

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

**DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN BEYİN DOKUSUNDAKİ  
APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE TIYAMİNİN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Yahya AKALIN**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Serpil BULUT**

**ELAZIĞ  
2011**

**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.

Prof. Dr. Serpil BULUT

**Danışman**

\_\_\_\_\_

**Uzmanlık Sınavı 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 Prof. Dr. Serpil BULUT'a, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Nöroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Doç. Dr. M. Said BERİLGİN ve Yrd. Doç. Dr. Caner Fevzi DEMİR'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, yine katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyeleri Doç. Dr. Özlem DABAK ve Doç. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU hocalarıma, tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Uzm. Dr. Selçuk İLHAN'a, Nöroloji Anabilim dalında birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, hemşire hanımlara ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Doğduğum günden beri sevgi, şefkat ve dualarıyla her zaman yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca tez çalışmam esnasında, varlığından huzur ve güven duyduğum sevgili eşim Dt. Sibel Yüksel AKALIN'a sonsuz sevgi ve şükranlarımı sunarım.

## ÖZET

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, kan glukoz seviyesinin yüksekliği ile karakterize kronik, hiperglisemik, metabolik bir hastalıktır. Uzun süreli diyabette ortaya çıkan serebral değişiklikler nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif bozukluklar şeklinde kendini göstermektedir.

Tiyamin veya B1 vitamini B vitamin ailesinin bir üyesidir. Tiyamin metabolik sistemlerde başlıca tiyamin pirofosfat şeklinde görev yapar. Tiyamin, karbonhidratların ve çoğu aminoasitlerin son katabolizmaları için gereklidir. Yapılan çalışmalarda tiyaminin antioksidan etkileri gösterilmiştir. Bu çalışmada, streptozosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik rat modelinde beyindeki apoptotik değişiklikler üzerine tiyaminin koruyucu etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 21 adet  $238 \pm 8$  gr ağırlığında, 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanıldı. Tüm gruplar 6 haftalık deney süresince standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda (Grup I) bu ratlar, sadece ad libitum yem ve su aldılar. Diğer 2 gruba diyabet oluşturmak için 50 mg/kg dozunda Streptozosin, intraperitoneal olarak tek doz uygulandı. Deneysel diyabet oluştuğu belirlendikten sonra Grup II diyabetik ratlar sadece standart yem ve su alırken Grup III'ü oluşturan diyabetik ratlara 6 hafta boyunca tiyamin (25 mg/kg/gün dozunda) oral olarak verildi. 6 haftalık tedaviden sonra tüm gruplardaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından ratların beyin dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokuları histolojik çalışma için % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Histolojik çalışma için rutin ışık mikroskobu takibi yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5µm lik kesitler alındı. Alınan kesitlere apoptotik değişiklikleri incelemek için immünohistokimyasal ve TUNEL boyama yapıldı.

Grup II'nin beyin dokularında bax immun reaktivitesinde belirgin artış gözlemlendi. Grup III'deki bax ekspresyonu genel anlamda Grup I ile benzerlik gösterirken Grup II'den daha az şekilde olduğu gözlemlendi.

Her üç grupta da TUNEL pozitif hücrelerin yaygınlığı bax pozitif hücrelerin yaygınlığıyla paralellik gösterdi. Işık mikroskopik incelemelerde Grup II'de Grup I'e

oranla fazla sayıda TUNEL pozitif hücre saptandı. Tiyamin ile tedavi edilen Grup III'ün beyin kesitleri Grup II'ye göre daha az sayıda TUNEL pozitif hücreye sahipti. Grup III ve Grup I arasında anlamlı farklılık yoktu.

Sonuç olarak, beyin dokusunda DM'un oluşturduğu apoptotik değişikliklere karşı tiyaminin koruyucu olduğu gözlemlendi. Diyabetin serebral komplikasyonlarını önlemek amacıyla Tiyamin ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının denenmesinin yararlı olabileceği ve bu konuda ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus, Tiyamin, Beyin, Apoptozis.

## **ABSTRACT**

### **THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF THIAMINE ON THE APOPTOTIC ALTERATIONS IN THE EXPERIMENTAL DIABETIC RAT BRAIN TISSUE**

Diabetes mellitus is a hyperglycemic metabolic, chronic disorder characterized by high blood glucose levels, that result from deficiency of insulin secretion or effects of insulin or both of them. Overtime diabetes cause cerebral changes which appear as neurochemical, electrophysiological, structural and cognitive disorders.

Thiamin or vitamin B1 is a member of the B vitamin family. Thiamine, known as B1 vitamin, acts in thiamin pyrophosphate form during metabolic processes. Thiamin is necessary in the catabolism of Carbonhidrates and most of amino acid. It is observed in experimental studies that thiamin has antioxidant properties. In this study, it was investigated the protective effects of thiamin on apoptotic changes of rat brain in a diabetic rat model induced streptozosin.

Twenty-one adult male Wistar albino rats, with body weight of  $238 \pm 8$  gr, were used. All rats were recived Standard chow and water ad libitum during experimental period. Rats were randomly divided into three groups with seven rats per gruop. Rats in group I, used as control, were recived just standard chow and water ad libitum. Rats in group II and Group III were injected intraperitoneal streptozotocin (50mg/kg) to establish diabetes mellitus rat model. After confirmed of experimental diabetes mellitus, diabetic animals in Group II were recived just standard chow and water wheras diabetic rats of group III were recived thiamin (25mg/kg/day, oral) for six week.

After treatment for six week, all of rats weighed and then decapitated. The brains were quickly removed and fixed in 10% formalin for 24 h and embedded with parafin. Parafin blocks were sliced into  $5\mu\text{m}$  sections to observe apoptotic changes using TUNEL and immunohistochemical(Bax) tecniques.

Bax immunoreactivity of group II(DM) brain tissues increased significantly. The expression of Bax in group III (DM + thiamin) was generally similar to that in group I controls and less than group II.

Prevalance of TUNEL – positive cells consistent with prevalance of Bax-positive cells in all three groups. In the light microscopic examination, there was a significantly greater number of TUNEL-positive cells in the group II (DM) than in the group I. Brain sections of thiamine –treated groupIII had less TUNEL-positive cells compared to brain sections of diabetic group II. There was no significant difference between the group III and group I.

In conclusion, it is observed that thiamin has protective effects against DM-induced apoptotic changes in the brain tissues. To prevent DM-induced cerebral complications, thiamine treatment may be useful and there is necessity advanced research about this.

**Key Words:** Diabetes mellitus, Thiamine, brain, apoptosis

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes Mellitus	2
1.1.1. Tanım	2
1.1.2. Epidemiyoloji	2
1.1.3. Tanı	2
1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması	3
1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	4
1.1.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi	4
1.1.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	5
1.1.4.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi	5
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	5
1.1.6. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonları	6
1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonlarının Patogenezi	10
1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogeneziyle Olan Bağlantılar	11
1.1.6.1.2. Beyin Yaşlanmasının Patogeneziyle Olan Bağlantılar	12
1.1.6.1.3. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü	13
1.1.6.1.4. Hipogliseminin Etkileri	13
1.2. Oksidatif Stres	14
1.2.1. Diyabet ve Oksidatif Stres	14
1.2.2. Anti-Oksidanlar	15
1.3. Apoptozis	17
1.3.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi	17
1.3.2. Apoptozisin Regülasyonu	18

	<b><u>Sayfa No</u></b>
1.3.2.1. p53'ün Rolü	18
1.3.2.2. Bcl-2/Bax	18
1.3.2.3. Kaspazlar	18
1.3.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu	19
1.3.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi	19
1.3.3.2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu	19
1.3.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)	19
1.3.5. Hastalıklarda Apoptozis	19
1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	20
1.3.6.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri	21
1.3.6.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı	21
1.3.6.1.2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı	21
1.3.6.1.3. Elektron Mikroskobu	21
1.3.6.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu:	22
1.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler	22
1.3.6.2.1. Anneksin V Yöntemi	22
1.3.6.2.2. TUNEL Yöntemi	22
1.3.6.2.3. M30 Yöntemi	23
1.3.6.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi	23
1.3.6.3. Biokimyasal Yöntemler	23
1.3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi:	23
1.3.6.3.2. "Western" Blotting	23
1.3.6.3.3. "Flow" Sitometri	23
1.3.6.4. İmmünolojik Yöntemler	23
1.3.6.4.1. ELISA	23
1.3.6.4.2. Flourimetrik Yöntem	24
1.3.6.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	24
1.3.6.5.1. DNA Microarrays	24
1.4. Tiyamin ve Etkileri	24
1.4.1. Tiyaminin Tarihçesi	24
1.4.2. Tiyaminin Kimyasal Yapısı, Özellikleri ve Antagonistleri	25
1.4.3. Tiyaminin Metabolizması	26
1.4.3.1. Sindirimi, Emilmesi ve Taşınması	26
1.4.3.2. Fosforilasyonu	26

	<b>Sayfa No</b>
1.4.3.3. Depolanması ve Boşaltımı	27
1.4.4. Tiyaminin Fonksiyonları	27
1.4.4.1. Koenzim fonksiyonu	27
1.4.4.2. Nörofizyolojik Fonksiyonu	30
1.4.5. Tiyaminle ilgili klinik durumlar	30
1.4.6. Tiyaminin Toksisitesi	31
1.4.7. Tiyamin ve oksidatif stres	31
1.4.8. Antioksidanlar tiyamin eksikliğine karşı koruma sağlar	33
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>34</b>
2.1. Deney Hayvanları	34
2.2. Diyabet İndüksiyonu	34
2.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	35
2.4. Örneklerin Alınması	35
2.5. Biyokimyasal Çalışma	36
2.5.1. Kan glukoz düzeyleri	36
2.6. Histolojik Çalışma	36
2.7. İmmünohistokimyasal Çalışma	36
2.8. TUNEL Metodu	38
2.9. İstatistiksel Analiz	40
<b>3. BULGULAR</b>	<b>41</b>
3.1. Klinik Bulgular	41
3.2. Biyokimyasal Bulgular	41
3.2.1. Kan glukoz düzeyleri	41
3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular	42
3.4. TUNEL Bulgular	44
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>47</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>52</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>67</b>

## TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
<b>Tablo 1.</b> DM'nin tanı kriterleri	3
<b>Tablo 2.</b> Glukoz Toleransının Sınıflaması	3
<b>Tablo 3.</b> DM'nin etiyolojik sınıflandırılması	4
<b>Tablo 4.</b> Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları	6
<b>Tablo 5.</b> Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar	20
<b>Tablo 6.</b> Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	21
<b>Tablo 7.</b> Bazı besin maddelerindeki Tiyamin konsantrasyonları	26
<b>Tablo 8.</b> Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	34
<b>Tablo 9.</b> Histolojik takip serileri	36
<b>Tablo 10.</b> İmmünohistokimyasal boyama prosedürü	37
<b>Tablo 11.</b> İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi	38
<b>Tablo 12.</b> TUNEL boyama prosedürü	38
<b>Tablo 13.</b> TUNEL boyama yaygınlığının derecesi	39
<b>Tablo 14.</b> STZ ile deneysel DM oluştuğu andaki başlangıç ve final ağırlık değerleri	41
<b>Tablo 15.</b> STZ ile deneysel DM oluştuğu andaki başlangıç ve final kan glukoz değerleri	41

## ŞEKİL LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Şekil 1.</b> Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü	16
<b>Şekil 2.</b> Antioksidan Savunma Sistemleri	16
<b>Şekil 3.</b> TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü	22
<b>Şekil 4.</b> Tiyamin ve karbonhidrat metabolizması	29
<b>Şekil 5.</b> Kontrol grubunda beyin korteksinde bax immünreaktif hücreler	42
<b>Şekil 6.</b> Diyabet grubunda beyin korteksinde artmış bax immünreaktif hücreler	43
<b>Şekil 7.</b> Diyabet + vitamin B1 grubunda beyin korteksinde bax immünreaktif hücreler	43
<b>Şekil 8.</b> Kontrol grubunda beyin korteksinde TUNEL pozitif hücre	44
<b>Şekil 9.</b> Diyabet grubunda beyin korteksinde artmış TUNEL pozitif hücreler	45
<b>Şekil 10.</b> Diyabet + vitamin B1 grubunda beyin korteksinde TUNEL pozitif hücreler	45
<b>Şekil 11.</b> TUNEL pozitif kontrol. Meme Dokusu.	46
<b>Şekil 12.</b> TUNEL negatif kontrol.	46

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ACE</b>	: Angiotensin Converting Enzim
<b>AD</b>	: Alzheimer Hastalığı
<b>ADA</b>	: Amerikan Diyabet Cemiyeti
<b>AGEs</b>	: İleri glikasyon son ürünleri
<b>AIF</b>	: Apoptozis Uyarıcı Faktör
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BAEPs</b>	: Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelleri
<b>CAMKII</b>	: Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin bağımlı protein inaz II
<b>DISC</b>	: Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EAE</b>	: Deneysel allerjik ensefalomyelit
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
<b>GDNF</b>	: Glial cell derivated nörotrofik faktör
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>HB</b>	: Hematoksilen boyama
<b>HbA1c</b>	: Hemoglobin A1c
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IDDM</b>	: İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus
<b>IFG</b>	: Bozulmuş açlık glisemisi
<b>İGT</b>	: Bozulmuş glukoz toleransı
<b>KAT</b>	: Katalaz
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MS</b>	: Multiple Skleroz
<b>NADH / NAD<sup>+</sup></b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid: nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADPH</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat

<b>NIDDM</b>	: İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus
<b>NMDA</b>	: N-Metil D-Aspartat
<b>NOD</b>	: Non-Obez Diyabet
<b>NT3</b>	: Nörotropin 3
<b>OGTT</b>	: Oral glukoz tolerans testi
<b>ONOO•</b>	: Peroksinitrit
<b>PCD</b>	: Programmed Cell Death
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>RDA</b>	: Alınması tavsiye edilen günlük doz
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SSS</b>	: Santral Sinir Sistemi
<b>STZ</b>	: Streptozosin
<b>SSEPs</b>	: Somatosensorial uyarılmış potansiyeller
<b>TMP</b>	: Tiyamin monofosfat
<b>TPP</b>	: Tiyamin pirofosfat
<b>TRIAL</b>	: Apoptozisi indükleyen reseptör ligand
<b>TSE</b>	: Transmissible Spongiform Ensefalopatiler
<b>TTP</b>	: Tiyamin Trifosfat
<b>TÜRDEP</b>	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması

## 1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), çok çeşitli etyolojiler ile ortaya çıkan insülin salınımı insülin aktivitesi ya da her ikisinde birden oluşan aksamalardan kaynaklanan; karbonhidrat yağ ve protein metabolizmasındaki düzensizlik ve kronik hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (1).

Akut komplikasyonların yanında uzun süren metabolik düzensizlikler nedeniyle, çeşitli organların çalışmasında yetersizlik ve işlevsizlik şeklinde kronik komplikasyonlara da neden olabilmektedir (2).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, DM'nin, hastaların MSS işlevlerinde de aksaklıklara neden olabileceğini göstermektedir (3, 4).

Yapılan araştırmalar, hem Tip I hem de Tip II hastalarında insülin işlevlerindeki bozulmanın ve hipergliseminin, MSS komplikasyonlarının gelişimi, çeşitli nörodejeneratif hastalıkların ve duygu durum bozukluklarının oluşumu açısından patolojik önemi olduğunu ortaya koymaktadır (5, 6). Tip I diyabetik hayvanlardan elde edilen deneysel veriler, bu hayvanların MSS'lerinde yapısal ve elektrofizyolojik bozukluklar geliştiğini; nörotransmitter düzeylerinde, nöron yoğunluğunda, apoptotik aktivitede ve bilişsel fonksiyonlarda önemli değişimler olduğunu ortaya koymaktadır (7).

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olduğu gibi aynı zamanda artmış bir oksidatif stres durumudur. Diyabette artmış serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan defans sistemlerine sahiptir (8-12).

Vitaminler reaktif oksijen türlerinin alıcı ve vericileri görevini üstlenirken, mineraller ise enzimlerin aktivitesini düzenlemede görevlidirler (13).

Tiyamin eksikliği sonucu birkaç temel mekanizma ile hücrede apoptozis ve nörodejenerasyon oluşur. Tiyamin, tiyamin fosfat ve tiyamin bağımlı enzimlerdeki azalma oksidatif stresi çoğaltır ve nörodejenerasyona sürükler (14).

Biz bu çalışmamızda Tiyaminin oksidatif hasarın arttığı DM'de merkezi sinir sistemindeki koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

## **1.1. Diabetes Mellitus**

### **1.1.1. Tanım**

Diabetes mellitus (DM), hiperglisemi ile karakterize heterojen bir metabolizma bozukluğu olup insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Özellikle lipid, karbonhidrat ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyrederek (15).

Diabetes mellitus polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi klinik belirtiler ile karşımıza çıkar. Ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidozis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi semptomlarla gösterir. Genellikle semptomlar ağır seyretmez, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Patolojik fonksiyon değişikliklerine neden olan hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Bazen de retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlar ile ortaya çıkabilir (15-17). DM ile birlikte olan metabolik bozukluklar pek çok organı ilgilendiren fizyopatolojik değişikliklere bağlı olarak, kişi ve toplum üzerinde ciddi bir sağlık sorununa neden olmaktadır (18).

### **1.1.2. Epidemiyoloji**

Diabetes mellitus'ta erken dönemde tanı konması ve tedavi programlarının belirlenmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi gereklidir (19). Hastalık ilk yıllarda genellikle asemptomatik seyrettiğinden, gelişmiş ülkelerde bile diyabetiklerin bilinmeyen diyabetlilere oranı 2/1'dir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yaptığı çalışmalara göre 100 milyon civarındaki diyabetli sayısının önümüzdeki on yılın sonunda 200 milyona ve 21. yüzyılın başlarında da 300 milyona ulaşması beklenmektedir (20, 21). 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 (22).

### **1.1.3. Tanı**

Amerikan Diyabet Birliği (ADA)'nın 2004 ve DSÖ'nün 1999 yılı raporlarına göre DM'nin tanı kriterleri Tablo 1'deki gibidir (23-25).

**Tablo 1.** DM'nin tanı kriterleri (24).

- 
1. Klasik diyabet semptomları (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ile birlikte günün herhangi bir saatinde, son öğün zamanı dikkate alınmaksızın, plazma glukoz konsantrasyonunun  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/L) olması
  2. En az 8 saatlik açlık sonrasında plazma glukoz düzeyinin  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/L) olması
  3. 75 gr glukoz kullanılarak uygulanan olan Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nin 2. saat glukoz düzeyinin  $\geq 200$  mg/dl (11,1 mmol/L) olması
- 

Eğer hasta asemptomatik ise veya minimal semptom varsa ve açlık plazma glukoz konsantrasyonları tanısız değilse, diyabet tanısı için Tablo 2' deki gibi OGTT gerekli olur (25).

**Tablo 2.** Glukoz Toleransının Sınıflaması (25).

---

**Açlık Plazma Glukozu**

Normal  $<100$  mg/dl

Bozulmuş açlık Glukozu  $\geq 100$  mg/dl ve  $<126$  mg/dl

Diyabet  $\geq 126$  mg/dl

**OGTT sırasında 2. saat plazma Glukozu**

Normal  $<140$  mg/dl

Bozulmuş Glukoz toleransı (IGT)  $\geq 140$  ve  $<200$  mg/dl

Diyabet  $\geq 200$  mg/dl

---

**1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması**

Diyabet 4 ana klinik gruba göre sınıflandırılmıştır. Bunlar; Tip 1 DM, Tip 2 DM, diğer spesifik diyabet tipleri ve gestasyonel DM (GDM)'dir (27, 28). ADA'nın 2004'te kabul ettiği DM'nin etiyolojik sınıflandırması Tablo 3'de gösterilmiştir (24).

**Tablo 3.** DM'nin etiyolojik sınıflandırılması (24).

---

**I- Tip 1 Diyabet**

- a) İmmunolojik
- b) İdiopatik

**II- Tip 2 Diyabet**

**III- Diğer spesifik tipler**

**IV- Gestasyonel diyabet (GDM)**

---

Diyabetiklerin %90'ına yakını Tip 2, %5'i ise Tip 1 diyabettir (29).

**1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus**

Tip 1 diyabet genetik zeminde ilerleyici beta hücre yıkımı sonucu insülin yetersizliği ile karakterize otoimmün bir hastalıktır (30). Genellikle otuz yaşın altında ortaya çıkar. Tip 1 diyabet, tüm diyabetlilerin yaklaşık % 7-10 oranı kadar bölümünü kapsar (31).

**1.1.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi**

**a) Genetik Faktörler:** Tip 1 diyabette genetik faktörlerin öneminin bilinmesine karşın spesifik bir genetik geçiş şekli tespit edilememiştir. Diyabetlilerin kardeşlerinde Tip 1 diyabet genel popülasyona göre yaklaşık 15 kat daha sık görülür. Tip 1 diyabetli vakaların % 90-95'i DR3 ve/veya DR4 Class II HLA molekülü ekspres ederler (32-36).

**b) Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler:** Beta hücrelerinde immün toleransın bozulmasına ve otoimmünitenin aktivasyonuna neden olan etkenlerin başında virüsler, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelir (32-36).

