

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
NÖROLOJİ ANABİLİM DALI**

**PREGABALİNİN DİYABETİK RATLARDA BEYİN DOKUSU VE
SİYATİK SİNİR ÜZERİNE KORUYUCU
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Metin BALDUZ**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR**

ELAZIĞ – 2014

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Bülent MÜNGEN

Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR

Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, Nöroloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent MÜNGEN'e, tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle bana her zaman yardımcı olan ve asistanlık eğitimime büyük katkı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR'e, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Nöroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. M. Said BERİLGİN, Prof. Dr. Serpil BULUT ve Yrd. Doç. Dr. Murat GÖNEN'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, tezimin istatistik çalışması aşamasındaki katkılarından dolayı Uzm. Dr. Selçuk İLHAN'a, tezimin biyokimyasal parametrelerinin saptanmasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mehtap ÖZÇELİK'e, tezimin yazım aşamasındaki katkılarından dolayı değerli arkadaşım Uzm. Dr. Hasan Hüseyin ÖZDEMİR ve Dr. İrem TAŞCI'ya, Nöroloji Anabilim dalında birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doğduğum günden beri sevgi, şefkat ve dualarıyla her zaman yanımda olan anneme ve babama, beni kendilerinden çok düşünen kardeşlerime sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Onlarla nice güzelliklere...

ÖZET

Diabetes mellitus, toplumun büyük bölümünü etkileyen ve kandaki glukoz miktarının kontrol edilememesinden kaynaklanan metabolik bir hastalıktır. Pregabalinin (PGB) nöropatik ağrı, jeneralize anksiyete bozukluğu ve epilepsi tedavisinde etkinliği gösterilmiştir.

Bu çalışmada, streptozosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde PGB'in ratlarda beyin ve siyatik sinir dokularında nöroprotektif etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada, 28 adet 8 haftalık Wistar Albino türü erkek ratlar kullanıldı. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Diyabet (DM) ve diyabet+pregabalin (DM+PGB) grubuna 180 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözülürölerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Diyabet oluştuktan sonra DM grubuna 8 hafta boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. PGB ve DM+PGB grubuna 8 hafta süreyle PGB (50 mg/gün) intraperitoneal yolla verildi. Deney sonunda ratlar dekapite edilip beyin ve siyatik sinir dokuları çıkarıldı. Parafin bloklardan alınan kesitlere histolojik, immünohistokimyasal ve TUNEL boyama yapıldı.

Diyabet (DM) grubu Malonildialdehit (MDA) değerleri kontrol grubuna göre belirgin yüksek saptandı. Glutasyon peroksidaz (GPx) ve süperoksid dismutaz (SOD) aktivitesinde ise kontrol grubuna göre azalma saptandı. DM+PGB grubunda MDA değerleri DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük saptanırken, SOD aktivitesi yüksek saptandı. PGB grubu ile kontrol grubu arasında yapılan biyokimyasal analizlerin tümünde anlamlı bir fark oluşmadı. Bax, kaspaz-3 ve TUNEL yöntemi ile yapılan immünohistokimyasal incelemelerde beyin dokusunda DM+PGB grubunda apoptosis oranı, DM grubuna göre daha düşük saptandı. Siyatik sinir histolojik incelemelerinde DM+PGB grubunda miyelin hasarı DM grubuna göre daha düşük oranda gözlendi.

Bu çalışmada PGB'in DM'un yol açtığı beyin hasarını azalttığı gösterilmiştir. PGB DM ilişkili beyin hasarı riskini azaltmada etkinlik gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Diabetes mellitus, pregabalin, beyin, apoptozis, oksidatif stres

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF PREGABALIN ON DIABETIC RATS SCIATIC NERVE AND BRAIN TISSUE

Diabetes mellitus is a metabolic disorder based on uncontrolled blood glucose concentration that affects majority of human population. Pregabalin (PGB) has demonstrated efficacy for epilepsy, generalized anxiety disorder and in several neuropathic pain.

In this study, the protective effects of PGB are investigated in rat brain and sciatic tissue with streptozotocin (STZ) - induced experimental diabetes.

Twenty eight Wistar Albino male rats (aged 8 week) were used in this study. Rats were randomly assigned to four groups each consisting of seven animals. Rats in group Diabetic (DM) and group diabetic+pregabalin (DM+PGB) were injected with 180 mg/kg STZ solved in 0,1 M phosphate-citrate buffer (pH:4,5) intraperitoneally. After confirmed of experimental diabetes mellitus, no application was performed to group DM for 8 weeks. Rats in Group pregabalin (PGB) and group DM+PGB were administered with 50 mg/day PGB intraperitoneally for 8 weeks. At the end of experimental study rats were decapitated, brain and sciatic tissues were taken. Parafin sections were stained by histological, immunohistochemically and TUNEL protocols.

In group DM, Malonildialdehit (MDA) concentrations were significantly higher than control; however glutation peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activities were lower than control. MDA concentrations were significantly lower in group DM+PGB than group DM, whereas SOD activity was higher. There was no different significantly between group PGB and control in whole biochemical examinations. In immunohistochemical examinations (bax, caspase-3 and TUNEL) of brain tissue, apoptotosis rate in DM + PGB was lower than group DM. Histological examination of sciatic nerve, myelin damage in DM + PGB group was significantly more lower than group DM.

This study suggests that; PGB may decrease brain damage that caused by DM. PGB may be effective to reduce the risk for brain damage associated with DM.

Key Words: Diabetes mellitus, pregabalin, brain, apoptosis, oxidative stres

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO LİSTESİ	viii
ŞEKİL LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	1
1.1.3. Tanı	2
1.1.4. Hastalığın semptomları	3
1.1.5. Diabetes Mellitus Sınıflaması	3
1.1.5.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	3
1.1.5.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi	3
1.1.5.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	4
1.1.5.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi	4
1.1.6. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	5
1.1.6.1. Diabetes Mellitusun Kronik Komplikasyonlarının mekanizması	6
1.1.6.2. Diabetes Mellitus ve Serebrovasküler Komplikasyonlar	7
1.1.6.3. Diyabetik Nöropati	8
1.1.6.3.1. Diyabetik Nöropati Epidemiyolojisi	9
1.1.6.3.2. Diyabetik Nöropati Semptomları	9
1.1.6.3.3. Diyabetik Nöropati Patogenezi	10
1.1.7. Siyatik Sinir	13
1.1.7.1. Mikrostrüktürel Anatomi	13
1.2. Oksidatif Stres	13
1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	15
1.2.2. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller	20
1.2.3. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar	21
1.2.4. Anti-Oksidanlar	21
1.3. Apoptozis	23
1.3.1. Apoptozisde görev alan araçılar	28
1.3.2. Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar	30
1.3.3. Apoptozis ve Oksidatif Stres	31

1.3.4. Apoptozis Morfolojisi	32
1.3.5. Apoptozis ve Nekrozis farkı	33
1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	34
1.4. Pregabalin	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1. Deney Hayvanları	42
2.2. Diyabet İndüksiyonu	43
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	43
2.4. Örneklerin Alınması	44
2.5. Biyokimyasal Çalışma	44
2.5.1. Kan glukoz düzeyleri	44
2.5.2. Dokuların Hazırlanması	44
2.5.3. Lipid Peroksidasyon Tayini	44
2.5.4. Superoksid Dismutaz Aktivitesinin Tayini	44
2.5.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini	45
2.5.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi	45
2.5.7. Redükte Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi	45
2.5.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi	45
2.6. Histolojik Çalışma	45
2.6.1. İmmünohistokimyasal Çalışma	46
2.6.2. Tunel Metodu	48
2.6.3. Weil Metodu	50
2.7. İstatistiksel Analiz	50
3. BULGULAR	51
3.1. Klinik Bulgular	51
3.2. Biyokimyasal Bulgular	51
3.2.1. Kan glukoz düzeyleri	51
3.2.2. Oksidan Ve Antioksidan Parametreler	52
3.3. Histolojik Bulgular	54
3.3.1. Bax İmmünreaktivitesi	54
3.3.2. Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi	56
3.3.3. TUNEL Boyama	59
3.3.4. Siyatik Sinir İncelemesi	62
4. TARTIŞMA	65
5. KAYNAKLAR	73
6. ÖZGEÇMİŞ	96

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri	2
Tablo 2.	DM tanısı: Açlık Plazma Glukozu ve OGTT Yorumu	3
Tablo 3.	Diyabetes Mellitus Komplikasyonları	5
Tablo 4.	Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar	30
Tablo 5.	Apoptozis ve Nekrozis Farkı	34
Tablo 6.	Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	35
Tablo 7.	Deney Hayvanlarına Verilen Rat Yeminin Terkibi	42
Tablo 8.	Histolojik Takip Serileri	46
Tablo 9.	İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	47
Tablo 10.	İmmünohistokimyasal Boyanma Yaygınlığının Derecesi	48
Tablo 11.	TUNEL Boyama Prosedürü	49
Tablo 12.	TUNEL Boyama Yaygınlığının Derecesi	50
Tablo 13.	Ratların Deney Süresince Ağırlık Değişimleri	51
Tablo 14.	Ratların Deney Süresince Kan Glukoz Değişimleri	52
Tablo 15.	Biyokimyasal Parametreler	52

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi	10
Şekil 2. Diyabetik Nöropati Patogenezinde Miyoinositol Yolu	11
Şekil 3. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Detoksifikasyonu Yolları	15
Şekil 4. Diyabetin Mikrovasküler Komplikasyonlarının Gelişiminde PKC'nin Rolü	19
Şekil 5. Polyol Yolunun Şeması	19
Şekil 6. Hücre İçi Aşırı Glukoz Artışının Sonuçları	20
Şekil 7. Antioksidan Savunma Sistemleri	22
Şekil 8. Antioksidan Enzim Olan SOD ve GPx'in Etki Mekanizmaları	22
Şekil 9. Fas ve TNF Ölüm Reseptör ve Aktivatörleri	25
Şekil 10. İntrensek Apoptotik Sinyal Yolu	26
Şekil 11. Apoptozis Yolakları	28
Şekil 12. GABA ve PGB'in Moleküler Yapısı	39
Şekil 13. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında bax immünreaktivitesi	54
Şekil 14. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında bax immünreaktivitesi	55
Şekil 15. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında bax immünreaktivitesi	55
Şekil 16. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında bax immünreaktivitesi	56
Şekil 17. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz-3 immünreaktivitesi	57
Şekil 18. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi	57
Şekil 19. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi	58
Şekil 20. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi	58
Şekil 21. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler	59
Şekil 22. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler	60
Şekil 23. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler	60
Şekil 24. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler	61
Şekil 25. TUNEL negatif kontrol	61
Şekil 26. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu	62
Şekil 27. Siyatik sinir kontrol grubu	62
Şekil 28. Siyatik sinir DM grubu	63
Şekil 29. Siyatik sinir DM+PGB grubu	63
Şekil 30. Siyatik sinir PGB grubu	64

KISALTMALAR LİSTESİ

AIF	: Apoptozis-indükleyici faktör
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
ADA	:Amerikan Diyabet Birliği
AGEs	: İleri glikasyon son ürünleri
ATP	: Adenozin trifosfat
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotropik faktör
CAD	: Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz
DAG	: Diaçilgliserol
DCCT	: Diyabet kontrol ve komplikasyonları çalışması
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FasL	: Fas Ligant
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi
GABA	: Gama-aminobütirik asit
GAD	: Glutamik asit dekarboksilaz
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside Glutasyon
GST	: Glutasyon S-Transferaz
HbA1c	: Hemoglobin A1c
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IA 2	: Tirozin fosfataz
ICA	: Adacık hücre antijeni
ICE	: İnterlökin-1β dönüştürücü enzim
ICAD	: Kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü
IDDM	: İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus
IFG	: Bozulmuş açlık glukozu
IGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
KAT	: Katalaz
MDA	: Malonildialdehit

NADH / NAD⁺ adenin dinükleotid	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid: nikotinamid
NADPH	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NGF	: Nerve Growth faktör
NIDDM	: İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus
NMDA	: N-Metil D-Aspartat
NO	: Nitrik Oksid
NK	: Natural Killer
NT-3	: Nörotropin 3
O₂⁻	: Süperoksid
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
OH⁻	: Hidroksil radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
ONOOH	: Peroksinitröz Asit
PCD	: Programlanmış hücre ölümü
PGB	: Pregabalin
PKC	: Protein kinaz C
RNT	: Reaktif Nitrojen Türleri
ROS	: Reaktif oksijen radikalleri
SC	: Schwann hücresi
SOD	: Süperoksid dismutaz
SSS	: Santral Sinir Sistemi
STZ	: Streptozosin
TGF-β	: Transforming growth faktör β
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TNFR	: Tümör nekrozis faktör reseptörü
TURDEP	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
UKPDS	: United Kingdom Prospective Diabetes Study
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VKKK	: Voltaj duyarlı kalsiyum kanalları
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), insülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkileyen bir hastalıktır. (1, 2).

Tip 2 diyabet patogeneğinde temel mekanizmalar arasında pulsatil insülin sekresyonunun bozulması, β - hücre kütleğinde azalmaya bağlı olarak gelişen insülin eksikliği, glukoz toksisitesi, insülin transkripsiyonunu azalması, uzun süre yüksek seyreden serbest yağ asitlerinin oluşturduğu lipotoksosite ve periferik dokularda oluşan reseptör defektleri ve insülin direnci yer almaktadır (3).

Diabetes mellitusun sık görülmesi; hastalığın kendisinin ve sebep olduğu komplikasyonların tedavisinin kesin yapılamaması ve tedavi maliyetlerinin yüksekliği DM'yi araştırmacılar için cazip bir konu haline getirmiştir.

Pregabalin (PGB), [(S)-3-izobutil GABA], (S)-3-(aminometil)-5-metilheksanoik asit yapısında ve gama-aminobütirik asid'in (GABA) üçüncü karbon pozisyonunda alkil türevi olup epilepsi, nöropatik ağrı ve jeneralize anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan yakın zamanda geliştirilmiş bir moleküldür (4).

Biz bu çalışmada PGB'in DM'un beyin ve siyatik sinir dokularındaki oksidatif hasara ve apoptozise karşı koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık.

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Tanım

Diabetes mellitus insulinin tamamen veya kısmi eksikliğine bağlı olarak gelişen ve yüksek kan şekeri ile karakterize bir hastalıktır (1, 2).

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından diyabet tanı kriterleri 2013 yılında tekrar tanımlanmıştır (3).

Diabetes mellitus tedavisinde insülinin kullanılmaya başlanması ile hiperglisemi ve buna bağlı oluşan metabolik ve vasküler komplikasyonlar azalmış ve hastaların yaşam süreleri uzamıştır.

1.1.2. Epidemiyoloji

Ülkemizde yapılan en geniş çalışma Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP)'dir. Bu çalışmada DM prevalansı % 7,2 ve glukoz tolerans

bozukluğu (IGT) prevalansı % 6,7 olarak saptanmıştır. Kadınlarda DM, IGT ve obezite (özellikle kırsal kesimde) daha yüksek bulunmuştur (5).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan son bir çalışmada; her iki tip diyabetinde yaygınlığının 2030 yılında 366 milyona çıkarak, 2002 yılındaki 170 milyon değerini ikiye katlayacağı tahmin edilmektedir (6).

Amerika'da 20-74 yaş grubunda toplumda diyabet prevalansı % 6,6 bulunmuş ve diyabet olduğu bilinmeyen olgularının oranının % 50 civarında olduğu bildirilmiştir (7).

1.1.3. Tanı

Amerikan Diyabet Birliği tarafından belirlenen diyabet tanı kriterleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri (3)

- Hemoglobin A1C (HbA1C)'nin $\geq$ %6,5 olması
- Açlık plazma glukozunun $\geq$ 126 mg/dL (7.0 mmol/L) olması
Açlık en az 8 saat kalori alımının olmaması olarak tanımlanır.
- Oral glukoz tolerans testi (75 g) (OGTT) sırasında veya rastgele alınan kan örneğinde 2. saat plazma glukozunun $\geq$ 200 mg/dL (11.1 mmol/L) olması
- Yukarıdaki bilgiler gebe olmayan yetişkinler için geçerlidir.

Ayrıca günün herhangi bir saatinde açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın venöz plazmada ölçülen kan şekerinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması ve buna polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi diyabet semptomlarının eşlik etmesi de tanı koymak için yeterlidir.

Tam olmayan bir açlık veya bireyler arası farklılık yanlış tanı ile hastalar için ömür boyu süren önemli sonuçlar doğurabilir. Asemptomatik veya minimal semptom varsa, açlık kan veya plazma glukoz konsantrasyonları tanısal değilse, diyabet tanısının konması veya dışlanması için OGTT yapılması gereklidir (8).

Amerikan Diyabet Birliği kriterlerine göre, açlık plazma glukozu ve OGTT sonuçlarına göre; DM, bozulmuş açlık glukozu (IFG), IGT tanıları konulabilir (Tablo 2). IFG açlık plazma Glukoz düzeyi 100-126 mg/dl arasında olması durumudur ve bu durumda OGTT yapılarak diyabet tanısı konulur. Testin 2. saatinde kan şekerinin

200 mg/dl ve üzerinde olması diyabet tanısı koydurur (Tablo 2). Yine aynı birlik HbA1c'nin %5,7-6,4 arasında olmasını DM gelişimi açısından riskli olarak kabul etmektedir (prediyabet) (9).

Tablo 2. DM tanısı: Açlık Plazma Glukozu ve OGTT Yorumu (9)

	Normal	IGT	IFG	DM
Açlık	<100	-	100-125	>126
120. dk	<140	140-199	-	>200

1.1.4. Hastalığın Semptomları

Diyabetin başlıca semptomları ağız kuruluğu, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifajidir. Çoğunlukla semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Stupor, koma, ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi semptomlar ise genelde tedavi edilmediğinde ortaya çıkan ağır semptomlar arasında gösterilir (10).

1.1.5. Diabetes Mellitus Sınıflaması

1. Tip 1 (IDDM= İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus)
2. Tip 2 (NIDDM= İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus)
3. Gestasyonel DM
4. Sekonder DM (diğer hastalıklara sekonder gelişen)
5. Konjenital insülin rezistansına bağlı DM
6. Ailevi otoimmün DM

1.1.5.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Tip 1 diyabet çocukluk yaş grubunda sık görülen, T-hücrelerinin aracılık ettiği, insülin üretiminde görev alan pankreasın beta hücrelerinin süregelen otoimmün veya otoimmün dışı nedenlerle haraplanması sonucu gelişen, insülojeni ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (11, 12). Her hangi bir yaş grubunda görülebildiği gibi en sık 7–15 yaşları arasında görülmektedir (11).

1.1.5.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi

a) Genetik Faktörler: Tip 1 DM gelişiminde multifaktoriyal mekanizmaların rol aldığı öne sürülmüştür. Genetik faktörlerin önemli yer tuttuğu bildirilmesine karşın, herhangi bir mendelyan kalıtsal faktörün tek başına rol oynamadığı

belirlenmektedir (13, 14). Tip 1 diyabetli vakaların % 90-95'i DR3 ve/veya DR4 Class II HLA molekülü ile ekspres ederler (15-19).

b) Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler: Diyet, hijyen ve toksinler bilinen en önemli olası çevresel faktörlerdir. Tip 1 DM gelişimi çevresel faktörlere maruziyet sıklığına ve süresine de bağlıdır (20). Virüslerin etkisi ise yapısında bulunan antijenlerin pankreasın beta hücreleri ile çapraz reaksiyona girerek otoimmüniteyi tetiklediği şeklinde açıklanmaktadır (12, 21).

c) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu: Beta hücrelerinden kaynaklı toksin ya da antijenik peptidler aracılığı ile tetiklenen immün sistem destrüktif insülitise yol açmaktadır (15-19).

d) İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü: İlk olarak makrofajlar, CD8 sitotoksik T lenfositleri daha sonra CD4 lenfositleri TH1, NK (Natural Killer) hücreleri ve B lenfositleri tarafından beta hücre adacıkları hasara uğrar. Hasar, hastalığın başlangıç yaşı küçük olanlarda, puberte döneminde, sekonder enfeksiyonlarda ve kız çocuklarında daha hızlıdır (15-19).

e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikorları: Tip 1 diyabet tanısında sensitivite ve spesifitesi yüksek altın standart olarak alınan otoantikorlar arasında ICA (Adacık hücre antijeni), anti GAD (Glutamik asit dekarboksilaz), IA 2 (Tirozin fosfataz) yer almaktadır (15-19).

1.1.5.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 diyabetliler, tüm diyabetiklerin ortalama % 85'ini oluşturmaktadır (19). Yakınmalar genellikle 45 yaş civarında başlar. Çoğu hastada kronik komplikasyonlar tanı anında mevcuttur (22, 23).

1.1.5.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi

Tip 2 diyabet patogenezinde temel mekanizmalar arasında pulsatil insülin sekresyonunun bozulması, β - hücre kütlelerinde azalmaya bağlı olarak gelişen insülin eksikliği, glukoz toksisitesi, insülin transkripsiyonunu azalması, uzun süre yüksek seyreden serbest yağ asitlerinin oluşturduğu lipotoksisite ve periferik dokularda oluşan reseptör defektleri ve insülin direnci yer almaktadır (3). Ayrıca genetik faktörler, yaş, cinsiyet, artmış vücut yağ kitlesi ve dağılımı, egzersiz, ailesel diyabet

öyküsü, sigara içimi ve ırk da insülin duyarlılığını etkilediği yadsınamaz bir gerçektir (3). Tip 2 diyabetin çoğu hastada genetik faktörler etkisi ile gerçekleştiği belirtilmektedir. Son yıllarda ortaya atılan dördüncü bir görüş, primer defektin hiperinsülineminin tetiklediği insülin direncidir. Hiperinsülineminin nonoksidatif glukoz kullanımını veya glikojen sentezini bozarak Tip 2 diyabette olduğu gibi insülin direncine yol açabileceği ileri sürülmektedir (24, 25).

1.1.6. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabetin komplikasyonları insülin homeostazisi ve enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin bir sonucu olarak meydana gelmektedir. DM'un komplikasyonları Tablo 3' de belirtilmiştir (26-28).

Tablo 3. Diyabetes Mellitus Komplikasyonları (26-28)

Akut komplikasyonlar	Ketoasidoz, şok, serebral ödem, dehidratasyon Hipoglisemi Kilo alımı ve kilo kaybı İnsülin alerjisi Enfeksiyona eğilim
Subakut komplikasyonlar	Lipoatrofi, lipohipertrofi Kısıtlı eklem hareketleri, Büyüme geriliği Osteopeni Koğnitif fonksiyonlarda bozulma Katarakt Hiperlipidemi Emosyonel bozukluk
Kronik komplikasyonlar	
A- Mikrovasküler	Retinopati, nefropati, nöropati
B- Makrovasküler	Koroner arter tutulumu, Miyokard enfarktüsü Serebral vasküler hastalıklar ve inme Alt ekstremita ateroskleroza, ülserasyonu

Diabetes Control an Complications Trial (DCCT) çalışmasının sonuçları ve deneysel çalışmalar, uzun süreli olarak HbA1C düzeylerinin < % 7,1 olması mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nöropati ve nefropati % 50-70 oranında azalttığını göstermiştir. Glukoz kontrolünün iyi sağlanması diyabetin hem makrovasküler hem de mikrovasküler komplikasyonlarında azaltıcı etkisinin olduğunu göstermiştir (29).

1.1.6.1. Diabetes Mellitusun Kronik Komplikasyonlarının mekanizması

Diyabette hipergliseminin kronik komplikasyonlara nasıl yol açabileceğini açıklayan, birbiriyle bağdaşan üç farklı teori ileri sürülmüştür.

Birinci hipotez; artmış intrasellüler glikozun hücrel proteinlerin nonenzimatik glikozilasyon yoluyla ileri glikozilasyon son ürünleri (AGEs) oluşumuna yol açtığı şeklindedir. Nonenzimatik glikozilasyon, glikozun proteinlerin amino grubu ile etkileşmesi sonucu gelişir. AGEs'nin proteinlere (kollajen, ekstrasellüler matriks proteinleri) çapraz bağlandığı, ateroskleroza hızlandığı, glomerüler disfonksiyona katkıda bulunduğu, nitrik oksit sentezini azalttığı, endotel disfonksiyonunu indüklediği ve ekstrasellüler matriks bileşimi ve yapısını değiştirdiği gösterilmiştir. Serum AGEs düzeyleri glisemi düzeyi ile koreledir; AGEs glomerüler filtrasyon hızı düştükçe birikir (30).

