcısı olarak kullanabilir. İn vivo koşullarda baskın olan peroksidaz aktivitesidir (57,58).

Memeli dokularında CAT aktivitesi farklı düzeylerde bulunur. En yüksek konsantrasyonlarda karaciğer ve eritrositte rastlanmaktadır. Böbrek dokusunda da hayli yüksek oranda bulunmaktadır (58)

Enzimin inhibitörleri; asetat, askorbat, azid, siyanid, siyanojenbromid, 2,4-diklorofenol, etanol, florid, formik asit, hidroksilamin, metanol, monokloramin, ve nitrittir (58).

3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px):

GSH-Px (E.C: 1.11.1.9 , Glutasyon: H₂O₂ oksidoredüktaz) dokularda ve vücut sıvılarında H₂O₂'nin ve lipid hidroperoksitlerinin, redükte GSH ile redüksiyonunu katalizler ve hücrenin oksidatif zedelenmeye karşı korunmasını sağlar (59)



2.4. LİPİD PEROKSİDASYONUNUN ÖNEMİ

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 nihai bir kırılmaya sebep olur. Peroksit fragmentasyonunun bazı son ürünleri aynı zamanda sitotoksiktir (60). "

Lipid peroksidasyonunun birçok hastalık durumunda arttığını ve dokuların birçok toksin tarafından zehirlendiğini gösteren birçok delil mevcuttur. Bu toksisite için sorumlu tutulan artmış lipid peroksidasyonuna, hastalık ya da toksinin sebep olduğu tahmin edilmektedir. Oysa çok yıllar önce, hasarlı dokuların sağlam dokulardan daha hızlı peroksidasyona uğradığı gösterilmiştir. Hasara uğramış dokuların bu kadar hızlı peroksidasyona uğrama eğiliminin sebepleri, bazı antioksidanların inaktivasyonu, antioksidanların hücrelerden ayrılması ve metal iyonlarının (özellikle demir ve bakır) depo bölgelerinden ve hasarlı lizozomlardan salınan enzimlerce hidroliz olan metalloproteinlerden salınmasıdır. Bu olaylar dizisi hastalık ya da toksikolojideki artmış lipid peroksidasyon raporlarının çoğunu açıklayabilir. Peroksidasyon hücre hasarına eşlik eder ve peroksidasyonun antioksidanlarca önlenmesi hücre hasarını önleyebilir. Bu durumda lipid peroksidasyonunun ölçülmesi, doku hasarının iyi bir belirleyicisi olabilir (61, 62, 63).

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 (64). 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 asidlerinin peroksidasyonunun tesbit edilmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. MDA'in toksik, karsinogenik ve mutajenik etkileri olduğu bildirilmiştir. MDA'in yaşlanmada da rol oynadığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır. MDA'in 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 (65,66). Lipoproteinlerin MDA ile modifikasyonlarının aterosklerozda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür. MDA'in amino asitlerin α -amino grupları, adenin ve sitozin bazları ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (67,68).

2.5. DİYABETİN RETİNAL OLMAYAN 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 (69).

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
İris	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 sık görülmektedir. Siliyer cismin pigment epitelindeki aşırı glikojen depolanması akomodasyonda oluşan problemlerden sorumlu tutulmaktadır. Refraksiyonda olan değişimler ise daha iyi anlaşılmıştır. Hiperglisemi durumunda yakın görme ve tam tersi olarak hipoglisemi durumlarında ise uzak görme daha iyi olmaktadır. Yüksek düzeyde glukoz, lens içi sorbitol düzeyinde artış ve sonuçta akut şişme ile birlikte lens kalınlığı ve kurvatüründe artış ile sonuçlanır. Diyabetin tedavisi ile birlikte refraksiyon kusuru düzelir. Refraksiyon açısından bir diğer hipotez ise lens içi osmotik basınçta olan değişimlerdir. Hiperglisemi ile birlikte osmotik basınç artar, lens dehidrate olur ve refraktif indeks yükselir (69,70,71). Refraksiyon değişimleri yaşlı hastalarda daha sık görülmesine rağmen genç hastalardaki varyasyonlar daha yoğundur (69).

Kısa dalga boyuna duyarlı kon elektroretinogram (ERG) çalışmalarında retinopatili veya retinopatisiz diyabetli hastalarda selektif düşüş birçok çalışmada gösterilmiştir (72,73,74). Bu sistemde oluşan hasarın nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. İki teori ileri sürülmektedir. Metabolik kontrolün uzun süreli kötü olduğu hastalarda ERG'de saptanan bozukluklarda mikrovasküler değişikliklerin rol oynadığı düşünülmektedir (74). Buna karşın diğer bir çalışmada ise spesifik tritan defektinde lensin sarılaşmasının etkili olduğu belirtilmektedir (75).

2.5.2. Kornea

Diabetes mellitus, korneanın tüm tabakalarını etkileyebilen bir hastalıktır. Kornea epitel tabakasında, hücre sayısında azalma ve incelme saptanır. Bazal membranda olan değişimler epitelyal yapışmayı ve epitelizasyonu etkilemektedir. Bu klinik olarak, bazı diyabet hastalarında epitelyal keratit ile sonuçlanır (76). Florofotometri ile yapılan korneal otofloresans çalışmalarında, belirgin bir diyabetik retinopatinin bulunmadığı hastalarda artış görülürken proliferatif diyabetik retinopatili gözlerde ise daha fazla olarak saptanır (77,78). Korneal otofloresans, metabolik kontrolün belirleyicisi olarak kullanılabilir. Çünkü, kan glukoz seviyesindeki kısa süreli değişimlere duyarlıdır ve kan-aköz bariyerindeki bozulmayı yansıtır (79).

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. Bu da aldoz redüktaz enziminin, korneal duyarlılıkta oluşan azalmada etkili olduğu izlenimini uyandırmaktadır (80). Hem tip I hem de tip II diabetes mellituslu hastalarda korneal duyarlılıkta azalma mevcuttur (81)

Endotel hücrelerinde, polimegatizm ve azalmış pleomorfizm saptanır (76). Diyabetik hastaların %67'sinde endotel fonksiyonu normal kontrol hastalarına oranla daha düşüktür (82). Buna karşın, akut hiperglisemi sırasında korneal ödem glukoz seviyesinin normal olduğu zamanlara oranla daha azdır (83).

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 (84,85,86,87), bazı çalışmalarda ise bu ilişki gösterilememiştir (88).

Diyabet, açı kapanması glomu bulunan hastalarda da daha yüksek oranda saptanmaktadır. Lens kalınlığında artış ve otonomik disfonksiyona bağlı pupil dilatasyonu sorumlu tutulmuştur (86).

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 (79)

2.5.4. Kraniyal Nöropatiler

Ekstraoküler kas felci, diyabetin hastalığın derecesi ile ilişkisi bulunmayan bir komplikasyonudur. Çok sık görülmemekle birlikte diyabetin ilk belirtisi olarak da ortaya çıkabilirler. Okülmotor ve abduzens sinirleri, troklear sinire oranla daha fazla etkilenir. Genellikle izole tutulum gözlenir. Patogenezi ise halen tartışmalıdır. Vasküler ve metabolik problemlerin kombinasyonu, aksonal transfer ve vasküler geçirgenliği etkileyerek kraniyal nöropatlere neden olurlar. Fokal beyin sapı lezyonları bazı vakalarda gösterilmiştir (69,89,90).

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 (91). İskemik optik nöropati saptanan hastaların %24'ü diyabetiktir (92).

2.5.6. Lens

Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri lenste katarakt oluşturmastır. Diyabetik katarakt iki ana tipte görülür. "Gerçek" diyabetik kataraktının yapısı osmotik karakterdedir, insüline bağımlı diyabetlilerde ve erken yaşlarda özellikle ilk üç dekada ortaya çıkmaktadır. Juvenil-onset diyabetik katarakt olarak da adlandırılır. Klinik olarak, lensin kortikal bölgesindeki "kayağdı manzarası" kesafetler, polikromatik kristaller veya lentiküler kortekste vakuoller şeklinde görülür. Bu tür katarakt osmotik yapının düzelmesi ile geri dönebilir (69).

..

İkinci tür diyabetik katarakt ise geri dönüşümsüzdür ve her iki diyabet türünde de görülebilir. Gelişimi uzun sürer ve ilk olarak 4. ve 5. dekadlarda ortaya çıkar. Kataraktın türü yaşa bağlı olan değişikliklerle benzerdir (69).

Elektron mikroskopisi ile yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçanlarda lens kesafetlerinin posterior subkapsüler bölgede ve ön korteksin merkezinde olduğu saptanmıştır. Kesafet alanlarında, lens liflerinde düzensizlik ve ödem de görülmektedir (93). Tip II diyabetli vakalarda, lens ön yüzündeki epitel hücre yoğunluğunda ve adenoizintrifosfataz (ATPaz) fonksiyonunda azalma saptanmıştır (94). Bu değişimler, katarakt gelişimindeki osmotik modeli kanıtlamaktadır.

Katarakt Oluşumunun Mekanizması:

1. Osmotik stres ve sorbitol yolu:

Sorbitol yolu ve aldoz redüktaz inhibitörleri üzerine yapılan sıçan çalışmaları halen devam etmektedir. Yüksek düzeyde glukoz aldoz redüktaz enzimini aktive ederek lens içi sorbitol düzeyini artırır. Sorbitol, hücre zarını geçememeleri sebebiyle hücre içinde birikir ve hipertonic osmotik dengesizlik ile birlikte lens hidrasyonunu artırır. Yapılan çalışmalarda, aldoz redüktaz inhibitörleri ile sorbitol

birikimi ve buna bağlı katarakt oluşumu engellenmesine rağmen henüz insanlara yönelik bir çalışma yapılamamıştır (69,95,96,97).

2. Protein Modifikasyonu:

Özellikle tip II diyabette görülen bir diğer mekanizma ise ileri glikasyon son rnleri (AGE) ile sonuçlanan protein modifikasyonlarıdır. AGE, proteinler ile geniş çapraz bağlara sahiptirler ve kataraktın nedeni olarak gösterilirler(79).

3. Oksidasyon:

Diyabetik lense olan oksidatif hasar AGE rnlerinin direkt oksidasyonu veya hücrenin redoks siklusunda olan değişiklikler sonucu ortaya çıkabilir. Bu iki olay protein birikimi ve katarakt ile sonuçlanırlar (79).

Diyabetik lenslerde proteine bağlı serbest sülfidril ve karbonil proteinleri artar ve bu proteinlere olan,oksidatif hasarın göstergesidirler. Aynı zamanda antioksidan mekanizmalar da baskılanır. Diyabetik sıçanlarda antioksidan mekanizmanın baskılanması ise hidrasyon değişikliklerine ve vakuol oluşumuna neden olur (98,99).