**c) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu:** Virüs ya da toksinlerle doğal yapısı bozulan beta hücreleri, salgıladıkları sitokinlerle (IFN-a, IFN-g, TNF-a, nitrik oksit (NO), IL-1 vb.) ya da antijenik peptidlerle immün sistem elemanlarını uyarır. Bunun sonucunda destrüktif insülitis başlatılır (32-36).

**d) İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü:** Geç faz immün aktif dönemde, inflamasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu süreci insülitis olarak nitelendirilir. Adacıkları önce makrofajlar CD8 sitotoksik T lenfositleri daha sonra CD4 lenfositleri TH1, NK (Natural Killer) hücreleri ve B lenfositleri infiltre eder ve

hasara uğrattır. Hasar, hastalığın başlangıç yaşı küçük olanlarda, puberte döneminde, sekonder infeksiyonlarda ve kız çocuklarında daha hızlıdır (32-36).

**e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikoları:** Günümüzde prelinik dönem Tip 1 diyabet tanısında sensitivite ve spesifitesi yüksek altın standart olarak alınan üç otoantikör; ICA (Adacık hücre antijeni), anti GAD (Glutamik asit dekarboksilaz) otoantikörleridir (32-36).

#### **1.1.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus**

Tip 2 diyabetliler, tüm diyabetiklerin ortalama % 85'ini oluşturmaktadır (37). Çoğunlukla uzun sürebilen asemptomatik bir dönem mevcuttur. Yakınmalar genellikle 45 yaş civarında başlar. İlk tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar çoğu zaman vardır (15, 17).

##### **1.1.4.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi**

Tip 2 diyabet patogenezinde beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve hepatik glukoz üretimi artışı gibi üç ana metabolik bozukluk rol oynar (14-18). Primer defekt olarak insülin direnci ve /veya insülin eksikliği ön plandadır (15, 16). Tip 2 diyabette primer patolojinin beta hücre fonksiyon bozukluğu veya insülin direnci olmasında yaş, etnik farklılıklar, obezite ve diyabetin heterojenitesinin kısmen de olsa belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (38). Tip 2 diyabetin çoğu formları genetik yüklülük ile ilişkilidir. Son yıllarda bunlara eklenen dördüncü bir görüş, primer defektin hiperinsülinemi olduğu ve insülin direncinin hiperinsülinemiye bağlı olarak oluştuğu hipotezidir. Hiperinsülineminin nonoksidatif glukoz kullanımını veya glikojen sentezini bozarak Tip 2 diyabette olduğu gibi insülin direncine yol açabileceği ileri sürülmektedir (39, 40).

##### **1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları**

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları mevcuttur. Uzun süreli diyabet tüm damarların yapısını bozar. Tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine karşın klinikte retina, renal glomerül ve büyük sinirlerdeki patolojiler ile ortaya çıkar (41). DM'nin akut ve kronik komplikasyonları Tablo 4'de gösterilmiştir (42, 43).

**Tablo 4.** Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları (42).

---

**Akut Komplikasyonlar**

1. Diyabetik ketoasidoz (DKA)
2. Hiperosmolar hiperglisemik sendrom (HHS)
3. Laktik asidoz
4. Hipoglisemi

**Kronik Komplikasyonlar**

Makrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik kalp hastalığı
- b. Periferik arter hastalığı
- c. Serebrovasküler hastalık

Mikrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik nöropati
- b. Diyabetik nefropati
- c. Diyabetik retinopati

Diğer komplikasyonlar

- a. Diyabetik ayak
  - b. Diyabetik gastroenteropati
  - c. Genitoüriner bozukluklar
  - d. Erektile disfonksiyon
- 

**1.1.6. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonları**

Diabetes Mellitus'un nörolojik komplikasyonlarının etyopatogenezi uzun yıllar araştırmacıların ilgi alanı olmuştur. Bu ilgi genellikle periferik ve otonom sinir sistemi üzerinde yoğunlaşmıştır (44). Ancak son yıllarda Diabetes Mellitus'un santral sinir sistemini de etkilediğine dair kanıtlar da ortaya konmaktadır (45). Santral sinir sistemindeki diyabetik komplikasyonlar periferik sinir sistemindekinin aksine kolay fark edilemez (46). Diyabetik hastalarda akut ve kronik metabolik ve vasküler bozukluklar beynin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar verebilir (45, 47). Diyabetik olgularda serebrovasküler olay riski artmıştır. Ayrıca hiperglisemik ve hipoglisemik ataklar da akut serebral fonksiyon bozukluğuna neden olur (45, 46).

Uzun süreli diyabette, daha sinsi gelişen bu yüzden de kolay fark edilemeyen serebral değişiklikler de meydana gelmektedir (45, 47). Bu serebral bozukluklar; nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif düzeyde gösterilmiştir.

Nörokimyasal değişikliklerle ilgili verilerin sonuçları genellikle kemirgen modellerden elde edilenlere dayanmaktadır (46). Bu değişiklikler şunlardır:

1. STZ ile oluşturulmuş diyabetik ratların striatumunda asetilkolin sentez ve salınımı azalmıştır. Asetilkolin metabolizmasındaki oluşan bu değişiklikler kognitif bozukluklarla ilişkilendirilmektedir.
2. Diyabetik ratların beyinlerinin farklı bölgelerinde adrenalin ve noradrenalin içeriğinin değişkenlik göstermesi.
3. Serotonin azalmış döngüsü.
4. Dopaminerjik nöronal aktivitenin azalması ve dopamin içeriğinin artması.

İnsan çalışmalarından nörokimyasal değişikliklerle ilgili elde edilen veriler ise şunlardır:

1. Ciddi ketoasidozda serotonin döngüsünün artması ve post-mortem beyin örneklerinde medial ve lateral hipotalamusta serotonin içeriğinin artması.
2. Beynin farklı bölgelerinde dopamin içeriğinin artması (46).

Diyabetik hastalarda uyarılmış potansiyeller ve olay-ilişkili potansiyellerin ölçülmesiyle, elektrofizyolojik anormalliklere ilişkin veriler elde edilmiştir. Diyabetik hastalarda santral ve periferik orijinli evoked potansiyellerin latensilerinde artış olmaktadır. Latensilerdeki bu artış diyabetin santral sinir sisteminde sinyal iletimini bozduğunu göstermektedir.

P300 dalgasında olduğu gibi olay-ilişkili potansiyellerin latensileri de uyarılmış potansiyellere ilaveten, artış göstermektedir. P300 dalgası, dikkat ve kısa süreli hafızayla alakalı olup kognitif ve hafızaya ait fonksiyonlarla ilişkili bir geç kortikal nörofizyolojik olaydır. Diyabetik hastalarda yüksek beyin fonksiyonlarındaki bozulmanın bir göstergesi olarak artmış P300 latensisi öngörülebilir ve böylece elektrofizyolojik ve kognitif bozukluklar arasında bir ilişki kurulabilir (45-47).

Bir diğer elektrofizyolojik değişiklik, tüm santral kortekste ortaya çıkan yavaşlamış EEG (elektroensefalografi) ritmidir ki genellikle insüline bağımlı

olmayan diyabetik hastalarda rastlanmaktadır. Bununla birlikte diyabetik çocuklarda da non-spesifik EEG anormallikleri görülmektedir (46).

Tip 1 DM'de insülin eksikliği ile birlikte, C peptid eksikliğinin de santral sinir sistemi komplikasyonlarının gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. C peptid için özgül bir reseptör bölgesi olmamakla birlikte, bu peptidin insülinin sinyal yolları aracılığı ile etki ettiğini gösteren kanıtlar bulunmaktadır. BB/Wor sıçanlarda, C peptidin bozulmuş insülin benzeri büyüme faktörü aktivitesini ve insülin reseptör sentezini kısmen düzelttiği ve hipokampustaki nöronal apoptozisin oluşumunu kısmen önlediği bildirilmiştir. İn vivo ve invitro çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre, insülin / C peptid yetersizliğinin Tip 1 DM'de görülen nöronal apoptoziste önemli rol oynadığı düşünülmektedir (48, 49).

Diyabet serebral atrofi ve fokal beyaz madde lezyonlarının gelişiminde yapısal değişiklikler için bir risk faktörüdür. Diyabetik olguların beyinlerinde görülen yapısal değişiklikler diyabet olmayan olgulara göre daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır (45).

Deneyisel diyabet oluşturulan hayvanlarda, beyin ve medulla spinaliste nöronal atrofi, aksonal dejenerasyon, glikojen birikimi, ensefalomalazi, demiyelinizasyon ve glia (astrozit) hücrelerinde hasar oluşumu gibi yapısal değişiklikler rapor edilmiştir (50-53). Diyabetik hayvanlarda hipokampus, arkuat ve ventromediyal nükleus, neokorteks ve prefrontal kortekste nöronların yoğunluğunda anlamlı bir azalma görüldüğü ve bu nedenle beyin ağırlığında azalma olduğu rapor edilmiştir. İn vivo ve invitro çalışmalar, bu nöron kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığını belirtmektedir. Tip 1 DM'de nöronal yoğunluğun azalmasının diyabetin süresi ile korele olduğu ve apoptozis kaynaklı nöronal kaybın zaman ilerledikçe arttığı bildirilmiştir (50, 54).

Diyabetikler hücresel düzeyde değerlendirildiğinde ise, diyabetik hayvanlarda santral sinir sistemlerine ait hücrelerin çekirdek şekillerinde ve kromatin görünümünde bozulmalar olduğu, mikrotübül sayılarının arttığı, endoplazmik retikulumlarında genişleme, parçalanma ve degranülasyon olduğu rapor edilmiştir (49).

Yapılan nöropsikolojik çalışmalarda, Tip 1 ve Tip 2 diyabetik hastalarda, geniş çeşitlilikteki kognitif testlerde performans kayıpları gözlenmektedir (45-47).

Yapılan alışmalar Tip 1 diyabetik hastalarda öğrenmede, hafızada, problem çözmede, mental ve motor hızda bozulmalar olabilmektedir (45-47, 55).

Tip 1 diyabetik çocuklarda, diyabetin ortaya çıkış yaşı ve hipoglisemik olayların sıklığı kognitif değişikliklerin temel belirleyicileridir (45, 46). Diyabetin 5 yaşından önce ortaya çıktığı ve hipoglisemik olaylara sık maruz kalan olgularda, daha sık kognitif bozukluklara rastlanmaktadır Diyabetik ocuklarda kognitif fonksiyonları etkileyen diğer faktörler ise, HbA1c (hemoglobınA1c) düzeyleri ile takip edilen kötü glisemik kontrol ve hastalığın sresidir.