Hipotezlerden ikincisi; hipergliseminin glikozun sorbitol yolu aracılığıyla olan metabolizmasını arttırması gözlemine dayalı olarak açıklamaya çalışılmıştır. İntrasellüler glikoz yükseldiği zaman, glikozun bir bölümü aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole dönüştürülür. Yüksek sorbitol konsantrasyonları miyoinsitolde azalma, redoks potansiyelinde değişiklik şeklinde hücrel fizyolojiyi farklı yönlerde etkiler ve hücrel disfonksiyona yol açabilir. Ancak aldoz redüktaz inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda bu tedavi yönteminin retinopati, nöropati veya nefropati üzerinde faydalı etkisi gösterilememiştir (30).

Üçüncü hipotez ise hipergliseminin protein kinaz C'nin (PKC) bazı izoformlarının aktivasyonuna yol açan diaçilgliserol (DAG) oluşumunu arttırdığı ileri sürülmüştür. PKC ise diyabetik komplikasyonlara yol açan çeşitli hücrel olayları etkilemektedir. Örneğin, endotelial hücrelerde ve nöronlarda fibronektin, tip IV kollajen, kontraktıl proteinler ve ekstrasellüler matriks proteinleri genlerinin transkripsiyonunu değiştirdiği in vitro olarak saptanmıştır (30).

Growth faktörler diyabet komplikasyonlarının patofizyolojisinde önemli yer tutmaktadır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) diyabetik proliferatif retinopatide lokal olarak artmıştır ve lazer fotokoagülasyondan sonra azalır. Transforming growth faktör β (TGF- β) diyabetik nefropatide artmıştır ve mezangial hücrelerde, bazal membranda kollajen ve fibronektin sentezini stimüle eder. Platelet derived büyüme faktör, epidermal büyüme faktör, insülin-like büyüme faktör 1,

growth hormon, basic fibroblast growth faktör gibi diğer growth faktörlerin ve hatta insülinin diyabetik komplikasyonlarda rol oynadığı ileri sürülmüştür. Ayrıca oksidatif stres ve serbest radikal oluşumu da komplikasyonların gelişmesine katkıda bulunabilir (30).

Mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların gelişimi ile hipergliseminin derecesi arasında doğrusal bir ilişki yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (31, 32). Kalp hastalıklarındaki makrovasküler komplikasyonların yanı sıra, nöropati, nefropati ve retinopati gibi mikrovasküler komplikasyonlar yaşam kalitelerini olumsuz olarak etkilenir. Tümör nekrozis faktör-a (TNF-a) ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler diyabette artarak insülin hassasiyetinde düşüşe neden olurlar (33).

Serbest radikaller olarak belirtilen süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali (OH^-), nitrik oksit diyabette ortaya çıkan oksidatif stresin temel belirleyicileridir. Ayrıca pek çok çalışma diyabetik komplikasyonlar ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu yüzden lipid peroksidasyonunun kontrolü çok önemlidir (34).

1.1.6.2. Diabetes Mellitus ve Serebrovasküler Komplikasyonlar

Diyabetin santral sinir sistemi (SSS) üzerine olan etkileri son yıllarda ortaya konmaktadır (35). Diyabetin metabolik ve vasküler bozuklukları sonucu beyin yapısal ve fonksiyonel yapısı zarar görmektedir (35, 36). Akut serebral bozukluklara örnek olarak diyabetik hastalarda serebrovasküler olay risk ve tahribatının artması, hiperglisemik ve hipoglisemik ataklar sayılabilir (35, 37). Uzun vadede gelişen komplikasyonlar ise daha sinsi seyirli olup bu bozukluklar nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve koğnitif düzeyde gösterilmiştir (35, 36).

Tip 1 DM'da C peptidin BB/Wor sıçanlarda bozulmuş insülin benzeri büyüme faktörü aktivitesini ve insülin reseptör sentezini kısmen düzelttiği ve hipokampustaki nöronal apoptozisin oluşumunu kısmen önlediği bildirilmiştir. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insülin/C peptid yetersizliğinin Tip 1 DM'da görülen nöronal apoptoziste önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (38, 39).

Diyabetin süresi ile Tip 1 DM'de apoptozis kaynaklı nöronal kayıp arasında korelasyon olduğu bazı çalışmalarda bildirilmiştir (40, 41). Subkortikal alanda ve

beyin kökünde lezyonlar, beyin ve medulla spinaliste nöronal atrofi, aksonal dejenerasyon, glikojen birikimi, ensefalomalazi, demiyelinizasyon ve glia (astrozit) hücrelerinde hasar oluşumu gibi yapısal değişikliklerin diyabette gözlendiği de bir takım çalışmalarda ortaya konulmuştur (40, 42-44).

Hücre bazda ise santral sinir sistemlerine ait hücrelerin çekirdek şekillerinde ve kromatin görünümünde bozulmalar olduğu, mikrotübül sayılarının arttığı, endoplazmik retikulumlarında genişleme, parçalanma ve degranülasyon olduğu bildirilmiştir (39).

Günümüzde serebral komplikasyonlarda birçok mekanizmanın rol aldığı düşünülmektedir. Bunların başlıcaları;

1. Periferik diyabetik nöropati patogeneğinde yer alan faktörler (35, 36).
2. Beyin yaşlanma sürecini hızlandırdığı görüşü: Diyabetteki nöropsikolojik ve yapısal değişiklikler yaşlanmakta olan beyindeki değişiklikleri taklit etmektedir (35, 36, 45).
3. Serebrovasküler olaylar için risk faktörleri olan hipertansiyon ve ateroskleroz rol oynayabilir (35).
4. Hipogliseminin muhtemel rolü (35, 37, 46-49).
5. Serebral insülin düzeylerindeki, insülin reseptörlerindeki ve insülin sinyalizasyonundaki değişikliklerin dahil olduğu nöromodülatuar değişiklikler (50-52).

Diyabetik hastalarda serebral vazoreaktivite bozulmaktadır (36, 47). Serebral vazoreaktivite ve eşlik eden kan akımındaki değişiklikler, hipoglisemi, hipotansiyon, hipoksi ve hiperkapni gibi durumlarda rol oynayan önemli kompensatuar mekanizmalardır. Bu mekanizmaların kaybının beyin üzerinde zararlı etkileri olması muhtemeldir.

1.1.6.3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati; diğer periferik nöropati faktörlerinin olmadığı, DM zemininde gelişen klinik veya subklinik düzeyde ortaya çıkabilen periferik nöropati olarak tanımlanmaktadır (53).

1.1.6.3.1. Diyabetik Nöropati Epidemiyolojisi

Periferik ve otonomik nöropati DM'un en sık görülen komplikasyonlarından (54).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nın yaptığı çalışmalara göre 100 milyon civarındaki diyabetli sayısının önümüzdeki on yılın sonunda 200 milyona ve 21. yüzyılın başlarında da 300 milyona ulaşması beklenmektedir (55). Periferik nöropatinin yıllık insidansı ise, United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) ve DCCT çalışmasında yaklaşık olarak %2 olarak saptanmıştır. Tanı kriterlerinin değişmesi, epidemiyolojik çalışmaların, tedavi alan hastalarda sınırlı kalması ve diyabet hastalarının büyük bir popülasyonunun teşhis edilememesi nedeniyle, kesin ve doğru bir prevalans saptamak mümkün değildir (56-60).

Nöropatinin belirlenmesi ve tedavi süresi hastaların yaşam kalitesini doğrudan etkilemektedir. Nöropatinin prevalansında ve gelişiminde diyabet süresi, HbA1c düzeyi, sigara ve erkek cinsiyeti önemli faktörlerdir (61, 62).

1.1.6.3.2. Diyabetik Nöropati Semptomları

Semptomlar sıklıkla bilateral ve simetriktr. En sık karşılaşılan semptomlar; geceleri alt ekstremitelerde artan parestezi, soğukluk hissi ve ağrıdır. Muayene bulguları arasında başlıca eldiven çorap tarzı duyu kaybı ve buna paralel hiporefleksi veya arefleksi yer almaktadır. Daha ileri dönemde ayak distal kaslarda motor tutulum ve intrinsik kaslarda atrofi saptanabilir. Kalın miyelinli liflerin etkilenmesi; karıncalanma, batma, iğnelenme, parmak uçlarında sıkışma hissi gibi pozitif semptomlar ile uyuşma, hissizlik şeklinde ifade edilen negatif semptomlara yol açar. İnce miyelinli ve miyelinsiz liflerin etkilenmesi durumunda ise ağrı, yanma, soğukluk hissi gibi pozitif semptomlar ile ağrı ve ısı duyusunun değişen derecelerde kaybıyla giden negatif semptomlar görülür. Sıklıkla hem kalın hem de ince liflerin değişen derecelerde etkilenimi sonucu semptomlar birliktelik gösterir. Ancak sadece ince lif tutulumu ile seyreden vakalar da vardır (63).

Üst ekstremitte bulguları polinöropatinin proksimal yayılımı olarak görülebilir ancak çoğunlukla süperimpoze olmuş mononöropati (karpal tünel sendromu, dirsekte ulnar nöropati) olarak karşımıza çıkar (64).

Terzi ve ark. (53) yaptığı bir araştırmada Tip 1 DM'lu ve kesin nöropatisi olanların %44'ünde dizabilite ve Tip 2 DM'u olan ve duyuşal nöropatisi bulunan hastaların %74'ünde aktivitede kısmi kısıtlanma bildirilmiştir.

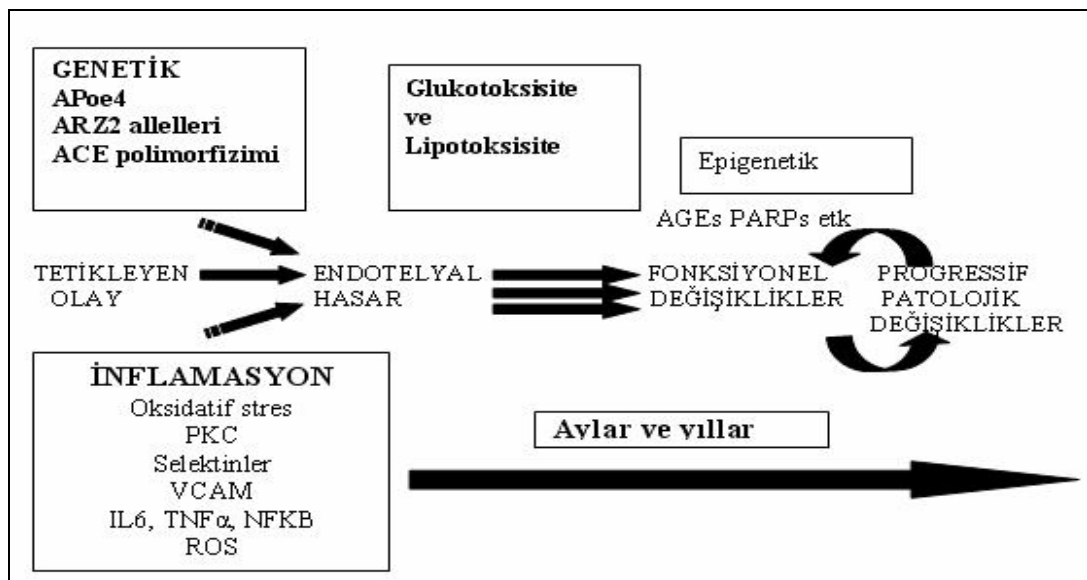
1.1.6.3.3. Diyabetik Nöropati Patogenezi

Streptozosin (STZ) ilişkili diyabette ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin hem periferel hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır (65, 66).

Diyabeti Önleme ve Komplikasyonları Tedavi Araştırma Grubunun 1995 yılındaki bir çalışmada 1441 tip 2 diyabetli hastada yoğun kan şekeri takibi ve insülin tedavisi uygulanmış, 5. yıl sonunda klinik nöropati gelişiminde %64, anormal sinir iletim çalışmalarında %44 ve anormal otonomik fonksiyon testlerinde % 44 azalma tespit edilmiştir (67).

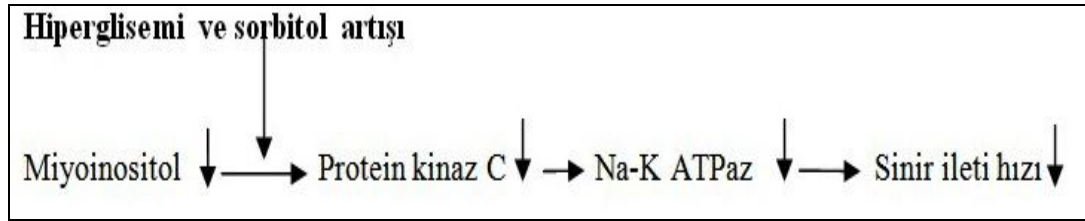
Uzun süre asemptomatik olan olgularda sinir iletim çalışmaları ile polinöropati varlığı tespit edilebilir. Daha çok aksonal dejenerasyon bulguları saptanmasına rağmen demiyelinizasyonla giden ileti anormallikleri de görülür (68).

Diyabetik polinöropatinin patogeneğinde metabolik, vasküler, nörotrofik, genetik ve immünolojik mekanizmaların yer aldığı düşünülmektedir (69). Diyabetik nöropati patogenezi Şekil 1’de şematize edilmiştir (56).



Şekil 1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi (56)

A) Metabolik Mekanizmalar: Hiperglisemi sinir hücresine glukoz girişinin insülin bağımlı olmaması nedeniyle periferik sinirlerde artmış glukoz konsantrasyonlarına yol açar. Artmış glukoz konsantrasyonu ise aldoz redüktazın aktivitesinin artmasına, sorbitol ve fruktozun hücre çerisinde artmasına sebep olmaktadır. Sorbitol direkt hücre dışına atılamayan bir moleküldür. Biriken sorbitol hem hücrenin ozmotik dengesini bozarak hücre ödemine ve sinir hücre fonksiyonlarını bozulmasına, hem de bilinmeyen bir nedenle hücre içinde miyoinositol miktarının azalmasına neden olur (70) (Şekil 2).



Şekil 2. Diyabetik Nöropati Patogenezinde Miyoinositol Yolu (70)

Hücre membran fosfolipidlerinin sentezi için miyoinositol gerekli bir moleküldür. Eksikliği hücre membran yapısında bozulma, Na/K pompa aktivitesinde azalmaya yol açar. Ayrıca hiperglisemi de miyoinositolün hücre içine girişini azaltır. Hayvan deneylerinde belirtilen bulguların tespit edilmesine rağmen insanlarda periferik sinirde sorbitol birikimi ile miyoinositolde azalma gösterilememiş ve diyetle miyoinositol eklenmesi kesin bir yarar sağlamamıştır (71).

Polyol yolunun aşırı çalışması, oksidatif strese de neden olmaktadır. Serbest radikaller endotelyumda biriken nitrik oksit inhibisyonuna ve Schwann hücrelerinin apoptozisine aracılık ederek periferik sinir lifi kaybına neden olur. Oksidatif stres, glukozun aldoz redüktaz ile sorbitol oluşumunu hızlandırıp, süperoksid dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) eksikliğine yol açar. Periferik sinirler için Reaktif Oksijen Radikalleri (ROS) direkt olarak nöronları ve Schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabet ile birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar. Bu yüzden diyabetik ratlarda siyatik sinir lipid peroksidasyonu yükselmiştir ve SOD seviyeleri ve redükte Glutatyon (GSH) formu, GPx ve redüktazda bir değişiklik olmamasına rağmen azalmıştır (72).

Uzun dönem etkilerine bakıldığında diyabet dorsal sinir kökü gangliyonlarında mitokondrileri ve hücre yapıları üzerine demiyelinizasyon ve aksonopati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol açabilir (73).

Reaktif oksijen radikallerini detoksifiye etmede GPx mitokondride katalaz (KAT)'ın olmamasından dolayı daha önemli bir rol üstlenir. Hiperglisemi aldoz redüktaz enzim aktivasyonu aracılığı ile GPx eksikliğine ve sonuç olarak serbest radikal artışına yol açar (74). Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) aldoz redüktaz aktivitesi için gereklidir. Vazodilatasyonda görev yapan Nitrik Oksid (NO) sentezi ve GSH'un azalması oksidatif strese yol açarken, aynı zamanda vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışında da rol oynar (70, 71). Diyabette oksidatif stresin eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açtığı, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma olduğu bilinmektedir (75). Gürbilek ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada diyabet süresinin uzaması ve iyi regüle edilememesi, eritrosit zarı Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olduğu saptanmıştır (76).

B) Vasküler mekanizmalar: Özellikle asimetrik fokal nöropatilerin patogeneğinde önemlidir. Kapiller lümeni etkileyen endotel hücrelerinin şişmesi, damar duvarının kalınlaşması ve kapiller lümenin fibrin veya agregasyona uğramış plateletlerle oklüzyonu sonucu hipoksiye bağlı sinir hücre hasarı, aksonal dejenerasyon gelişir. Serbest radikaller PKC'yi aktive ederek vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların oluşmasında rol alırlar (77, 78).

C) Nörotrofik mekanizmalar: Beyin kaynaklı nörotropik faktör (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) ve neurotrophin 4/5 (NT-4/5) adında nerve growth faktör'ün (NGF) yapısal homologu olan 3 büyüme faktörü bulunmuştur. NGF, NT-3, Insulin-80like growth factor-I (IGF-I) ve Insulin-like growth factor-II (IGF-II) ile yapılan in vitro ve nöropatili hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar bu faktörlerin sinir dejenerasyonunu etkilediğini göstermektedir. Bu etki bahsedilen faktörlerin yapısal olarak insüline benzerliğine bağlanmıştır. Rekombinant human NGF'nin subkutan enjeksiyonu, duyuusal semptomları ve soğuk eşikini değiştirmektedir. Nörotrofik

faktörlerle nöropatilerin önlenmesi tedavisini amaçlayan preklinik araştırmalar olumlu sonuçlar vermekle birlikte, bu güne kadar yapılan klinik çalışmalarda birbiri ile uyumsuz sonuçlar elde edilmiştir (79).

D) İmmün mekanizmalar: Yapılan bir çalışmada diyabetik otonomik ve diyabetik lumbosakral radikülopleksonöropatide immünolojik faktörlerin önemli olduğu ortaya konmuştur (68). Yine çalışmalarda sempatik gangliyon karşı otoantikorlar geliştiği, sural sinir biyopsisinde endonöral veya epinöral lenfositik infiltrasyon gösterilmiştir. Kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati ile diyabetik nöropatinin birlikteliği de immün veya sitotoksik faktörleri düşündürür (80).

1.1.7. Siyatik Sinir

Sakral pleksus 5, 6 ve kısmen 4. lumbal sinirler tarafından oluşturulur (81). Sakral pleksus pelviste orijinlerine göre anterior ve posterior olmak üzere 2 sinire ayrılır. Posterior dalı siyatik sinirdir (n. ischiadicus). Siyatik sinir n. tibialis, n. Peroneus communis adı verilen terminal dallara sahiptir (82).

1.1.7.1. Mikrostrüktürel Anatomi

Bir periferik sinir, boyutuna bağlı olarak bir veya binlerce sinir lifi içerebilmektedir. Periferik sinirin lifleri (akson) endonöryum denilen, Schwann hücresi (SC) ve retiküler kollajen ağlardan oluşan yapı ile sarılıdır. Sinir liflerinin bir araya gelmesi ile fasikül oluşur ve perinöryum ile sarılıdır. Fasiküllerin bir araya gelmesi ile ise periferik sinir oluşur ve epinöryum tarafından kuşatılır (83).

Periferik sinirlerde miyelinli ve miyelinsiz aksonlar bulunmaktadır. Miyelin, periferik sinir sisteminde SC'ler tarafından oluşturulmaktadır. SC'nin akson etrafında sirküler tarzda defalarca dolanması ile meydana gelir. Miyelinli liflerde 1-2 mm aralıklarla Ranvier düğümleri bulunmaktadır. Bu sayede miyelinli lifler çıplak liflere göre yaklaşık 8 kat daha hızlı saltatuvar (sıçrayıcı) iletim yapabilmektedir (84, 85).

1.2. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen radikalleri ve reaktif nitrojen türleri (RNT), normal hücrel metabolizmanın ürünleri olup düşük konsantrasyonlarda hücrenin zararlı etkilere karşı oluşturduğu hücrel cevapta rol almaktadırlar (86). Serbest radikallerin zararlı

etkileri, oksidatif stres ve nitrozatif stres diye adlandırılan biyolojik hasara neden olmaktadır. Bir yandan ROS/RNT'de aşırı üretim, diğer yandan enzimatik ve non-enzimatik antioksidan sistemlerdeki bozukluk buna neden olmaktadır (87).

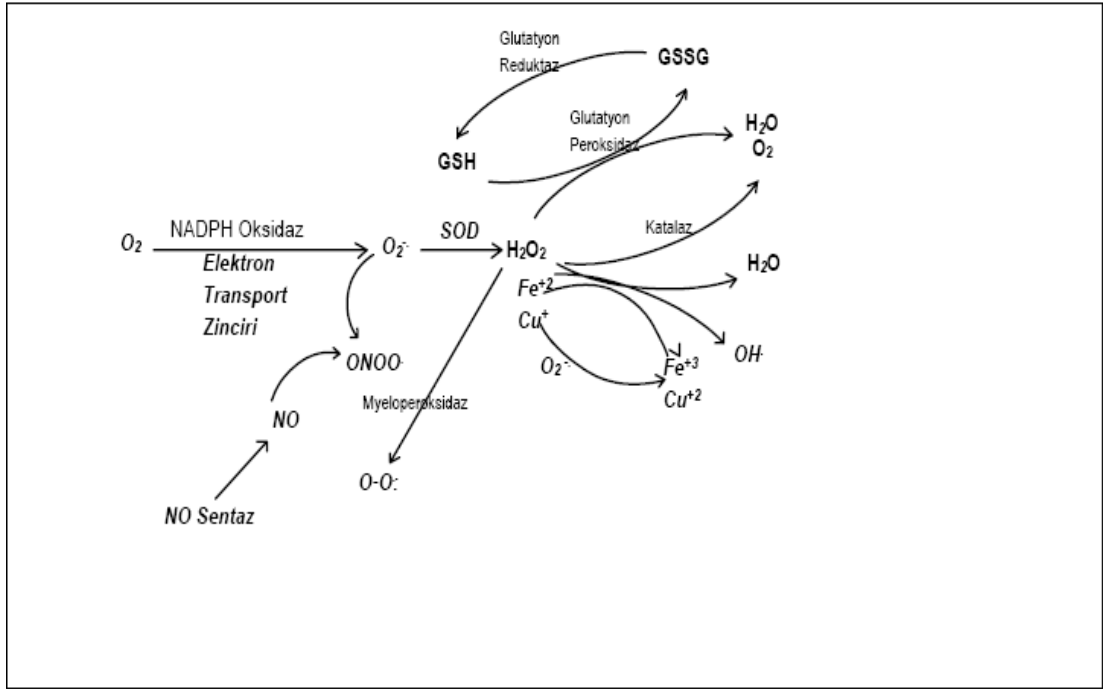
Oksidatif stres, oksijeni kullanan metabolik reaksiyonlardan ve canlı organizmada denge halindeki prooksidan/antioksidan sistemin bozulmasından kaynaklanmaktadır. Bu dengenin bozulması sonucunda lipitler, membranlar, proteinler ve nükleik asitler üzerinden hücresel hasar gerçekleşmektedir (86).

Mitokondriyal elektron transportu, norepinefrin, dopamin gibi bazı nörotransmitterlerin otooksidasyonu, hipoksi ve iskemiye başlatan olaylar, oksidan oluşumunu ve bunu takiben doku hasarını tetiklemektedir. Oksidatif stres temel olarak O_2^- ve nitrik oksit üretimine dayanmaktadır (88). Serbest oksijen radikalleri O_2^- , H_2O_2 ve OH^- 'dir.

O_2^- : Oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur (89) (Şekil 3). O_2^- , H_2O_2 oluşumunda primer radikaldir (90). O_2^- asıl hücresel hasarı H_2O_2 kaynağı ve geçiş metal iyonlarının indirgeyicisi görevini üstlenerek oluşturmaktadır (91). Demir gibi maddelerin varlığında O_2^- ve H_2O_2 daha güçlü reaktiflere çevrilir ve hücre hasarına katkıda bulunurlar (92).

H_2O_2 : O_2^- serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzimdir ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan SOD aracılığı ile H_2O_2 'e indirgenir (89) (Şekil 3). H_2O_2 üretildiği bölgede kalan O_2^- 'nin aksine membranları geçen, sitozole diffüze olan ve uzun ömürlü bir oksidan olarak bilinir. O_2^- ile reaksiyona girerek en reaktif ve zarar verici radikal olan OH^- oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir. H_2O_2 başka bir şekilde de serbest Fe^{+2} ile reaksiyona girerse demir okside olurken OH^- oluşur (93).

OH^- : Bilinen en reaktif radikaldir. H_2O_2 geçiş metallerinin varlığında toksik OH^- radikale dönüşür (93).