İnsan lenslerinde yapılan çalışmalarda ise lipid peroksit seviyesinde artış saptanmıştır (100).

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 (101).

2.6. DİYABETİK RETİNOPATİ

Bütün dünyada 20-65 yaş arası bireylerde yasal körlüklerin bir numaralı sebebi olarak gösterilen diyabet retinopatisi, retinanın prekapiller arteriollerini, kapillerlerini ve venllerini tutan bir mikroanjyopati tablosudur (102,103).

Modern tedavi yöntemleri ile diyabetlinin yaşam süresinin uzaması, diyabetik retinopatinin görülme sıklığını da arttırmıştır. 10 yıllık diyabetlide retinopati %20 oranında görülürken 25 yıllık diyabetlide bu oran %85'e çıkmaktadır (103). Diyabetik retinopati, insüline bağımlı diyabetlilerde (%40) bağımlı olmayanlara (%20) oranla daha sık görülür (102)

Diyabetin süresinin uzaması, metabolik kontrolün kötü olması, gebelik, hipertansiyon, renal hastalık, şişmanlık, hiperlipidemi, tütün kullanımı ve anemi retinopatinin gelişimini hızlandıran faktörlerdir (102,103).

2.6.1. Etyopatogenez:

Retinopatiyi oluşturan olayların tümünden mikrovasküler tıkanma ve sızıntı sorumludur.

“

1. Mikrovasküler oklüzyon:

Kapiller bazal membranda kalınlaşma, endotelyal hücre hasarı ve proliferasyonu, kırmızı kan hücrelerinde deformasyon ve trombositlerde olan değişikliklere bağlı gelişen adhezyon ve agregasyon mikrovasküler tıkanmanın patogenezinden sorumludurlar (102).

Retinadaki kapiller perfüzyonun kapanması hipoksi ile sonuçlanır. Retina hipoksisinin iki önemli etkisi arteryovenöz şantlar ve neovaskülarizasyondur (102,103)

2 Mikrovasküler sızıntı:

Retina kapillerinde bulunan endotelyal 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 retina 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 (102,103)

2.6.2. Diyabetik Retinopatinin Sınıflandırılması:

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

1 Proliferatif olmayan 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 (102,103).

b. Preproliferatif diyabetik retinopati:

Tesbihlenme, kıvrım artışı ve parmak-sucuk şeklinde segmentasyon tarzında venöz değişiklikler, retina sinir liflerinin oklüzyonuna bağlı gelişen yumuşak eksudalar, koyu leke biçiminde hemorajiler ve intraretinal mikrovasküler anomaliler (IRMA) görülmektedir (102,103)

2. Proliferatif diyabetik retinopati:

Diyabetik nüfusun yaklaşık %5-10'unu etkilemektedir. İnsüline bağımlı diyabeti olan hastalar, otuz yıl sonrasında %60 oranında proliferatif diyabetik retinopati görülmesi nedeniyle artmış bir risk altında bulunmaktadır. Neovaskülarizasyon, proliferatif diyabetik retinopatinin en önemli bulgusudur. 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 (102,103).

Diyabetik retinopatinin görmeyi tehdit eden ciddi komplikasyonları, tedavinin yapılamadığı veya yetersiz olduğu gözlerde ortaya çıkmaktadırlar:

1. Persistan vitreus içi hemoraji
2. Traksiyonel retina dekolmanı
3. Opak membranlar
4. Sönmüş göz evresi
5. Rubeosis iridis ve neovasküler glokom(102)

2.6.3. Diyabetik Retinopati Oluşum Mekanizmaları:

1. İleri glikasyon son ürünleri (AGE):

Kapiller hücreler ile ekstraselüler matriks arasındaki bağlantıyı zedeler. Vitreus içerisinde AGE seviyesinin artması Müller hücrelerinde vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF) yapımını artırarak intraoküler neovaskülarizasyon oluşumunu uyarır (104). AGE ve reseptörlerinin lokalizasyonu diyabetik mikrovasküler hasar alanlarında retinada iç pleksiform tabakada ve iç limitan membranda gösterilmiştir (105). AGE inhibitörü olarak aminoguanidine ve monoklonal antikolar ile yapılan çalışmalarda, AGE seviyesinde olan düşüş gösterilmiştir (106). Perisit kaybı ve aselüler kapiller formasyon kan glukoz ve AGE seviyesinde orta derecede artış ile birlikte iken endotelial hücre proliferasyonu için yüksek miktarda glukoz ve AGE gereklidir (107).

2. Oksidasyon:

Diyabetik retinopatide oksidasyonun rolü için yapılan çalışmalar, retinal hasarın mekanizması ve antioksidan tedavi üzerinde ağırlaşmıştır. Birçok çalışmada, diyabetik retinopati durumlarında proteinlere olan oksidatif hasar ve antioksidanların fonksiyonlarında olan değişiklikler gösterilmiştir (108). Goto-Kakizaki (GK) sıçanları, herediter 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 (109). Artmış sitoplazmik laktat/pyruvate oranındaki artış ile birlikte NAD⁺/NADH oranında progresif azalma deneysel diyabet hayvanlarında erken dönemlerde gösterilmiştir (110).

Amin oksidaza bağlı deaminasyon sonrasında, endotelyal hasar ve plak formasyonu, oksidatif glikasyona veya LDL oksidasyonuna neden olabilecek artmış oksidatif stres ve vasküler sistem hasarı görölmektedir. Formaldehit uygulaması da, ileri glikasyon ve protein hasarı ile sonuçlanır (111).

Birçok ekzojen antioksidan uygulamaları, hiperglisemiye bağlı gelişen oksidatif hasarı önlemede başarılı olmuştur. C ve E vitaminleri bunlar arasında en sık uygulanan antioksidanlardır (112).

3. Büyüme Faktörleri:

Artmış vasküler geçirgenlik ve neovaskülarizasyon, diyabetik maküler ödem ve proliferatif diyabetik retinopati ile sonuçlanır. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ise oküler neovaskülarizasyon ve oküler olmayan dokulardaki damar geçirgenliğinin önemli uyarılarından biridir. İntravitreal VEGF'ün kaynağı iskemik retina „olarak gösterilmesine karşın serumdaki artış gözden kaçırılmamalıdır (112). Yapılan çalışmaların çoğunda, VEGF lokalizasyonu ve konsantrasyonu belirlenememiştir. Buna rağmen, 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 (113).

İnsülin benzeri büyüme faktörü, proliferatif diyabetik retinopatili hastalarda retinal kapiller perfüzyonun bozulmasına bağlı gelişen retinal iskeminin bulunduğu hastalara oranla daha yüksek seviyede bulunur (114).

4. Aldoz redüktaz inhibitörleri:

Streptozotosin ile oluşturulmuş diyabeti olan sıçanlarda yapılan iki çalışmada, aldoz redüktaz inhibitörlerinin retinal sorbitol ve fruktoz seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir (115,116). Buna karşın aldoz redüktaz inhibitörlerinin tedavi edici dozları henüz belirlenmemiştir.

5. Metabolitler:

Bu mekanizmalardan biri , hiperglisemiye bağlı artmış diaçilgliserol (DAG) seviyesinde artış ve protein kinaz C (PKC)'nin aktivasyonudur. PKC, ekstraselüler

matriks ve sitokin üretiminde artışa neden olur ve vasküler geçirgenlik ve vasküler hücre proliferasyonu artar Buna bağlı olarak, sitoplazmik fosfolipaz A2 aktivasyonu artar ve Na-K ATPaz inhibe olur. Bu çalışmalarda ayrıca, LY333531 ve E vitamini gibi PKC inhibitörlerinin kullanımı ile birlikte muhtemelen DAG kinaz aktivasyonuna bağlı DAG seviyesinde azalmanın neden olduğu diyabetik vasküler komplikasyonlarda düzelme gösterilmiştir (117,118,119)

Diyabetik retinopatiji açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda ayrıca aşağıda yer alan sonuçlar elde edilmiştir:

- a. Diyabetik retinada nitrik oksit sentetaz aktivitesinde artış, amino asitlerin bazal seviyesinde azalma ve L-arginine alımında artış (120).
- b. Serum trigliserid seviyesi ile mikrosirküler damarlarda olan değişimler (121).
- c. Glial reaktivite (122).
- d. Diyabetik retina hücrelerinde proteinlerin mono-ADP-ribosilasyonu (123).
- e. Kallikrein-bağlı proteinlerin varlığı (124)
- f. Prostanoid metabolizmasındaki değişimler (125).

6. Alternatif mekanizmalar :

Diyabetik retinopatinin oluşumunda öne sürülen diğer mekanizmalar:

- a Endotel hücre ölümüne bağlı olarak, damarların ve mikroanevrizmaların lökosit tıkaçı ile kapanması (126)
- b. Retinada lökosit birikiminde artış ve buna bağlı mikrovasküler oklüzyon ve disfonksiyon (127)
- c. Endotelin miktarında artış (128,29)
- d Trombosit hiperaktivasyonu (130)
- e. Retinada nöral hücre apoptosisinde artış (131).
- f Böbrek, beyin, retina ve lenste artmış lipid peroksidasyonu ve tedavide kadmiyumun rolü (132).

2.7. VİTREUS

İnsan vitreusu, şeffaf, avasküler ve jelatinöz bir yapı olup 4 5 ml'lik vitreus boşluğunu doldurur. Bu boşluk, önde lens, zonüller ve siliyer cisim, arkada ise retina ve optik sinir tarafından çevrelenir. Hacim ve ağırlık olarak gözün 2/3'ünü oluşturur (133,134)

Vitreus yapısal olarak sıvı içeriği fazla hyalüronik asit matrikste asılı kollajen fibril ağından ibarettir ve %99'u sudur (133,134).

Küre şeklinde bir yapı olan vitreus iki kısma ayrılır:

1. Kortikal vitreus:

Lens ve retinaya komşu olan dış kısmını oluşturmaktadır. Önünde bombeleşme sonucu oluşan lentiküler fossada lens bulunmaktadır. Kortikal vitreusun yoğunluğu bu bölgede artar ve ön hyaloid membranı oluşturur. Özellikle gençlerde Weigert ligamanı ile lens arka kapsülüne sıkıca yapışır (133).

Vitreusun pars plana epiteli ve ora serratanın hemen arkasındaki retinaya olan sıkı yapışma bölgesine vitreus tabanı adı verilmektedir. Kortikal vitreus bu alanda yoğun kollajen fibriller içermektedir. Diğer bir sıkı yapışma bölgesi ise optik disk kenarındır ve lens arka yüzüne yapışma bölgesinde olduğu gibi yaşla birlikte zamanla gevşer (133).