Tip 1 diyabetik yetişkinlerde mental fonksiyonlarda kk fakat fark edilebilir azalmalar meydana gelmektedir (45). Diyabetiklerde bozuklukların gözlendiği spesifik tasklarla ilgili çalışmaların sonuçları ve bozuklukların dereceleri farklılıklar göstermektedir. Bu farklılıklar, çalışmalara katılan populasyonların heterojen olmasından ve bozuklukların kısmen zor fark edilir olmasından kaynaklanmaktadır (45, 47, 56). Ayrıca diyabetikler arasında ciddi hipoglisemide ve kronik hiperglisemiye maruziyetde farklılıklar olması da önemlidir; nk hipoglisemi ve hiperglisemi beyni farklı mekanizmalar aracılığıyla etkiler (45, 47). Yetişkin Tip 1 diyabetiklerdeki serebral komplikasyonların önlenmesinde glisemik kontrol, iki yönlü rol oynamaktadır. Bir yandan yükselmiş HbA1c değerleriyle ifade edilen kötü glisemik kontrol ve periferik nöropati gibi kötü glisemik kontrolle ilişkili diğer komplikasyonlar kognitif fonksiyon bozukluğuyla ilişkili iken diğer yandan da yoğun tedavi hipoglisemik olayların sıklığını arttırmakta ve beyni olumsuz yönde etkilemektedir (45).

Tip 2 diyabetik hastalarda, özellikle sözel hafıza ve kompleks bilgi işlenmesi ile ilgili tasklarda orta derecede kognitif bozukluklar bildirilmiştir. Temel dikkat işlevi, motor reaksiyon zamanı ve kısa süreli hafıza daha az etkileniyor görünmektedir. Tip 2 diyabetiklerde kognitif fonksiyon bozukluğu için risk faktörleri; artmış HbA1c ve açlık plazma glukoz düzeyleri, yükselmiş serum trigliserid düzeyleri ve periferik nöropatinin varlığıdır. Hipoglisemik olaylar temel bir risk faktörü gibi görünmemektedir, nk bozulmuş glukoz toleransı olan olgularda ve yeni teşhis edilmiş ve henüz tedaviye başlanmamış hastalarda da kognitif bozukluklara rastlanmaktadır.

Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar diyabet ile hem vasküler demans hem de Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir (45). Bu bulgular, daha belirgin kognitif bozukluklar gösteren yaşlı diyabetik hastalardan, aynı yaştaki kontrollerle karşılaştırıldığında elde edilen sonuçlarla uyumludur. Diyabetin beyin üzerine olan etkilerinin yaşlılarda daha belirgin olmasının nedenleri açık değildir. Kognitif fonksiyon bozukluklarına hem yeni teşhis edilmiş diyabetik olgularda hem de bozulmuş glukoz toleransı ve/veya hiperinsülinemisi olan yaşlı olgularda rastlanabilmektedir. Bu bulgular, yaşlılarda diyabetin beyin üzerindeki etkilerinin uzun süreyle diyabete maruz kalmaktan ziyade, yaşlanmakta olan beynin diyabetik koşullar karşısında daha zayıf olmasından kaynaklandığına işaret etmektedir (45, 47).

Diyabetiklerde kognitif fonksiyonun etkilendiği düşündürülen başka faktörler de vardır. Örneğin; Tip 1 ve Tip 2 diyabetik hastalarda psikiyatrik bozuklukların, özellikle de depresyon ve anksiyete bozukluklarının prevalansı artmıştır (45).

Özetle diyabetes mellitus; klinik olarak anlamlı kognitif bozukluklarla karakterize yavaş gelişen, bir ensefalopatiyle ilişkilidir (47).

#### **1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonlarının Patogenezi**

Diyabetik ensefalopatinin patogeneziye yönelik çalışmalar diyabetin diğer komplikasyonlarına göre daha azdır. Pek çok patogenetik faktör bu komplikasyonların oluşumunda bir arada rol oynuyor gibi görünmektedir. Bu faktörler:

- Periferik diyabetik nöropati patogenezinde yer alan faktörler (45, 47),

-Diyabetteki nöropsikolojik ve yapısal değişiklikler yaşlanmakta olan beyindeki değişiklikleri taklit ettiğinden ve diyabetin beyin üzerindeki etkilerine yaşlı olgular genç olgulardan daha duyarlı olduğundan, diyabetin beynin yaşlanma sürecine katkıda bulunması ya da bu süreci hızlandırması (45, 47, 57),

-Serebrovasküler olayların oluşmasında risk faktörleri olan hipertansiyon ve ateroskleroz (45),

-Hipoglisemi (44-46, 48-60),

-Serebral insülin düzeylerindeki, insülin reseptörlerindeki ve insülin sinyalizasyonundaki değişikliklerin dahil olduğu nöromodülatuar değişikliklerin bir sonucu olarak insülinin şüpheli rolüdür (47, 61-63).

### 1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogeneziyle Olan Bağlantılar

Periferik diyabetik nöropatinin patogenezi vasküler disfonksiyon, trofik destekte meydana gelen değişiklikler ve artmış glukoz düzeylerinin direkt toksik etkisini içeren multifaktöriyel bir olaydır. Diyabetik nöropatide olduğu gibi, diyabetik ensefalopatide de vasküler disfonksiyon önemli rol oynar. Beyinde meydana gelen vasküler değişikliklerin sonucu olarak sinir kan akımında ve endonöral oksijen miktarında azalma oluşur (45-47). Hem akut hem de kronik hiperglisemisi olan hayvanlarda serebral kan akımındaki lokal azalmalar gösterilmiştir (46). Diyabetik hastalarda da serebral kan akımında hem lokal azalmalar hem de artışlar olduğu bildirilmiştir (45). Nörotrofik destekte de değişikliklerin meydana geldiği yapılan çalışmalarla rapor edilmiştir. IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) geninin serebral ekspresyonundaki azalma bu değişikliklere örnek olarak verilebilir.

Hipergliseminin sonucu olarak beyindeki glukoz düzeyi artmaktadır. Beyindeki artmış glukoz düzeyi aynen periferik sinir sisteminde olduğu gibi polyol yolağı aktivitesinde artışa ve sorbitol ve fruktozun birikimine neden olur. Ancak diyabetik rodentlerin beyinlerindeki sorbitol ve fruktoz düzeylerindeki artış periferik sinirlerdeki artışa göre daha düşük seviyededir. Periferik sinirlerdeki sorbitol düzeylerindeki artışın, myoinozitol seviyelerindeki azalmayla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Myoinozitolün azalması fosfoinozitid metabolizmasında bozukluklara neden olmakta bu da diaçilgliserol üretimini bozmaktadır. Sonuç olarak bu değişiklikler; PKC (protein kinaz C) aktivitesinde meydana gelen değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Diyabetik ratların beyinlerinde, sorbitol düzeylerindeki artışa rağmen myoinozitol düzeyleri de artmaktadır. Fakat periferik sinirlerde olduğu gibi fosfoinozitid ve diaçilgliserol düzeyleri düşmektedir. Diyabetin, sinaptik plastisitede meydana gelen değişikliklerin ışığında, beyindeki protein kinaz aktivitelerini de etkilediği söylenmektedir. Diyabetik ratlarda protein kinaz A ve C aktivitelerinin arttığı, CAMKII ( $Ca^{2+}$  / kalmodulin bağımlı protein kinaz II) aktivitesinin ise azaldığı kanıtlanmıştır. Yüksek glukoz düzeyleri sonucu oluşan bir diğer toksik etki de AGEs (ileri glikasyon son ürünleri) üretiminin artışıdır. Diyabetik ratların spinal kordlarında ve beyinlerinde AGEs'nin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ancak bu artış periferik sinirlerdeki artıştan daha düşük düzeydedir. Yine diyabetik ratların

beyin dokularında ve serebral mikrodamarlarında oksidatif hasarı gösteren lipid peroksidasyon yan ürünlerinin arttığı gözlenmektedir. Bunun dışında beynin antioksidan savunmasında rol oynayan süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri de azalmaktadır (45, 47).  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bozulmada hiperglisemiye bağlı olduğu düşünülen bir diğer değişikliklerdir. Diyabetik hayvanlar ve insanlardan elde edilen sonuçlar birçok dokuda intrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinin arttığını göstermiştir. İntrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeyini belirleyen membran Na, K-ATPaz aktivitesi de değişmektedir. Periferik sinir sisteminde myoinozitol eksikliğinin Na, K-ATPaz aktivitesini düşürdüğü ve bunun da sinir disfonksiyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulmuş ratların santral sinir sistemlerinde de Na, K-ATPaz aktivitesi azalmakta ve lokal farklılıklar göstermektedir. En çok düşüş serebral korteks ve hipokampusta gözlenmektedir. Ancak hipergliseminin beyindeki myoinozitol düzeyini arttırdığı bilindiğinden, santral sinir sisteminde Na, K-ATPaz aktivitesi ile myoinozitol düzeyi arasındaki ilişki net değildir (45-47, 64).

#### **1.1.6.1.2. Beyin Yaşlanmasının Patogeneziyle Olan Bağlantılar**

Diyabetin beyin üzerindeki etkileri yaşlılarda daha belirgindir ve hızlanmış kognitif gerilemeyle kendini gösterir. Bu olay yaşlanmakta olan beynin diyabetin etkilerine karşı daha duyarlı olmasına ya da yaşlanmanın ve diyabetin patogenezinin etkileşimine bağlanabilir. Ayrıca Tip 1 ve Tip 2 diyabetin patofizyolojisindeki farklılıklar da gözönünde bulundurulmalıdır çünkü yaşlılar Tip 2 diyabetten daha çok etkilenmektedirler (47).

Diyabetik komplikasyonların patogenezinde adı geçen oksidatif stres, vasküler fonksiyon bozukluğu ve AGEs'nin birikimi gibi olaylar beynin yaşlanmasında da rol oynamaktadır. Kemirgenlerin ve insanların yaşlanmakta olan beyinlerinde protein ve lipidlerin oksidasyonunun arttığı gösterilmiştir. Yine beynin de dahil olduğu birçok dokuda, muhtemelen düşük protein döngüsünün bir sonucu olarak AGEs'nin biriktiği görülmektedir. AGEs'nin oluşumu reaktif oksijen türlerinin artmış üretimi ile ilişkilidir. Yaşlanma esnasında beynin kapillerlerinin ilerleyici bir dejenerasyona uğraması sonucu meydana gelen kapiller anormalliklerin uzun vadede serebral kan akımını etkileyebildiği bilinmektedir. Oksidatif stres, AGEs ve iskeminin olumsuz etkileri kısmen bozulmuş olan nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazı

aracılığıyla meydana gelmekte ve nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bu bozulma beyin yaşlanmasıyla ilişkili nöropatolojik değişikliklerin ortaya çıkmasında bir son yolak olarak kabul edilmektedir.