Şekil 3. Serbest Radikallerin Oluşumu ve Detoksifikasyonu Yolları (91)

Serbest oksijen radikalleri intrasellüler depolardan Ca^{+2} salınımı ile protein denatürasyonu ve lipid peroksidasyonu sonucu hücre iskeleti ve DNA'da (Deoksiribonükleik asit) hasar yapar (90).

1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Periferal ve merkezi sinir sisteminde diyabet yapısal ve fonksiyonel hastalıklara neden olmaktadır (37). Diyabetik hastaların beyinlerinde elektrofizyolojik ve yapısal anormalliklerin bilişsel bozukluklarla bağlantılı olduğu bilinmektedir (94, 95).

Serbest radikaller sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim ve normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korur (96). ROS düşük konsantrasyonlarda normal hücre fonksiyon için esansiyel olmalarına rağmen, lipid membranların, DNA'nın ve proteinlerin peroksidasyonuna neden olabilir ve hücre homeostazı ve fonksiyonları olumsuz yönde etkileyebilirler. O_2^- , OH^- , H_2O_2 ve Peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi ROS'nin oluşumu, ROS ile mücadele eden KAT, GPx, SOD, Vitamin E ve GSH gibi bileşiklerle sınırlandırılır. Diyabette ortaya çıkan oksidatif stresin bir komplikasyon mu, yoksa diyabetin diğer uzun dönem komplikasyonlarının bir nedeni mi olduğu

konusunda araştırmalar devam etmektedir (97, 98). Birçok hastalığın patogenezinde artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunu rol aldığı son yıllarda yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Ayrıca uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görölen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (99, 100). Diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş GSH mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri ile de ortaya konulmuştur (101). Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulur, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girer Proteazlar aktive olur ve hücre iskeletinde hasar meydana gelir. Kalsiyum endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına da neden olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri; hidrokarbon gazlar ve toksik aldehyitlerdir (102). Aldehyitlerden malonildialdehyit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (102, 103).

Oksijen radikali, NO'i nötrale eder ve ortaya çıkan ONOO⁻ formu endotel tahribine sebep olabilen OH⁻ kaynağıdır. Bu nedenle oksidatif stres, hiperglisemiye akut maruz kaldıktan sonra bile bazı deneysel preparatlarda açıkça görölen vasküler endotele bağlı gevşemeyi azaltır (104).

Sinir hücresinde hücre içi kalsiyum artışının başlıca nedeni sinapslardan uyarıcı aminoasitlerin salınmasıdır (105, 106). Bazı çalışmalarda glutamat reseptörlerinin uyarılmasının nöronal hücre ölümünde anahtar rol oynadığını göstermektedir (107). Glutamat, özđün reseptörleri ile etkileşerek duysal bilgilerin iletilmesi, motor aktivite, spinal reflekslerin düzenlenmesi, hafıza ve öğrenme gibi birçok işlevde önemli rol oynamaktadır (108). Glutamat için dört reseptör bilinmektedir.

1. NMDA (N-metil D-aspartat) reseptörü.
2. AMPA (alfa amino-3.hidroksi-5.metil-4.isoksazol propionik asid).
3. Kainat reseptörleri.
4. Metabotropik reseptörler.

Glutamatın NMDA reseptörlerine bağlanması sonrasında sodyum ve kalsiyum hücre içine, potasyum ise hücre dışına hareket eder. Hücre içi kalsiyum

düzeyinin yükselmesi sonucu, serbest radikal oluşumu ve mitokondriyal hasar meydana gelmektedir (109, 110).

Kontrol edilmeyen hiperglisemili diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati riski daha yüksektir. Bu hastalıkların bazıları genetikdir, diğerleri membranın glikasyonunun yükselmesi, sorbitol akümüasyonu ve hiperglisemi tarafından sebep olunan aldoz redüktazın aktivasyonu ile bağlantılı olabilen bazı proteinlerle ilişkilidir. Protein glikasyonu, lipoproteinlerin oksidasyonu, trombosit kümeleşmesi ve kanın hiperkoagülabilesi gibi risk faktörleri bir ölçüde hipergliseminin direk sonuçlarına ve DM'da vasküler hastalıkların gelişmesine farklı derecelerde katkıda bulunurlar (111).

Diyabette artan ROS üretiminin hiperglisemi dışındaki nedenleri iskemi, artmış mitokondriyal kaçak, katekolamin oksidasyonu ve lökositlerdir (97). Hiperglisemi ROS'nin üretimini birkaç farklı mekanizma ile artırır. Bu mekanizmalar; glukozun otooksidasyonu, protein glikasyonu, PKC aktivasyonu ve polyol yolağıdır (97, 98, 112, 113).

Glukozun otooksidasyonu: Geçiş metallerinin varlığında, glukozun bir enediol radikal anyonuna dönüşümüdür. Bu radikal moleküler oksijeni indirgerken O_2^- , OH^- ve H_2O_2 gibi oksidan araçlar ve α -ketoaldehidlerin üretimine neden olur. Bu moleküller DNA, proteinler ve lipidler gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilirler (97). Ayrıca glukozun otooksidasyonu AGEs oluşumu ile de yakından ilişkilidir (112).

Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu: Protein glikasyonu glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki kovalent bağlanmalar sonucu meydana gelir. Geçiş metallerinin varlığında (demir, bakır vs.) glikasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerinin yokluğunda da meydana gelebileceği gösterilmiştir. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan uzun olduğu durumlarda glikasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'ni oluştururlar. Glikasyona uğramış proteinler gibi, AGEs'de serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Ayrıca ROS'de AGEs'nin oluşumunu hızlandırırlar (114).

Artmış AGEs oluşumunun diyabetik komplikasyonlara yol açan patolojik mekanizmaları şunlardır:

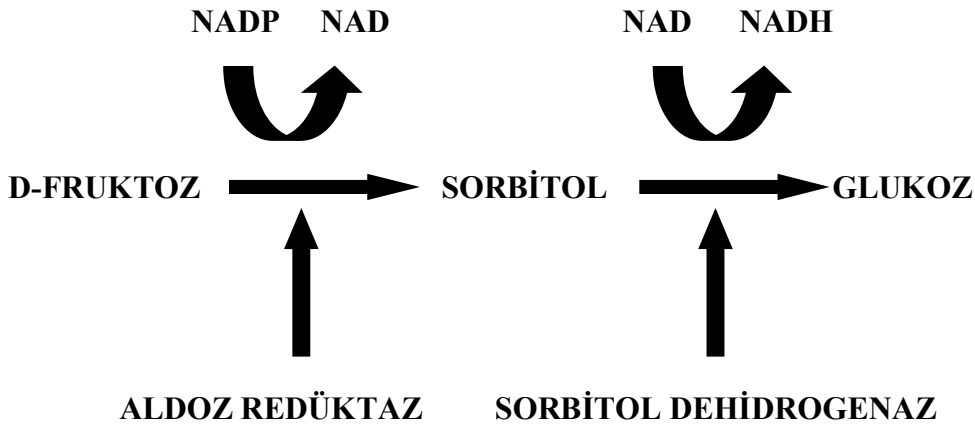
- Hücre dışı matriks bağlantılarını etkileyerek sinyal iletilerini bozarlar,
- Kollajen gibi yapısal proteinlere, geri dönüşümsüz şekilde bağlanarak bazal membran ve matriks bileşenlerini bozarlar,
- Adezyon yapan matriks proteinlerini etkileyerek kapiller geçirgenliği artırır, makrofaj ve mezengiyal hücrelere de bağlanarak bölgeye monositlerin göçüne, matriks artışına ve NO yapımının engellenmesine neden olurlar,
- Kendine özgü reseptörlere (RAGE - receptors for AGE) bağlanır ve NF- κ B'yi aktive ederler. Böylelikle çok sayıda sitokin, kimokin ve vazoaktif hormon üretimini uyarırlar,
- Glukoz, fruktoz ve ara ürünler doğrudan hedef dokudaki protein fonksiyonlarını etkileyebilir (115-117).

PKC aktivasyonu: PKC, 12 izoenzimi içeren ve vücutta yaygın olarak bulunan bir enzim ailesidir. PKC, özellikle hücrel cevapların büyüme faktörlerine, nörotransmitterlere, prostaglandinlere ve bazı ilaçlara iletilmesi gibi birçok hücre fonksiyonları ile ilişkilidir. Diyabetik hayvanlarda retina, glomerül, aort ve kalpte arttığı gözlenmiştir. Radyoaktif glukoz ile yapılan incelemelerde, glikolitik yolun ara ürünlerinin DAG'ün yapısına katıldığı gösterilmiştir. DAG ise PKC'nin en önemli endojen aktivatörüdür. Böylece hiperglisemiyle oluşan bu ara ürünlerdeki artış, DAG oluşumuna ve PKC aktivasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca VEGF gibi vazoaktif maddeler, büyüme faktörleri, dislipidemi, oksidatif stress ve AGEs oluşumu PKC'nin aktivasyonuna neden olmaktadır. PKC kan akımının düzenlenmesi, hücrel farklılaşma, sitokin oluşumu gibi birçok vasküler fonksiyonlarda rol oynar. Bu nedenle PKC aktivasyonunun diyabetik nöropati patogenezinde kritik bir etken olma olasılığı yüksektir (Şekil 4). Artmış PKC aktivitesi sonucunda vasküler alanda permeabilite artışı, iskemi ve bazal membran artışı olur (57, 118-120).



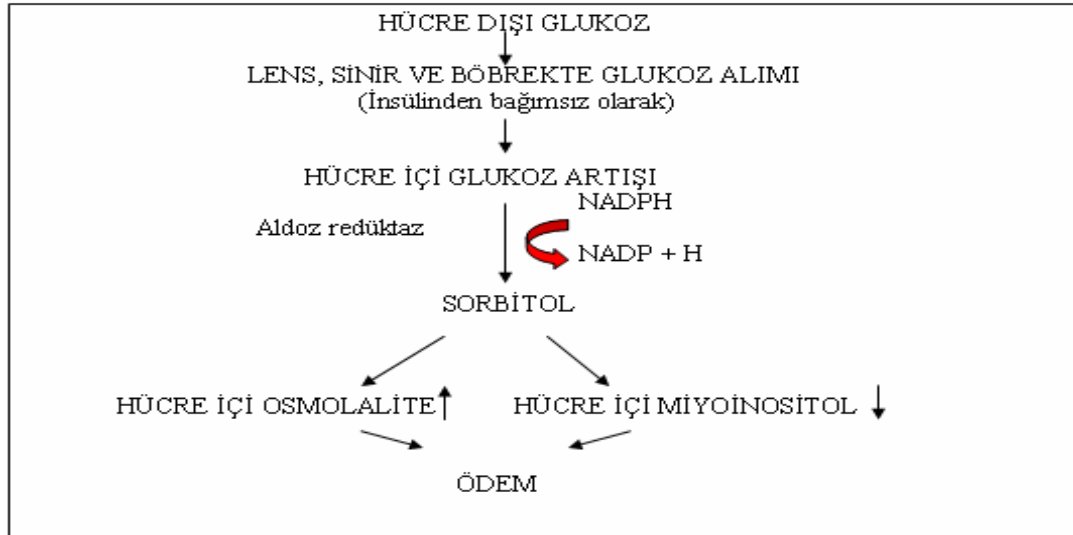
Şekil 4. Diyabetin Mikrovasküler Komplikasyonlarının Gelişiminde PKC'nin Rolü (121)

Polyol yolağı: Glukoz-6-fosfat iki temel yolakla metabolize edilir; glikoliz ve pentoz fosfat yolu. Pentoz fosfat yolu primer NADPH kaynağıdır (97). Glukozun hücre içi konsantrasyonunun anormal olarak arttığı durumlarda glukoz aldoz redüktaz enzimi ile sorbitole indirgenir (Şekil 5). Daha sonra sorbitol dehidrogenazla fruktoza yükseltgenir. Aldoz redüktazın aktivite gösterebilmesi için NADPH'a ihtiyacı vardır. Bu yüzden polyol yolağı aktivitesinin artması intrasellüler NADPH eksikliğiyle sonuçlanır. Glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin de NADPH ihtiyacı vardır. Bu yüzden bu kofaktörün intrasellüler eksikliği glutasyon redüktaz aktivitesini azaltarak, serbest radikal aracılı hasarlara karşı korunmada önemli bir faktör olan intrasellüler GSH içeriğinin azalmasına neden olur (114).



Şekil 5. Polyol Yolunun Şeması (122)

Aldoz redüktaz inhibitörlerinin kullanıldığı bazı çalışmalarda lipid peroksidasyonunun azaldığı (123) ve eritrosit GSH düzeylerinin arttığı (124) gösterilmiştir. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin artması ise hücre içi NADH / NAD⁺ (redükte nikotinamid adenin dinükleotid / nikotinamid adenin dinükleotid) oranının artmasına neden olur. Bu durum “hiperglisemik psödohipoksi” olarak adlandırılır ve serbest radikal üretiminin artmasına neden olur bu da iskiyle sonuçlanabilir (97). Bunun ötesinde biriken sorbitol ozmotik stres aracılığıyla mitokondrial disfonksiyona neden olarak, antioksidatif defansı olumsuz yönde etkiler (Şekil 6). İntrasellüler bir ozmolit ve endojen bir antioksidan olan ve antioksidatif savunmada rol alan taurinin ve glutatyonun azalmasına neden olur (112). Yine hücre içi ROS’nin aşırı üretimine neden olan bir başka sebep de glikoliz sonucu oluşan piruvatın kompleks II (süksinatubikinin) düzeyinde mitokondriye olan transportudur (125).



Şekil 6. Hücre İçi Aşırı Glukoz Artışının Sonuçları (56, 126)

1.2.2. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller

Streptozosin ile oluşturulan deneysel diyabet çalışmalarının birçoğunda oksidasyonun diyabetin ortaya çıkışındaki rolüne dair bulgular elde edilmiştir. Bir glukonitrozure olan STZ’in etki mekanizması net ortaya konulamamıştır. STZ’in uygun olmayan NO cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. DM’un başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır ve bu

insülitiste fagositlerden salınan serbest radikaller önemli rol oynar. Sitokinler de β hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar (127).

1.2.3. Serbest Radikallere Bağlı Hücresel Hasar

Serbest radikallerin yüksek konsantrasyonları lipidler, nükleik asitler ve proteinlerin hücresel hasarlanmasında önemli rol oynarlar (87). Lipidler SR'e en hassas moleküllerdir. Hücre membranlarında bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları SR'le kolayca reaksiyona girebilir. Çoklu doymamış yağ asitlerinin ROS'ne maruz kalması lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonunun ilk aşamasında yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren H atomu çıkarılması ile lipid radikali ($L^{\cdot}$) oluşur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksit radikalini ($LOO^{\cdot}$) oluşturur. Lipid peroksit radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksitler ortamdaki H atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksitleri ($LOOH$) oluştururlar. Lipid peroksitler daha sonra MDA ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA ya da proteinler ile reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. MDA, üç veya daha fazla çift bağ sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşmaktadır. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (34, 128, 129). Nukleotid yapısı içinde yer alan purin ve pirimidin bazları ve deoksiriboz bağlanma bölgesi oksijen radikallerinin etkilerini gösterdiği bölgeler olup bu bölgelerin hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (87, 130).

Oksidasyona en çok maruz kalan aminoasitler metionin, sistein gibi terminal sülfidril grubu içeren ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik yapıda olanlardır. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında değişiklikler oluşur ve fonksiyonları etkilenir (131).

1.2.4. Anti-Oksidanlar

Antioksidan Savunma Sistemleri ROS oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemede görev almaktadır (Şekil 7).

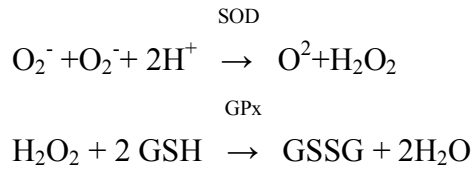


Şekil 7. Antioksidan Savunma Sistemleri (132)

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler (10, 133-138).

1. Temizleme etkisi:

Süperoksit dismutaz, KAT, GPx, Glutasyon redüktaz, Glutasyon S-Transferaz (GST) gibi enzimler oksidanları daha zayıf bir moleküle çevirir (Şekil 8).



Şekil 8. Antioksidan Enzim Olan SOD ve GPx'in Etki Mekanizmaları

2. Baskılama etkisi:

Vitaminler (A,C,E) ve flavonoidler oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirirler.

3. Onarma etkisi:

4. Zincir koparma etkisi:

Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır (139).

SOD: Üç tür SOD vardır. Birincisi mitokondride lokalize Mn-SOD, ikincisi sitozolde lokalize Cu-Zn SOD ve üçüncüsü de Cu içeren ve plazmadaki O_2^- radikallerini metabolize eden vasküler endotele bağlı Cu-SOD'dur. Metalloprotein olan SOD bir O_2^- molekülünü O_2 molekülüne yükseltgeyip, diğer O_2^- molekülünü H_2O_2 'e indirger (10, 133-135) (Şekil 8).

KAT: Her biri bir prostetik grup olan ve yapısında Fe +3 bulunduran 4 hem grubundan oluşmuş bir hemoproteindir. Peroksizomlarda lokalizedir. KAT SOD'ın oluşturduğu H_2O_2 'i peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalar. Düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i GPx parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise KAT aktivite kazanır. KAT aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur (10, 133-137).

GPx: GSH'u yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur (Şekil 8). GPx yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin bir integral parçasıdır (133).

Glutasyon redüktaz: Yükseltgenmiş glutasyonu redükte hale çeviren 2 subünitten oluşmuş bir dimerdir (10).

GST: Toksik metabolitlerle glutasyonun konjugasyonunu katalizleyerek toksik metabolitlerin detoksifikasyonuna yol açan başka bir antioksidandır (140).

Endojen ve non-enzimatik ajanlar: Askorbik Asit (Vitamin C), Vitamin E (α -Tokoferol) ve Vitamin A (β -Karoten) dır (93).

1.3. Apoptozis

Apoptozis kelimesi, nükleer fragmentasyon, apoptotik cisimcik ve kromatin yoğunlaşması gibi morfolojik değişikliklerin görüldüğü programlanmış hücre ölümü (PCD) manasını taşımaktadır (141).

Hücre ölümü genellikle apoptozis ve nekroz olarak ikiye ayrılır.

Nekroz; pasif, katabolik bir süreç ve her zaman patolojik bir olaydır. Histolojik bulguları mitokondrial ve nükleer şişme, organellerin bozulması, nükleus etrafındaki kromatinin yoğunlaşması şeklinde devam ederek, DNA'nın nükleer ve sitoplazmik membranında bozulma ile giden bir süreçtir (142, 143).

Apoptozis ise multisellüler organizmalarda fizyolojik koşullarda oluşur. Gelişimin normal bir parçasıdır ve enerji gerektiren aktif bir süreçtir (142, 144, 145). Değişik doku ve hücre tiplerinde morfolojik ve biyokimyasal seyri ile kompleks bir olgudur (146, 147).

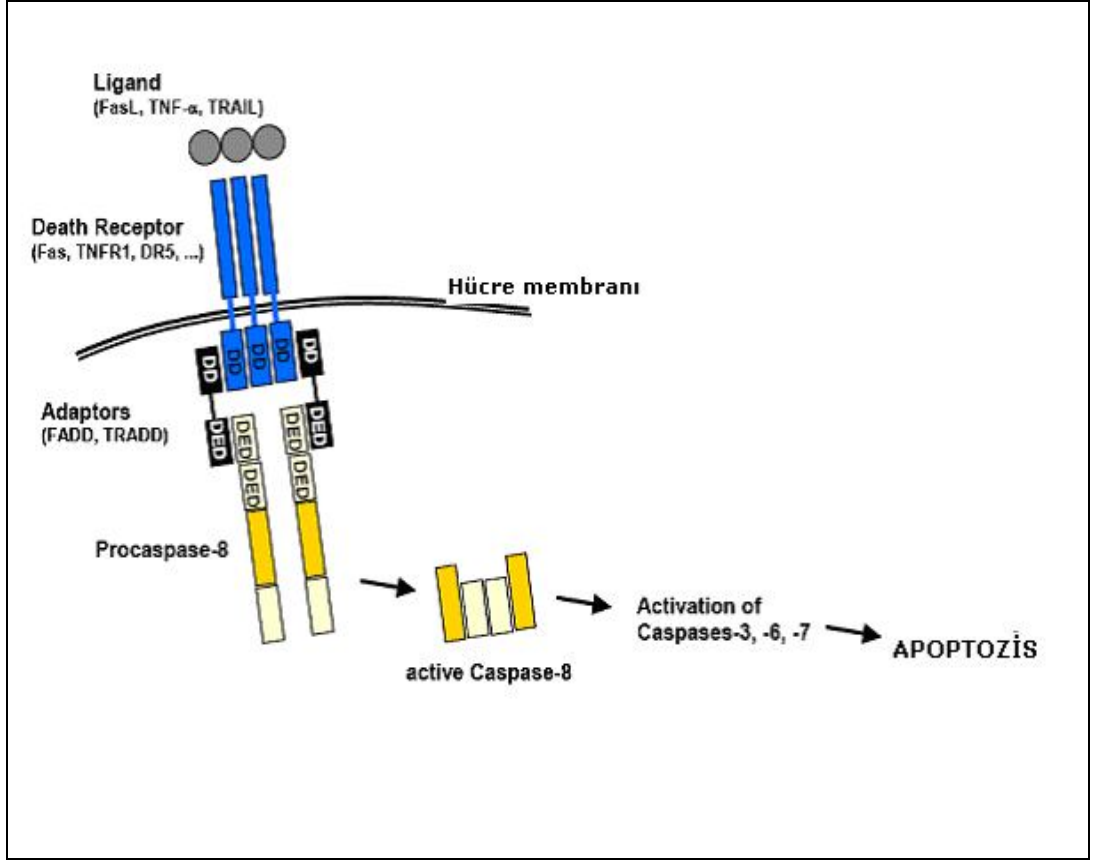
Apoptozise yol açan başlıca nedenler arasında; Fas veya tümör nekrozis faktör reseptörü-1 (TNFR-1) reseptörlerinin aktivasyonu, sitotoksik T lenfositler, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53'ün aktive olması, hücre içi

Ca²⁺ miktarındaki artış, büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması, viral enfeksiyonlar, kanser ilaçları, radyasyon, yüksek doz glukokortikoid, ve oksidatif stres olarak sıralanabilir (148).

Lenfositlerde ve diğer birçok hücrede kaspazların aktive olmasıyla oluşan apoptozis iki farklı yolak izler.

1) Ekstremsel Sinyal Yolu Fas Ligand ve TNF: Fas Ligand (FasL) ve TNF gibi ölüm faktörü olarak da adlandırılan proteinlerin ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Sitokinler protein yapısında olup hedef hücrelerde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol eder. Sitokinler, yapısal özelliklerine göre; sitokin bağımlı büyüme faktörü, TNF ve helikal sitokinler olmak üzere üç alt gruba ayrılırlar. Önemli bir apoptotik faktör olan FasL, TNF ailesinin bir üyesidir (149). TNF, hedef hücredeki TNFR-1 ve TNFR-2 adlı reseptörlere bağlanarak apoptozisi aktive eder. FasL, sitotoksik T lenfositlerde (CTL) ve NK hücrelerde bulunur. Hedef hücrede bulunan reseptörü Fas ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. FasL, Tip-II membran proteini gibi sentezlenir. FasL'in N terminali sitoplazmadadır, C terminali ise ekstrasellüler alana doğru uzanmaktadır (150).

Membrana bağlı TNF ve FasL'in metalloproteinaz enzimleri aracılığı ile proteolizi sonucunda membrandan ayrılıp serbest hale geçerek solubl TNF ve solubl FasL adını almaktadır (151). Solubl formda bulunan TNF ve FasL'da apoptozisi aktive etmekle beraber membrana bağlı TNF ve FasL'in, spesifik reseptörlerini aktive etmekte solubl formlarından daha etkili oldukları saptanmıştır (152) (Şekil 9).