Sağlıklı bir gözde kortikal vitreus tüm retina ile temas halinde olup, dağınık kollajen filamanlarla iç limitan membrana tutunmuştur. Bu bağlantılar bazen sıkı olup retina deliklerine neden olabilir. Kortikal vitreusta ayrıca hiyalosit denen fagositik hücrelerde vardır (133).

2. Santral vitreus:

Daha az kollajen lifleri ile birlikte kortikal vitreusa oranla daha az yoğun bir yapıya sahiptir. Fötal hayatta lensten optik sinir başına doğru uzanan hyaloid kanal içindeki hyaloid arter doğumdan hemen sonra kaybolur. Kanal ise yaşam boyu

devam eder. Bazen arterinde gdk bir i kısmı lens arka yüzüne yapışık olarak vitreusta dalgalanır (Mittendorf lekesi) (133).

Diyabet durumunda vitreusta likefikasyon ortaya çıkmaktadır. Maillard rnleri, normal yaşı grupları ile karşılaştırıldığında diyabetlilerde vitreusta saptanmaktadır. Maillard rnleri, hyalran gibi glikozaminoglikanlarda depolimerizasyona neden olurlar ve bu nedenle likefikasyondan sorumlu tutulmaktadır (135,136). Antioksidan enzimler, demir şelatları ve serbest radikal yakalayıcılarının kullanımı ile birlikte Maillard ürünlerine bağlı gelişen dejenerasyonun engellendiğinin gösterilmesi serbest radikallerin rolünü ispatlamaktadır (136).

2.8. LİPOİK ASİT

İlk olarak Reed, ve arkadaşları tarafından izole edilen α -lipoik asit (ALA) (thioctic acid; 2-dithiolane-3 penatanoic acid; 1,2-dithiolane-3 valeric acid) suda erimeyen fakat organik czclerde eriyebilen bir maddedir. Piruvat dehidrogenaz ve α -ketoglutarat dehidrogenaz enzim komplekslerinde önemli rol oynayan bir kofaktördür ve son zamanlarda hem α -lipoik asit hem de redükte formu dihidrolipoik asit (DHHLA) antioksidan özellikleri ile önemli derecede dikkat cekmektedir. Önceleri vitaminler sınıfına dahil edilmesi önerilmiş fakat daha sonra hayvanlar ve insanlar tarafından da sentezlenebildiği gözlenmiştir (4,137).

ALA ve DHHLA, ideal bir antioksidanın tüm kriterlerini içermeleri nedeniyle "evrensel antioksidanlar" olarak adlandırılmışlardır (138). ALA, oral yolla alındığında hemen absorbe olur ve bazı dokular tarafından DHHLA'e cvrilir (139). Her iki form, lipid ve aköz ortamlarda serbest radikallerin aktivitesini azaltır ve metal şelatlayıcı etki gösterir. Ek olarak, DHHLA diğer antioksidanların rejenerasyonunda rol alır.

2.8.1. Antioksidan Aktivite:

ALA'in antioksidan etkileri ilk olarak 1959 yılında Rosenberg ve Culik tarafından bildirilmiştir (140). Antioksidan etkilerini aşağıda yer alan mekanizmalar ile gösterir:

1. Reaktif oksijen türleri ile reaksiyon ve metal şelatlama:

Lipoik Asit: Hidroksil radikali, hipokloröz asit ve tekil oksijen ile reaksiyon gösterir (141,142,143) Buna karşın, hidrojen peroksit, süperoksit radikali ve peroksil radikallerini ise etkilemez (142). Ayrıca metaller (kadmiyum, demir, manganez, çinko, bakır) ile şelatlayıcı etki gösterir (4,142).

Dihidrolipoic asit: Hipokloröz asit, peroksil radikali ve hidroksil radikali ile reaksiyona girerken, hidrojen peroksit ve tekil oksijen üzerinde etkisizdir (141,142,143). Lipoik asit gibi şelatlayıcı etkisi de mevcuttur (142).

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 (4).

”

3. Proteinlerin ayarlanması: Ekzojen olarak verilen α -lipoik asit, intraselüler fonksiyonları sadece antioksidan aktivite ile değil aynı zamanda thoredoksin, enzimler ve taşıyıcı proteinler gibi thiol içeren proteinleri etkileyerek ayarlar (4).

4. Genler üzerine olan etki: NF- κ B ve c-fos genleri üzerine olan etkileri araştırılmaktadır (144,145).

Antioksidan etkileri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda, α -lipoik asidin, diyabet, iskemi-reperfüzyon hasarı, metal zehirlenmesi, radyasyon hasarı, ve HIV enfeksiyonu tedavisinde etkili olabileceği saptanmıştır (4).

2.8.2. Diyabet ve α -Lipoik Asit:

ALA'nın hem Tip I hem de Tip II diyabette potansiyel koruyucu veya iyileştirici etkileri rapor edilmiştir. Diyabette gelişen birçok komplikasyonun, oksidatif serbest radikal oluşumu ile ilgili olduğu gösterilmiştir (146). Diyabetik hastaların serum tiyobarbitürik asit reaktif ürünleri (TBARS) seviyeleri diyabetik olmayanlara oranla daha yüksek bulunmuştur. ALA ve DHLA'nın diyabette indüklenen komplikasyonları önlediği gösterildiğinden beri, bu komplikasyonlarda oksidan stresin rolü ile ALA ve DHLA'nın antioksidan özellikleri arasındaki ilişki çok ilgi çekmektedir (146,147,148).

Deney hayvanları üzerine yapılan bazı çalışmalarda, ALA'in diyabette sadece antioksidan özelliklerinden dolayı değil başka sebeplerle de kullanıldığı rapor edilmiştir örneğin; intraperitoneal ALA uygulamasının, streptozotosin ile diyabetik hale getirilmiş sıçanların fetslerini nöral tüp hasarından koruduğu (149), glisemiye düşürdüğü ve kas GLUT-4 seviyelerini artırdığı (150) ve gentamisin ile indüklenen nefrotoksisiteye karşı koruyucu etkilerinin bulunduğu (151) bildirilmiştir.

“

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, $22\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklık ve $\%50\pm5$ 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: 10 sıçan içeren bu grup kontrol grubu olarak seçildi. Bu gruba deney başlangıcında 1 kez STZ taşıyıcısı intraperitoneal olarak enjekte edildikten sonra, 10 hafta süresince her gün intraperitoneal olarak ALA taşıyıcısı enjeksiyonu uygulandı.

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

3 Diyabet grubu: Başlangıçta 20 sıçan ile başlanan, fakat diyabet nedeni ile ölümlerden dolayı 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 şekerleri ölçüldü ve kan şekeri 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabet olarak kabul edildi (normal açlık kan şekeri sınırları 50-135 mg/dl). Bu sıçanlara 10 hafta boyunca her gün ALA taşıyıcısı intraperitoneal olarak enjekte edildi

4. Diyabet-Lipoik asit grubu: Başlangıçta 20 sıçan ile başlanan, fakat diyabet nedeni ile ölümlerden dolayı 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. Otomatik mikropipet ile insizyon bölgesinden vitreal boşluğa ulaşıldı ve vitreus aspire edildi. Alınan bu vitreus 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 vitreustaki biyokimyasal tetkikler aynı gün içerisinde uygulandı ve bu süre içerisinde buz içinde saklandı.

3.3. METODLAR

3.3.1. Protein Tayini

Vitreus içerisinde yer alan protein içerikleri, Lowry'nin metoduna göre bovine serum albümin (BSA) standardı kullanılarak ölçüldü (152).

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, porotein 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 vitreus miktarı çok düşük olduğu için protein miktarları konusunda net 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 (153).

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 absorbans değişikliği, SOD inhibisyonu ile ilişkilidir.

Ayırıcılar:

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

Yöntem:

Tampon ile gerekli dilüsyonlar yapıldıktan sonra aşağıdaki yöntem uygulanır

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

Epinefrin eklendikten ve tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 480 nm'de ve 30°C tampon 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) numune gibi çalışıldı. Tüm standartlar üç kez çalışılarak ortalamaları alındı.

Aktivitenin Hesaplanması:

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

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

$$X = [(\Delta OD / dk \text{ (standart)}) / (\Delta OD / dk \text{ (kontrol)})] \times 100$$
$$\text{Standartın \% inhibisyon değeri} = 100 - X$$

$\Delta OD / dk$ (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 (154).

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.

Ayır  lar.

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   l  m   için gerekli dilüsyonlar fosfat tamponu ile yapıldıktan sonra aşağıdaki prosedür uygulandı.

	K��r (��l)	Numune (��l)
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

A_0 : 0 saniyedeki absorbans değeri

A_{15} : 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 (155,156).

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

3.5.2. Kimyasal Malzemeler

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

4. BULGULAR

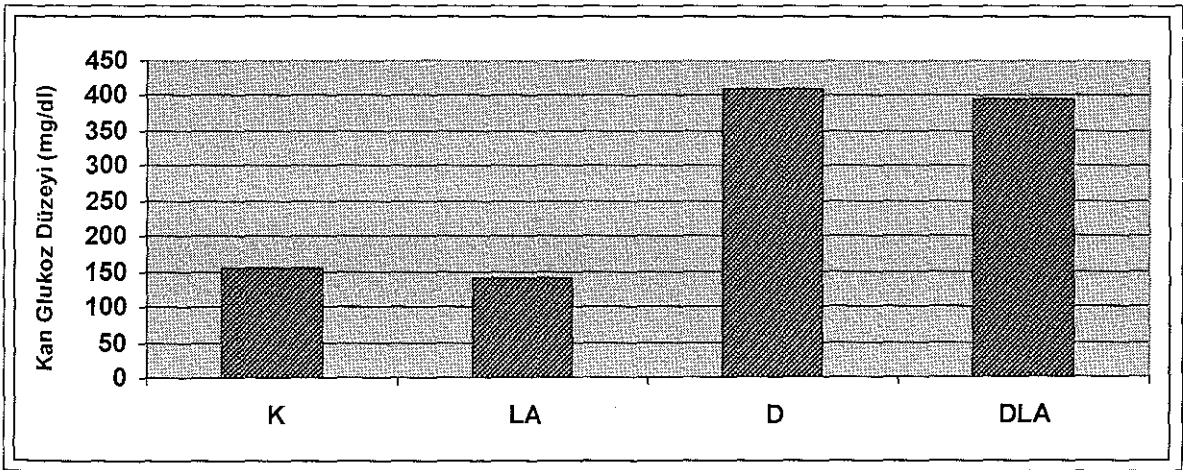
4.1. KAN ŞEKERİ DÜZEYLERİ

Dört grupta yer alan hayvanların son açlık kan şekeri düzeyleri tablo 4.1 ve şekil 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 $\pm$ 4.40	
Lipoik asit grubu (LA)	141.40 $\pm$ 4.81	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	409.33 $\pm$ 17.85	b: $p<0.001$ c: $p<0.001$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	395.25 $\pm$ 12.31	d: $p<0.001$ e: $p<0.001$ f: $p>0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması



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

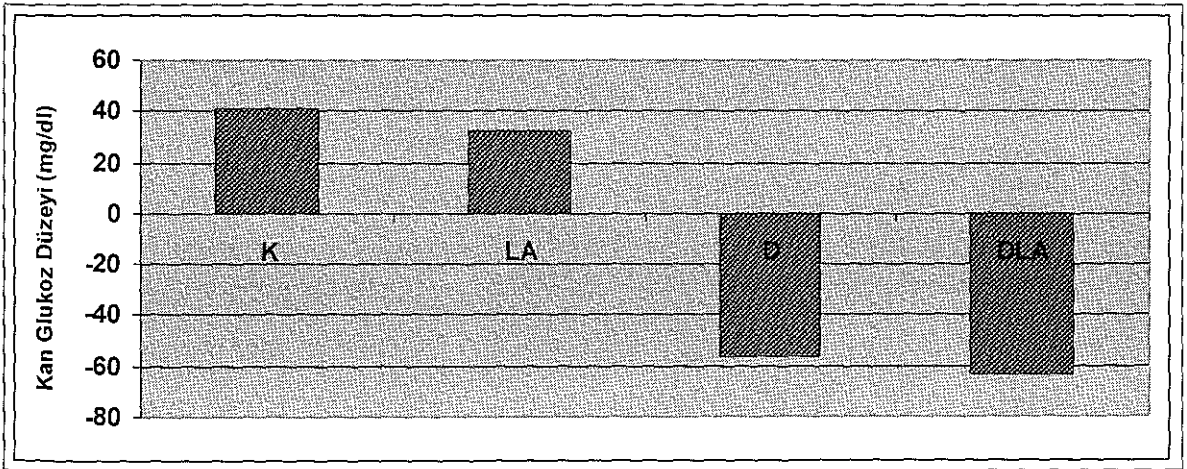
4.2. KİLO DEĞİŞİMLERİ

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

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 (DLA)	- 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 DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması



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

4.3. VİTREUS SIVISININ DEĞERLENDİRİLMESİ

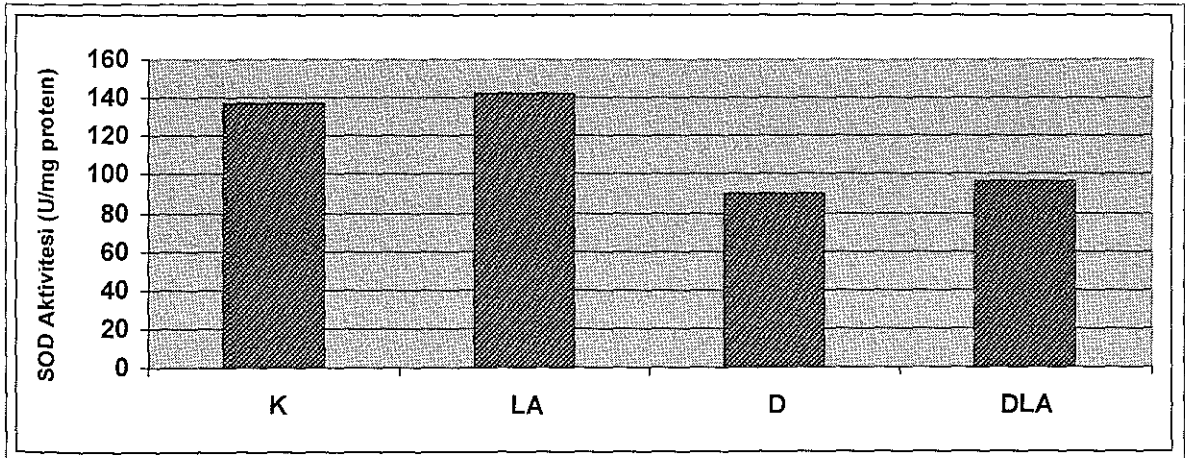
4.3.1. Vitreus Sıvısının SOD Aktiviteleri:

Vitreustaki SOD aktiviteleri tablo 4.3.1 ve şekil 4.3.1'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, diyabetik gruplarda SOD düzeyi diyabetik olmayan gruplara oranla anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$). Lipoik asit uygulanan gruplarda ise uygulanmayanlara oranla fark anlamlı değildir ($p>0.05$).

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

Grup	SOD (ortalama $\pm$ standart hata)	P
Kontrol grubu (K)	137.02 $\pm$ 11.15	
Lipoik asit grubu (LA)	142.40 $\pm$ 12.38	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	89.51 $\pm$ 8.41	b: $p<0.05$ c: $p<0.05$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	96.02 $\pm$ 13.49	d: $p<0.05$ e: $p<0.05$ f: $p>0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması



Şekil 4.2.1. Grupların vitreustaki SOD değerleri

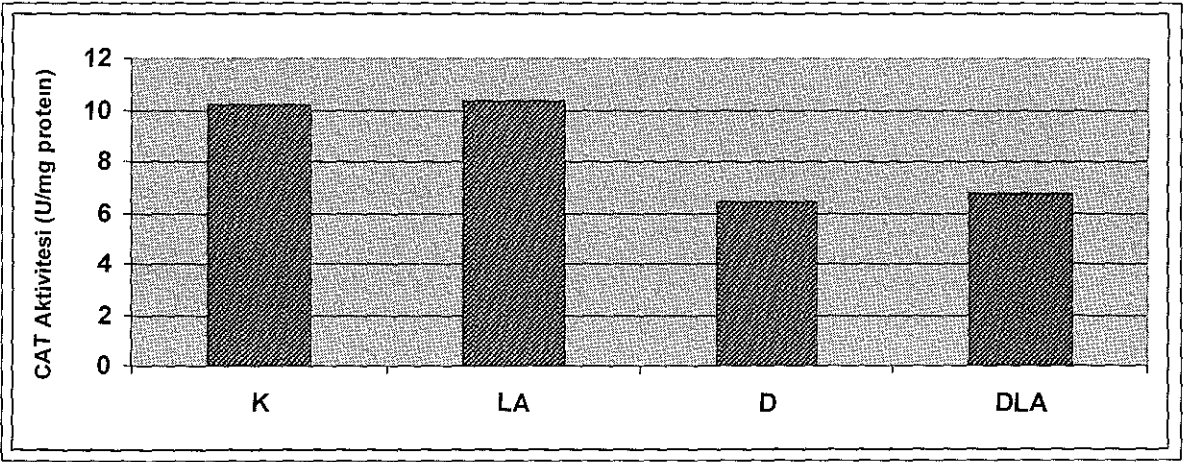
4.3.2. Vitreus CAT Aktiviteleri:

Vitreustaki CAT aktiviteleri tablo 4.3.2 ve şekil 4.3.2’de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, diyabetik gruplarda CAT düzeyi diyabetik olmayan gruplara oranla anlamlı derecede düşüktür ($p<0.05$) Lipoik asit uygulanan gruplarda ise uygulanmayanlara oranla fark anlamlı değildir ($p>0.05$).

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

Grup	CAT (ortalama $\pm$ standart hata)	p
Kontrol grubu (K)	10.18 $\pm$ 0.73	
Lipoik asit grubu (LA)	10.39 $\pm$ 0.91	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	6.42 $\pm$ 0.74	b: $p<0.05$ c: $p<0.05$
“ Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	6.71 $\pm$ 0.82	d: $p<0.05$ e: $p<0.05$ f: $p>0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması



Şekil 4.3.2 Grupların vitreustaki CAT değerleri

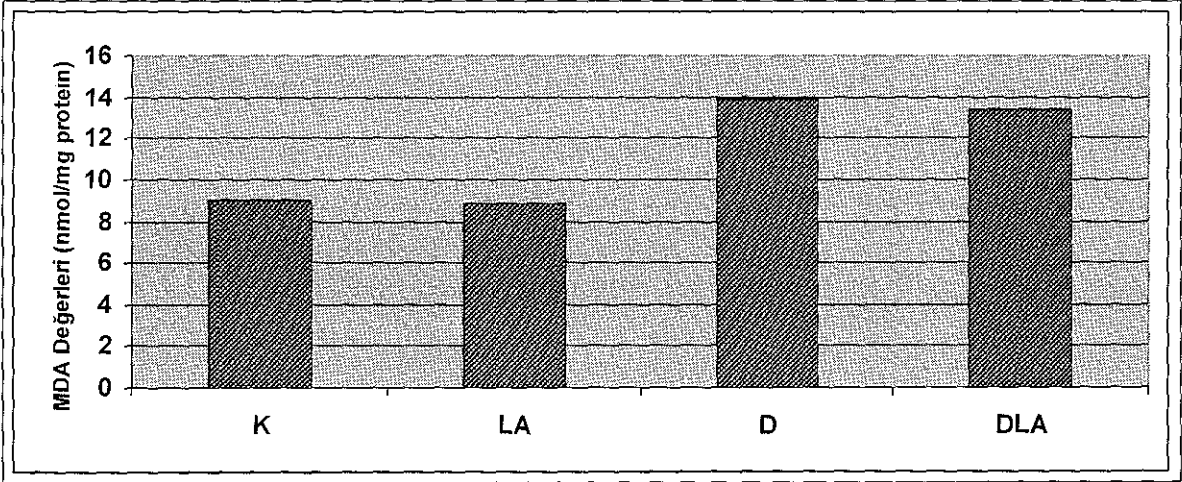
4.3.3. Vitreus MDA Değerleri:

Vitreustaki MDA değerleri tablo 4.3.3 ve şekil 4.3.3'de verilmiştir. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, diyabetik gruplarda MDA düzeyi diyabetik olmayan gruplara oranla anlamlı derecede yüksektir ($p<0.05$). Lipoik asit uygulanan gruplarda ise MDA seviyesinde olan azalma anlamlı değildir ($p>0.05$).

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

Grup	MDA (ortalama $\pm$ standart hata)	p
Kontrol grubu (K)	8.97 $\pm$ 1.00	
Lipoik asit grubu (LA)	8.78 $\pm$ 0.80	a: $p>0.05$
Diyabet grubu (D)	13.82 $\pm$ 1.06	b: $p<0.05$ c: $p<0.05$
Diyabet + Lipoik asit grubu (DLA)	13.40 $\pm$ 1.61	d: $p<0.05$ e: $p<0.05$ f: $p>0.05$

a: K ve LA'nın, b: K ve D'nin, c: LA ve D'nin, d: K ve DLA'nın, e: LA ve DLA'nın, f: D ve DLA'nın istatistiksel karşılaştırılması



Şekil 4.3.3. Grupların vitreustaki MDA değerleri

5. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus, tüm komplikasyonlarının yanında diyabetik retinopati oluşturması nedeniyle tüm dünyada çalışan yaş grubunda akiz gelişen görme kaybı nedenleri arasındaki önemini halen devam ettirmektedir.