Özetle; beyin yaşlanmasına ve diyabetin serebral komplikasyonlarının gelişimine olan etkileri iskemi, oksidatif stres, AGEs'nin oluşumu ve bozulmuş nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazı mekanizmaları ile farklılıklar göstermektedir. Ancak benzerlikler bulunmakla birlikte bu durum diyabetik yaşlı hastaların diyabetin beyin üzerindeki etkilerine karşı daha hassas olmalarını kısmen de olsa açıklayabilir (45, 47).

#### **1.1.6.1.3. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü**

Diyabet hipertansiyon ve serebrovasküler hastalık prevalansındaki artışa neden olmaktadır. Bu durum serebrovasküler hastalık riskinin artmasına ve hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır. Bu hemodinamik değişiklikler de serebral kan akımındaki lokal değişimlerle sonuçlanmaktadır (45). Ayrıca serebral vazoreaktivite de diyabetik hastalarda bozulmaktadır (45, 47, 65). Serebral vazoreaktivite ve eşlik eden kan akımındaki değişiklikler, hipoglisemi, hipotansiyon, hipoksi ve hiperkapni gibi durumlarda rol oynayan önemli kompensatuar mekanizmalardır. Bu mekanizmaların kaybı beyin üzerinde zararlı etkiler oluşmasına neden olabilir.

Hipertansiyon, hem direkt hem de indirekt olarak diyabetin serebral komplikasyonları üzerinde rol oynayarak serebrovasküler hastalığın gelişimi sürecini hızlandırmaktadır (45, 65). Buna ilaveten hem diyabetik hem de diyabetik olmayan yaşlılarda kognitif bozukluklar için predispozisyon oluşturmaktadır (40, 66). Kronik hipertansiyonun beyin üzerindeki etkilerinin patofizyolojisi kısmen anlaşılmıştır ancak hiperinsülineminin diyabetik olmayan olgularda dahi hipertansiyonun beyin üzerindeki zararlı etkilerini kuvvetlendirdiğini belirtmekte yarar vardır (45, 67).

#### **1.1.6.1.4. Hipogliseminin Etkileri**

Sık hipoglisemi ataklarının tekrarlaması, beyin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olmaktadır (37). Tek bir hipoglisemik olayın neden olduğu kognitif değişikliklerin geçici olduğu düşünölmektedir ancak tekrarlayan hipoglisemik olayların kümülatif etkisi ise kalıcı kognitif bozukluklarla sonuçlanabilmektedir (45, 46).

Hipoglisemide beyin zedelenmesi asidik aminoasitlerin rol aldığı eksitotoksik olaylarla meydana gelmektedir. Bu tarz zedelenme iskemi ve hipokside de gözlenmektedir (44). Hipoglisemi esnasında meydana gelen seçici nöronal hasarın bir eksituar aminoasit alt tipi olan NMDA reseptörünün aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir. NMDA reseptör aktivitesindeki bu aktivite artışı sonucu intrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinde patolojik bir artış meydana gelir. Sonuç olarak nükleer ve mitokondrial fonksiyon kaybı ve proteazların ve diğer  $Ca^{2+}$  bağımlı enzimlerin aktivitesinde artış meydana gelir (44-46). Bu değişiklikler zaten yetersiz olan enerji kullanımını nörotransmisyon ve nöronal aktiviteyi uyararak artırır ve enerji açığı olan hücrelerin ölümüne neden olur (44). Beyindeki seçici nöronal hasarın dağılımı NMDA-reseptör yoğunluğuyla ilişkilidir (46).

## **1.2. Oksidatif Stres**

Diyabet etiyolojisinde oksidatif stres önemli bir mekanizma olarak kabul görmektedir. Normal metabolik süreçte serbest radikaller vücutta üretilmekte ve çevresel faktörlerle etkileşim içindedirler. Vücutta serbest radikallerin yol açtığı olumsuz sonuçlara karşı antioksidanların çoğu vücudu savunmaktadır (68).

Diyabetin etiyolojisinde oksidatif stresin rolü olduğu ve diyabetin ilerlemesine neden olduğu, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabeti bulunan olgularda serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir (69).

### **1.2.1. Diyabet ve Oksidatif Stres**

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, serbest radikal üretimini arttırdığı saptanmıştır. Bunu nonenzimatik glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarı ile gerçekleştirmektedir (70). Diyabette, toksik serbest radikaller ile hücre defansın azalması uzun zamandır bilinmektedir (71).

Pankreas adacık hücrelerinde, antioksidan olan Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokulara göre en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (72, 73).

Beta hücreleri oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olarak kabul edilip gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (74). Oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinin diyabet oluşturulan rat deney modellerinde arttığı görülmüştür (75).

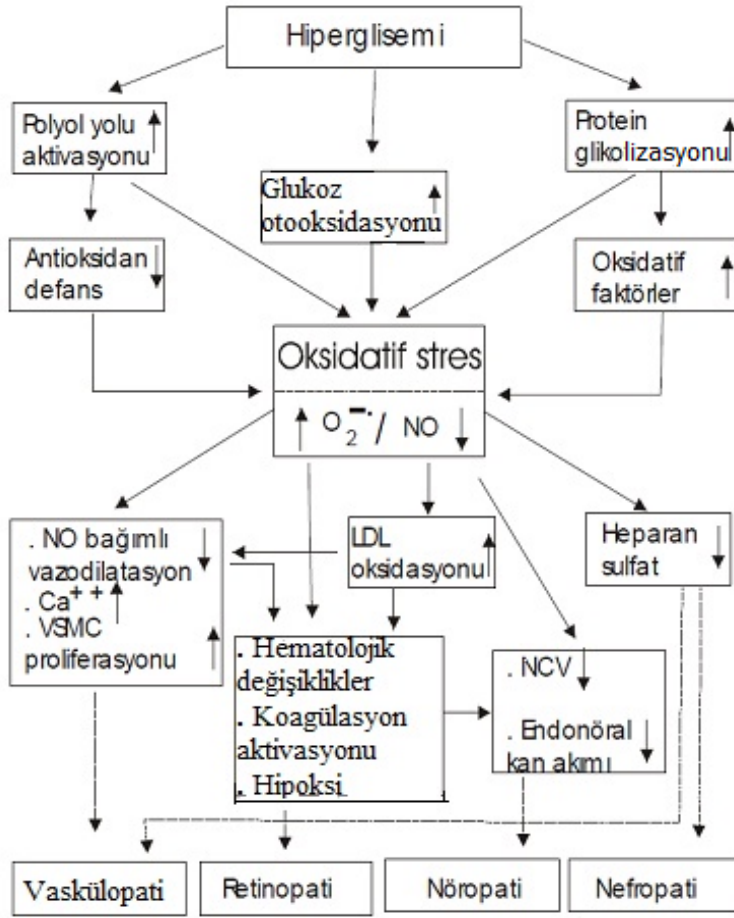
Hipergliseminin direkt sonucu olarak serbest radikal oluşumunun olduğunu savunan çalışmalar da mevcuttur (76). Bununla birlikte yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda endotel ve düz kas hücreleri inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (77, 78). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasındaki ilişki in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir (79). Oksidan maddeler oluşturarak Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip eden streptozotosin (STZ) (80), deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılır. Diyabeti uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevaplarına neden olarak başlattığı sanılmaktadır (81, 82).

Diyabetin neden olduğu artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan aktivite beynin patolojik olaylara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olur. Deneysel olarak indüklenen hiperglisemide ratların beyinlerinde oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir. Tip 1 diyabetik hastaların serumlarında da süperoksit üretiminin arttığı ve bu artışın glisemik kontrolün etkinliğinin arttırılmasıyla azaldığı gözlenmiştir (83).

Diyabet komplikasyonlarının patogenezindeki oksidatif stresin rolü Şekil 1’de gösterilmiştir (84).

### **1.2.2. Anti-Oksidanlar**

“Antioksidan Savunma Sistemleri” olarak adlandırılan bazı savunma mekanizmaları ROS’ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta geliştirilmiştir (Şekil 2) (85).



**Şekil 1.** Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogeneziindeki rolü (R.J. Reiter'den modifiye edilmiştir).

VSMC (vascular smooth muscle cell): vasküler düz kas hücresi.

NCV( neuron conduction velocity): nöron iletim hızı.



**Şekil 2.** Antioksidan Savunma Sistemleri (85).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılardır, asıl antioksidan savunmayı sağlayan ve serbest radikal toplayıcı enzimleri içeren hücre içi savunma sistemleri ile albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içeren hücre dışı savunma sistemleri; oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı etkisiz hale getirirler. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (85).

### **1.3. Apoptozis**

#### **1.3.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi**

Apoptozis, fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanır. Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (86).

İlk kez Kerr, Currie ve Wyllie tarafından 1972 yılında “fizyolojik hücre ölümü” olarak tanımlanmıştır. Sonra yine Kerr ve Wyllie (87) tarafından deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir. Mekanizması hala tam olarak çözülemese de programlı hücre ölümü hücrelerinin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olayların aktive olmasıyla başladığı ileri sürülmektedir (88). Ayrıca nekroz oluşturabilen hipertermi, radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve hipoksi gibi etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirirler (87).

Apoptozisde, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de, bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersine nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (89).

Günümüzde, biyokimyasal ve genetik komponentlerin apoptoziste rolü olduğu düşünülmektedir. Bunların ortaya konulmasıyla apoptozis aktivasyonu veya inhibisyonuna yönelik çalışmalar yapılarak; kanser, AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi yöntemleri üzerinde çalışılmaktadır (90).

### **1.3.2. Apoptozisin Regülasyonu**

Apoptozisin regülasyonu, sıkı bir şekilde, nematodlardan insanlara kadar gen kontrol aşaması ile korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile regüle edilir. Bu aşama genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb.) veya sitokinlerin bulunmaması gibi (eritropoietin vb.) farklı uyaranlarla hareketlilik gösterebilir. DNA'daki tek veya çift iplik parçacıkları, nükleozitlerin azlığı ve DNA'ya bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlar. Ardından bir dizi olay sonucunda hücre apoptotik yola girer (91).

#### **1.3.2.1. p53'ün Rolü**

İnsanda apoptozisin düzenlenmesi, p53 den başlayıp kaspazlara kadar uzanan bir olaylar zincirinden oluşmaktadır. Bir tümör süpresör gen olarak görev yapan p53'ün mutasyona uğraması veya bulunmaması hücre yaşamını uzatmaktadır. Genotoksik olaylar ile oluşan hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya direkt olarak bağlanıp hasarı tanır. Ardından G1'de hücre siklusunun durmasını sağlayarak onarım için gerekli olan zamanı kazanır. Hasar diğer yönden fazlaysa hücreyi apoptozise sevk eder (91).