Şekil 9. Fas ve TNF ölüm reseptör ve aktivatörleri (152)

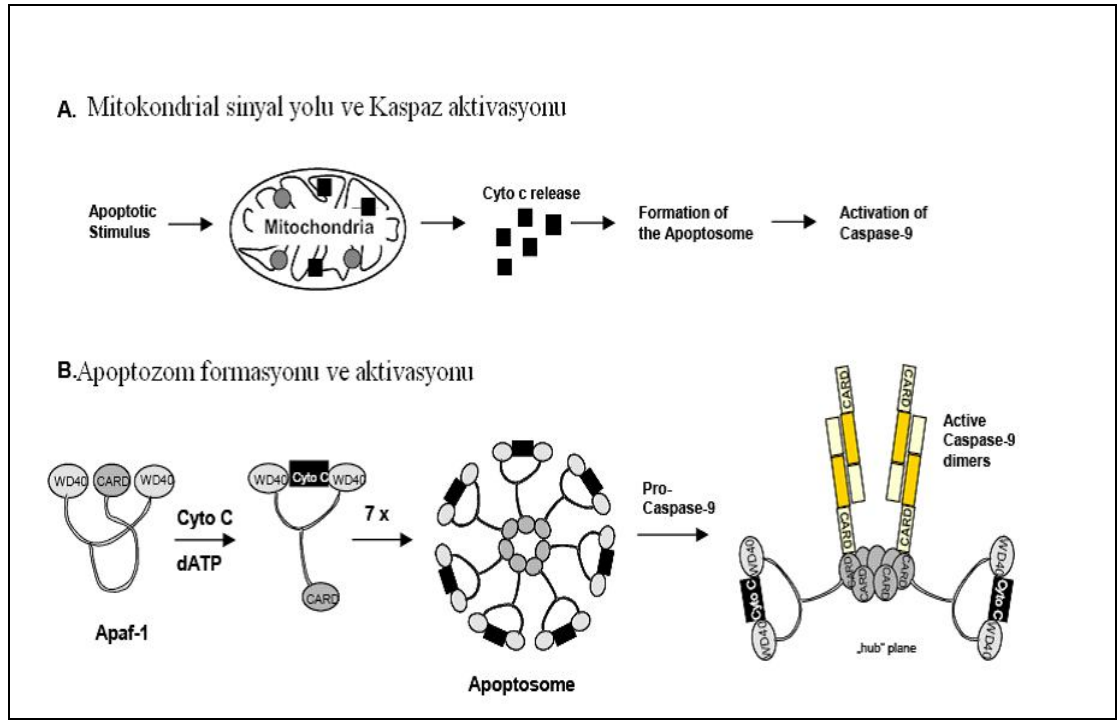
2) İntrensek Sinyal Yolu: Reseptörden bağımsız, mitokondriyal başlangıçlı olaylar zinciridir. Hücre içindeki büyüme faktörlerinin, sitokinlerin ve hormonların eksikliği, radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller intrensek yolağı başlatan başlıca nedenlerdir (148).

İntrensek yolak kendi arasında iki farklı yol izler.

a) Mitokondriyal Yolak: Memeli hücrelerinde majör apoptotik sinyal yoludur. Radyasyon, toksinler, ısı artışı, çoğu kemoterapötik ajan, tümör supresör genler, viral virulans faktör gibi sebepler intrensek mitokondriyal yolak üzerinden apoptotik sürecin başlamasına neden olurlar (153) (Şekil 10).

Sitokrom-C apoptozis sürecinde merkezi bir konumda yer alan mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Sitokrom-C mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör (AIF, apoptosis-inducing factor) ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-C sitoplazmik protein olan Apaf-1'e (apoptotic protease activating factor-1) bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin (adenozin

trifosfat) da katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan pro kaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan pro kaspaz 3'ü aktive eder. Aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD) inaktifleştirir, böylece ICAD'nün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (154) (Şekil 10).



Şekil 10. İntrensek Apoptotik Sinyal Yolu (154)

b) Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması:

Endoplazmik retikulum (ER) intrinsek apoptotik yolağın başlaması için ikinci majör etkiye sahiptir. ER'un protein sentezini, protein trafiğini, strese cevabı ve intrasellüler kalsiyum seviyelerini düzenlemede rol oynadığı bildirilmektedir (155-157). Son zamanlarda amiloid β nörotoksisitesine katkıda bulunan kaspaz-12'ye bağımlı endoplazmik retikulum aracılı apoptotik yol tarif edilmiştir (158). ER hücre içi kalsiyum dengesi, sentezi ve membran proteinlerinin katlanmasını içeren birçok süreçte kritik öneme sahiptir. ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden Kaspaz-12 bu yolda önemli rol almaktadır. Ca^{++} seviyesinin yükselmesi ve kalpainin endoplazmik retikulumu etkilemesi ile pro kaspaz-12

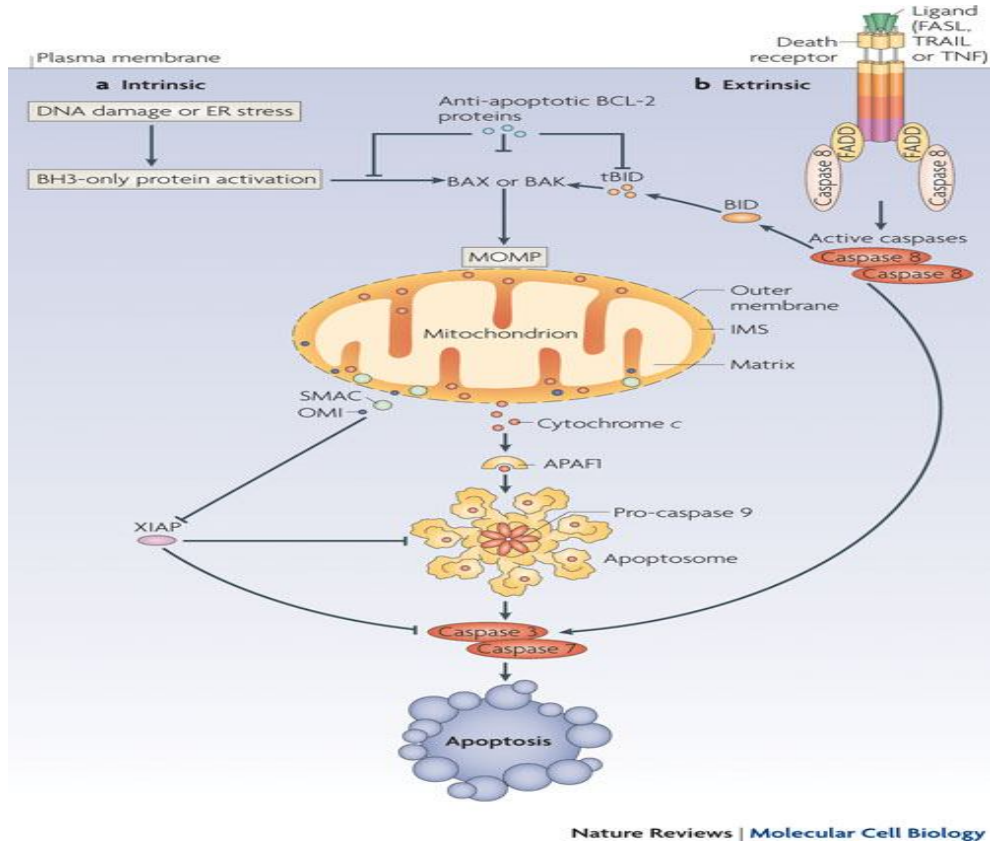
aktifleşir. Ayrıca kaspaz-7 salınımı ile de pro kaspaz-12 salınımı arasında bir bağlantı bulunur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskatını aktive eder. İn vivo ve in vitro olarak kaspaz-12'nin kaspaz-9'u aktive ettiği son yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (159).

İnfaz yolağı

Her iki yolak apoptozisin son yolağı olarak düşünülen infaz (execution) fazında sonlanırlar. Efektör kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7 aktivasyonu sonucu proteazlar aktive olur, nukleer ve sitoplazmik hücre iskelet proteinleri parçalanır. Sonuç olarak hücrede apoptozise ait morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelmektedir (160).

Kaspaz-3 en önemli efektör kaspazlardan biridir ve başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olarak proteolitik kaskadın başlamasına neden olur. Kaspaz-3 aktivasyonu, ICAD ile birleşik halde bulunan endonükleaz CAD'yı inhibitöründen ayırarak aktive eder. Takiben CAD çekirdekdeki kromozomal DNA'yı parçalar ve kromatin yoğunlaşmasına neden olur (161).

Apoptozisin son basamağı apoptotik hücrelerin fagositozu ile gerçekleşmektedir. Hücre yüzeyinde yer alan fosfolipidlerin asimetrisi ve fosfatidilserinin membran iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması noninflamatuvar fagositik tanınmayı kolaylaştırarak fagositozu kolaylaştırır (162). Apoptozis yolları Şekil 11 'de gösterilmiştir.



Şekil 11. Apoptozis Yolakları (163)

1.3.1. Apoptozisde görev alan araçlar

p53: Hücrede iç veya dış nedenlerle DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, apoptozise neden olabilmektedir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. Bir tümör supresör geni olan p53 proteini nükleusta lokalizedir ve harekete geçtiğinde esas fonksiyonu, pek çok diğer genin transkripsiyonunu kontrol ederek DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu indüklemektir. p53 geni, apoptotik sinyal sonucu aktif hale gelerek DNA hasarını tamir edebilecek düzeydeyse, hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesine engel olmakta ve hücreye DNA'yı tamir etmek için zaman kazandırmaktadır. DNA hasarı tamir edilemeyecek düzeydeyse, hücre siklusundaki blok ortadan kalkar ve hücre hasarının tamiri başarılı olmaz. Bunu takiben p53 geni bcl-2 grubu proteinlerden bax proteinini aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar (164).

Bcl-2 protein ailesi: Mitokondriyal yolda işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir. Bcl-2 ailesi, iki farklı gruptan oluşur: apoptozisi indükleyenler (Pro-apoptotik üyeler: Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs) ve apoptozisi

inhibe edenler (Anti-apoptotik üyeler: Bcl-2, Bcl-Xl). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin rölâtif oranı hücrenin hayatta kalıp kalmayacağını belirler. Dolayısıyla oranın artması ya da azalması apoptozisin inhibisyonu veya aktivasyonu ile sonuçlanır. Pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri (Bax, Bad, Bid, Bcl-Xs), sitozolde yer alır ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanarak burada por oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sit-c ve AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlayarak apoptozisi indükler (165).

Anti-apoptotik Bcl-2 gen ailesi (Bcl-2, Bcl-Xl), pek çok proteinin sitozolden intrasellüler membrana dağılımını düzenleyen adaptör bir protein olarak etki gösterir. Sit-c'nin ve AIF'ün mitokondriden çıkışını engeller ve böylece apoptozisi inhibe eder (165).

Kaspazlar: Aktif merkezinde sistein bulunduğundan “sistein proteazlar” olarak adlandırılan ve apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan enzimlerdir. Aspartik asitten sonraki peptid bağını kırmakla görevlidirler (166). İnaktif olarak sentezlenen kaspazlar yapılarında bulunan aspartat bağının ayrılmasıyla proenzimden, subünitler içeren aktif enzimlere dönüşür ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik kaskada neden olurlar (167). Bu enzimlerin başlıca görevleri; apoptozis sürecinde genomik DNA'nın 50-200 kb parçalar halinde kırılması, proteinlerin parçalanması, fosfolipidlerinin hücre zarı iç yüzeyinden dış yüzeyine çıkması şeklinde sıralanabilir (168, 169).

Kaspazlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılırlar:

1. Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10'u içerir. Her biri 100 aminoasitten oluşan başlatıcı kaspazlar, transmembran reseptörleri veya sitotoksik moleküller ile etkileşerek aktif hale geçerler. Bu kaspazlar pro-apoptotik sinyali aldıktan sonra yolağın devamındaki diğer kaspaz üyelerinin aktive olmasını sağlarlar. Daha sonra efektör kaspazları aktifleştirirler ve apoptotik mekanizmanın hücre içerisinde farklı yollarda devam etmesine neden olurlar (170).

2. Efektör Kaspazlar: Bu gruba kaspaz 3, 6 ve 7 dahildir. Bu kaspazlar çeşitli hücre içi proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (171).

3. Sitokinleri Aktive Eden Kaspazlar: Hücre sinyal iletiminde önemli role sahip sitokinlerin aktivasyonlarında görev yapan bu grup Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13,

14'den oluşmaktadır. Bu gruba dahil olan Kaspaz 1, interlökin-1 β dönüştürücü enzim (ICE) olarak bilinmekte ve öncül interlökin-1 β 'nın aktif hale geçmesine neden olmaktadır (172).

1.3.2. Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar

Apoptozis, akut ve kronik düzensiz hücre ölümüyle beraber birçok hastalığa yol açmaktadır. Apoptozis, deri, bağırsak mukozası ve immün sistem gibi dokulardaki çoğalan hücrelerin sayısını ve sürekliliğini devam ettirmekle kalmayıp aynı zamanda periferik ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (173). Düzensiz apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar Tablo 4'de gösterilmiştir (174).

Tablo 4. Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar

• Malign ve Pre-Malign Durumlar - Solid Tümörler - B Hücre Lenfomaları, - Kronik Lenfositik Lösemi, - Prostat Hipertrofisi, - Preneoplastik Karaciğer Odakları, - Kemoterapiye Direnç. • Nörolojik Bozukluklar - Felç, - Alzheimer Hastalığı, - Ataxia Telangiectasia. • Kalp Hastalıkları - İskemik Kardiak Hasar, - Kemoterapiyle İndüklenen - Miyokardial Baskılanma.	• İmmün Sistem Bozuklukları - AİDS, - Tip 1 Diabetes Mellitus, - Lupus Eritematozus, - Sjogren Sendromu, - Glomerülonefritis. • İntestinal Bozukluklar - Dizanteri, - İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları, - Radyasyon ve HIV Enfeksiyonu ile Oluşan Diare. • Böbrek Hastalıkları - Polikistik Böbrek Hastalığı, - Anemi / Eritropoezis.
--	---

Apoptotik hücre ölümü hem akut hem de kronik nörolojik hastalıkların bir özelliğidir (175). Gelişim esnasında oluşan PCD ilk kez sinir sistemi için tanımlanmıştır (176).

Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Bu uyarılara örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (177).

1.3.3. Apoptozis ve Oksidatif Stres

Reaktif oksijen radikalleri hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşenlerinin yapılarının bozulmalarına neden olurlar.

Mitokondriyal ROS'nin aşırı üretimi ve/veya mitokondriyal redoks homeostazisinin bozulması mitokondriyal membran geçirgenliğinin bozulmasına yol açar. Buna bağlı olarak intrasellüler su homeostazisi bozularak mitokondriyal matriksin ozmotik olarak şişmesine neden olur (178). Mitokondriyal disfonksiyon, aşırı ROS üretimini tetikleyerek Bcl-2 ailesi üyelerinde redoks-aracılı değişiklikler meydana getirir. Bu değişiklik hücredeki diğer mitokondrilere de yansır ve bu mitokondriilerin membran permeabilitesini değiştirerek apoptozis alevlendirilir (179).

Reaktif oksijen radikalleri üretimi ve buna bağlı olarak oluşan oksidatif stres, aynı zamanda redoks-aracılı olarak ER'dan sitoplazmaya Ca^{+2} salınımına neden olur. Hücre içi serbest Ca^{+2} artışı, Ca^{+2} - bağımlı enzimleri (endonükleazlar ve fosfolipazlar) aktive ederek birçok farklı mekanizma ile apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. İntrasellüler Ca^{+2} homeostazisindeki bozukluk diğer taraftan sitokinleri aktive eden kaspaz-12'nin aktivasyonunu indükler. Kaspaz-12, kaspaz-3, kaspaz-8 ve kaspaz-9'u aktive ederek proteolitik kaspaz kaskadının başlamasına neden olur (180).

Reaktif oksijen radikalleri üretimindeki artış, Ca^{+2} 'un hücre içine girişini arttırmasının yanında fosfatidilserinin oksidasyonuna ve plazma membranının dış yüzeyine translokasyonuna neden olur. Dolayısıyla ROS'nin fagositik yolda görev aldığı ve apoptozisi indüklediği gözlenmiştir (181).

Katabolik enzimlerin uyarılması sonucunda zardaki fosfolipitler bozulur. Hücre içi kalsiyum artması ile fosfolipaz A2 uyarılır ve aroşidonik asit salınır, böylece hücre hasarı oluşur. Proteazların uyarılması ile yapısal zar proteinleri yıkılır. Lipazların uyarılması ile lipid peroksidasyonu olur. Endonükleazların uyarılması ile genetik yapı bozulur. Prostaglandinler salınır, böylece mikrovasküler geçirgenlik ve vazodilatasyon artar. Kalsiyum ayrıca nitrik oksit sentazı uyarır ve NO oluşumu artar ve bu da ROS üretimini artırır (182). Oksijen radikalleri serbest oksijen elektron transport zinciri içinde suya dönüşürken oluşur. NO siklik GMP oluşumunu bozarak hasara yol açarken oksijen ile reaksiyona girerek DNA hasarı ve membran lipid peroksidasyonuna neden olan O_2^- , peroksit ve $ONOO^-$ serbest radikallerini oluşturur

(182). Bunlar apoptozisin potansiyel uyarıcılarıdır. NO'nun deneysel çalışmalarda fokal serebral iskemiye yol açtığı ve bu hasarın NOS inhibitörleri ile önlenilebileceği gösterilmiştir (183).

1.3.4. Apoptozis Morfolojisi

Apoptozisin başlama süresi, hücre tipine göre değişiklik gösterir ancak morfolojik değişiklikler bütün hücre tiplerinde benzerdir. Çekirdek, sitoplazma ve hücre yüzeyinde meydana gelen değişimler birbiri ile uyumludur. Başlıca üç evrede gerçekleşir;

- I. evre: Hücre büzülmesi ve çekirdek yoğunlaşması,
- II. evre: Hücre tomurcuklanması ve “apoptotik cisimciklerin” oluşumu,
- III. evre: Apoptotik cisimciklerin fagositozidir (184).

I. Evre: Apoptozise gidecek olan hücreler diğer hücrelerden ayrılarak membran yapısı bozulur. Endonükleaz enzimlerinin aktive olmasıyla DNA 180-200 baz çifti uzunluğunda kırılır ve çekirdek kromatini dağılır. Çekirdek kromatini farklı boyutlarda ve şekillerde çekirdeğin iç yüzeyine porları kapatacak şekilde yoğunlaşarak yapışır (184). Çekirdek zarı bölünerek parçalara ayrılır. Muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarının aktivasyonunun bozulmasına bağlı olarak sitoplazmik proteinlerin yoğunlaşması ve hacmin azalmasına bağlı olarak hücrede büzülme ortaya çıkar (185). Bu da apoptotik hücrelerin neden sağlıklı hücrelerden daha küçük gözlendiğini açıklar. Daha sonra hücre zarlarında çıkıntılar ve kıvrımlar oluşurken, ER genişler ve hücre zarı ile birleşerek yüzeyde kraterler oluşturur fakat bu süreçte mitokondrilerin yapısında önemli bir değişiklik görülmez (184).

II. Evre: Hücre zarında büzülmenin artmasıyla blebberler ortaya çıkar. Takip eden süreçte hücre, sitoplazma, organel ve çekirdek parçaları içeren zarla çevrili apoptotik cisim olarak adlandırılan parçalara ayrılır. Apoptotik cisimlerin bir kısmı yoğun olarak hücre organellerini içerirken, bir kısmında çekirdek kalıntıları mevcuttur (185).

III. Evre: Apoptotik cisimlerin bulundukları hücreler arası alanlarda makrofajlar ve komşu hücreler tarafından hızlıca fagosit edilmelerini kapsar (185).

Bu evreler sırasında apoptozisin deneysel olarak saptanması ancak 2. ve 3. evrelerde mümkündür (186-188).

Apoptozis sırasında hücre içi makromoleküller dışarı çıkmadığından herhangi bir inflamatuvar cevaba neden olmaz ve komşu hücrelerde zarar oluşturmaz (189).

1.3.5. Apoptozis ve Nekrozis farkı

Apoptozis, nekrozdan oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, kontrolsüz ve pasif bir süreç olup genelde geniş alanları ve hücreleri etkiler. Enerji desteği kesilir ve direkt hücre zarının hasara uğradığı gözlenir. Apoptozis ise kontrollü, enerji bağımlı bir süreçtir, hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir ve tek bir hücreyi veya hücre grubunu etkiler (148). Nekrozisde zarın hasarı sonrası su içeri girer ve hücre şişer (cell swelling), apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage) (148).

Apoptozis nekrozis farkı Tablo 5’de ayrıntılı olarak özetlenmiştir.

Tablo 5. Apoptozis ve Nekrozis Farkı (148)

ÖZELLİK	NEKROZİS	APOPTOZİS
Morfolojik özellikler	-Hücre zarı bütünlüğünün kaybı -Kromatin flokülasyonu -Hücre şişmesi -Endoplazmik retikulumun dilatasyonu -Büyük vakuollerin oluşumu -Hücresinin lizisi	-İntakt hücre zarı fakat zarda bleblerin oluşumu -Kromatinin nükleer zar civarında toplanması ve yoğunlaşması -Hücre küçülmesi -Organellerde disintegrasyon yok -Hücresinin mitokondri, nükleus, ribozom ve diğer organelleri içeren zarla çevrili apoptotik cisimlere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	-Bozulmuş iyon homeostazisi -ATP gerekmez (pasif süreç) -DNA rastgele parçalanır -Postlitik DNA fragmentasyonu (ölümün geç safhası)	-Kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması -ATP gereklidir (aktif süreç) DNA internükleozomal alanlara 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır -DNA Fragmentasyonu
Diğer özellikler	-Hücresel gruplar halinde ölür -Fizyolojik olmayan etkiler sonucu gerçekleşir -Lizozomal enzimler salınır -İnflamasyona neden olur	-Hücreler tek tek veya birkaçı bir arada ölür -Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir -Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler -İnflamasyon görülmez

1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilirken günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. Kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptotik epitelial hücrelerde kaspaz aktivitesiyle kırılan keratin 18'in kırıldıktan

sonraki özgün formunu saptayan antikorları kullanarak daha spesifik yöntemler 2000' li yıllarda ortaya çıktı. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler genel olarak 5 başlıkta toplanabilir (Tablo 6).

Tablo 6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

-
- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
 - İmmünohistokimyasal yöntemler
 - Biyokimyasal yöntemler
 - İmmünolojik yöntemler
 - Moleküler biyoloji yöntemleri
-

1- Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

a- Işık Mikroskobu Kullanımı

Hematoksilen boyama: Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Gözlenebilen değişiklikler; hücre küçülmesi "celi shrinkage", veya sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage", kromatinin kondanse olması "nuclear condensation" ve nükleus zarının periferinde toplanması, nükleusun küçülmesi "pyknosis" veya parçalara bölünmesi "nuclear fragmentation" şeklinde sıralanabilir (190).

Giemsa boyama: Nükleus morfolojisi esas alınarak yapılır. Hematoksilen boyamaya göre sitoplazma sınırları daha iyi seçilebilmekle birlikte belirgin bir üstünlüğü yoktur (190).

b- Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Floresan boyalar DNA'ya floresan boyaların bağlanması sonucu kromatinin dolayısıyla nükleusun görünür hale gelmesi temeline dayanan bu yöntem ayrıca hücre kültürü çalışmasında kullanıldığında, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Hoechst boyası canlı ve ölü tüm hücreleri boyarken sadece ölü hücreleri boyayabilen propidium iyodur boyası beraber kullanılır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodur gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş

(ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilen ancak ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayrımı nükleus morfolojisine bakılarak yapılmaktadır (190).

Elektron Mikroskobu:

Elektron mikroskobu çalışmaları apoptozis saptanması için gold standarddır. Nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede bu yöntemle sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (190).

Faz Kontrast Mikroskobu:

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır (190).

2- Histokimyasal Yöntemler

a- Anneksin V Yöntemi:

Apoptotik hücrelerde dış yüze transloke olmuş fosfatidilserin (PS) floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Normal hücrelerde ise PS hücre zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunur. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (190).

b- TUNEL Yöntemi:

Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir. DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. (190).

c- M30 Yöntemi:

Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır. Kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immünohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir (190).

d- Kaspaz-3 Yöntemi:

Kaspaz-3 eksprese ettiği bilinen dokuda veya apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırdığı kesin bilinen olaylarda kullanılır. Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 IHC metoduyla belirlenebilir (190).

e- Bcl-2/Bax Yöntemi:

Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin regülasyonundan sorumludur (191, 192). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri homodimer ya da heterodimerler olacak şekilde kompleks yaparak işlerini görürler. Mitokondri ve çekirdek zarlarının yanında endoplazmik retikulum zarında da mevcuttur (191, 193). Bcl-2/Bax oranının artması durumunda hücre yaşamına devam eder. Bax fazla miktarda ise hücre ölür (194).

3- Biokimyasal Yöntemler

a- Agaroz Jel Elektroforezi:

DNA Fragmentasyonu: Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" denilen apoptozisin karakteristik özelliği ortaya çıkar. Apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (190).

b- "Western" Blotting:

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspazın belirlenmesi
- Sitokrom C salıverilmesi

Bu yöntemde apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür, ayrıca sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla belirlenebilir. Normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (190).

c- "Flow" Sitometri:

- DNA azalması
- Annexin V

Bu yöntemin temel prensibinde antikor kullanılarak apoptozise özgü her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması yer almaktadır. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır;

- Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- Anneksin V kullanılarak (190).