Kan glukoz seviyesinin yetersiz olarak kontrolü, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların gelişiminde birincil nedeni oluştururken, makrovasküler komplikasyonların gelişimine de katkıda bulunurlar (2). Hipergliseminin bu etkisi, diyabetik olmayan hayvan gruplarına galaktozla zenginleştirilmiş diyet verilmesi ve sonucunda diyabetik hayvanlarda ve insanlarda rastlanan retinal kapiller lezyonların bu hayvan gruplarında görülmesi ile ispatlanmıştır (157). Kan glukoz seviyesi sıkı bir şekilde kontrol altına alındığı durumlarda, kan ve vitreusta lipid peroksit seviyesinde, ve buna bağlı olarak da oksidatif doku hasarında azalma saptanmıştır (158). Çalışmamızda yer alan hayvanların kan şekeri düzeyleri ötenazinin uygulandığı gün ölçülmüş ve hem diyabet hem de diyabet-lipoik asit grubunda bulunan değerler kontrol ve lipoik asit grubunda yer alan sıçanlara göre anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuştur.

Hipergliseminin retinopati gelişimindeki etkisi üzerine birçok hipotez ileri sürülmesine rağmen hangisinin daha önemli olduğunu saptamak oldukça zordur (157). Polyol metabolizmasındaki artış, proteinlerin enzimatik olmayan glikasyonu, protein kinaz C'nin aktivasyonu ve oksidatif stres bu mekanizmalar içerisinde en önemlilerini teşkil etmektedirler (2,3).

Işık hasarı, iskemi-reperfüzyon hasarı, üveit, katarakt ve diyabetik retinopati gibi birçok oküler hastalıkların patogenezinin oksijen radikalleri ve dolayısıyla oksidatif stres sorumlu tutulmuştur (159). Glukozun otoksidasyonu ve enzimatik olmayan glikasyon, birlikte glikooksidasyon olarak adlandırılır, diyabetik dokularda serbest radikallerin artışına katkıda bulunurlar. Oksidatif strese artışa neden olan diğer mekanizmalar ise düşük moleküler ağırlıklı antioksidanların doku konsantrasyonunda azalma ve antioksidatif savunma enzimlerinin aktivasyonunda zayıflamadır (157,160).

Son yıllarda yapılan çalışmalar göstermiştir ki; serbest radikallerin salınımında artış ve antioksidan sistemde oluşan azalma, kontrolü zor olan diyabetik vakalarda lipid peroksidasyonunda, diyabetik komplikasyonların gelişiminde ve retinal hastalık ile birlikte ortaya çıkan katarakt gelişim oranında artış ile sonuçlanmaktadır (161).

Glikooksidasyon olayının sonucunda, bir oksijen atomu elektronlarından birini kaybederek negatif yüklü ve dengesiz bir molekül olarak serbest radikal oluşturur. Oluşan bu serbest radikal, termodinamik ve yapısal kararlılığını devam ettirmek için komşu molekülden bir elektron alarak yeni bir serbest radikal oluşumuna neden olur. Süperoksit anyonu (O_2^-), ilk oluşan serbest radikaldir ve daha protonlu formu olan perhidroksil radikali ($HO_2\cdot$) bunu takip edebilir. Hidrojen peroksit (H_2O_2), ortamda demir iyonu olduğu durumlarda hücreler ve dokular için en zararlı serbest radikal formu olan hidroksil radikaline ($OH\cdot$) dönüşürler (162).

Hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin oluşumu vitreus dejenerasyonu ile sonuçlanabilir. Vitreusun viskoelastik yapısında oluşan kayıp, çevre dokulara olan mekanik koruyucu etkisini azaltırken, fizyolojik yapısında oluşan hasar nöral retina metabolizması için olan depo fonksiyonunu da düşürür. Bunun yanında, yapılan birçok çalışmada vitreusta artan hidrojen peroksit radikalinin katarakt gelişimini indüklediği gösterilmiştir. Katarakt saptanan vakaların vitreuslarında yapılan incelemelerde çok yüksek düzeyde hidrojen peroksite rastlanmış ve lens proteinlerinin glukoz otoksidasyonu sonucu oluşan hidroksil radikallerince hasara uğradığı saptanmıştır (161). Sonuç olarak, vitreusta oksijen radikallerinde meydana gelen artış sadece vitreus yapısında oluşan patolojik olayları değil, aynı zamanda da lens ve nöral retina gibi vitreusu çevreleyen dokularda oluşan hasarları da yansıtmaktadır (159).

Oksidatif hasara karşı olarak serbest radikal oluşumunu azaltmak veya kompanze etmek için hücre içi ve hücre dışı enzimatik ve enzimatik olmayan defans 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 (162)

Antioksidan enzimler, oküler dokuları oksijen radikalleri ile oluşan hasarlardan korumada hayati bir öneme sahiptir. Süperoksit dismutaz enziminin bakır-çinko ve manganez içeren iki türü, süperoksit iyonunu hidrojen peroksit'e çevirir. Daha önce de belirtildiği gibi, hidrojen peroksit iyonu daha reaktif bir serbest radikal olan hidroksil radikaline dönüşebilir. Bu nedenle, süperoksit dismutaz enzimi, aktivitesinin etkili olabilmesi için katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri ile birlikte reaksiyon gösterirler. Bu iki enzim, hidrojen peroksit radikalini toksik olmayan ürünler olan su ve molekuler oksijene çevirirler. Bu üç enzimin kombine etkisi, oksidatif hasarı engellemede önemli bir metabolik yolu oluşturmaktadırlar (163)

Oküler dokularda, oksijen radikallerinin varlığını göstermek için birçok metod geliştirilmiştir. Bu metodların çoğunda, oksijen radikallerinin varlığı, neden oldukları doku hasarının antioksidanların kullanımı ile azalmasının gösterilmesi ile birlikte indirekt olarak tespit edilmiştir. Buna karşın, artmış oksijen radikallerinin direkt olarak tespiti yüksek oranda reaktif ve kısa ömürlü olmaları ve hızla katalize edilmeleri nedeniyle oldukça zordur (159)

Vitreus, özellikle insan deneylerinde ve retinanın alınamadığı durumlarda retinal metabolizmanın incelenmesinde iyi bir alternatiftir. Gorevic ve ark., vitreusta yer alan proteinlerin büyük bir oranının retina tarafından üretildiğini göstermiştir (164). Reddy ise vitreusun retinal protein metabolizması için bir depo gibi davrandığını ispatlamıştır (165). Bu nedenlerden dolayı, diyabetin neden olduğu oksidatif stresi ve α -lipoik asitin etkilerini saptamak için sıçanların vitreusları kullanılmıştır. Kornea ve lens ultraviyole ışınlarının çoğunu absorbe etmelerine rağmen vitreus retinaya olabilecek bir radyasyon hasarında son bölge olarak önemini korumaktadır. Vitreusun antioksidan korumasında oluşan disfonksiyonun lens ve retina gibi duyarlı dokulardaki hücresel metabolizmayı olumsuz yönde etkilediği rapor edilmiştir (5)

Verdejo ve ark yapmış oldukları bir çalışmada, 12 proliferatif vitreoretinopatili ve 15 proliferatif diyabetik retinopatili hastanın vitreusları vitrektomi ile elde edilmiş ve vitreuslarındaki süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri kontrol grubu hastalarına oranla önemli ölçüde ($p<0.01$) düşük olarak saptanmıştır (162). Tanaka'nın insanlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmaya göre, diyabetik vitreusun süperoksit dismutaz aktivitesi diyabetik olmayan vitreuslara oranla önemli ölçüde ($p<0.05$) düşük olarak saptanmıştır (166). Kernell ve ark çalışmalarında, proliferatif retinopatili 10 diyabetik hasta, yedi diyabetik kadavra ve 35 diyabetik olmayan kontrol hastalarının vitreuslarındaki süperoksit dismutaz aktivitelerini karşılaştırmışlar ve diyabetik gruplarda ve özellikle proliferatif retinopatili vakalarda süperoksit dismutaz aktivitesini önemli ölçüde düşük olarak saptamışlardır (167). Bizim çalışmamızda da, vitreus sıvısında süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri diyabet oluşturulmuş olan iki grupta diyabet oluşturulmayan iki gruba oranla anlamlı derecede düşük olarak bulunmuştur ve daha önce yapılmış olan çalışmaları desteklemektedir. Bu iki enzimin aktivitesinde gözlenen azalma iki nedene bağlanabilir. Birincisi, tüm vücut dokularında olduğu gibi vitreusta da diyabete bağlı olarak antioksidan sistemin aktivasyonunda oluşan dengesizlik olabilir. İkinci neden ise, protein yapısındaki enzimlerin hipergliseminin neden olduğu enzimatik olmayan glikasyona maruz kalmaları olasılığıdır.

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 (168).

Hücre zarları, içerdikleri yüksek orandaki çoklu doymamış yağ asitleri nedeniyle oksidatif atak sonrasında lipid hidroperoksit seviyesinde artışa neden olurlar. Günümüzde çok iyi bilinmektedir ki; lipid peroksidasyonu doku hasarı ve hastalıklarının oluşumunda serbest radikal üretimi ve antioksidan savunma mekanizmasındaki dengenin bozulması sonucunda artan önemli bir mekanizmadır (162,169). Diyabetik gözlerde, reaktif serbest radikaller ile retinal rodların dış bölümlerinde yüksek miktarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri arasındaki reaksiyon sonucu retinal lipid oksidasyonunda artış meydana gelir. Oluşan lipid peroksitleri retinanın deposu olarak görev yapan vitreusu geçerek lense ulaşır.

Lens liflerinin plazma zarlarında oksidatif strese neden olan bu lipid peroksitleri katarakt gelişimine de neden olmaktadır (161). Diyabetik retinopatide oluşan neovaskülarizasyondan lipid serbest radikalleri sorumlu tutulmuştur (170). Daha önce yapılan birçok çalışmada, oküler dokular retina ve lenste diyabet sonrası lipid peroksidasyonu ürünlerinde artış gösterilmesine karşın vitreus üzerine yapılan çalışmalar zor elde edilmesi nedeniyle sınırlı kalmıştır.