#### **1.3.2.2. Bcl-2/Bax**

Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin regülasyonundan sorumludur (91, 92). 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 (91, 93). Örneğin; Bcl-2 ile Bax etkileşiminde Bcl-2 fazla miktarda ise hücre yaşamına devam eder. Bax fazla miktarda ise hücre ölür (89).

#### **1.3.2.3. Kaspazlar**

Apoptozis mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar;

- 1- Ölüm reseptörleri
- 2- Adaptör proteinler
- 3- Proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (93, 94).

Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) gen ailesinde yer almaktadır. Ölüm reseptörlerinin polipeptit stoplazmik kısımları, ölüm alanı (Death Domain) denilen, adaptör proteinlere bağlanan bir aminoasit dizisinden oluşur (94).

Adaptör proteinler, reseptörle gelen sinyal sonrasında kaspazlara bağlanıp onları aktifleştirirler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF-R1 ve Fas (CD95) karaciğerde çok miktarda bulunur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi aktif hale gelir. Kaspazla aktif hale gelen DNaz (CAD: caspase activated Dnase) aracılığı ile DNA yıkımından sorumludur (94).

Ölüm sinyali salan başlatıcı kaspazlar, adaptör proteine bağlanarak ölüme yön verirler. Fakat ölüme neden olmazlar, bu görevi yapacak olan uygulayıcı (effektör) özellikteki kaspazları aktifleştirirler. Uygulayıcı kaspazlar; başlatıcı kaspazların akışını aktif hale getirirler (94).

### **1.3.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu**

#### **1.3.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi**

Bu apoptotik yol salgısal özelliktedir ve patojenle infekte olmuş hücreler ile tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında rol almaktadır. Granzim ve Perforinler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve Naturel Killer (NK) hücrelerinin stoplazmik salgı granüllerindeki proteinlerin en önemlilerindendir (91).

#### **1.3.3.2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu**

Apoptozisin salgıdan bağımsız mekanizması, hücre zarı üzerindeki “ölüm reseptörlerinin“ aktive olmasıyla bağlantılıdır. Tümör nekroz faktör grubundan olan Fas (CD95), hücre yüzeyi reseptörlerindendir. apoptotik sinyalin uyarıcısı olarak görev yapan Fas, birçok hücre türünde bulunmaktadır. TNF grubunun bir üyesi olarak bilinen Fas ligandı (FasL) ise, sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinde bulunur. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik süreç başlar (91).

#### **1.3.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)**

Apoptozis nükleer parçalanma ve kromatin yoğunlaşmasını kapsayan birkaç morfolojik nükleer değişikliklerle oluşmaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve DNA kırılmasına neden olan gen son dönemlerde bulunmuş, ardından klonlanmış ve AIF olarak adlandırılmıştır. AIF, DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşmasına neden olarak kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptozisi başlatır (95).

#### **1.3.5. Hastalıklarda Apoptozis**

Apoptozis patolojik ve fizyolojik birçok olayda rol oynamaktadır. Fizyolojik olaylar hücre yapımı ve yıkımı olarak bilinir (90). Apoptosis, deri, bağırsak

mukoza ve immün sistem gibi dokulardaki çoğalan hücrelerin sayısını ve sürekliliğini devam ettirmekle birlikte periferik ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde de etkin rol oynar (96). Gelişim esnasında oluşan programlanmış hücre ölümü ilk kez sinir sistemi için tanımlanmıştır (97). Apoptotik hücre ölümü akut ve kronik nörolojik hastalıkların bir özelliğidir (98).

Apoptozis, düzensiz hücre ölümüyle birlikte akut ve kronik birçok hastalığa yol açmaktadır. Apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar Tablo 5’de gösterilmiştir (99).

**Tablo 5.** Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar (99).

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Malign ve Pre-Malign Durumlar</b> Solid Tümörler B Hücre Lenfomaları, Kronik Lenfositik Lösemi, Prostat Hipertrofisi, Kemoterapiye Direnç.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İmmün Sistem Bozuklukları</b> AİDS, Tip 1 Diabetes Mellitus, Lupus Eritematozus, Sjogren Sendromu, Glomerülonefritis.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Nörolojik Bozukluklar</b> Felç, Alzheimer Hastalığı, Ataxia Telangiectasia.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İntestinal Bozukluklar</b> Dizanteri,</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Kalp Hastalıkları</b> İskemik Kardiak Hasar, Kemoterapiyle İndüklenen Miyokardial Baskılanma.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Böbrek Hastalıkları</b> Polikistik Böbrek Hastalığı, Anemi / Eritropoezis.</li></ul>

### 1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tesbit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000’li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18’in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir. (Tablo 6) (100).

**Tablo 6.** Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler (100)

---

I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
II. İmmünohistokimyasal yöntemler
III. Biyokimyasal yöntemler
IV. İmmunolojik yöntemler
V. Moleküler biyoloji yöntemleri

---

### **1.3.6.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri**

#### **1.3.6.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı**

**1- Hematoksilen boyama:** Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. 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. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: 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" (100).

**2- Giemsa boyama:** Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır (100).

#### **1.3.6.1.2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı**

Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır (100).

#### **1.3.6.1.3. Elektron Mikroskobu**

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar da (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı

gibi) incelenebilir. Elektron mikroskobu çalışmalarında, nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (100).

#### **1.3.6.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu**

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır (100).

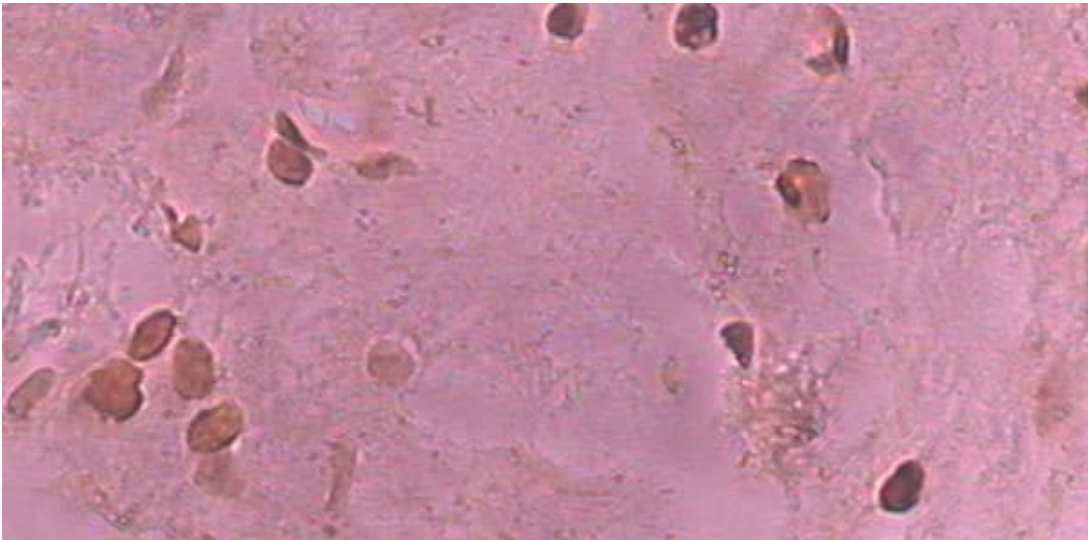
#### **1.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler**

##### **1.3.6.2.1. Anneksin V Yöntemi**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (100).

##### **1.3.6.2.2. TUNEL Yöntemi**

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu methodla saptanabilir (100) (Şekil 3).



**Şekil 3.** TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü

### **1.3.6.2.3. M30 Yöntemi**

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir (100).

### **1.3.6.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi**

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 IHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir (100).

## **1.3.6.3. Biokimyasal Yöntemler**

### **1.3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi:**

Deoksiribonükleik asit (DNA Fragmentasyonu): DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (100).

### **1.3.6.3.2. "Western" Blotting**

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür, sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla belirlenebilir (100).

### **1.3.6.3.3. "Flow" Sitometri**

"Flow" sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır;

- I. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- II. Anneksin V kullanılarak (100).

## **1.3.6.4. İmmünolojik Yöntemler**

### **1.3.6.4.1. ELISA**

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (100).

#### **1.3.6.4.2. Flourimetrik Yöntem**

- *Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)*

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (100).

#### **1.3.6.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri**

##### **1.3.6.5.1. DNA Microarrays**

Deoksiribonükleik asit (DNA) "microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (100).

#### **1.4. Tiyamin ve Etkileri**

##### **1.4.1. Tiyaminin Tarihçesi**

İnsanlarda "Beriberi hastalığı", tiyamin (B1 vitamini) yetersizliği sonucu ortaya çıkar ve muhtemelen ilk yazılan yetersizlik hastalığıdır. Bu yüzden tiyamin en eski vitamin olarak kabul edilir. Beriberi ilk olarak M.Ö. 2600'de Çin'de tarif edilmiştir. Ancak hastalığın sebebi ve tedavisi uzun yıllar bulunamamıştır. 1880'lerde Japon deniz kuvvetlerindeki denizciler üzerinde yaptığı bir çalışmada Takaki, beriberi insidansını %32 olarak bulmuştur. Ancak Takaki, hastalığı diyetle eklenen proteinin önlediğini zannetmiştir (101).

Hollandalı araştırmacı Eijkman 1890'larda, öğütülmüş pirinç diyeti ile beslediği tavuklarda paralizi geliştiğini görmüş ve bu durumu polinevrit olarak adlandırarak, insanlardaki beriberi hastalığı bulguları ile benzerliğini bulmuştur (101-103).

Grijns, beriberiye,1901'de hayati önemi olan bir besin maddesinin eksikliğinin neden olabileceğini belirtmiştir (101).

Casimir Funk isimli araştırmacı, Londra'daki Lister Enstitüsünde 1911'de amin karakterinde etkili bir antiberiberik maddeyi pirinç kepeğinden elde etmiştir. Funk, memeliler için hayati öneme sahip olan bu maddeye "vital-amin" (vitamin)

adını vermiştir. Daha sonra vitaminlerin amin olmadığını belirlenmesiyle bu kelime tüm vitamin ailesi için kullanılmıştır (101-103).

1926' da, Jansen ve Donath, tiyamini saf formunda izole etmişlerdir (101, 102, 104). Williams ve ark. (102, 103) ise, 1936'da tiyaminin kimyasal yapısını bulmuş ve vitamini sentezleyebilmişlerdir.

#### **1.4.2. Tiyaminin Kimyasal Yapısı, Özellikleri ve Antagonistleri**

Tiyamin suda çok, alkolda az çözünür, yağlı çözücülerde çözünmez, pH'sı 3.5'un altındaki çözeltilerde ısıya dayanıklıdır. Hafif oksidasyonla tiokroma oksitlenir. Tiokromun verdiği mavi floresans, tiyamin konsantrasyonunu tayin etmenin esasını teşkil eder. Bu amaçla tiyamin, alkalik ferrisiyanür ile muamele edilerek tiokroma oksitlenir ve bunun verdiği floresans belli miktarda saf tiyaminin verdiği floresans ile mukayese edilir (104).