4- İmmünolojik Yöntemler

a- ELISA:

- DNA fragmentasyonu
- M30 düzeyi

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında hem M30 düzeyinin ölçümü, hem de DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür (190).

b- Flourimetrik Yöntem:

- Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)

Kültürü yapılmış hücrelerde kullanılır. Araştırılacak kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazları parçalayan ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (190).

5- Moleküler Biyoloji Yöntemleri

DNA Microarrays:

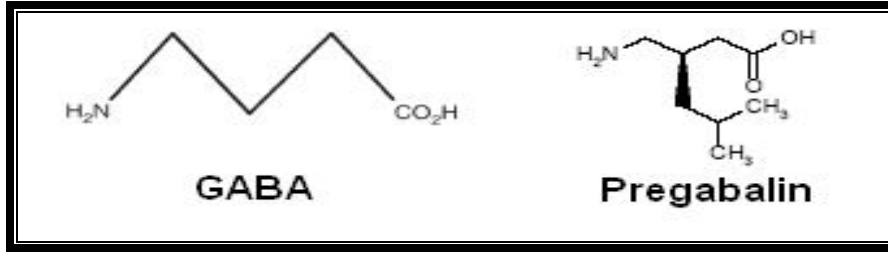
Gen ekspresyon dereceleri

- Hücre ölüm reseptörleri
- Kaspazlar

Apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı sağlayacağı düşünülen DNA Microarrays yöntemi günümüzde ulaşılması zor ve pahalı bir yöntem olmakla beraber gelecekte sık kullanılacak ve etkili bir yöntemdir (190).

1.4. Pregabalin

Pregabalin (PGB), [(S)-3-izobutil GABA], (S)-3-(aminometil)-5-metilheksanoik asit yapısında ve gama-aminobütirik asid'in (GABA) üçüncü karbon pozisyonunda alkil türevi olup epilepsi, nöropatik ağrı ve jeneralize anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan yakın zamanda geliştirilmiş bir moleküldür (4, 195) (Şekil 12).



Şekil 12. GABA ve PGB'in Moleküler Yapısı (196)

Yapılan fare deneylerinde PGB'in beyin korteks, hipokampus, amigdala, spinal kord voltaj duyarlı kalsiyum kanalları (VKKK)'nın $\alpha 2\delta$ tip 1 alt ünitesine spesifik olarak bağlandığı gösterilmiştir (195).

Epilepsi gibi nöronlarda anormal ateşlenme olduğunda veya nöropatik ağrıdaki gibi nöronlar hasarlanmış olduğunda, bu nöronlar aşırı uyarılmış hale gelir ve uyarılmış nöronlarda Ca^{+2} iyon akışı norepinefrin, glutamat ve substans P gibi pek çok nörotransmitterin salınımına neden olur. PGB hipereksite nöronlarda VKKK'na potent olarak bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını modüle ederek glutamat, noradrenalin ve substans P gibi pek çok eksitator nörotransmitterin salınımını azaltır. Bunun sonucunda postsinaptik reseptörlerin stimülasyonunda azalma oluşur ve nöronlar normal fizyolojik durumuna döner. PGB'in bağlanması ile ilgili önemli bir nokta, normal sinir fonksiyonu değişmezken ektopik aktivitenin azalmasıdır (197).

Pregabalinin emilimi hızlıdır ve biyoyararlanımı yaklaşık olarak %90'dır. Doruk plazma konsantrasyonuna oral alımından bir saat sonra ulaşır. Plazma proteinlerine bağlanmaz. Minimal metabolizmaya uğrar ve yarı ömrü 5,8–6,3 saat arasındır. Yaklaşık olarak %98'i böbrekten değişmeden atılır (198). Dozla orantılı farmakokinetiği PGB'in klinik uygulamalarında güvenli olduğunu göstermektedir. Emilimi yemeklerle ilişkili değildir. Rat, fare ve maymunlarda kan beyin bariyerini hızla geçtiği gösterilmiştir (4). Hepatik metabolizması yoktur ve sitokrom P450 gibi

karaciğer enzimlerini inhibe etmez. Plazma proteinlerine bağlanmadığından ve metabolize olmadığından ilaç etkileşimlerine neden olmaz. Lamotrijin, fenobarbital, topiramet ve valproik asit ile birlikte kullanıldığında farmakokinetiklerini etkilemediği gösterilmiştir (4). Önerilen optimal tırapatik dozu günlük 300-600 mg'dır.

Uyku hali ve sersemlik hissi başta olmak üzere iştah artışı, öfori hali, libidoda azalma, irritabilite, ataksi, dikkat kaybı, koordinasyon bozukluğu, hafıza bozukluğu, tremor, dizatri, parestezi, bulanık görme, diplopi, vertigo, ağız kuruluğu, konstipasyon, kusma, gaz, erektil disfonksiyon, yorgunluk, periferik ödem, ödem, yürüyüşte anormallik ve kilo artışı görülen yan etkiler arasında sayılmaktadır (199, 200).

Pregabalinin gebe kadınlarda kullanımına ilişkin yeterli veri yoktur. PGB'in insanlarda anne sütüne geçip geçmediği bilinmemektedir; ancak sıçan sütünde mevcuttur. Bu nedenle, emzirme tavsiye edilmez.

Tedaviye dirençli parsiyel epilepsi hastalarında tedavi alternatifi olarak PGB önemli bir yer tutmaktadır (201). İlaça dirençli epilepsi hastaları ile yapılan açık uçlu üç çalışmanın değerlendirildiği bir meta analizde 600 mg/gün doz ile kompleks parsiyel, basit parsiyel ve sekonder jeneralize nöbetlerde plaseboya göre anlamlı olarak üstün olduğu belirtilmektedir (200).

Van Sevanter ve arkadaşları; postherpetik nevraljili 370 hastada plasebo ile PGB'in 150-300 ve 600 mg dozlarının analjezik etkisini karşılaştırmış, PGB'in doza bağlı etkisi gözlenmiş ve doz artışı ile ağrıdaki azalmanın korele olduğunu saptamıştır.

Diyabetik nöropatik ağrı da birçok çalışma yayımlanmıştır. Richter, çalışmasında özellikle PGB'in 300-600 mg/günlük dozlarında ağrı ve uyku kalitesinde plaseboya göre anlamlı düzelme olduğunu belirtmiştir (202).

Yapılan bir çalışmada Siddall tarafından 137 komplet ve inkomplet spinal kord yaralanmalı hasta üzerinde yapılan çalışmada ortalama ağrı skorlarında, yaşam kalite ölçütlerinde, uyku kalitesinde ve anksiyete skorlarında PGB grubunda istatistiki olarak anlamlı düzelme saptanmıştır (203).

Pregabalinin spinal kord hasarında nöroprotektif olduğu ratlarda gösterilmiştir (204).

Çalışmamızda PGB'in deneysel olarak oluşturulmuş diyabetik ratlarda nöroprotektif etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte yapıldı ve çalışmanın etik onayı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alındı (29.12.2011/145).

2.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan en az 8 haftalık Wistar Albino cinsi erkek ratlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (FÜDAM) Hayvan Laboratuvarı'nda bulundukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Ratlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 7'de belirtilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 7. Deney Hayvanlarına Verilen Rat Yeminin Terkibi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

**% 18 fosfor, %25 kalsiyum, %0,2 flor'dan oluşur.

2.2. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 14 adet ratda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 180 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal olarak 0,4 ml (0,1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4,5) çözülürerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu > 250 mg/dl'yi geçen ratlar, diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile yapıldı. Ratların açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 9-10 arasında alındı.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneyisel çalışmalar, toplam 28 adet rat üzerinde gerçekleştirildi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Ratlar; kontrol (Grup I), pregabalin-kontrol (Grup II), diyabet (Grup III) ve diyabet + pregabalin (Grup IV) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1. Grup (n=7) Kontrol grubu: 8 haftalık deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

2. Grup (n=7) Pregabalin-kontrol (PGB) grubu: 8 haftalık deney süresince her gün intraperitoneal 50 mg/kg PGB uygulandı. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

3. Grup (n=7) Diyabet (DM) grubu: 180 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) STZ verilip 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

4. Grup (n=7) Diyabet + pregabalin (DM+PGB): 180 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) STZ verilip 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olan bu ratlara diyabet oluşumu itibariyle 8 hafta boyunca her gün intraperitoneal 50 mg/kg PGB

uygulandı. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

2.4. Örneklerin Alınması

Tüm gruplardaki ratlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından ratların beyin ve siyatik sinir dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan beyin ve siyatik sinir dokuları biyokimyasal çalışma için -80C°’de saklandı. Histolojik çalışma için ise %10’luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

2.5. Biyokimyasal Çalışma

2.5.1. Kan glukoz düzeyleri:

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile ölçüldü.

2.5.2. Dokuların Hazırlaması:

Dokular distile su ile sulandırılarak cam-cam homojenizatörde homojenize edildi. 2500 rpm’de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatantı kullanıldı.

2.5.3. Lipid Peroksidasyon Tayini:

Malonildialdehit, Matkovics ve ark. (205) tarafından modifiye edilen Placer ve ark. (206) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA’in tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu temeline dayanır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve çözeltinin absorbansı 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

2.5.4. Süperoksid Dismutaz Aktivitesinin Tayini:

Bu metotta SOD aktivite ölçümü ksantin- ksantin oksidaz sistemi ile üretilen O_2^- radikalinin nitroblue tetrazolium’u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanan Sun’un bildirdiği metoda göre yapıldı (207). Bu şekilde üretilen O_2^- radikalinin NBT’u indirgemesi 560 nm’de maksimum absorbands veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır.

2.5.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini:

Glutasyon peroksidaz aktivite düzeyi Lawrance ve Burk'un (208) yöntemine göre ölçüldü. GPx, GSH'ü GSSG'a okside ederken Cumenehidroperoksit kullanır. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] (DTNB) solüsyonu ile karıştırılması sonucu hem kör hem de örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin 412 nm'de spektrofotometre ile okunması sonucu belirlenir.

2.5.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi:

Katalaz aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre yapıldı (209). KAT enzimi H₂O₂ yıkarak H₂O ve O₂'e dönüştürür.

2.5.7. Redükte Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi:

Redükte glutasyon düzeyi Sedlak ve Lindsay'ın tarif ettiği şekilde belirlendi (210). Bu metot renk ajanı olarak DTNB eklendiğinde sülfhidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemidir.

2.5.8. Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi:

Protein miktarı Lowry yöntemine göre ölçüldü (211). Alkali bakır tartarat ayracı peptid bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayracı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor- mavi renk şekillenir. Oluşan renk spektrofotometrede 546 nm'de okunur.

2.6. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan beyin dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 8). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH–2) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 8. Histolojik Takip Serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

2.6.1. İmmünohistokimyasal Çalışma

Beyin dokusunda bax ve kaspaz 3 immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki Tablo 9’da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 9. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H ₂ O ₂	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole)	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilin	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Bax mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-7480, California, USA; caspase 3 Rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab2302, London, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse / rabbit IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve 3-Amino–9-ethyl

carbazole kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskobunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 10).

Tablo 10. İmmünohistokimyasal Boyanma Yaygınlığının Derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.6.2. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 11).

Tablo 11. TUNEL Boyama Prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.	

Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris Hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 12).

Tablo 12. TUNEL Boyama Yaygınlığının Derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

2.6.3. Weil Metodu

Çalışmada bulunan gruplardaki ratların siyatik dokularından 2 adet farklı seviyeden 2 mm kalınlığında kesitler alındı. Doku örnekleri mikrodalga ışıınımlı yardımcıyla kimyasal fiksasyona maruz bırakıldı. Bu doku örneklerinden 2'şer adet parafin kesit alındı. Kesitlerden birine hematoksilin-eozin boyaması yapılarak fiksasyon kalitesi değerlendirildi. 1 kesit Weil'in metodu literatürde belirtildiği gibi konvansiyonel şartlarda ve mikrodalga ışıınımlı yardımcıyla boyandı (212).

2.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 12.0 programı kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma (ort±SD) olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılığı karşılaştırma için Kruskal-Wallis testi, sonrasında ikili karşılaştırmalar için Mann-Whitney-U testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Tüm gruplarda ratların vücut ağırlıkları deneyin 4. Haftası ve deney sonunda başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdi ($p<0.05$) (Tablo 13).

Tablo 13. Ratların Deney Süresince Ağırlık Değişimleri

	Grup I(Kontrol) (n=7)	Grup II(PGB) (n=7)	Grup III(DM) (n=7)	Grup IV(DM+PGB) (n=7)
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	200,2±7,3	205,8±13,1	209,1±4,22	210,2±7,4
4. Hafta vücut ağırlığı (gr)	252,4±11,17 ^a	230,8±15,12 ^a	252,1 ±16,88 ^a	250,3±11,47 ^a
Final vücut ağırlığı (gr)	290,4±11,56 ^a	281,6±11,52 ^a	288,2 ±15,91 ^a	293,1±11,32 ^a

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

^b Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

3.2. Biyokimyasal Bulgular

3.2.1. Kan glukoz düzeyleri

Deneklerin gruplandırmasında kan glukoz değerlerinin 250 mg/dl üzerinde olması diabetes olarak kabul edildi. Deneyin 4. Haftasında yapılan analizlerde yüksek glukoz değerlerinin DM gruplarında korunduğu teyit edilerek çalışmaya devam edildi. DM ve DM+PGB gruplarına ait ratların kan glukozu değerlerinde deneyin 4. Haftası ve sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı. ($p<0.05$). Kontrol grubu ile kıyaslandığında DM ve DM+PGB gruplarına ait ratların kan glukozu değerlerinde deneyin 4. Haftasında ve sonunda anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). Kontrol ve PGB grubu kan glukoz düzeylerinde ise deney süresi boyunca anlamlı farklılık oluşmadı (Tablo 14).

Tablo 14. Ratların Deney Süresince Kan Glukoz Değişimleri

		Grup I(Kontrol) (n=7)	Grup II(PGB) (n=7)	Grup III(DM) (n=7)	Grup IV(DM+PGB) (n=7)
Başlangıç kan glukoza (mg/dl)		97,40 ± 3,63	99,40 ± 3,23	100,51 ± 5,22	98,6 ± 8,86
4. Hafta kan glukoza (mg/dl)		97,30 ± 7,23	98,9 ± 6,25	400,20 ± 9,11 ^{a,b}	415 ± 15,21 ^{ab}
Final kan glukoza (mg/dl)		96,00 ± 8,57	97,30 ± 8,57	417,20 ± 11,57 ^{a,b}	413,20 ± 13,17 ^{a,b}

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

^b Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Parametreler

Pregabalinin ve diyabetin oksidatif sistemi etkileyen biyokimyasal parametreler üzerine etkileri Tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Biyokimyasal Parametreler

Gruplar	MDA (nmol/g)	KAT (k/g)	GPx (U/g)	GSH (nmol/g)	SOD (U/mg)
Grup I (Kontrol)	52.50±4.19	11.36±5.54	30.12±2.58	12.47±1.95	4.79±1.80
Grup II(PGB)	65.87±21.80 bc	13.72±2.88	36.96±13.25	15.52±4.00	5.37±1.50
Grup III(DM)	113.46±13.44 ac	8.70±4.31	21.59±5.94 a	10.28±3.04	4.72±1.05
Grup IV(DM+PGB)	92.77±5.01 ab	13.14±3.65	35.29±11.33	14.83±1.79	8.23±2.22 ab

^a Kontrol grubuna göre anlamlılık,

^b DM grubuna göre,

^c DM+PGB grubuna göre anlamlılık vardır, p<0.05

MDA Bulguları:

Yapılan analizlerde;

1. DM grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0.05$),
2. DM+ PGB grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0.05$).
3. DM+ PGB grubu MDA değerleri DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük saptandı ($p<0.05$).
4. PGB grubu MDA değerleri DM grubu MDA değerlerine göre anlamlı oranda düşük saptandı. ($p<0.05$)
5. PGB grubu MDA değerleri DM+ PGB grubu MDA değerlerine göre anlamlı oranda düşük saptandı. ($p<0.05$)

KAT Bulguları:

Yapılan analizlerde; gruplar arasında KAT analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak sayısal olarak DM grubu KAT değerleri diğer tüm gruplara göre düşük saptanmıştır.

GPx Bulguları:

Yapılan analizlerde;

1. DM grubu GPx değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük saptandı ($p<0.05$).
2. Diğer gruplar arasında istatistiksel anlamda fark gözlenmedi.

GSH Bulguları:

Gruplar arasında GSH analizinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak sayısal olarak DM grubu GSH değerleri diğer tüm gruplara göre düşük saptanmıştır.

SOD Bulguları:

Yapılan analizlerde;

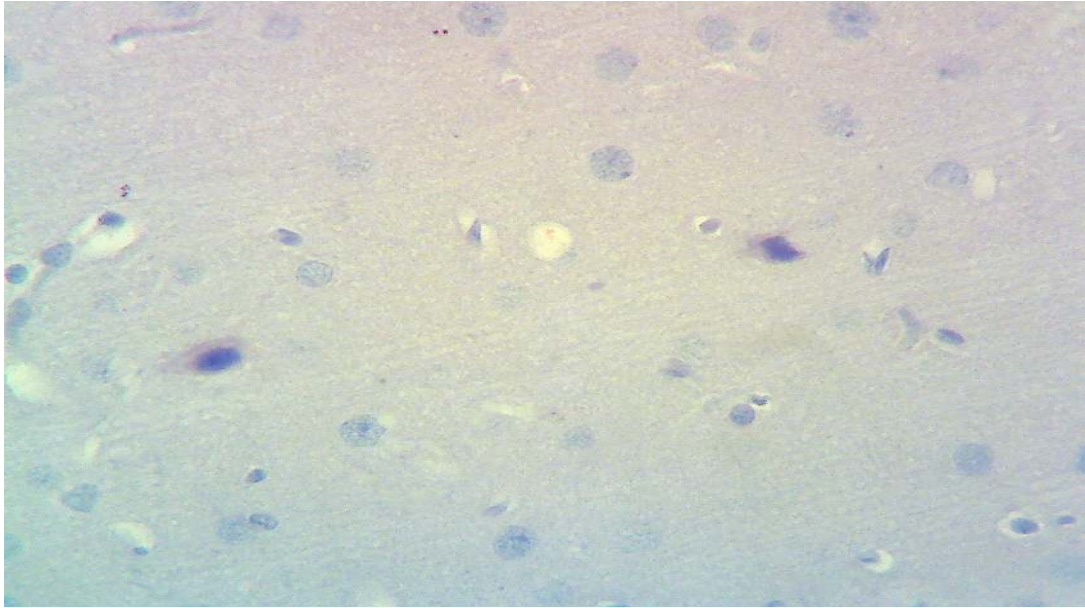
1. DM+ PGB grubu SOD ölçümleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.

2. DM+ PGB grubu SOD ölçümleri DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir.
3. Diğer gruplar arasında istatistiksel anlamda fark oluşmamıştır.

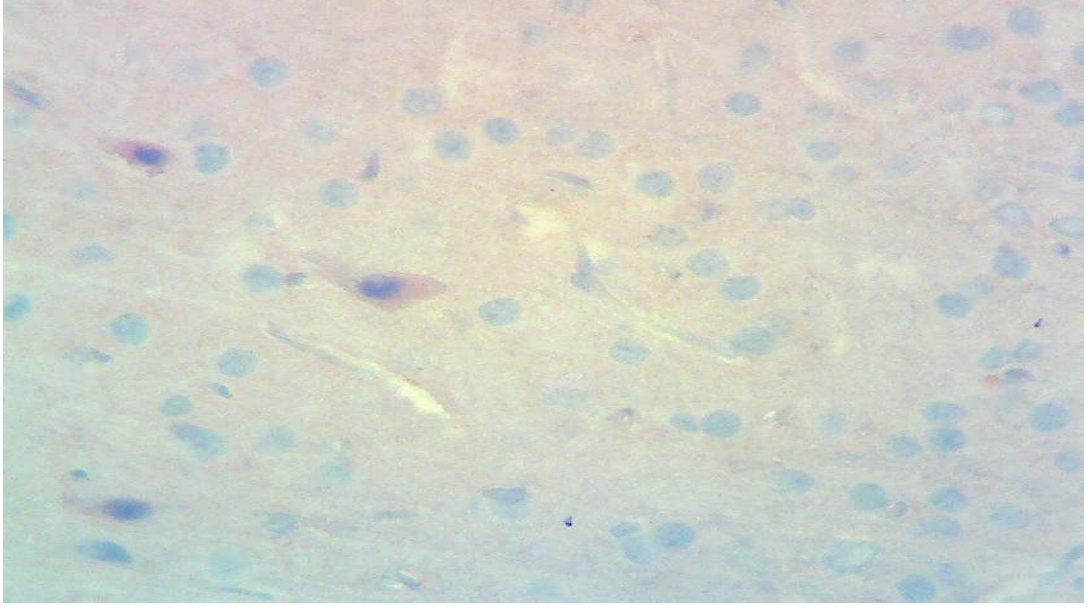
3.3. Histolojik Bulgular

3.3.1. Bax İmmünreaktivitesi

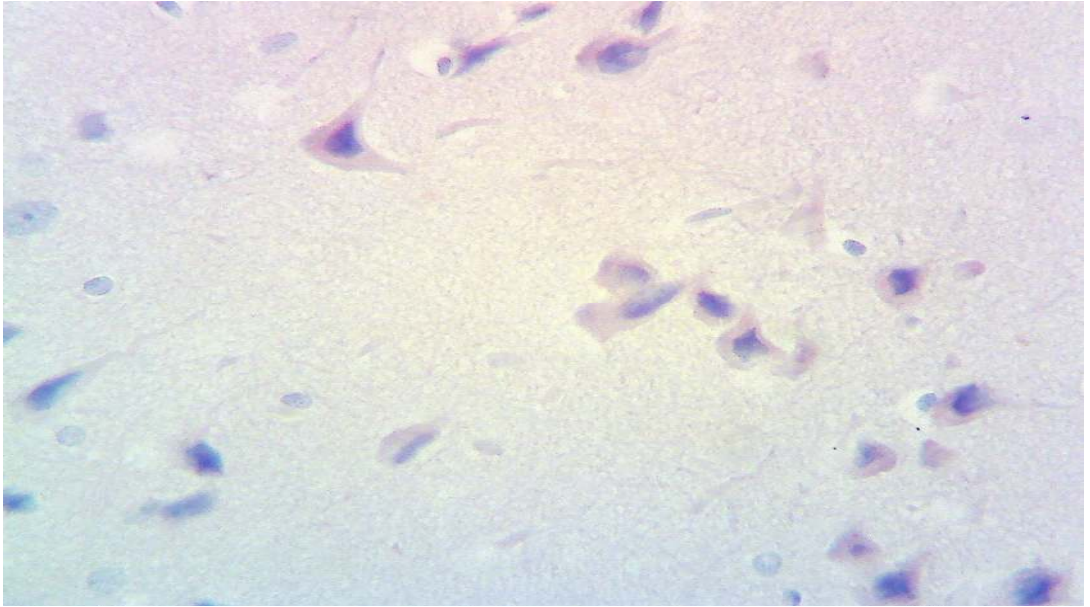
Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; bax immünreaktivitesi kontrol ve PGB gruplarında +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 13, 14). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda bax immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 15). PGB tedavisi alan DM+PGB grubunda ise DM grubuna göre bax immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 16).