Altomare ve ark. diyabetik hastalar üzerine yaptıkları bir çalışmada, hastaların vitreuslarında malondialdehit seviyesini kontrol grubuna oranla daha yüksek olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada, retinopatili hastalar ayrı bir grup olarak incelenmiş ve malondialdehit seviyeleri retinopatisiz guplara oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (161). Verdejo ve ark. yaptıkları çalışmada, proliferatif retinopatili ve proliferatif vitreoretinopatili hastaların vitreuslarında TBARS seviyesini kontrol grubu hastalarına oranla anlamlı derecede ($p<0.001$) yüksek olarak saptamışlardır (162). Boker ve ark., proliferatif vitreoretinopatili 27 hastanın vitreuslarında malondialdehit seviyelerini kontrol grubu hastalarına oranla daha yüksek olarak saptamışlardır (171). Tanaka, diyabetik ve diyabetik olmayan insan gruplarının vitreuslarını incelemiş ve lipid peroksitlerini anlamlı oranda yüksek ($p<0.05$) olarak saptamıştır (166). Giardino (2) ve Agaeva (172) çalışmalarında deneysel diyabet oluşturdukları tavşan vitreuslarında lipid peroksit seviyelerinde artış saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise daha önce üzerinde çalışılmamış olan sıçan vitreusları kullanılmıştır. Buna karşın, daha önce yapılan çalışmaları destekleyecek şekilde vitreus malondialdehit seviyeleri diyabet grubunda yer alan hayvanlarda anlamlı oranda yüksek olarak bulunmuştur.

Reed ve ark. tarafından 1951 yılında ilk olarak tanımlanmasının ardından vitamin olarak sınıflandırılan alfa-lipoik asit (ALA) üzerinde yapılan çalışmalar genişletildikçe insanlar ve hayvanlar tarafından da sentezlenebildiği saptanmıştır (137,173,174). Son yıllarda ise ALA'nın ve redükte formu dihidrolipoik asitin (DHLA) olası antioksidan etkilerine yönelik olan çalışmalar hızlandırılmıştır.

Bir bileşiğin antioksidan olarak kabul edilebilmesi için çeşitli kriterler mevcuttur:

- Serbest radikal yakalanması için spesifik olması.

- Metal şelatlayıcı etkisinin bulunması
- Diğer antioksidanlar ile ilişkiye girebilmesi.
- Gen iletimini etkilemesi.

İdeal bir antioksidan tüm bu kriterleri içermelidir α -lipoik asit ve dihidrolipoik asit çifti ideale çok yakındırlar ve bu sebeple “evrensel antioksidanlar” olarak kabul edilmektedirler (175) ALA kan-retina bariyerini geçerek oküler dokular üzerinde etki gösterir (176).

Daha önce de bahsedildiği gibi diyabet komplikasyonlarının gelişiminde hipergliseminin etkisi oldukça fazladır. Yapılan bazı çalışmalarda, ALA’nın izole edilmiş sıçan diyaframı, kalbi ve kültürü yapılmış miyotübüllere olan glukoz geçişini arttırdığı saptanmıştır (177,178,179). ALA bu etkisini GLUT-1 ve GLUT-4 üzerinden ve insüline bağlı glukoz taşınması üzerinde aditif etki ile gösterir. Henriksen ve ark. “insüline dirençli obez Zucker sıçan modeli üzerindeki çalışmalarında insülin varlığı veya yokluğu durumlarında ALA’nın glukoz alımını arttırdığını göstermişlerdir (180). Tip II diyabet hastalarına intravenöz olarak uygulanan ALA hücrelere glukoz geçişini arttırmaktadır (181). Buna karşın, Obrosova ve ark. streptozotosin ile diyabet oluşturdıkları sıçan gruplarında ALA kullanımı ile kan glukoz konsantrasyonları ve kilo kaybında düzelme saptamamışlardır (182). Aynı şekilde, 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

Günümüze kadar bir çok antioksidan (C ve E vitaminleri, nicanartine, Trolox) diyabetik komplikasyonların önlenmesindeki başarıları açısından incelenmişlerdir. Evrensel antioksidan olarak değerlendirilen ALA üzerine yapılan çalışmalar, diyabetik katarakt ve açık açılı glokom üzerine yoğunlaşmıştır.

Glukoz ortamında inkübe edilmiş lensler ve diyabetik hayvan modellerinde, ALA’nın katarakt oluşumunu engellediği bulunmuştur. ALA, yağ asidi taşıyıcı moleküller yardımı ile lense girer ve DHLA’e dönüşür DHLA lens içerisinde askorbik asit ve E vitamini oluşumunu indükler. C ve E vitaminlerindeki artış GSH

yıkımının azalması ile sonuçlanır. Lipoik asitin diyabete bağlı kataraktı engellemesinde diğer bir mekanizma ise, aldoz redüktazın inhibisyonudur (180). Borenshtein ve ark. sıçanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ALA tedavisi ile tip II diyabet oluşturulan hayvanlarda katarakt gelişiminin engellendiğini rapor etmişlerdir (184). Maitra ve ark. butionin sülfoksimin ile oluşturulmuş yenidoğan sıçan kataraktında R-ALA ve S-ALA'nın etkilerini karşılaştırmışlar ve R-ALA'nın katarakt oluşturma yüzdesini %100'den % 55'indirdiğini ve lens antioksidanlarını koruduğunu görmüşlerdir. Buna karşın S-ALA katarakt oluşumu üzerine etki etmemiştir (185)

Düşük glutatyon seviyesi glokom gelişiminin patolojik sürecinden sorumlu tutulmuştur. Fillina ve ark. açık açılı glokoma sahip gözlerde yaptıkları bir çalışmada, günlük 0.15 g dozunda iki ay uygulanan ALA tedavisinin antioksidan özellikleri ve oküler dokuların metabolizmasına olan etkileri nedeniyle glutatyon seviyesinde artış ve hastaların görme keskinliği, görme alanı ve tonometri değerlerinde kontrol grubu hastalarına oranla gelişme saptamışlardır 0.075 g dozunda uygulanan hastalarda ise iyileşme daha az bulunmuştur (186)

Katarakt ve glokom üzerine yapılan çalışmaların yanında, ALA'nın diyabetik retina üzerine etkilerini gösteren çalışmalar da mevcuttur. Obrosava 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 (182). 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 (176).

Bizim çalışmamızda ise, ALA diyabetik ve diyabetik olmayan iki gruba günlük 50 mg/kg dozunda 10 hafta boyunca uygulanmıştır. Bu maddenin antioksidan etkisi, hücre içi antioksidan enzimlerinden süperoksit dismutaz ve katalaz ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan malondialdehit kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Diyabet oluşumu ile birlikte düşüş saptanan antioksidan enzimlerin aktivitesinde ALA kullanımına karşın belirgin bir düzelme görülmemiştir. Aynı

şekilde, diyabete bağlı artmış oksidatif stresin bir diğer bulgusu olan malondialdehitin vitreus seviyesindeki artışta her gün uygulanan ALA'e rağmen düşüşe rastlanmamıştır

Daha önce ALA'in antioksidan etkileri üzerine yapılan çalışmaların aksine bizim çalışmamızda vitreus sıvısında bu maddenin etkisi desteklenmemektedir. Sıçanlar için ölümcül dozu (LD₅₀) intravenöz olarak uygulanan 400-500 mg/kg (4) olarak kabul edilmesine karşın ALA, tiyamin eksikliği bulunan sıçanlar için intraperitoneal uygulanan 20 mg/kg dozu ölümcül komplikasyonlara neden olabilmektedir. Buna karşın, tiyamin eksikliği bulunmayan hayvanlarda ise yan etki görülmemiştir (187). İnsanlarda görülen yan etkiler ise, alerjik deri reaksiyonları ve diyabetik hastalarda görülebilen hipoglisemidir (4). Daha önce yapılan çalışmalarda, 50 mg/kg dozunda uygulanan ALA'in, diyabetik sıçanlarda kan şekeri, kilo kaybı ve aortanın antioksidan aktivitesi üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu (188), periferik sinir iletiminin erken komplikasyonlarını engellediği (189) gösterilmiştir. Somani ve ark. ise cisplatin ile oluşturulmuş nefrotoksisite (190) ve ototoksisite (191) durumlarında artan dozda (25, 50, 100 mg/kg) uygulanan ALA'in antioksidan savunma mekanizmasındaki azalma ve lipid peroksidasyonunda oluşan artışı engellemede daha etkili olduğunu yayınlamışlardır. Nagamatsu ve ark. yayınlamış oldukları bir çalışmada ise, diyabetik sıçanların sinir liflerinde oluşan oksidatif stresin ALA'in artan dozlarıyla (25, 50, 100 mg/kg) engellendiği ispatlanmıştır (192). Tüm bu çalışmalar göstermiştir ki; günlük 25 mg/kg dozundan itibaren kullanılan ALA diyabetik dokularda oksidatif stresi engellemede başarılı olmaktadır. Bizim çalışmamızda bu nedenlerden dolayı ALA günlük 50 mg/kg dozunda kullanılmıştır. Evrensel bir antioksidan olarak kabul edilen ALA'in vitreus sıvısında etkisinin saptanmaması dozun düşük olarak kullanılması olabilir. Bu nedenle bundan sonra yapılacak olan çalışmalarda, toksisitesinin ve yan etkisinin düşük olduğu bilinen ALA'in intraperitoneal olarak daha yüksek dozlarda uygulanmasının vitreal antioksidan mekanizma üzerindeki etkisi incelenebilir.

6. SONUÇLAR

1. Streptozotosin uygulanmış hayvanlarda kontrol grubuna göre 10 hafta sonra ölçülen kan şekeri düzeyleri ve kilo kaybı anlamlı derecede yüksek olarak bulunmuş ve bu grupta yer alan sıçanlar diyabetik olarak kabul edilmiştir.
2. Streptozotosin ile oluşturulmuş deneysel diyabet gruplarında süperoksit dismutaz ve katalaz düzeyleri vitreusta kontrol gruplarına oranla anlamlı derecede düşük olarak bulunmuş ve böylece diyabetik hayvanların vitreuslarında oksidatif stresin arttığı gösterilmiştir.
3. Diyabet grubunda yer alan hayvanların enükleasyon sonrası alınan vitreuslarında lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehit düzeyinin kontrol grubuna oranla anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur.
4. Evrensel antioksidan olarak tanımlanmış olan ALA'nın 50 mg/kg dozunda 10 hafta boyunca her gün intraperitoneal olarak uygulanması ile hayvanların kan şekeri seviyesinde düzelme görülmemesi insülin yokluğunda ALA'nın glukozun hücre içerisine girişini etkilemediğini ispatlamaktadır.
5. Tedavi amacı ile ALA'nın kullanıldığı sıçan gruplarının vitreuslarında malondialdehit seviyesinde azalma ve antioksidan enzimler olan katalaz ve süperoksit dismutaz aktivitelerinde artış gösterilmemiş olması 50 mg/kg dozunda kullanılan ALA'nın diyabete bağlı olarak vitreusta oluşan oksidatif stresin önlenmesinde yetersiz kaldığını düşündürmektedir.