Tiyaminin hidroklorit ve monohidrat formları olup Tıpta genellikle hidroklorit formu kullanılır (101, 103).

Tabiatta antitiyamin aktiviteli maddeler oldukça fazladır. Bunlar, başlıca tiyaminin yapısal benzerleri (analogları) ve tiyaminin yapısını bozanlar olmak üzere iki grup altında toplanırlar (101).

Yapısal benzerlik gösteren antagonistler; piritiyamin, oksitiyamin ve amprolium gibi sentetik bileşiklerdir. Bunlar, inaktif olduklarından metabolik yolun değişik noktalarında tiyaminin kullanımını bozarlar (103, 105).

Tiyaminin yapısını bozmak sureti ile etki eden antitiamin etkili unsurların başında tiaminaz gelir. Tiaminaz, bazı hayvansal organizmalarda (sazan balığı ve kabuklu türlerinde) ve bazı bitki türlerinde (eğrelti otu ve at kuyruğu) bulunur (104-107). Bu vitaminin biyolojik aktif şekli olan tiyamin pirofosfat (TPP), tiyamine ATP den bir pirofosfat grubunun transferiyle oluşur. Tiyamin pirofosfat, alfa ketoasitlerin oksidatif dekarboksilasyonunda ve transketolaz reaksiyonunda alfa-ketollerin yıkımı ve oluşumunda koenzim olarak rol oynar (108).

Tiyamin eksikliğinde (beriberi), dokularda pirüvik asit ve bazı aminoasitlerin kullanılması azalırken, yağların kullanılması artar. Bu nedenle, tiyamin özgül olarak karbonhidratların ve birçok aminoasitlerin son metabolizmaları için gereklidir. Bu besinlerin kullanımlarının azalmış olması, tiyamin eksikliğinde görülen birçok bozukluklardan sorumludur (109).

Bazı besinlerin içerdikleri tiyamin miktarı Tablo 7 de gösterilmiştir (101).

**Tablo 7.** Bazı besin maddelerindeki Tiyamin konsantrasyonları (101).

<u>KARBONHİDRAT</u> <u>KAYNAKLARI</u>	mg/kg	<u>PROTEİN KAYNAKLARI</u>	mg/kg
Arpa tanesi	5.7	<u>BİTKİSEL KAYNAKLAR</u>	
Baklagiller	6.0	Kaba yonca	3.9
Mısır (tane)	3.5	Bira mayası	95.2
Mısır (kaba un)	10.9	Hindistan cevizi unu	0.8
Mısır (nişastası az un)	2.1	Pamuk çekirdeği unu	6.4
Akdarı	4.5	Keten tohumu unu	5.1
Yulaf tanesi	5.2	Yer fıstığı unu	12.0
Tatlı patates	0.9	Bezelye (kuru)	9.0
Patates	1.0	Susam unu	10.0
Pirinç tanesi	5.0		
Pirinç kepeği	23.0	<u>HAYVANSAL</u> <u>KAYNAKLAR</u>	
İşlenmiş pirinç	0.3	Kan unu (kuru)	0.2
Çavdar	4.4	Yumurta	3.4
Darı tanesi	3.9	Balık unu	2.0
Şeker pancarı posası	0.4	Karaciğer unu	2.6
Şeker kamışı melası	1.2	Et kemik unu	0.1
Buğday tanesi	5.5	İnek sütü	0.4
Buğday kepeği	8.0	Yağsız süt (kuru)	3.5

### 1.4.3. Tiyaminin Metabolizması

#### 1.4.3.1. Sindirimi, Emilmesi ve Taşınması

Doğal kaynaklardan alınan serbest tiyamin, suda çözünür ve önemli bir kısmı duodenumdan olmak üzere bağırsaklardan absorbe edilir (103, 104). Emilim mekanizması henüz tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen, tiyaminin hem aktif hem de pasif diffüzyonun bu olayda rol oynadığı düşünülmektedir (103). Tiyaminin düşük konsantrasyonlarında, aktif transport söz konusudur. Oysa yüksek konsantrasyonlarda, tiyamin barsak duvarından pasif olarak geçer. Absorbe edilen tiyamin, vena porta yolu ile taşıyıcı bir protein aracılığıyla karaciğere taşınır (103).

#### 1.4.3.2. Fosforilasyonu

Tiyamin Adenozin trifosfat (ATP) etkisi ile bilhassa karaciğerde fosforillenerek, Tiyamin pirofosfat (TPP)'a dönüştürülür. TPP ise, tiyaminin metabolik olarak aktif formudur. Vücuttaki toplam tiyamininin yaklaşık % 80'i TPP,

%10'u tiyamin trifosfat (TTP) ve kalanı da tiyamin monofosfat (TMP) ve serbest tiyamindir (101, 103).

### **1.4.3.3. Depolanması ve Boşaltımı**

Tiyamin kolayca absorbe edilmesine ve vücut hücrelerine taşınmasına karşın, önemli miktarlarda depo edilemez. Özellikle böbrekler, kalp, beyin ve karaciğer gibi yüksek metabolik aktiviteli organlarda az da olsa depolanır. Bu organlardaki tiyamin miktarları da oldukça değişkenlik gösterir (101, 103). Bu nedenle organizmanın düzenli olarak tiyamin alımına ihtiyacı vardır (102). İhtiyaçtan fazla alınan tiyamin idrar, gaita ve daha az olarak da ter yolu ile hızlı bir şekilde atılır (102-104). Dokulardaki yarı ömrü az olduğundan ve az depolandığından ilave verilmesi uzun dönem olmalıdır (110).

### **1.4.4. Tiyaminin Fonksiyonları**

#### **1.4.4.1. Koenzim fonksiyonu**

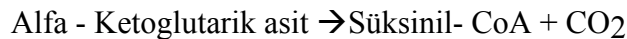
Tiyaminin organizmadaki koenzim fonksiyonu, bu vitaminin TPP formu ile gerçekleşir. TPP öncelikle karbonhidrat metabolizmasında önem taşır. TPP, alfa-keto asitlerin (piruvat, alfa-ketoglutarik asit) dekarboksilasyonu ve transketolaz için koenzim olarak görev yapar (Şekil 4). Bu reaksiyonların karbonhidrat kullanılarak enerji üretilmesinde hayati önemi vardır (101-104). TPP'nin iştirak ettiği reaksiyonlar şunlardır;

a) Glikoliz:



Piruvat, aktif asetik aside (asetil CoA) dönüşür. Asetil CoA, hücre metabolizmasında önemli bir rol oynar. Bir yandan sitrikasit siklusuna girerek bu siklusun gerektiği gibi çalışmasını sağlar, diğer yandan yağ asitleri ve sterinlerin temel yapı taşı olarak karbonhidratların lipidlere dönüşümünü gerçekleştirir (102-104).

b) Krebs (Sitrik asit) siklusu:

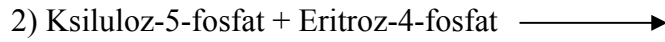
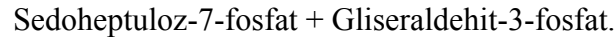


Alfa-Ketoglutarik asidin TPP tarafından katalize edilen oksidatif dekarboksilasyonu sonucu süksinil-CoA oluşumu, sitrik asit siklusunun çok önemli

bir kısmı reaksiyonudur. Organizmada bu reaksiyonun normal olarak gerçekleşmesi, optimal enerji elde edilmesine olanak sağlar (103).

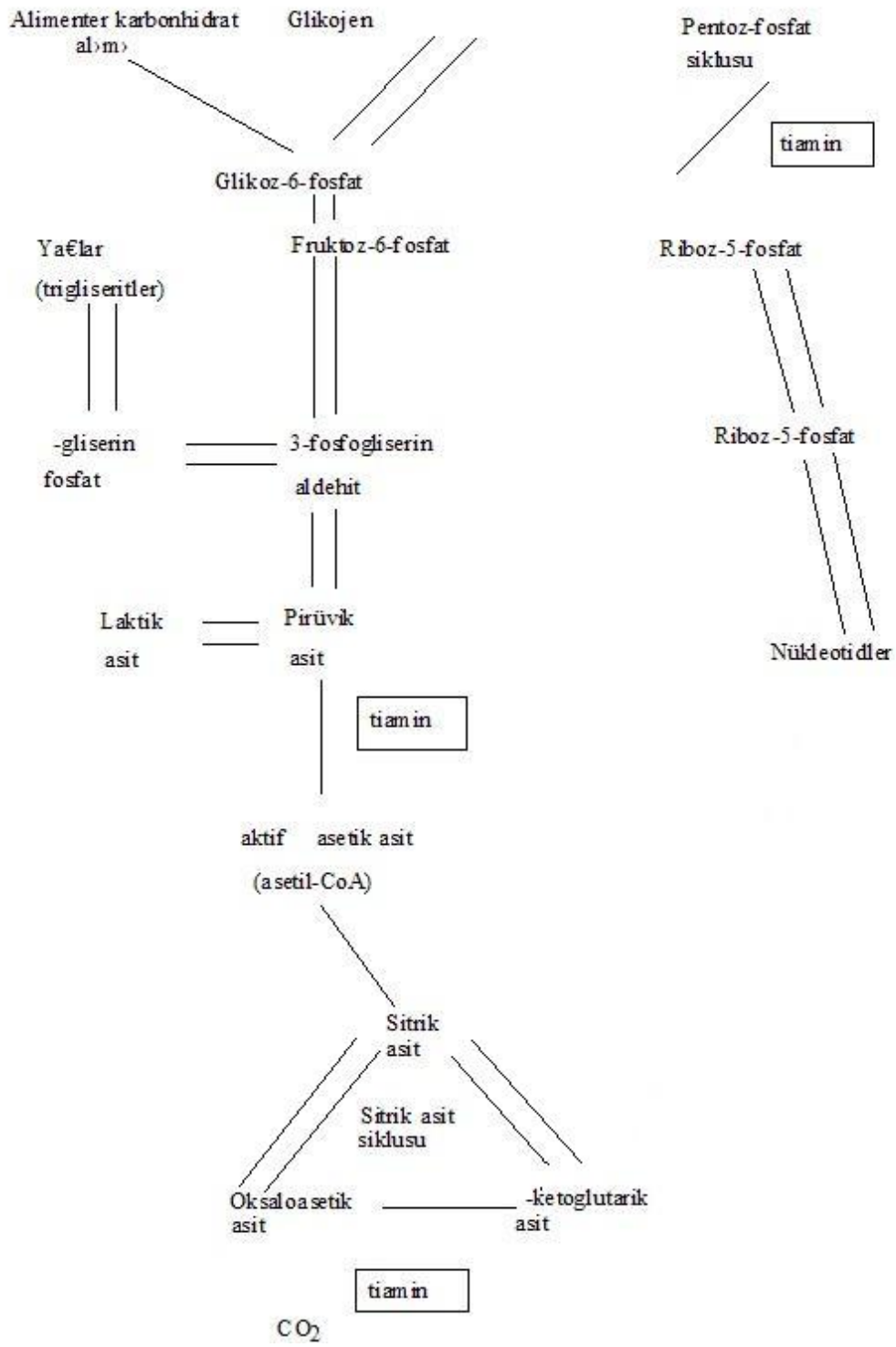
c) Pentozfosfat siklusu:

TPP, aynı zamanda pentozfosfat yolunun bir enzimi olan transketolazın da koenzimidir. Transketolaz ketol grubunun ara maddelerinden çeşitli akseptörlere transferini katalize eder. Bu enzim kalp, karaciğer ve eritrosit gibi memeli dokularında bulunur. Transketolazın katalize ettiği reaksiyonlar şunlardır;



Pentozfosfat yolu, nükleotid üretilmesinde gerekli olan ribozun sentezi için bilinen tek mekanizmadır. Ayrıca bu yolda karbonhidrat metabolizmasındaki ara maddeleri indirgeyerek yağ asidi yapmakta hayati önemi olan Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) da üretilmektedir (101, 103, 104).