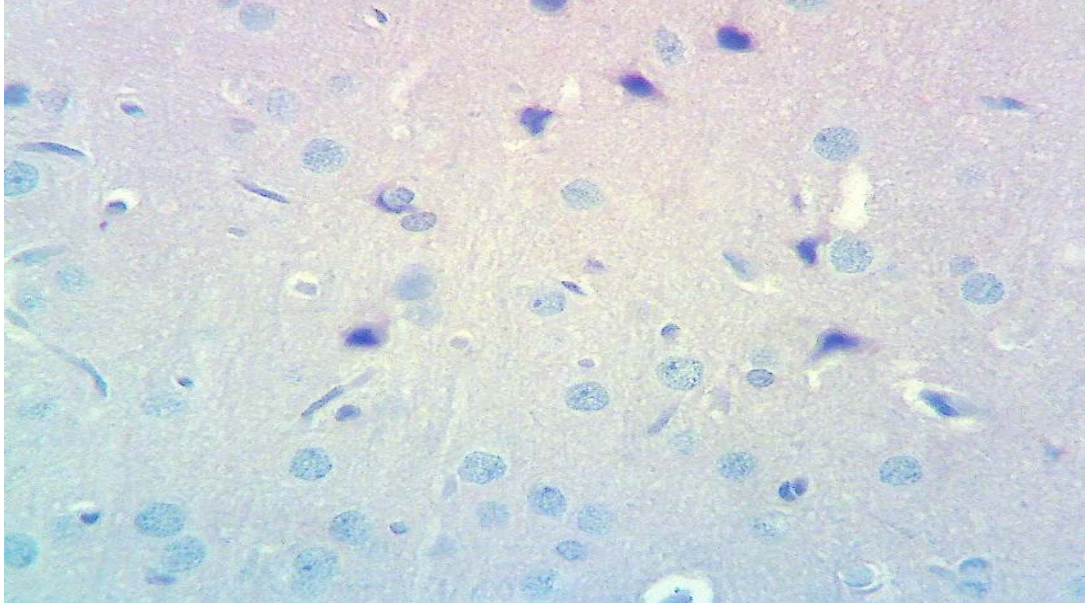
Şekil 13. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında bax immünreaktivitesi



Şekil 14. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında bax immünreaktivitesi



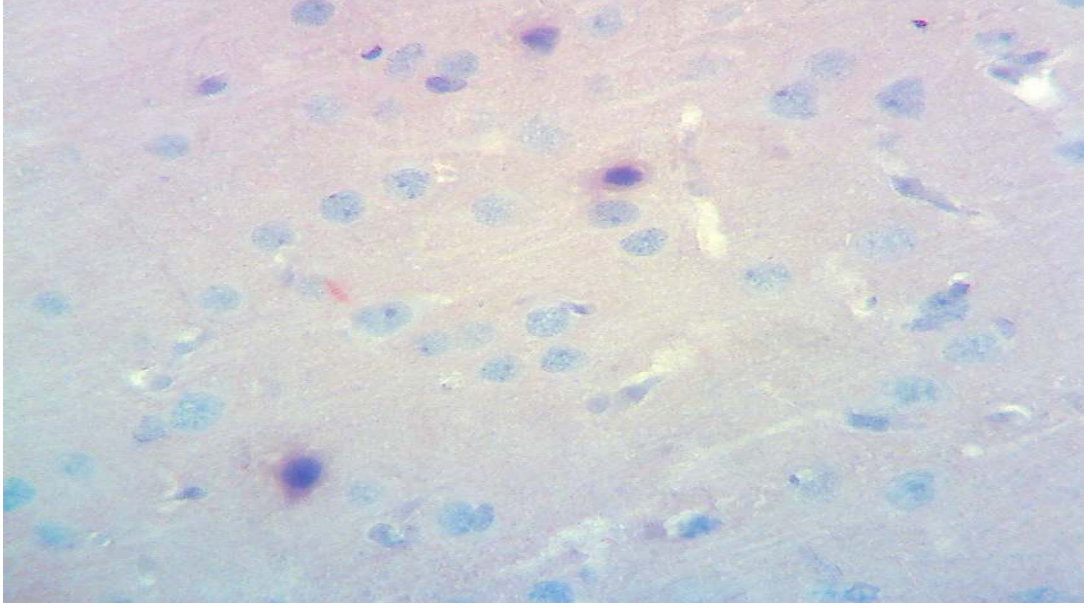
Şekil 15. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında bax immünreaktivitesi



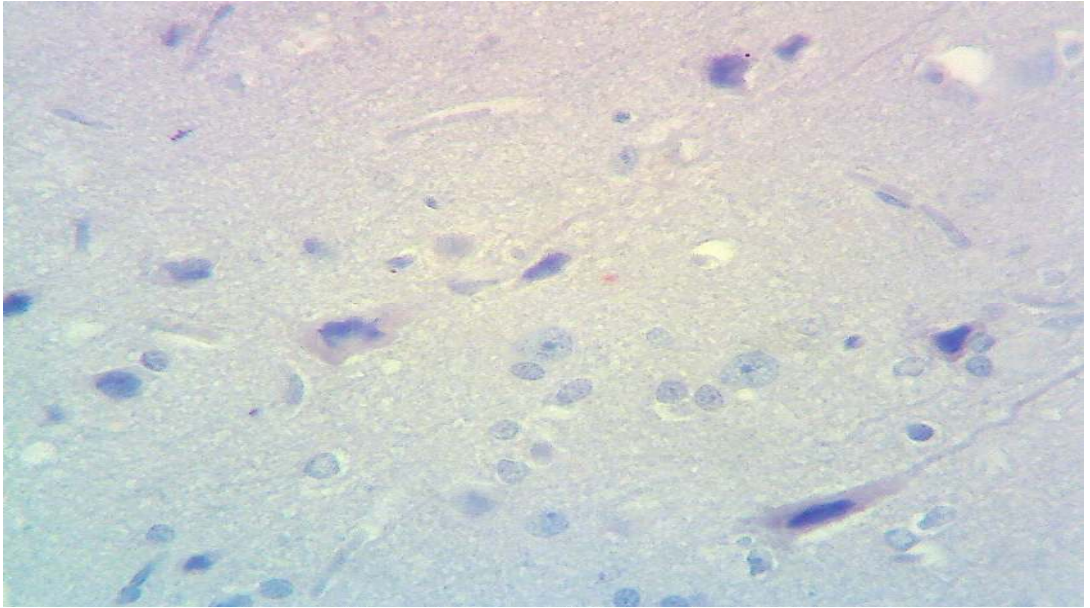
Şekil 16. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında bax immünreaktivitesi

3.3.2. Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi

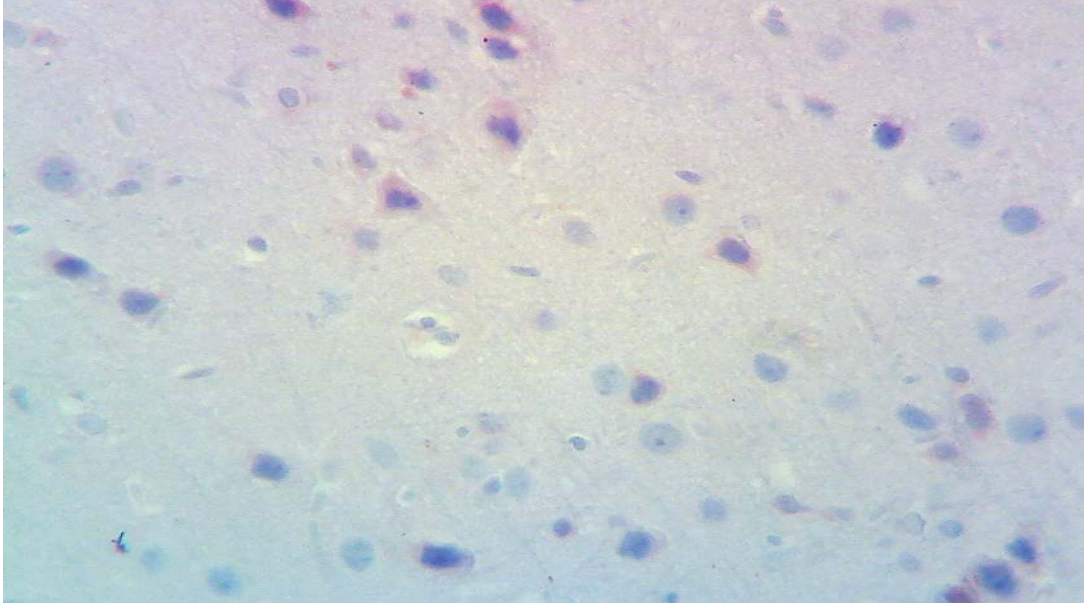
Kaspaz 3 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Kaspaz 3 immünreaktivitesi kontrol ve PGB gruplarında +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 17, 18). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda Kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 19). PGB'in tedavi olarak verildiği DM+PGB grubunda ise DM grubuna göre Kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi. (Şekil 20).



Şekil 17. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi



Şekil 18. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi



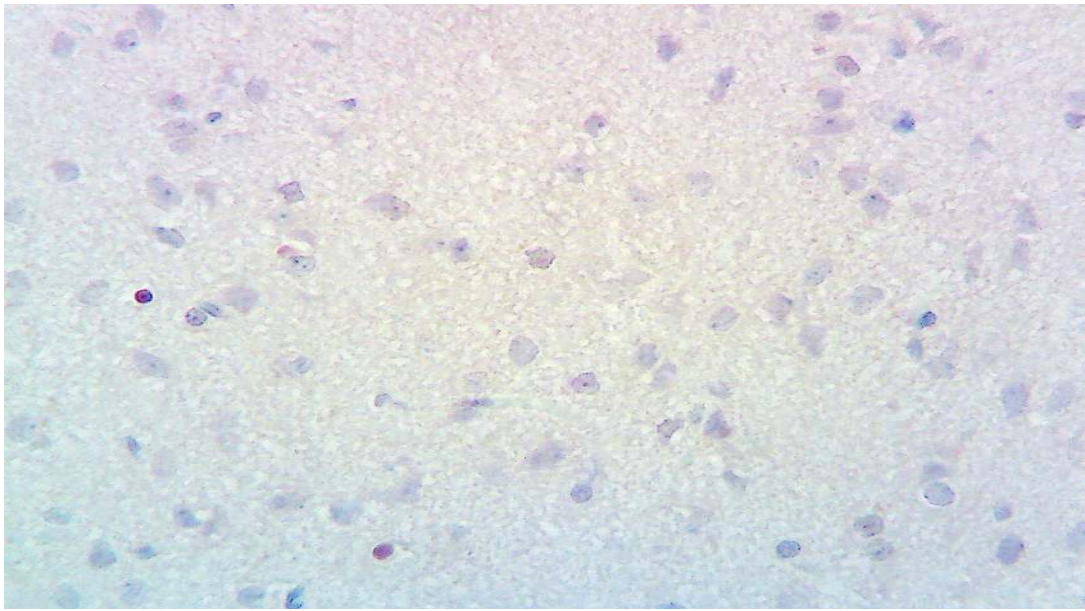
Şekil 19. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi



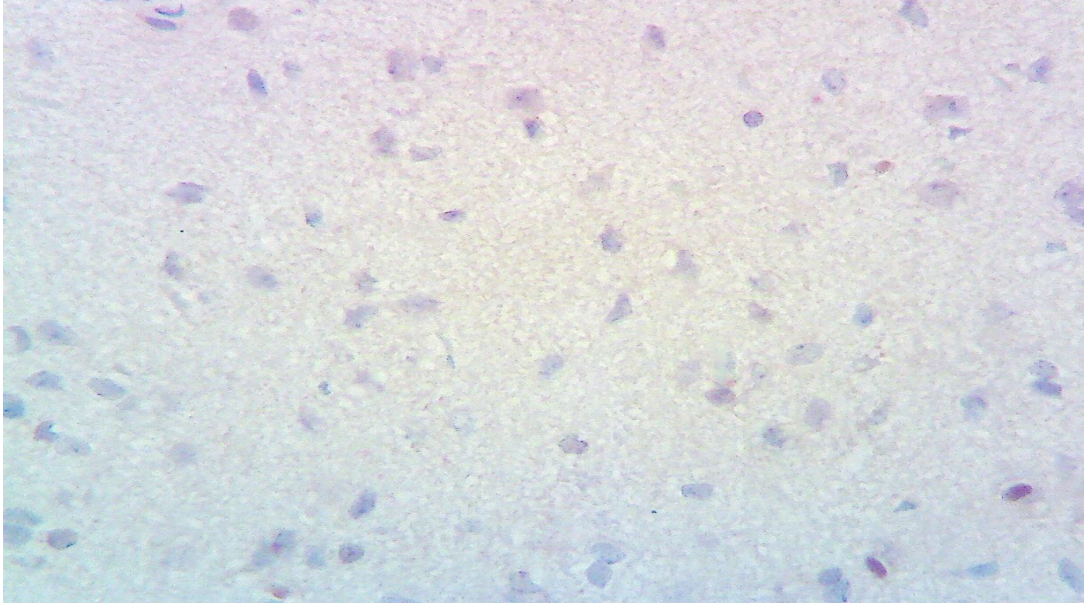
Şekil 20. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında Kaspaz 3 immünreaktivitesi

3.3.3. TUNEL Boyama

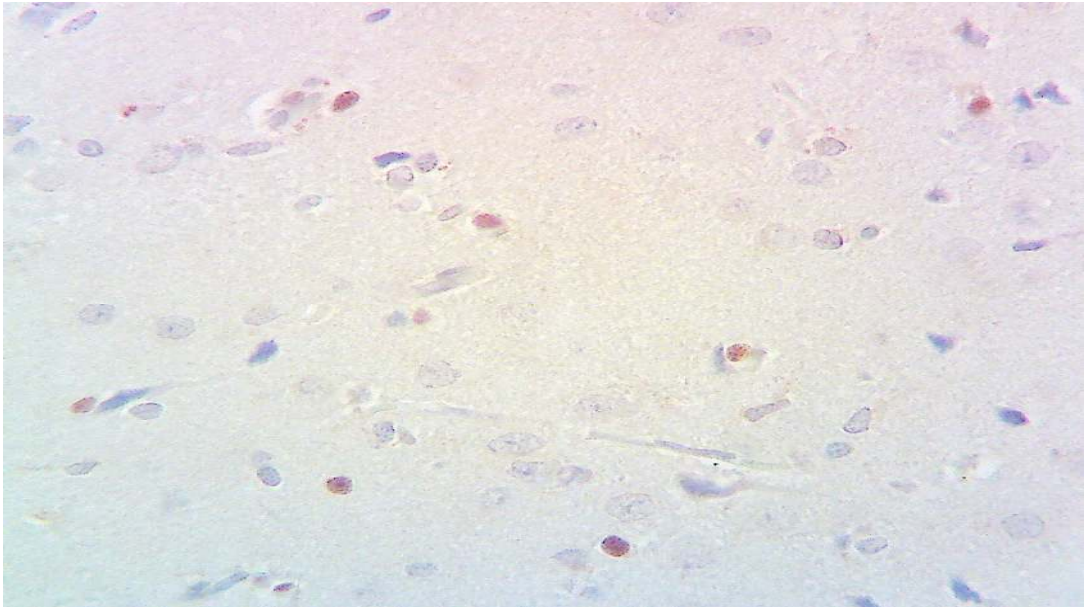
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol ve PGB gruplarında +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 21, 22). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği DM grubunda +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 23). PGB'in tedavi olarak verildiği DM+PGB grubunda ise DM grubuna göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 24). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 25). Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı (Şekil 26).



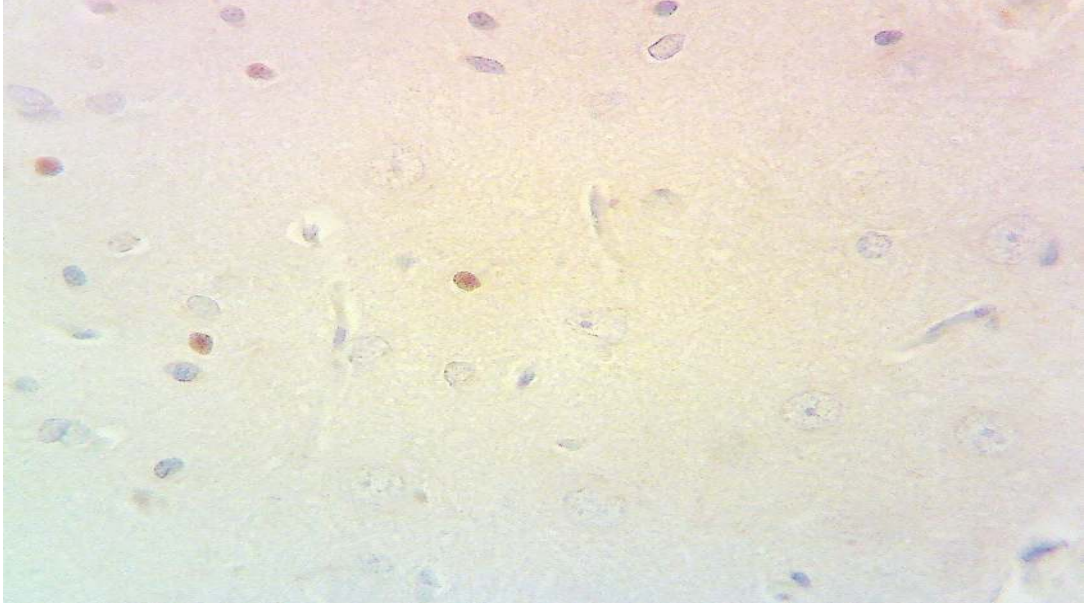
Şekil 21. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



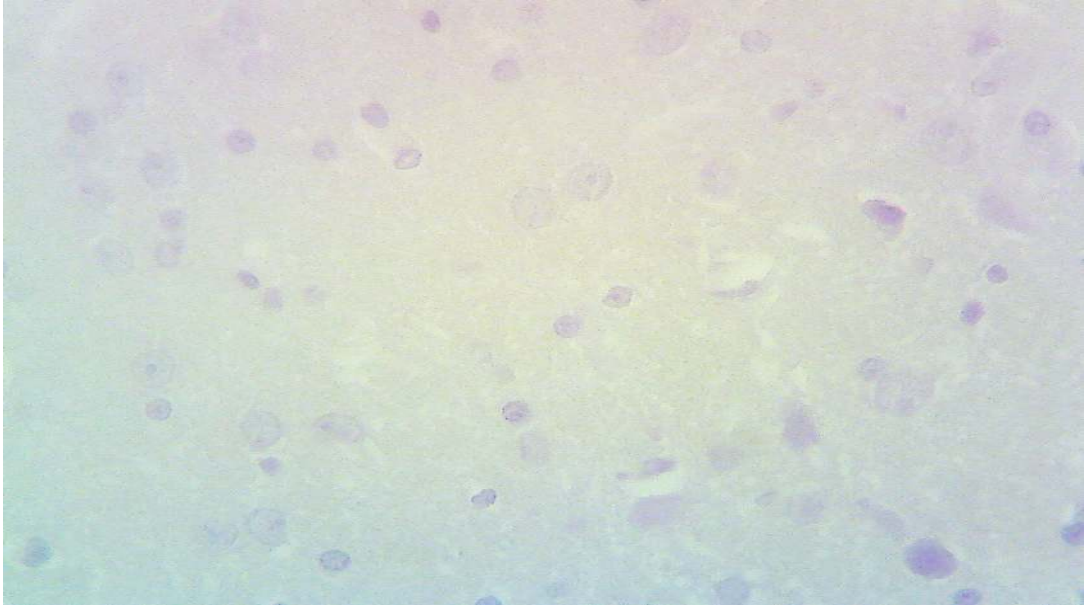
Şekil 22. PGB verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



Şekil 23. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



Şekil 24. DM+PGB grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



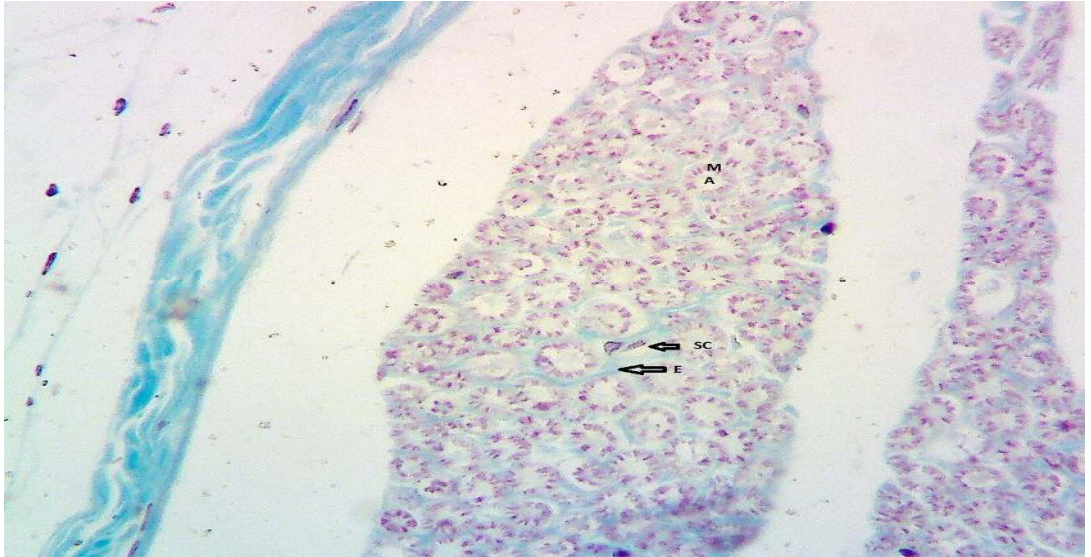
Şekil 25. TUNEL negatif kontrol



Şekil 26. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu

3.3.4. Siyatik Sinir İncelemesi

Siyatik sinir incelemesinde Weil yöntemi kullanıldı. Dokuların incelemesinde kontrol grubunda miyelin kılıfta belirgin bir kayıp gözlenmedi (Şekil 27). Miyelin kaybının DM grubunda kontrole göre göreceli olarak daha fazla olduğu (Şekil 28), DM+PGB grubunda ise DM grubuna göre nispeten daha az yoğunlukta olduğu saptandı (Şekil 29). PGB grubu ile kontrol grubu arasında ise belirgin bir farklılık gözlenmedi (Şekil 30).

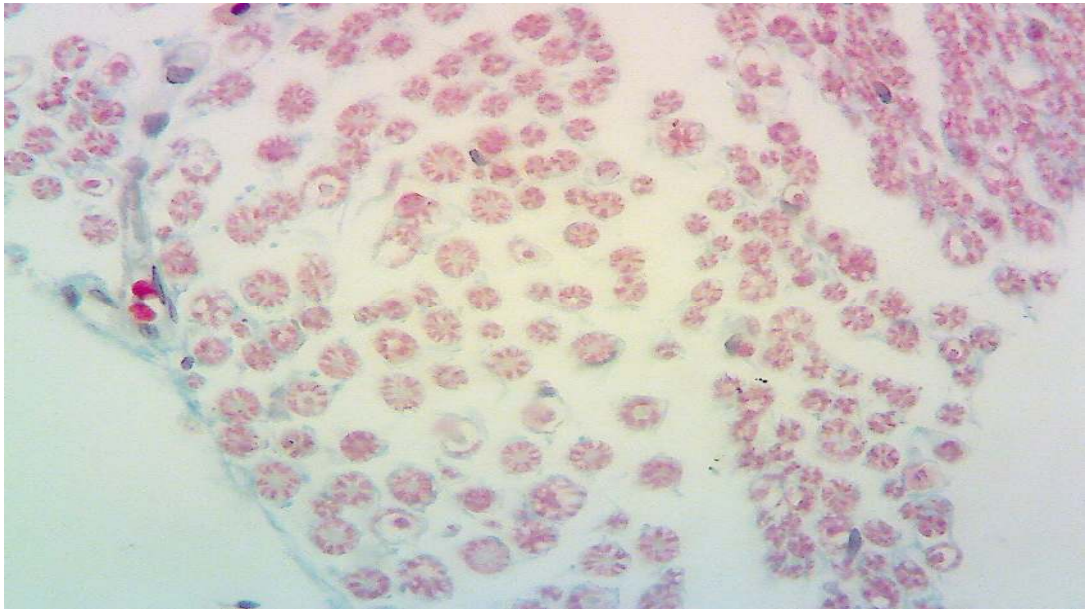


A: Akson, M: Miyelin kılıf, SC: Schwann Hücresi, E: Endonöryum

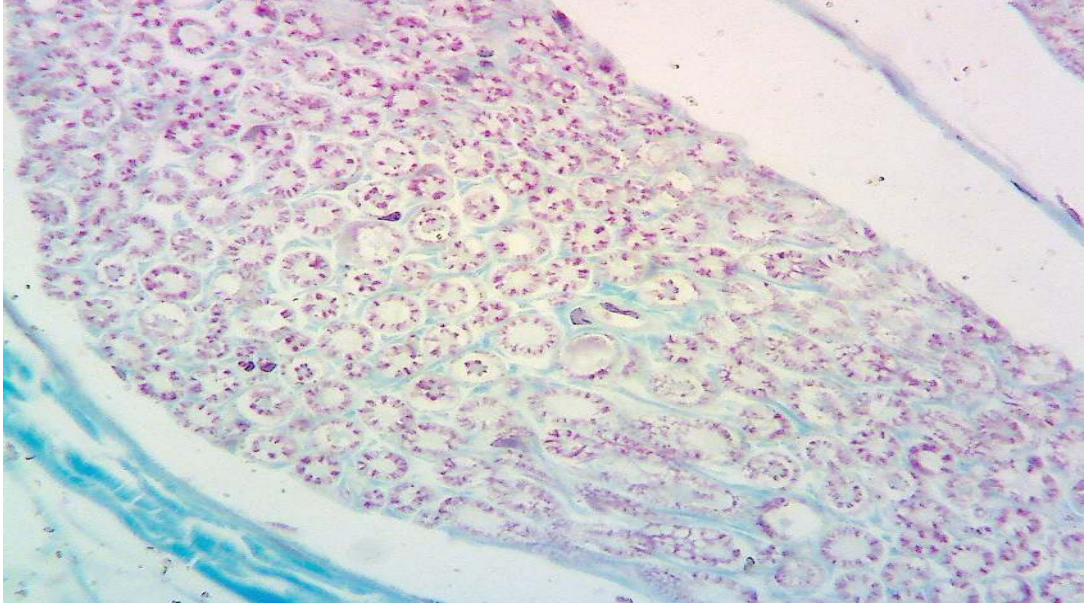
Şekil 27. Siyatik sinir kontrol grubu



Şekil 28. Siyatik sinir DM grubu



Şekil 29. Siyatik sinir DM+PGB grubu



Şekil 30. Siyatik sinir PGB grubu

4. TARTIŞMA

Diabetes mellitus; insülinin tamamen veya kısmi eksikliği sonucu hiperglisemi ile karakterize bir hastalıktır. Ayrıca insüline karşı gelişen direnç, DM gelişiminde rol oynamakta ve karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasını etkilemektedir (1, 2).