7. ÖZET

Diabetes Mellitus'a bağlı olarak gelişen komplikasyonların önlenmesine yönelik olarak birçok madde deneme aşamasındadır. Diyabette serbest radikallerin öneminin ortaya çıkması ile birlikte yapılan çalışmalar antioksidanlar üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmadaki amacımız, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda intraperitoneal olarak uygulanmış "evrensel antioksidan" α -lipoik asitin (ALA) vitreal antioksidan sistem ve lipid peroksidasyon 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 anlamlıdır.
2. Diyabetik sıçanlarda vitreal SOD ve CAT aktiviteleri diyabetik olmayan gruptaki sıçanlara oranla anlamlı derecede düşük olarak saptandı.
3. Vitreus sıvısında MDA düzeyinde diyabetik sıçanlarda görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır.
4. ALA tedavisinin uygulanması ile birlikte sıçanların kan glukoz seviyeleri, ağırlıkları ve vitreal MDA düzeyinde ve SOD ve CAT aktivitesinde düzelme görülmeydi.

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

8. 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 Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation, and oxidant-induced apoptosis Diabetes 1998; 47: 114-1120
- 3 Kowluru RA, Koppolu P Diabetes-induced activation of Caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy Free Rad Res 2002; 36(9): 993-999
- 4 Packer L, Witt EH, Tritschler HJ Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant Free Radic Biol Med 1995; 19: 227-250
- 5 Rose RC, Gogia R, Picher SP Properties of electrochemically active components in mammalian vitreous humor Exp Eye Res 1997; 64: 807-812
- 6 Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CJ, Plum F, Smith LH Cecil Essentials of Medicine 3rd edition, WB Saunders, Philadelphia, 1993: 513-523
- 7 Wilson JD, Foster DF Diabetes Mellitus Williams Textbook of Endocrinology, 1992: 1255-1333
- 8 National Diabetes Data Group Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance Diabetes 1979; 28(12):1039-57
- 9 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
- 10 Sheehy MJ, Scharf SJ, Rowe JR, Neme-de-Gimenez MH, Meske LM, Erlich HA, Nepom BS A diabet-susceptible HLA haplotype is best defined by a combination of HLA-DR and -DQ alleles J Clin Invest 1989; 83(3): 830-5
- 11 Tattersall RB, Pyke DA Diabetes in identical twins Lancet 1972; 25: 2(787): 1120-5
- 12 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
- 13 Bottazzo GF, Lendrum R Separate autoantibodies to human pancreatic glucagon and somatostatin cells Lancet 1976; 23; 2(7991): 873-6
- 14 Di Mario U, Dotta F, Crisa L, Anastasi E, Andreani D, Dib SA, Eisenbarth GS Circulating anti-immunoglobulin antibodies in recent-onset type I diabetic patients Diabetes 1988; 37(4): 462-6
- 15 Fernandez FS, Faveeuw C, Bulant CB, Tappaz M, Throsby M, Pelletier G, Vaudry H, Dardenne M, Homo Delarche F Localization of g-aminobutyric acid and glutamic acid decarboxylase in the pancreas of the nonobese diabetic mouse Endocrinology 1996; 137: 3497-3506
- 16 Jones DB, Hunter NR, Duff GW Heath-shock protein 65 as a β cell antigen of insulin-dependent diabetes Lancet 1990; 336: 583-85

- 17 Kuglin B, Gries FA, Kolb H Evidence of IgG autoantibodies against human proinsulin in patients with IDDM before insulin treatment *Diabetes* 1988; 37(1): 130-2
- 18 Ludwig SM, Faiman C, Dean HJ Insulin and insulin-receptor autoantibodies in children with newly diagnosed IDDM before insulin therapy *Diabetes* 1987; 36(4): 420-5
- 19 Srikanta S, Ricker AT, McCulloch DK, Soeldner JS, Eisenbarth GS, Palmer JP. Autoimmunity to insulin, beta cell dysfunction and development of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes* 1986; 35(2): 139-42
- 20 Barbosa J, King R, Goetz FC, Noreen H, Yunis EJ HLA in maturity-onset type of hyperglycemia in the young *Arch Intern Med* 1978; 138(1): 90-3
- 21 Velho G, Vaxillair M, Boccio V, Charpentier G, Froguel P Diabetes complications in NIDDM kindreds linked to the MODY3 Locus on chromosome 12 q *Diabetes Care* 1996; 19(9): 915-19
- 22 Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells Role of glucose permeability *Diabetes* 1982; 31(9): 743-8
- 23 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
- 24 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
- 25 Winegrad AL Banting lecture 1986 Does and common mechanism induce the diverse complications on diabetes *Diabetes* 1987; 36(39): 396-406
- 26 Koloğlu S Diabetes Mellitus Endokrinoloji ve Temel Klinik Medikal Network, Ankara; 1996: 359-499
- 27 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
- 28 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
- 29 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
- 30 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
- 31 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
- 32 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

- 33 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
- 34 Oberley LW. Free radicals and diabetes *Free Radic Biol Med* 1998; 5(2): 113-24
- 35 Yu PB Cellular defenses against damage from reactive oxygen species *Physiol Rev* 1994; 74(1): 139-162
- 36 Bottazzo GF. Beta cell damage in diabetic insulitis: are we approaching a solution *Diabetologia* 1984; 26 (4): 241-9
- 37 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
- 38 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
- 39 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
- 40 Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease- Free radicals and tissue injury *Lab Invest* 1982; 47: 412-26
- 41 Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 1989; 58: 79-110
- 42 Sadrzadeh SM, Graf E, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW Hemoglobin and biologic fenton reagent *J Biol Chem* 1984; 259(23): 14354-6
- 43 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
- 44 Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clin Chem* 1995 Dec; 41(12 Pt 2): 1819-28
- 45 Tappel AL Lipid peroxidation damage to cells components *Fed Proc* 1973; 32: 1870-74
- 46 Chiu D, Kuypers F, Lubin Bertram Lipid peroxidation in human red cells *Sem Hematol* 1989; 26: 257-76
- 47 Gutteridge JM, Halliwell B The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological system *Trends Biochem Sci* 1990; 15(4): 129-35
- 48 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
- 49 Stadtman ER, Berlett BS Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease *Drug Metabol Rev* 1998; 30(2): 225-43
- 50 Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991; 91(Suppl 3C): 14S-22S
- 51 Sun Y, Oberley LW, Lu Y A simple method for clinical assay superoxide dismutase *Clin Chem* 1988; 34(3): 497-500
- 52 Kimmel JR, Markowitz H, Brown DM. Some chemical and physical properties of erythrocyte superoxide dismutase *J Biol Chem* 1989; 264: 46-57

- 53 Hartz JW, Deutsch HF Subunit structure of human erythrocyte superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1972; 247: 7043-50
- 54 Rotilio G, Calabrese L, Bossa F, Barra D Properties of the apoprotein and role of copper and zinc in protein conformation and enzym activity of bovine superoxide dismutase *Biochem* 1972; 11: 2182-7
- 55 Bray RC, Cockle SA, Fielden EW, Roberts PB, Rotilio G Reduction and inactivation of superoxide dismutase by hydrogen peroxide *Biochem J* 1974; 139: 43-8
- 56 Saik LA, Hsieh HL, Baricos WH, Shapira E Enzymatic and immunologic quantitation of erythrocyte superoxide dismutase in adults and in neonates of different gestational ages *Pediatr Res* 1982; 16: 933-7
- 57 Horton AA, Fairhurst S Lipid peroxidation and mechanism toxicity *CRC Critical Reviews In Toxicology* 1987; 18(1):27-73
- 58 Aebi HE Catalase In: Bergmeyer HU (ed): *Methods of Enzymatic Analysis* Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987: 273-85
- 59 Fairbanks, V F , Klee, G G : Biochemical aspects of hematology Tietz N W: (ED), *Textbook of Clinical Chemistry* W B Saunders Company, Philadelphia, 1986
- 60 Halliwell B, Chirico S Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance *Am J Clin Nutr* 1993; 57: 715-25
- 61 Gutteridge JMC Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage *Clinical Chemistry* 1995; 41 (12): 1819-1828
- 62 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
- 63 Halliwell B, Gutteridge JMC Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy *Lancet* 1984; i1396-i1398
- 64 Nair V, Cooper CS, Vietti DE, Turner GA The chemistry of lipid peroxidation metabolites: crosslinking reactions of malondialdehyde *Lipids* 1986; 21: 6-9
- 65 Brooks BR, Klameth OL Interaction of DNA with bifunctional aldehydes *Eur J Biochem* 1968; 5: 178-182
- 66 Summerfield FW, Tappel AL Determination of malondialdehyde-DNA crosslinks by fluorescence and incorporation of tritium *Anal Biochem* 1981; 111: 77-82
- 67 Ohya T Reactivity of alkanals towards malondialdehyde (MDA) and the effect of alkanals on MDA determination with a thiobarbituric acid test *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 1078-1092
- 68 Esterbauer H: Estimation of peroxidative damage *Path Biol* 1996; 44 (1): 25-8
- 69 Garcia CA, Ruiz RS. Ocular Complications of Diabetes *Clinical Symposia* 1992; 44(1): 1-32
- 70 Swan PG Non-retinal ocular changes in Diabetes *Clin Exp Optom* 1999; 82(2-3): 43-46
- 71 Bron AJ, Brown NAP, Harding JJ, Ganea E The lens and cataract in Diabetes *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 37-67
- 72 Schneck ME, Fortune B, Switkes E, Crognale M, Adams AJ. Acute effects of blood glucose on chromatic visually evoked potentials in persons with diabetes and in normal persons *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 800-810

- 73 Yamamoto S, Kamiyama M, Nitta K, Yamada T, Hayasaka S Selective reduction of the S-cone electroretinogram in diabetes *Brit J Ophthalmol* 1996; 80: 973-975
- 74 Yamamoto S, Takeuchi S, Kamiyama M The short wavelength-sensitive cone electroretinogram in diabetes: relationship to systemic factors *Doc Ophthalmol* 1997-98; 94: 193-200
- 75 Tregear SJ, Knowles PJ, Ripley LG, Casswell AG Chromatic contrast threshold impairment in diabetes *Eye* 1997; 11: 537-546.
- 76 Sanchez Thorin JC The cornea in Diabetes mellitus *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 19-36
- 77 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
- 78 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
- 79 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
- 80 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
- 81 Ruben ST Corneal sensation in insulin dependent and non-insulin dependent diabetics with proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 1994; 72: 576-580.
- 82 Saini JS, Mittal S, Anand M. Cornea stres test-evaluation of corneal endothelial function in vivo by contact lens induced stress. *Indian J Ophthalmol* 1997; 45: 19-24
- 83 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
- 84 Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR Open-angle glaucoma and diabetes: the Blue Mountains eye study, Australia. *Ophthalmology* 1997; 104: 712-718
- 85 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
- 86 Schertzer RM, Wang D, Bartholomew LR. Diabetes mellitus and glaucoma *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 69-87
- 87 Mitchell P, Smith W, Chey T, Healey PR Open-angle glaucoma and diabetes *Ophthalmology* 1997; 104: 712-718
- 38 Georgopoulos G, Andreanos D, Liokis N, Papakonstantinou D, Vergados J, Theodossiadis G Risk factors in ocular hypertension *Eur J Ophthalmol* 1997; 7: 357-363.
- 39 Pardo G Neuroophthalmological manifestations of diabetes mellitus *Int Ophthalmol Clin* 1998; 38: 213-226
- 0 Hovelson SA, Renta VL. Diabetes Mellitus and cranial neuropathies: a case report. *Optom Vis Sci (suppl)* 1998; 75: 151