Diyabetiklerde inmeler daha ölümcül olmakta, daha fazla sekel bırakmaktadır. Diyabetik inme ya asemptomatik bir üfürüm duyularak tanınır veya bu hastalar geçici iskemik atak tablosu ile doktora başvururlar. Kanama tipi inmeler, diyabetik hastalarda ancak %8 oranındadır (213).

Hiperglisemi akut iskemik inme hastalarının yaklaşık üçte birini etkiler. Yapılan deneysel ve klinik inme çalışmalarında hipergliseminin pneumbral dokuya olan zararlı etkileri gösterilmiştir. Hiperglisemi hem kalsiyum inbalansını, hem de nöronlarda ROS birikimini arttırarak apoptozisi arttırır. Diğer taraftan beyinde stresi tetikleyen laktik asidi meydana getiren anaerobik yol ürün miktarını arttırır. Ayrıca NO miktarını azaltarak iskemik inme sonrası kan akışını azaltarak beyin perfüzyonunu bozar (214).

Stroke Hyperglycemia Insulin Network Effort çalışması hiperglisemiye bağlı beyin hasarında yetersiz insülin tedavisini adres göstermektedir. Glukagon like protein-1 tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisi, etanol tedavisi gibi yöntemler umut verici görünüyor olsa da, hipergliseminin doku hasarı altında yatan mekanizmalarını anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç mevcuttur (215).

Tip 2 DM, etkilediği bireylerde Alzheimer hastalığı da dahil bir çok kognitif bozukluk gelişme riskini yükeltmektedir. İnsülin direnci glukozun sinir hücrelerine girişini azaltarak, β amiloid birikimi ve sekresyonunu, tau protein foforilasyonunu ve senil plak oluşumunu arttırır. Yapılan araştırmalarda metformin, thiazolinedione, leptin, Glucagon-like peptide-1 tedavilerine ilişkin çok umut verici sonuçlar yayınlanmıştır (216, 217).

Deneysel diyabet modelleri genellikle pankreasın beta hücrelerine toksik olan STZ ile oluşturulmaktadır (218). Çalışmamızda *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotik olan STZ'i kullanıldı.

Diyabet artmış oksidatif stresle ilişkilidir (97, 100, 219). Artmış oksidatif stresin SSS komplikasyonlarının oluşumunda da temel rol oynadığı düşünülmektedir

(35, 36). Kontrolsüz serbest radikaller vücut boyunca çoğalıp hücre membranlarını, organları ve bağışıklık sistemini etkiler. DNA'yı etkileyerek, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olur (220).

İleri yaşlarda ROS'nin doku ve organ üzerine zararlı etkileri sonucu kanser gibi birçok hastalık ortaya çıkar (86). İnvitro ve in vivo çalışmalar nöron kaybında apoptozisin önemli bir rol oynadığını, apoptozis mekanizmasında ise hipergliseminin neden olduğu oksidatif stresin yer aldığını ortaya koymuştur. Tip 1 DM'da nöronal yoğunluğun diyabetin süresi ile ters korelasyon gösterdiği, zaman ilerledikçe apoptozis kaynaklı nöronal kaybın arttığı bildirilmiştir (40, 41).

Streptozosin ile oluşturulmuş diyabette ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin hem periferik hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır (65, 66, 221, 222).

Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonradan lipid peroksidasyonunu katalizleyen serbest radikaller üretebilir (96, 223). Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (224).

Diyabetin oluşturduğu oksidatif strese rol oynayan serbest radikaller O_2^- , H_2O_2 , OH^- , NO 'dir. Ayrıca yapılan bir takım çalışmada diyabetin komplikasyonları ile lipid peroksidasyonu arasında ilişki ortaya konmuş, diyabette lipid peroksidasyonunun kontrolünün önemi vurgulanmıştır (34). Lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon sonrası meydana gelen ürünler membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine zarar vererek membran geçirgenliği ve mikrovizkozitesi anlamlı şekilde bozar (87, 225).

Hücre içindeki kalsiyumun sürekli artışı katabolik enzimlerin (özellikle fosfolipazlar, proteazlar ve endonükleazlar) uyarılmasına neden olur. Katabolik enzimlerin uyarılması sonucunda zardaki fosfolipitler bozulur. Hücre içi kalsiyum artması ile fosfolipaz A2 uyarılır ve aroşidonik asit salınır, böylece hücre hasarı oluşur. Proteazların uyarılması ile yapısal zar proteinleri yıkılır. Lipazların uyarılması ile lipid peroksidasyonu olur. Endonükleazların uyarılması ile genetik yapı bozulur. Prostaglandinler salınır, böylece mikrovasküler geçirgenlik ve

vazodilatasyon artar. Kalsiyum ayrıca nitrik oksit sentazı uyarır ve NO oluşumu artar, bu da ROS üretimini artırır (182). ROS üretimindeki artış, Ca^{+2} 'un hücre içine girişini arttırmasının yanında fosfotidilserinin oksidasyonuna ve plazma membranının dış yüzeyine translokasyonuna neden olur. Dolayısıyla ROS'nin fagositik yolda da görev aldığı ve apoptozisi indüklediği gözlenmiştir (181).

Pregabalin epilepsi, nöropatik ağrı ve jeneralize anksiyete bozukluğu tedavisinde kullanılan yakın zamanda geliştirilmiş bir moleküldür (4, 195). GABA'nın yapısal analogu olmasına rağmen GABA reseptörlerine bağlanmaz (197). PGB esas olarak VKKK'nın $\alpha 2\delta$ alt ünitesine bağlanır (226). Hipereksite nöronlarda VKKK'na potent olarak bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum akışını modüle ederek glutamat, noradrenalin ve substans P gibi pek çok eksitatör nörotransmitterin salınımını azaltır. Böylece postsinaptik reseptörlerin stimülasyonunda azalma oluşur ve nöronlar normal fizyolojik durumuna döner. PGB'in bağlanması ile ilgili önemli bir nokta, normal sinir fonksiyonu değişmezken ektoptik aktivitenin azalmasıdır (196, 197). Pregabalinin nöronal ekzotoksisteyi azalttığı yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (227).

Pregabalinin beyin korteks, hipokampus, amigdala, spinal kordda voltaj duyarlı kalsiyum kanallarının $\alpha 2\delta$ tip 1 alt ünitesine spesifik olarak bağlandığı genetik modifiye fare modelinde gösterilmiştir (195).

Çalışmamızda ilk olarak STZ enjeksiyonu ile deneysel diyabet oluşturulmuş, diyabetin oluşumu kan şekeri artışı kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Lipid peroksidasyon ürünlerinin de hem Tip 1 diyabetik ratların (228, 229) hem de Tip 2 diyabetik ratların beyinlerinde arttığı rapor edilmiştir (229). Aldehitlerden MDA ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (102, 103). MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir (93).

Çalışmamızda; DM grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0.05$). DM+ PGB grubu MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı ($p<0.05$). DM grubundaki yükselmenin DM+PGB grubundaki yükselmeye oranla istatistiksel olarak daha fazla yükseldiği saptandı. PGB grubu MDA değerleri ile kontrol grubu

MDA değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşmadı. Bu durum PGB'in diyabetik ratlarda MDA değerlerini azalttığı, dolayısıyla oksidatif stresi azaltarak apoptozis oranının da daha düşük değerlerde saptanmasını açıklamaktadır. Coşar ve ark. (230) STZ ile deneysel diyabet oluşturmuş ve ratların beyin dokusunda omega-3 yağ asidinin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada MDA, SOD ve KAT miktarları ile birlikte nöronal apoptotik değişiklikler incelenmiştir. Diyabetik grupta MDA, SOD ve KAT düzeylerinin ve apoptotik nöronların arttığını saptamıştır. Tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada diyabetli hastaların artmış serum KAT aktivitesine sahip oldukları vurgulanmaktadır (231).

Yapılan bir çalışmada diyabetik kişilerde SOD ve GPx düzeyleri kontrol grubundan daha yüksek bulunmuş ve insülin tedavisinden sonra ise SOD düzeyindeki artış devam ederken GPx düzeyinde azalma meydana gelmiştir (232). Tedavi sonrası dönemde SOD, GPx ve KAT düzeylerinde kontrole göre belirgin düşme olduğu belirtilmektedir (233). Şekeroğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada diyetle tedavinin sonrasında diyabetik kişilerde kan şekeri normale döndüğünde serum MDA düzeyinde düşme, eritrosit SOD ve GPx düzeylerinde ise artma olduğunu tespit etmişlerdir (128). Görüldüğü gibi yapılan çalışmalarda SOD aktivitesinin diyabette artabileceği, azalabileceği veya değişmeyebileceğini gösteren birçok çalışma mevcuttur.

Bizim çalışmamızda; SOD aktivitesi ölçümlerinde DM+PGB grubu değerleri hem kontrol, hem de DM grubu değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek saptandı. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. KAT aktivitesi bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. Ancak sayısal olarak DM grubunda KAT aktivitesi diğer gruplara göre daha düşük değerlerde saptandı.

Glutatyon peroksidaz GSH'yı yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur. Yapılan çalışmalarda diyabetli hastalarda serum GPx aktivitesinin azalmış olduğu rapor edilmektedir (234).

Çalışmamızda; DM grubu GPx değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük saptandı ($p<0.05$). DM+ PGB grubu GPx değerlerinde ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. GSH

analizinde ise DM grubunda diğer gruplara göre düşüş saptandığı ancak bu değer in istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı saptandı. Yaptığımız çalışma PGB'in diyabet sırasında antioksidan GPx enziminin kullanımını Seghrouchni ve ark. (232) çalışmalarına benzer şekilde azalttığını göstermektedir.

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını TUNEL yöntemi ile belirlenir. Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin regülasyonundan sorumludur. Bax immünreaktivitesi deneysel diyabette beyin dokusunda daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Xue ve ark. (235) STZ ile deneysel diyabet oluşturarak Bax immünreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Zhen-guo ve arkadaşları diyabetik sıçanlarda nöronal apoptozisin arttığını ve bu apoptozisin temelinde ise intrasitoplazmik kalsiyum birikimi ile mitokondrial disfonksiyon, reseptör ile olan veya olmayan mekanizmalar veya IGF aktivitesinin süpresyonu ile olan iskemi gibi değişik hücrel mekanizmaların olduğunu ortaya koymuşlardır (41).

Kaspaz-3 en önemli efektör kaspazlardan biridir ve başlatıcı kaspazla (kaspaz-8, kaspaz-9, kaspaz-10) aktive olarak proteolitik kaskadın başlamasına neden olur (161). Kaspaz-3 ölçümü apoptotik mekanizma çalışmalarının saptanmasında önem taşımaktadır (236). Artmış ROS kaspaz-3 aktivitesini arttırarak ve Bcl-2 gen ekspresyonunu azaltarak apoptozis mekanizmasında rol alır (237, 238).

Yapılan bir çalışmada diyabetik rat dalak dokusunun immunohistokimyasal olarak analizinde diyabetin kaspaz-3'ü arttırarak ve Bcl-2 ekspresyonunu baskılayarak apoptotik süreci aktive ettiği izlenmiştir. Bununla uyumlu şekilde diyabetik gruptaki kaspaz-3 mRNA (mesajcı ribonükleik asid) ekspresyonu kontrol grubuna göre artmış, Bcl-2 mRNA ekspresyonu ise anlamlı şekilde azalmış oldukları bulunmuştur (239).

Jakobsen ve ark. (240) ile Junker ve ark. (241) uzun süreli deneysel diyabetik sıçanlarda beyinde ışık ve elektron mikroskopik düzeyde nöronlarda dejenerasyon olduğunu ve astrositlerde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu çalışmamızdaki diyabetik grupta belirlenen nöronal dejenerasyon ve astrosit artışı bulguları ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda, farelerin beyin korteksinde yapılan TUNEL, bax ve kaspaz-3 immünohistokimyasal incelemelerin sonucunda; DM grubunda apoptotik hücrelerin

kontrole göre belirgin bir artış gösterdiği, DM+PGB grubunda ise apoptozis görülme sıklığının hem kontrole göre, hem de DM grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdiği izlenmiştir. PGB grubunda ise kontrol grubuna benzer şekilde bulgular elde edilmiştir.

Diyabetik nöropati diyabetik hastalardaki en sık görülen komplikasyonlardan olup önemli morbidite ve mortalite nedenidir (57). Pirart 4400 hastada geniş bir prospektif çalışma yapmış, diyabet saptandığı zamanki nöropati prevalansını %7,5, 25 yıl sonraki prevalansı ise yaklaşık %50 oranında saptamıştır. Bu çalışmada nöropatinin genç diyabetiklerde daha az görüldüğü ve 40 yaş üzerinde sıklığının belirgin olarak arttığı saptanmıştır (57, 56). İngiltere’de hastanede yatan klinik hastalarında yapılan geniş bir çalışmada, 6487 diyabetik hastanın %24’ünde belirgin nöropati, %2,6’sında aktif ayak ülserleri saptanmış, amputasyona giden hasta oranının ise %2,1 olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada en sık görülen nöropati formu distal duysal ve otonom polinöropati olarak saptandı. Diyabetik nöropati, başta periferik sinirler olmak üzere vücudun tüm sinirlerini etkilemekte ve her iki tip diyabette ortaya çıkmaktadır (242). Diyabetik nöropati mekanizması günümüze dek yapılan birçok çalışmaya rağmen net ortaya konulamamıştır. Yapılan çalışmalarda temel olarak nöropati patolojisinin temelinde enerji üretim metabolizmasındaki poliol yolağında meydana gelen bozulmanın yer aldığı varsayılmıştır (243).

Diyabetin bilinen diğer bir etkisi endonöral kan akımında azalma meydana getirmesidir. Bunun sonucunda periferik sinirlere ihtiyacı olan maddeler yeterince taşınmaz (244).

Periferik hücrelerde hipergliseminin kaspaz aktivitesini arttırdığı, SC’nde apoptozisi indüklediği, IGF-I’ün ise koruyucu etkisinin olduğu daha önce gösterilmiştir (245).

Literatürde, diyabetin geç dönem komplikasyonlarının deneysel diyabetik sıçan modellerinde 4. haftada belirgin bir şekilde görüldüğü belirtilmekte (246-248), fonksiyonel özelliklerin ise diyabetin 2. haftasından itibaren etkilenmeye başladığı sınırlı çalışmalarda ortaya konmaktadır (249, 250).

Hipergliseminin hücre üzerindeki zararlı etkilerini azaltmayı amaçlayan bir çok çalışma mevcuttur (251-254).

Çalışmamızda, PGB'in deneysel diyabet oluşturulan ratlarda siyatik sinirdeki etkileri değerlendirilmiştir. Histolojik incelemeler sonucunda DM grubunda akson çevresinde bulunan miyelin kılıf kaybı, kontrol grubuna göre belirgin artış göstermiştir. DM+PGB grubu histolojik incelemesinde ise kontrole göre miyelin kılıfında hasarın arttığı saptanmasına rağmen, DM grubuna kıyasla bu kılıf harabiyetinin daha az olduğu gözlemlendi.

Yeni kuşak bir antiepileptik olan PGB'in nöroprotektif özelliği olduğuna dair Andre ve ark. (255) bir çalışma yapmış, bu çalışmada Lityumpilokarpin modeli ile epilepsi modelinde PGB'in rat piriform korteksinin II. tabakası ve entorhinal korteksin III-IV. tabakalarında nöroprotektif özellik gösterdiğini ancak hipokampusta nöroprotektif olmadığını bildirmişlerdir.

Ha ve ark. (204) PGB'in ratlarda spinal kord hasarlanması sonrası nöroprotektif etki gösterdiğini bildirmiştir.

Pregabalin kalsiyum kanalının alfa-2-delta alt ünitesine potent olarak bağlandıktan sonra, depolarizasyonla indüklenmiş kalsiyum girişini azaltır ve dolayısıyla pek çok eksitatuvar nörotransmitterin salınımını azaltır. Hücre içi serbest Ca^{+2} 'un artışı, Ca^{+2} - bağımlı enzimleri (endonükleazlar ve fosfolipazlar) aktive ederek birçok farklı mekanizma ile apoptotik hücre ölümüne katkıda bulunur. Ayrıca PGB'in ratlarda yapılmış çalışmada spinal iskemi sonrası nöroprotektör etkisi olduğu gösterilmiştir (204). PGB'in muhtemelen ekstrasellüler glutamat konsantrasyonunu azaltması ve bunun sonucunda hücrel egzotoksiteyi önlemesi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada STZ verilen ratlarda beyinde hücrel hasar oluşmakta ve DM oksidatif hasar ile lipid peroksidasyonunu arttırmaktadır. DM'un oluşturduğu oksidatif hasarı engellemek için verilen PGB'in lipid peroksidasyonunu azalttığı, antioksidan kapasiteyi arttırdığı ve hücreleri yapısal olarak apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir. Ayrıca PGB'in intrasellüler Ca^{+2} miktarında azalma sağlayarak birçok katalitik enzimin aktivasyonunu engellediğini düşünmekteyiz. Bax ve kaspaz-3 aktivitelerini ölçen immünohistokimyasal incelemelerde PGB'in diyabetik ratlarda apoptozisi belirgin azalttığı gösterilmiştir. Diyabetik rat siyatik sinir histopatolojik incelemelerinde de beyin immünohistokimyasal incelemeleri ile korele bulgular elde edilmiştir.

Sonuç olarak; DM komplikasyonları ile beraber değerdendirildiğinde yüksek mortalite ve morbiditeye sahip bir hastalıktır. Hastanın özürölük gelişiminde önemli role sahip olan santral ve periferik sinir sistemi ile ilgili komplikasyonlarının önlenabilmesi ve erken tedavisi önemli yer tutmaktadır. Bu çalışma PGB'in DM'un santral olumsuz etkilerini azaltma potansiyeli yönünden anlamlı sonuçları olduğunu ileri sürmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJFP, Roemen THM, Vusse GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J* 2003; 371: 753-760.
2. Abou-Seif MA, Youssef AA. Evaluation of some biochemical changes in diabetic patients. *Clin Chim Acta* 2004; 346: 161-170.
3. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes-2013. *Diabetes Care* 2013; 36: 11-66.
4. Ben-Menachem E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. *Epilepsia* 2004; 45: 13-18.
5. Satman I, Yılmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. The TURDEP group: Population- based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: result of the Turkish diabetes epidemiology study. *Diabetes Care* 2002; 25: 1551-1556.
6. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047–1053.
7. Jabbour SA, Goldstein BJ. Sodium glucose co-transporter 2 inhibitors: blocking renal tubular reabsorption of glucose to improve glycaemic control in patients with diabetes. *Int J Clin Pract* 2008; 62: 1279-1284.
8. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
9. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2012; 35: 64-71.
10. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 841-852.

11. Alemzadeh R, Wyatt DT. Diabetes Mellitus. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB (editors). Nelson Textbook of Pediatrics. 17. Baskı, Pennsylvania: Elsevier Saunders, 2004; 58: 1947-1972.
12. Fiallo-Scharer RV, Eisenbarth GS. Pathophysiology of insulin-dependent diabetes. Pescovitz OH, Eugster EA (editors). Pediatric Endocrinology: Mechanism, Manifestations, and Management. 1. Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 411-426.
13. Morales AE, She JX, Schatz DA. Genetics of Type 1 Diabetes. Pescovitz OH, Eugster EA (editors). Pediatric Endocrinology. 1. Baskı, Philadelphia (USA): Lippincott Williams & Wilkins, 2004; 403-410.
14. Haller MJ, Atkinson MA, Schatz D. Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation, and management. *Pediatr Clin North Am* 2005; 52: 1553-1578.
15. Balasa B, Van Gunst K, Jung N, Balakrishna D, Santamaria P, Hanafusa T, et al. Islet-specific expression of IL-10 promotes diabetes in nonobese diabetic mice independent of Fas, perforin, TNF receptor-1, and TNF receptor-2 molecules. *J Immunol* 2000; 165: 2841-2849.
16. Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C, Halbwachs-Mecarelli L, Bach JF, Chatenoud L, et al. Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellular adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol* 2002; 168: 3641-3648.
17. Binder C, Brange J. Insulin chemistry and pharmacokinetics. Porte D, Sherwin RS (editors). *Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus*. 5. Baskı, Stamford: Appleton & Lange, 1997: 689-708.
18. Cabrera-Rode E, Sarmiento L, Tiberti C, Molina G, Barrios J, Hernández D, et al. Type 1 diabetes islet associated antibodies in subjects infected by echovirus 16. *Diabetologia* 2003; 46: 1348-1353.
19. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, Matis LA. The role of Fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997; 89: 17-24.
20. Norris AW, Wolfsdorf JJ. Diabetes Mellitus. Brook GDC, Clayton PE, Brown RS, Savage MO (editors). *Clinical Pediatric Endocrinology*. 5. Baskı, Massachusetts (USA): Blackwell Publishing Ltd, 2005: 436-491.

21. Rosenbloom AI, Silverstein JH. Diabetes in the child and adolescent. Lifshitz F (editors). Pediatric Endocrinology. 4. Baskı, New York (USA): Marcel Decker, 2003: 611-651.
22. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 237-243.
23. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik. 1. Baskı, Ankara: Medical Network & Nobel, 1996: 368-385.
24. Groop LC, Widén E, Ferrannini E. Insulin resistance and insulin deficiency in the pathogenesis of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: Errors of metabolism or of methods? Diabetologia 1993; 36: 1326-1331.
25. De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H (editors). International Textbook of Diabetes Mellitus. 2. Baskı, Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997; 81: 635-689.
26. Hatun Ş. Diabetes Mellitus. Katkı Pediatri Dergisi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Sağlığı Enstitüsü Yayını, 1997; 18: 92-108.
27. Pala Ö. Tip I DM Epidemiyolojisi, Patogenezi, Klinik, Komplikasyon ve Tedavisi. İstanbul: Turgut yayıncılık ve AŞ Kanaat Basımevi, 1997: 1-27.
28. Kandemir N, Açıkgöz E, Yordam N. The epidemiology of juvenile-onset insulin-dependent diabetes mellitus in Turkish children. A retrospective analysis of 477 cases. Turk J Pediatr 1994; 36: 191-195.
29. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Design and methodologic considerations for the feasibility phase. The DCCT Research Group. Diabetes 1986; 35: 530-534.
30. Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Sağlık Y (çeviren) s. 2109-2137, İstanbul, Nobel Kitapevleri, 2004.

31. Stratton MI, Adler IA, Neil WA, Matthews ND, Manley ES, Cull AC, et al. Rholman R on behalf of the UK Prospective Diabete Group Study. Association of glycemia macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS35). *BMJ* 2000; 321: 405-412.
32. Klin R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1995; 18: 258-268.
33. Jay D, Hitomi H, Griending KK. Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 183-192.
34. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-676.
35. Biessels GJ. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms. *The Neth J Med* 1999; 54: 35-45.
36. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542-549.
37. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1994; 37: 643-650.
38. Li ZG, Sima AA. C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2004; 5: 79-90.
39. Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 187-197.
40. Martínez-Tellez R, Gómez-Villalobos Mde J, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. *Brain Res* 2005; 1048: 108-115.
41. Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 2002; 3: 241-245.
42. Araki Y, Nomura M, Tanaka H, Yamamoto H, Yamamoto T, Tsukaguchi I, et al. MRI of the brain in diabetes mellitus. *Neuroradiology* 1994; 36: 101-103.