- 91 Kritzinger EE, Beaumont HM A Colour Atlas of Optic Disc Abnormalities London: Wolfe Medical Publications, 1987: 63-64
- 92 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
- 93 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
- 94 Struck HG, Hammer U, Seydewitz V [Effect of diabetes mellitus on anterior central lens epithelium in cataract patients] *Ophthalmologe* 1997; 94: 327-331
- 95 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
- 96 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.
- 97 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
- 98 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
- 99 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
- 100 Ozmen D, Mutaf I, Ozmen B, Montes J, Bayindir O Lens lipid peroxides and glutathione concentrations in diabetic cataract *Ann Clin Biochem* 1997; 34: 190-192
- 101 Cekic O, Bardak Y Lenticular calcium, magnesium, and iron levels in diabetic rats and verapamil effect *Ophthalmic Res* 1998; 30: 107-112
- 102 Kanski JJ *Clinical Ophthalmology*. 4th edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2000: 465-479
- 103 Müftüoğlu G Retinanın vasküler hastalıkları. Aydı P , Akova Y (ed): *Temel Göz Hastalıkları Güneş Kitapevi*, Ankara, 2001: 297-300
- 104 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.
- 105 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

- 106 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
- 107 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.
- 108 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
- 109 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
- 110 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.
- 111 Yu PH Deamination of methylamine and angiopathy, toxicity of formaldehyde, oxidative stress and relevance to protein glycooxidation in diabetes *J Neural Transm (suppl)* 1998; 52: 201-216
- 112 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
- 113 Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, Duh E, Ishii H, Takagi C, Mori F, Ciulla TA, Ways 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
- 114 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
- 115 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
- 116 Hotta N, Nakamura J, Sakakibara Hamada Y, Hara T, Mori K, Nakashima E, Sasaki H, Kasama N, Inukai S, Koh N Electoretinogram in sucrose-fed diabetic rats treated with an aldose reductase inhibitor or an anticoagulant *Amer J Physiol* 1997; 273: E965-971
- 117 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
- 118 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
- 119 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

120. 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
121. Sorokin EL, Smoliakova GP [Structural and functional disorders of transcapillary metabolism of retina in patients with diabetic retinopathy] *Vestn Oftalmol* 1997; 113: 16-19
122. 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
123. 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
124. 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.
125. Fang C, Jiang Z, Tomlinson DR. Expression of constitutive cyclo-oxygenase (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.
126. Linsenmeier RA, Braun RD, McRipley MA, Padnick LB, Ahmed J, Hatchell DL, McLeod DS, Luty GA. Retinal hypoxia in long-term diabetic cats *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 1647-1657
127. 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
128. 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.
129. 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
130. 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
131. 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.
132. Yargicoglu P, Agar A, Edremittioğlu M, Kara C. The effects of cadmium and experimental diabetes on VEP spectral data and lipid peroxidation *Int J Neurosci* 1998; 93: 63-74
133. Apaydın C. Anatomî İçinde: Aydın P, Akova YA (ed): *Temel Göz Hastalıkları* Güneş Kitapevi, Ankara, 2001: S 18

- 134 Riordan-Eva P, Tabbara KF Anatomy and Embryology of the Eye. In: Vaughan DG, Asbury T, Riordan_Eva P (eds): General Ophthalmology Appleton and Lange, Lebanon, 1992: pp 15
- 135 Deguine Delay V, Menasche M, Schaefferbeke M, Schaefferbeke J, Pouliquen Y, Robert L [Epigenetic mechanisms of aging: relations between Maillard reactions and radical generation] CR Seances Soc Biol Fil 1997; 191: 247-252.
- 136 Deguine V, Menasche M, Ferrari P, Fraisse L, Pouliquen Y, Robert L. Free radical depolymerization of hyaluronan by Maillard reaction products: role in liquefaction of aging vitreous Int J Biol Macromol 1998; 22: 17-22
- 137 Reed LJ, DeBusk BG, Gunsalus IC, Hornberger CS Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase Science 1951; 114: 93-94.
- 138 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
- 139 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
- 140 Rosenberg HR, Culik R Effect of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies Arch Biochem Biophys 1959; 80: 86-93
- 141 Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L Thioctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species Free Rad Res Comms 1991; 15: 255-263
- 142 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
- 143 Stary FE, Jindal SJ, Murray RW Oxidation of α -lipoic acid 1975; 40: 58-62
- 144 Bacuerle PA The inducible transcription activator NF-KB regulation by distinct protein subunits Biochim Biophys Acta 1991; 1072: 63-80
- 145 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
- 146 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
- 147 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
- 148 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
- 149 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

150. 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
151. Sandhya P, Mohandass S, Varalakshmi P. Role of DL alpha-lipoic acid in gentamicin induced nephrotoxicity *Mol Cell Biochem* 1995; 145: 11-17
152. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randell RJ Protein measurement with folin-phenol reagent *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
153. 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
154. 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
155. 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
156. 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
157. Kowluru RA, Tang J, Kern TS Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia VII Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy *Diabetes* 2001; 50: 1938-1942
158. Augustin 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; 12(2): 94-101
159. Taguchi H, Ogura Y, Takanashi T, Hashizoe M, Honda Y In vivo quantitation of peroxides in the vitreous humor by fluorophotometry *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37(7): 1444-1450.
160. Lee ATW, Chung SSM Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract *FASEB J* 1999; 13: 23-30.
161. 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
162. Verdejo C, Marco P, Renau-Piqueras J, Pinazo-Duran MD. Lipid peroxidation in proliferative vitreoretinopathies *Eye* 1999; 13: 183-188.
163. Liles MR, Newsome DA, Oliver PD Antioxidant enzymes in the aging human retinal pigment epithelium. *Arch Ophthalmol* 1991; 109: 1285-1288
164. Gorevic PD, Rodrigues MM, Sepencu WH, Munoz PC, Allenm Jr AW, Verne AZ Prealbumin, major constituent of vitreous amyloid *Ophthalmology* 1987; 94: 792-798
165. Reddy VN Dynamics of transport system in the eye *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1979; 18: 1000-1018

- 166 Tanaka Y Peroxidative reactions in the vitreous as related to diabetic retinopathy. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi* 1998; 102(9): 576-582
- 167 Kernell A, Ludh BL, Marklund SL, Skoog KO, Bjorksten B Superoxide dismutase in the anterior chamber and the vitreous of diabetic patients *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33(11): 3131-5
- 168 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
- 169 Micelli-Ferrari T, Vendemiale G, Grattagliano J, Boscia F, Arnese L, Altomare E, Cardia L Role of lipid peroxidation in the pathogenesis of myopic and senile cataract *Br J Ophthalmol* 1996; 80: 840-843
- 170 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
- 171 Boker T, Augustin AJ, Breipohl W, Spitznas M, Lutz J. Increased lipid peroxide level and myeloperoxidase activity in the vitreous of patients suffering from proliferative vitreoretinopathy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1994 ; 232(11): 652-656
- 172 Agaeva RB, Dzhaferov AI Features of lipid peroxidation in the vitreous body and retina during intravitreal hemorrhaging in dithiosone-induced diabetes *Biull Eksp Biol Med* 1991; 112(10): 376-378
- 173 Rosenberg R, Culik R, Effect of α -lipoic acid on vitamin C and E defeciencies *Arch Biochem Biophys* 1959; 80: 86-93
- 174 Carreau JP. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids *Meth Enzymol* 1979; 62: 152-158
- 175 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
- 176 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
- 177 Haugaard N, Haugaard ES Stimulation of glucose utilization by thioctic acid in rat diaphragm incubated in vitro *Biochim Biophys Acta* 1970; 222: 583-586
- 178 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
- 179 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
- 180 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

- 181 Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Clancy DE, Simon I, Schiemann AL, Ulrich H, Jung I, Dietze GJ, Augustin HJ. Thioctic acid enhances glucose-disposal in patient with Type 2 diabetes. *Horm Metab* 1994.
- 182 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
- 183 Packer L. Antioxidant properties of lipoic acid and its therapeutic effects in prevention of diabetes complications and cataract. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 738: 257-264
- 184 Borenshtein D, Ofri R, Werman M, Stark A, Tritschler HJ, Moeller W, Madar Z. Cataract development in diabetic sand rats treated with alpha-lipoic acid and its gamma-linoleic acid conjugate. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17(1): 44-50.
- 185 Maitra I, Serbinova E, Tritschler HJ, Packer L. Stereospecific effects of R-lipoic acid on buthionine sulfoximine-induced cataract formation in newborn rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 221(2): 422-9.
- 186 Filina AA, Davydova NG, Endrikhovskii SN, Shamshinova AM. Lipoic acid as a means of metabolic therapy of open-angle glaucoma. *Vestn Oftalmol* 1995; 111(4): 6-8
- 187 Gal EM. Reversal of selective toxicity of α -lipoic acid in thiamine-deficient rats. *Nature* 1965; 207: 535
- 188 Kocak G, Aktan F, Canbolat O, Ozogul C, Elbeg S, Yildizoglu-Ari N, Karasu C. Alpha-lipoic acid treatment ameliorates metabolic parameters, blood pressure, vascular reactivity and morphology of vessels already damaged by streptozotocin-diabetes. *Diabetes Nutr Metab* 2000; 13(6): 308-18
- 189 Biessels GJ, Smale S, Duis SE, Kamal A, Gispen WH. The effect of gamma-linolenic acid-alpha-lipoic acid on functional deficits in the peripheral and central nervous system of streptozotocin-diabetic rats. *J Neurol Sci* 2001; 182(2): 99-106
- 190 Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacol Toxicol* 2000; 86(5): 234-41.
- 191 Rybak LP, Husain K, Whitworth C, Somani SM. Dose dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced ototoxicity in rats: antioxidant defense system. *Toxicol Sci* 1999; 47(2): 195-202
- 192 Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18(8): 1160-7.