43. Unger JW, Klitzsch T, Pera S, Reiter R. Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord. *Exp Neurol* 1998; 153: 23-34.
44. Scott JN, Clark AW, Zochodne DW. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 1999; 122: 2109-2118.
45. Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologica* 2000; 43: 500-506.
46. Diabetes Mellitus Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Kitabı Ankara, 1997.
47. McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992; 41: 557-570.
48. Auer RN. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 1986; 17: 699-708.
49. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 113-124.
50. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology. Mol Cell Endocrinol* 2001; 25: 125-134.
51. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E. Brain insulin receptors and spatial memory. *J Biol Chem* 1999; 274: 34893-34902.
52. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci Biobehav Rev* 2001; 25: 311-325.
53. Terzi M, Cengiz N, Onar MK. Diyabetik nöropati. *OMÜ Tıp Dergisi* 2004; 21: 39-49.
54. Orhan Y. Diabetes Mellitus. Sencer E (editor). *Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 247-286.
55. King H, Aubert RF, Herman WH. Global burden of diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
56. Özer F. Diyabetik nöropati. Yenigün M (editor). *Her Yönüyle Diabetes Mellitus*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 417-465.

57. Duby JJ, Campbell RK, Setter SM, White JR, Rasmussen KA. Diabetic neuropathy: An intensive review. *Am J Health-Syst Pharm* 2004; 61: 160-176.
58. Vinik AI, Mehrabyan A. Diabetic neuropathies. *Med Clin N Am* 2004; 88: 947-999.
59. Wein TE, Albers JW. Diabetic neuropathies. *Phys Med Rehab Clin N America* 2001; 12: 307-317.
60. Shaw JE, Zimmet PZ, Gries FA, Ziegler D. Epidemiology of diabetic neuropathy. Gries FA, Cameron NA, Low PA, Ziegler D (editors). *Textbook of Diabetic Neuropathy*. Newyork: Sigma Publ, 2003: 64-79.
61. Boru UT, Alp R, Sargin H, Koçer A, Sargin M, Luleci A, Yayla A. Prevalence of Peripheral Neuropathy in Type 2 Diabetic Patients Attending a Diabetes Center in Turkey. *Endocr J* 2004; 51: 563-567.
62. Maser RE, Steenkiste AR, Dorman JS, Nielsen VK, Bass EB, Manjoo Q, et al. Epidemiological correlates of diabetic neuropathy. Report from Pittsburgh Epidemiology of Diabetes Complications Study. *Diabetes* 1989; 38: 1456-1461.
63. Stewart JD, McKelvey R, Durcan L, Carpenter S, Karpati G. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIPD) in diabetics. *J Neurol Sci* 1996; 142: 59-64.
64. Jennifer AT, James BD. The spectrum of diabetic neuropathies. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2008; 19: 1-26.
65. Birrell AM, Heffernan SJ, Ansselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, et al. Functional and structural abnormalities in the nerves of type 1 diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.
66. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-788.
67. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive diabetes therapy on the development and progression of neuropathy. *Ann Intern Med* 1995; 122: 561-568.
68. Said G. Diabetic neuropathy: on updata. *J Neurol* 1996; 243: 431-440.

69. Parita P, Allison M. Diabetes Mellitus: Diagnosis and screening. *Am Fam Physician* 2010; 81: 863-870.
70. Kayaalp O. Glukoz transportunun ve metabolizmasının düzenlenmesi. *Tıbbi Farmakoloji*. 9. Baskı, Ankara: Hacettepe Taş, 2000: 1260-1262.
71. Sima AF. Metabolic alterations of peripheral nerve in diabetes. *Semin Neurol* 1996; 16: 129-137.
72. El-Missiry MA, El Gindy AM. Amelioration of alloxaninduced diabetes mellitus and oxidative stress in rats by oil of *Eruca sativa* seeds. *Ann Nutr Metab* 2000; 44: 97-100.
73. Sanders RA, Rauscher FM, Watkins JB 3rd. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001; 15: 143-149.
74. Wunderlich RP, Peters EJG, Bosma J, Armstrong DG. Pathophysiology and treatment of painful diabetic neuropathy of the lower extremity. *South Med J* 1998; 91: 894-898.
75. Rabini RA, Petrucci E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M, Mazzanti L. Diabetes mellitus and subjects' ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activities in human erythrocytes. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 327-332.
76. Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes Mellitus'lu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2004; 29: 237-242.
77. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-866.
78. Way KJ, Katai N, King GL. Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet Med* 2001; 18: 945-959.
79. Zochodne DW. Neurotrophins and other growth factors in diabetic neuropathy. *Semin Neurol* 1996; 16: 153-159.

80. Younger DS, Bronfin L. Overview of diabetic neuropathy. *Semin Neurol* 1996; 16: 107-113.
81. Asato F, Butler M, Blomberg H, Gordh T. Variation in rat sciatic nerve anatomy: implications for a rat model of neuropathic pain. *J Peripher Nerve Syst* 2000; 5: 19-21.
82. Green EC. *Anatomy of the Rat*. New York: Hafner Publishing, 1963: 127-133.
83. Fitzgerald MJT, Folan-Curran J (editors). *Peripheral nerves. Clinical neuroanatomy and related neuroscience*. 4. Baskı, Edinburgh: Saunders Pres, 2002: 65-72.
84. Snell R (editor). *Nerve fibers, peripheral nerves, receptor and effector endings, dermatomes and muscle activity. Clinical neuroanatomy*. 6. Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 69-132.
85. Okutan O. Periferik sinir sisteminin anatomisi. Demircan N, Zileli M (editors). *Periferik Sinir Cerrahisi*. 1. Baskı, Ankara: Türk Nöroşirurji Derneği, 2008: 7-26.
86. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
87. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
88. Warner DS, Sheng H, Batinic-Haberle I. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *J Exp Biol* 2004; 207: 3221-3231.
89. Şener G, Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik gelişim* 2008: 5-13.
90. Brouns R, De Deyn PP. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2009; 111: 483-495.
91. Rodríguez-Yáñez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol* 2008; 21: 353-357.
92. Rahman A, Üstünda B, Özercan İH, Burma O, Çekirdekçi A, Özveren MF, Uyar İS. Global serebral iskemi sonrası reperfüzyon hasarını azaltmada flavinoidlerin rolü. *TGKDÇD* 1999; 7: 6, 430-434.

93. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikaller ve antioksidanlar. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005; 3: 30-39.
94. Popovic M, Biessels GJ, Isaacson RL, Gispen WH. Learning and memory in streptozotocin-induced diabetic rats in a novel spatial/object discrimination task. Behav Brain Res 2001; 122: 201-207.
95. Stewart R, Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus, cognitive impairment and dementia. Diabet Med 1999; 16: 93-112.
96. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. Diabetologia 1993; 36: 1212-1213.
97. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. Diabetic complications 2001; 77: 1-18.
98. Doroty J, Vander J, Jason MH. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. Clin Biochem 2001; 34: 265-270.
99. Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, Koca C, Tutkun F, Özçelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. Indian J Biochem and Biophys 2003; 40: 447-450.
100. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. Neurosci Res Commun 1997; 21: 41-48.
101. Strain JJ. Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes. Proc Nutr Soc 1991; 50: 591-604.
102. Halliwell B. Oxidants and Central Nervous System: Some Fundamental Questions Acta Neurol Scand Suppl 1989; 126: 23-33.
103. Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. Mayo Clin Proc 1988; 63: 381-389.
104. Komers R, Oyama TT, Chapman JG, Allison KM, Anderson S. Effects of systemic inhibition of neuronal nitric oxide synthase in diabetic rats. Hypertension 2000; 35: 655-661.

105. Vries LS, Larocche JC, Levene MI. Cerebral ischaemic lesions. Levene MI, Bennett MJ, Punt J (editors). *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. 1. Baskı, Edinburg: Churchill Livingstone, 1988: 326-338.
106. Kjellmer I. Prenatal and intrapartum asphyxia. Levene MI, Bennett MJ, Punt J (editors). *Fetal and Neonatal Neurology and Neurosurgery*. 1. Baskı, Edinburg: Churchill Livingstone, 1988: 357-392.
107. Johnston MV. Excitotoxicity in neonatal hypoxia. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2001; 7: 229-234.
108. Choi DW, Rothman SW. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxicischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 1990; 13: 171-82.
109. Johnston MV, Trescher WH, Ishida A, Nakaji W. Neurobiology of hypoxic-ischemic injury in the developing brain. *Pediatr Res* 2001; 49: 735-741.
110. Hossain MA. Molecular mediators of hypoxic–ischemic injury and implications for epilepsy in the developing brain. *Epilepsy Behav* 2005; 7: 204-213.
111. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000; 398: 139-146.
112. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 217-223.
113. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8.
114. Rousselot DB, Bastard JP, Jaudon MC. Consequences of the diabetic status on the oxidant /antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000; 26: 163-176.
115. Türk Diabet Cemiyeti ve Türk Diabet Vakfı. *Türk Diabet Yıllığı 2002-2003*. İstanbul, 2003: 119-28.
116. Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Fieldman EL, Freeman R, et al. Diabetic neuropathies. *Diabetes Care* 2005; 28: 956-962.

117. Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; 44: 129-146.
118. Boulton AJM, Malik RA, Arezzo JC, Sosenko JM. Diabetic somatic neuropathies. *Diabetes Care* 2004; 27: 1458-1486.
119. Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia* 2001; 44: 659-673.
120. Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1271-1281.
121. He Z, King GL. Microvascular complication of diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2004; 33: 215-238.
122. Yagihashi S, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 1: 184-189.
123. Yeh LA, Ashton MA. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reversed by oral sorbinil. *Metabolism* 1990; 39: 619-622.
124. De Matia G, Laurenti O, Bravi C. Effect of aldose reductase inhibition on glutathione redox status in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 965-968.
125. Stern DM, Schimdt AM. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. *TIPS* 2000; 31: 367-369.
126. Mizisin AP, Powell HC. Pathogenesis and pathology of diabetic neuropathy. Gries FA, Cameron NA, Low PA, Ziegler D (editors.). *Textbook of Diabetic Neuropathy*. Newyork: Sigma Publ, 2003: 83-169.
127. Scribner KA, Akana SF, Walker CD, Dallman MF. Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* 1993; 133: 2667-2674.
128. Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and

serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Biochem 2000; 33: 669-674.

129. Masella R, Benedetto RD, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. J Nutr Biochem 2005; 16: 577-586.
130. Akkoç H. Miyokardiyal İskemi Reperfüzyon Hasarı. Dicle Tıp Dergisi 2008; 35: 211-215.
131. Rice-Evans CA. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. Rice-Evans CA, Burdon RH (editors). Free radical damage and its control. England: Elsevier Science Press, 1994: 131-153.
132. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. Biochem Pharmacol 1995; 49: 1341-1348.
133. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001; 54: 176-186.
134. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 2002; 21: 200-204.
135. Taysi S, Gul M, Sari RA, Akcay F, Bakan N. Oxidant/antioxidant status in serum of patients with systemic lupus erythematosus. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 684-688.
136. Habif S, Turgan N, Mutaf I, Aytaçlar F, Hamulu F, Bayındır O, Yılmaz C. Plasma catalase, glutathione peroxidase and selenium levels in adult diabetic patients. Tr J Med Sci 1997; 27: 139-141.
137. Taysi S, Kocer I, Memisogullari R, Kiziltunc A. Serum oxidant/antioxidant status in patients with Behcet's disease. Ann Clin Lab Sci 2002; 32: 377-382.
138. Sözmen EY. Yaşlanma Biyokimyası. Onat T, Emerk K, Sözmen EY (editors). İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002: 665-674.
139. Steinberg FM, Chait A. Antioxidant vitamin supplementation and lipid peroxidation in smokers. Am J Clin Nutr 1998; 68: 319-327.

140. Van Haaften RI, Evelo CT, Penders J, Eijnwachter MP, Haenen GR, Bast A. Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by tocopherols and alpha-tocopherol derivatives. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1548: 23-28.
141. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-992.
142. Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 111-120.
143. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000; 108: 317-330.
144. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-245.
145. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005; 5: 12.
146. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: Programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ* 1995; 2: 87-96.
147. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
148. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
149. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-1456.
150. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
151. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, et al. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263: 1759-1762.
152. Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of the tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; 83: 793-802.

153. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 433-435.
154. Khosravi-Far R, Esposti MD. Death receptor signals to mitochondria. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 1051-1057.
155. Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy Behav* 2005; 7: 3-11.
156. Li T, Fan Y, Luo Y, Xiao B, Lu C. In vivo delivery of a XIAP (BIR3-RING) fusion protein containing the protein transduction domain protects against neuronal death induced by seizures. *Exp Neurol* 2006; 197: 301-308.
157. Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1557-1572.
158. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP, Lozyk M, Goping IS, et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 731-740.
159. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 33869-33874.
160. Slee EA, Adrain C, Martin SJ. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001; 276: 7320-7326.
161. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 1998; 391: 96-99.
162. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 1997; 272: 26159-26165.
163. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 621-632.

164. Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-495.
165. Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular apoptosis: A discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 1996; 88: 386-401.
166. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.
167. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028-1042.
168. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 821-846.
169. Thornberry NA. The caspase family of cysteine proteases. *Br Med Bull* 1997; 53: 478-490.
170. Krauss G. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Darmstadt: Wiley-Vch 2001: 456-467.
171. Zheng TS, Hunot S, Kuida K, Momoi T, Srinivasan A, Nicholson DW, et al. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 2000; 6: 1241-1247.
172. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768-774.
173. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 120-129.
174. Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (NY)* 1994; 12: 487-493.
175. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-1375.
176. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.

177. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995; 6: 3-16.
178. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. *Trends Cell Biol* 1998; 8: 267-271.
179. Boya P, Morales MC, Gonzalez-Polo RA. The chemopreventive agent N-(4-hydroxyphenyl) retinamide induces apoptosis through a mitochondrial pathway regulated by proteins from the Bcl-2 family. *Oncogene* 2003; 22: 6220-6230.
180. Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, et al. ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res* 2003; 283: 156-66.
181. Kagan VE, Gleiss B, Tyurina YY. A role for oxidative stress in apoptosis: Oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 2002; 169: 487-499.
182. Rodrigo J, Fernandez AP, Serrano J, Peinado MA, Martinez A. The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia. *Free Radic Biol Med* 2005; 39: 26-50.
183. Dawson DA. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of actions and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1994; 6: 299-324.
184. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. Kopman WJ (editor). *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. 14. Baskı, New York: Lippincott Williams&Wilkins, 2001.
185. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
186. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, Schoen FJ (editors). *Cell Injury and Cell Death*. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6. Baskı, Philadelphia: WB Saunders, 1999: 18-25.
187. Nakano R. Apoptosis: gene-directed cell death. An overview. *Horm Res* 1997; 48: 2-4.
188. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

189. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1101-1109.
190. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003: 15-26.
191. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
192. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-1538.
193. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-1777.
194. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptozis. *Sendrom* 2001; 13: 102-107.
195. Bian F, Li Z, Offord J, Davis MD, McCormick C, Taylor CP, et al. Calcium channel alpha2-delta type 1 subunit is the major binding protein for pregabalin in neocortex, hippocampus, amygdala, and spinal cord: an ex vivo autoradiographic study in alpha2-delta type 1 genetically modified mice. *Brain Res* 2006; 1075: 68-80.
196. Ceyhan M, Tan E, A new anticonvulsant pregabalin. *Preclinical Data. TJN* 2008; 14: 161-171.
197. Kavoussi R. Pregabalin: From molecule to medicine. *Eur Neuropsychopharmacol* 2006; 16: 128-133.
198. Luszczki JJ. Third-generation antiepileptic drugs: mechanisms of action, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Rep* 2009; 61: 197-216.
199. Araç N. Nöropatik ağrı tedavisinde antiepileptik ilaçların yeri. Tan E (editor). *Nöropatik Ağrı. 3. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 311-328.*
200. Tassone DM, Boyce E, Guyer J, Nuzum D. Pregabalin: a novel gammaaminobutyricacid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onsetseizures, and anxiety disorders. *Clin Ther* 2007; 29: 26-48.
201. Brandt C, May TW, Pohlmann-Eden B, Nieder E, Elsner H, Witte-Boelt K, Schuermann I, Ebner A. Retention rate of pregabalin in drug-resistant epilepsy: 1-

- year follow-up, single-centre observation in 105 consecutive, adult patients. *Seizure* 2009; 18: 634-638.
202. Richter RW, Portenoy R, Sharma U, et al. Relief of painful diabetic peripheral neuropathy with pregabalin: a randomized, placebo-controlled trial. *J Pain* 2005; 6: 253-260.
 203. Siddall PJ, Cousins MJ, Otte A, Griesing T, Chambers R, Murphy TK. Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: a placebo-controlled trial. *Neurology* 2006; 67: 1792-1800.
 204. Ha KY, Kim YH, Rhyu KW, Kwon SE. Pregabalin as a neuroprotector after spinal cord injury in rats. *Eur Spine J* 2008; 17: 864-872.
 205. Matkovics B, Szabo I, Varga IS. Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways (in Hungarian). *Lab Diag* 1988; 15: 248-249.
 206. Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of products of lipid peroxidation in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359-364.
 207. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
 208. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Bioch Bioph Res Com* 1976; 71: 952-958.
 209. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymology* 1984; 105: 121-126.
 210. Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
 211. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr ALL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
 212. Lowe J. Techniques in neuropathology. Bancroft JD, Stevens A (editors). *Theory and Practise of Histological Techniques*. 4. Baskı, Edinburg: Churchill Livingstone, 1996: 341-381.
 213. Sözen T. Diyabetin kronik komplikasyonları. İliçin G, Biberoğlu K, Süleymanlar G, Ünal S (editors). *İç Hastalıkları*. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2003: 2321-2323.

214. Li WA, Moore-Langston S, Chakraborty T, Rafols JA, Conti AC, Ding Y. Hyperglycemia in stroke and possible treatments. *Neurol Res* 2013; 35: 479-491.
215. Li WA, Moore-Langston S, Chakraborty T, Rafols JA, Conti AC, Ding Y. Hyperglycemia in stroke and possible treatments. *Neurol Res* 2013; 35: 479-491.
216. Kageyama K, Yamagata S, Akimoto K, Sugiyama A, Murasawa S, Suda T. Action of glucagon-like peptide 1 and glucose levels on corticotropin-releasing factor and vasopressin gene expression in rat hypothalamic 4B cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 362: 221-226.
217. Li J, Deng J, Sheng W, Zuo Z. Metformin attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in obese, leptin-resistant mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 101: 564-574.
218. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512: 121-134.
219. Tang WH, Martin KA, Hwa J. Aldose reductase, oxidative stress, and diabetic mellitus. *Front Pharmacol* 2012; 3: 87.
220. Perez YS, Legleu CC, Cuellar CG, Carreon JP, Garcia SH, Neyoy MS, et al. Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of Preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer letters* 2005; 217: 25-32.
221. Tamaddonfard E, Farshid AA, Asri-Rezaee S, Javadi S, Khosravi V, Rahman B, Mirfakhraee Z. Crocin improved learning and memory impairments in streptozotocin-induced diabetic rats. *Iran J Basic Med Sci* 2013; 16: 91-100.
222. Pamidi N, Satheesha Nayak BN. Effect of streptozotocin induced diabetes on rat hippocampus. *Bratisl Lek Listy* 2012; 113: 583-588.
223. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee L. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932-939.

224. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 1992; 50: 335-339.
225. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1229-1234.
226. Taylor CP, Angelotti T, Fauman E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res* 2007; 73: 137-150.
227. Bissels GJ, Heide LP, Kamal A. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 2002; 441: 1-14.
228. Huang CW, Lai MC, Cheng JT, Tsai JJ, Huang CC, Wu SN. Pregabalin attenuates excitotoxicity in diabetes. *PLoS One* 2013; 8: 65154.
229. Reagan LP, Yee DK, Swzeda LI. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res* 2000; 862: 292-300.
230. Cosar M, Songur A, Sahin O, Uz E, Yilmaz R, Yagmurca M, Ozen OA. The neuroprotective effect of fish n-3 fatty acids in the hippocampus of diabetic rats. *Nutr Neurosci* 2008; 11: 161-166.
231. Memisogullari R, Taysi S, Bakan E, Capoglu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. *Cell Biochem Func* 2003; 21: 291-296.
232. Seghrouchni I, Draï J, Bannier E, Riviere J, Calmard P, Garcia I, et al. Oxidative stress parameters in Type I, Type II and insulin-treated Type II Diabetes Mellitus; insulin treatment efficiency. *Clin Chim Acta* 2002; 321: 89-96.
233. Aydin A, Orhan H, Sayal A, Ozata M, Sahin G, Isimer A. Oxidative stress and NO related parameters in Type II Diabetes Mellitus: effects of glycemic control. *Clin Biochem* 2001; 34: 65-70.

234. Komosin'ska-Vassev K, Olczyk K, Olczyk P, Winsz-Szczotka K. Effects of metabolic control and vascular complications on indices of oxidative stress in Type II diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2005; 65: 207-216.
235. Xue H, Jin L, Jin L, Zhang P, Li D, Xia Y, et al. Neuroprotection of aucubin in primary diabetic encephalopathy. *Sci China C Life Sci* 2008; 51: 495-502.
236. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2003; 43: 20-29.
237. Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH_m). *Brain Res Bull* 2004; 62: 497-504.
238. Pugazhenth S, Nesterova A, Jambal P, Audesirk G, Kern M, Cabell L, et al. Oxidative stress-mediated downregulation of bcl-2 promoter in hippocampal neurons. *J Neurochem* 2003; 84: 982-996.
239. Aktuğ H, Kosova B, Yavaşoğlu A, Çetintaş VB. Evaluation of caspase-3 and bcl-2 expressions in spleen tissue of streptozotocin-induced diabetic rats by immunohistochemistry and quantitative RT-PCR. *J Ege Med* 2010; 49: 1-6.
240. Jakobsen J, Sidenius E, Gundersen HJG, Osterby R. Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1987; 36: 597-601.
241. Junker U, Jaggi C, Bestetti G, Rossi GL. Basement membrane of hypothalamus and cortex capillaries from normotensive and spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol* 1985; 65: 202-208.
242. Thomas PK. Diabetic neuropathy: models, mechanisms and mayhem. *Can J Neurol Sci* 1992; 19: 1-7.
243. Tomlinson DR, Gardiner NJ. Diabetic neuropathies: components of etiology. *J Peripher Nerv Syst* 2008; 13: 112-121.
244. Siemionow M, Demir Y. Diabetic neuropathy: pathogenesis and treatment. *J Reconstr Microsurg* 2004; 20: 241-252.

245. Delaney CL, Russell JW, Cheng HL, Feldman EL. Insulin-like growth factor-I and overexpression of Bcl-xL prevent glucose-mediated apoptosis in Schwann cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60: 147-160.
246. Moriwaki Y, Inokuchi T, Yamamoto A, Ka T, Tsutsumi Z, Takahashi S, Yamamoto T. Effect of TNF-alpha inhibition on urinary albumin excretion in experimental diabetic rats. *Acta Diabetol* 2007; 44: 215-218.
247. Patumraj S, Wongeakin N, Sridulyakul P, Jariyapongskul A, Futrakul N, Bunnag S. Combined effects of curcumin and vitamin C to protect endothelial dysfunction in the iris tissue of STZ induced diabetic rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006; 35: 481-489.
248. Tong YC, Cheng JT. Changes in bladder nerve-growth factor and p75 genetic expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *BJU Int* 2005; 96: 1392-1396.
249. Sima AA. New insights into the metabolic and molecular basis for diabetic neuropathy. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 2445-2464.
250. Arezzo JC, Zotova E. Electrophysiologic measures of diabetic neuropathy: mechanism and meaning. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 229-255.
251. Yamamoto H, Shimoshige Y, Yamaji T, Murai N, Aoki T, Matsuoka N. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuropharmacology* 2009; 57: 403-8.
252. Zhang W, Li R, Li J, Wang W, Tie R, et al. Alpha-Linolenic Acid exerts an endothelial protective effect against high glucose injury via PI3K/Akt pathway. *PLoS One* 2013; 8: 68489.
253. Salkovic-Petrisic M, Knezovic A, Hoyer S, Riederer P. What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research. *J Neural Transm* 2013; 120: 233-52.
254. Darsalia V, Mansouri S, Ortsäter H, Olverling A, Nozadze N, Kappe C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats. *Clin Sci* 2012; 122: 473-83.

- 255.** Andre V, Dube C, Francois J, Leroy C, Rigoulot MA, Roch C, et al. Pathogenesis and pharmacology of epilepsy in the lithium-pilocarpine model. *Epilepsia* 2007; 48: 41-47.

6. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Adana'da doğdum. İlköğrenimimi Bahçelievler İlköğretim Okulu ve Mithat Paşa İlköğretim okulunda tamamladım. Lise öğrenimimi Adana Erkek Lisesi'nde bitirdikten sonra 2001 yılında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım. 2007 yılında mezun olduktan sonra Kilis Musabeyli İlçe Hastanesi ve Türkoğlu F.T.R Hastanesinde çalıştım. 2009 Eylül ayında Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak Fırat Üniversitesi Nöroloji ABD'da uzmanlık eğitimime başladım ve halen devam etmekteyim.