Tiyamin kan şekerinin yakılması kalp sağlığının korunması ve öğrenme gibi beyin fonksiyonları için gerekli olan bir vitamindir (110). Tiyamin şeker hastalarında damar hastalığını önlemekle birlikte, yaşlanmaya karşı koruduğu gibi katarakt alkol ve sigaranın zararlı etkilerini de azaltır (110).



Şekil 4. Tiyamin ve karbonhidrat metabolizması (103).

#### 1.4.4.2. Nörofizyolojik Fonksiyonu

Tiyaminin koenzim fonksiyonunun dışında nörofizyolojide özel bir rol oynadığı düşünülmekle birlikte, tiyaminin sinir dokusundaki fonksiyonları hakkındaki bilgiler azdır (101, 103, 111, 112).

Tiyaminin nöral dokudaki muhtemel görevleri şunlardır (112);

a) Nöral impulsları iletmede görevli asetil kolinin sentezinde rol oynar.

b) Hücre membranlardaki ganglion hücrelerinin membranlarında impulsların iletimi için önemli transport olan pasif Na<sup>+</sup> transportuna katılır.

c) Pentozfosfat siklusunda tiyamin yetersizliği sonucu transketolaz aktivitesindeki düşüş, yağ asidi sentezini ve sinir sistemindeki enerji metabolizmasını azaltır.

Tiyamin eksikliği merkezi ve periferik sinir sisteminde lezyonlara yol açar. Merkezi sinir sistemi enerjisinin hemen hemen tamamı karbonhidratların metabolizmasına bağlıdır. Tiyamin eksikliğinde sinir dokusunun %50-60 oranında azalan glikoz tüketimi, yağ metabolizmasında türeyen keton cisimlerinin kullanımı ile karşılanır. Tiyamin eksikliğinde merkezi sinir sisteminin nöron hücrelerinde sıklıkla kromatoliz ve şişmeye rastlanır. Kötü beslenen nöron hücrelerine özgü olan bu değişiklikler, merkezi sinir sisteminin çeşitli bölümleri arasındaki iletişimi bozabilir (109).

#### 1.4.5. Tiyaminle ilgili klinik durumlar

Pirüvat ve alfa ketoglutaratın oksidatif dekarboksilasyonu birçok hücrede, özellikle sinir sisteminde enerji metabolizmasında anahtar bir rol oynar. Tiyamin eksikliğinde bu iki dehidrogenaz reaksiyonunun aktivitesi azalır ve böylece ATP üretimi azalması sonucu hücre fonksiyonları bozulur (108). Eksikliğinde görülen başlıca kliniği Beriberi ve Wernicke Korsakoff sendromudur (108). Ayrıca, tiyamin eksikliği hem periferik hem de merkezi sinir sisteminde sinir liflerinin miyelin kılıflarında dejenerasyonuna yol açabilir. Periferik sinirlerdeki bu lezyonlar, sık olarak bu sinirlerin aşırı uyarılabilirlik kazanmalarına neden olur. Bu durumda, bir veya birkaç periferik sinir boyunca yayılan ağrılara yol açar ve “polinörit” denilen hastalık tablosu ortaya çıkar. Ayrıca medulla spinalisteki sinir yollarında paraliz

yaratan dejenerasyonlar görülür. Bazen paralizi bulunmasa bile kaslar atrofi sonucu ileri derecede güçsüz kalırlar (109).

#### **1.4.6. Tiyaminin Toksisitesi**

Tiyamin oral olarak yüksek dozlarda bile toksik değildir. Ancak yüksek dozlarda paranteral uygulamalarının, çok nadir de olsa insan ve hayvanlarda toksikasyona neden olabileceği ifade edilmiştir (101).

Kurtdede ve ark. (113) tarafından, terapötik dozda i.m. olarak tiyamin enjekte edilen bir sığırdan tremor, ataksi, salivasyon, taşikardi, polipne ve yatalak hal gibi toksikasyon belirtileri görüldüğü bildirilmiştir.

Toksikasyonların sebebi tiyamine karşı olan duyarlılık nedeniyle gelişen anaflaktik reaksiyonlardır. Toksikasyon belirtileri antihistaminik ve atropin verilerek ortadan kaldırılabilir (101, 113).

Diyabette tiyamin miktarının azaldığı, deneysel DM'de yüksek doz tiyamin verilmesinin tiyamin eksikliğini düzelttiği gösterilmiştir (114).

#### **1.4.7. Tiyamin ve oksidatif stres**

Tiyamin pirofosfat (TPP); enzimler tarafından ihtiyaç duyulan birkaç önemli metabolik sürece katılan, asetil-COA, tıkarboksilik asit döngüsü, pentoz fosfat yolu / Calvin Çevrimi, amino asit biyosentez zincir branşları, ve izoprenoid biyosentezlerin üretimini içeren bir ana kofaktördür (115). İntermediyer metabolizmadaki merkezi rolü nedeniyle, tüm biyolojik sistemler TPP ye ihtiyaç duyarlar. Bitkilerde ve mikroplarda tiyamin pirofosfat de novo sentez edilirken, insanlar ve hayvanlar bu kofaktörü serbest tiyamini su ile almalıdırlar. Tüm tanelerde ve yeşil sebzelerde tiyamin bolluğuna bağlı olarak, insan ve hayvan diyetlerinde bitkiler tiyaminin birincil diyet kaynağıdır (115). Ayrıca tiyamin eksikliği belirgin inflamatuvar yanıtta hücre kaybının olduğu zedelenme veya zedelenme olmaksızın oluşan oksidatif stresi artırır (116). Tiyamin eksikliği sonucu birkaç temel mekanizma ile hücrede apoptozis ve nörodejenerasyon oluşur. Bu mekanizmalar;

- 1- Enerji yapımı ve laktik asidozun oluşumu (117, 119)
- 2- Serbest radikallerin ve oksidatif stresin seviyesinin artırılması (119, 120)
- 3- Nörodejenerasyon başlangıcında oluşarak mikrogliaları değiştirmesi (121).
- 4- Voltaj bağımlı K kanallarında değişiklik yapması (122).
- 5- Sellüler membran kırılması (123).

6- Mitondrial kaspaz 3 aracılı apoptozun oluşması (124).

7- Nukleustaki amiloid prekürsör proteinin C terminal fragmanında translokasyon olması (125).

Tiyamin yetersizliği durumunda, kültürlerde yetiştirilmiş glial hücrelerin yağ asidi ve kolesterol sentezleme kabiliyetinin lipojenik enzimlerin yapımındaki azalma nedeniyle bozulduğu bildirilmiştir. Tiyamin yetersizliğinin başlangıç dönemlerinde, canlı organizmadaki glial hücrelerde görülen dejeneratif bozuklukların temelinde aynı mekanizmanın rolü aldığı düşünülmektedir (101).

Bu mekanizmaların birçoğu tiyamin eksikliğinin membran aracılı etkisiyle oluşur. Bununla birlikte deneysel tiyamin eksikliği bir azalmış oksidatif metabolizmadır (121). Tiyamin bağımlı mitokondriyal dehidrogenaz kompleksi serbest O<sub>2</sub> radikallerini üretir (119). O<sub>2</sub> bağımlı serbest radikaller krebs siklusundaki substrat döngüsü boyunca yönetilir ve moleküler oksijenle reaksiyonu aerobik şartlarda ROS üretiminin devam etmesiyle sonuçlanır (120). ROS üretimi mitokondriyal transport zinciri süresince lipidleri, membranı, proteinleri ile DNA yı içeren ve hücre hasarı yapan oksidatif stresle sonuçlanır (126). Tiyamin eksikliği glikolizisin artması laktat dehidrogenazın artması ve fokal laktat birikimi ile birlikte mitokondriyal disfonksiyonu provoke eder (118). Serbest radikallerin artması glutasyonun (GSH) ve majör nörodejeneratif hastalıkların orjini olan oksidatif stresin karşıtı olan defans sistemlerinin azalması ile sonuçlanır. Örneğin prion hastalıkları ve Transmissible Spongiform Ensefalopatiler (TSE) beyindeki antioksidan defans proteinlerinin konjenital ve dramatik azalması ile ilişkilidir (127). Tiyamin ve oksidatif stressle ilişkili bir başka hastalık diyabettir. Diabetes mellitusun komplikasyonları tiyamin eksikliğine benzer. Ve artmış reaktif oksijen türleriyle ilişkilidir (128). Tiyaminin bir enzim kofaktörü olarak insan beslenmesi üzerindeki önemli rolüne ek olarak, son çalışmalar gösteriyor ki, tiyamin farklı organizmalardaki stresi azaltma görevini de yerine getirebilmektedir (129). Kolibasilinde, tiyamin, paraquat bağlı hasara karşı koruyucu olarak muhtemel bir antioksidan olarak gösterilmiştir (130). Farelerin karaciğer mikrozomlarında, tüpte bulunan oleik asitin serbest radikal oksidasyonunu ve lipid peroksidasyonu engellemek için tiyamin kullanılmıştır (131). Aynı zamanda tiyaminin, farelerde mitokondriyal toksinleri ve oksidatif stresin teşvik ettiği ölü hücreleri engellediği

bulunmuştur. Wilson hastalığı için de tiyaminin potensiyel bir terapötik ajan olduğu bildirilmiştir (132, 133).

Bazı araştırmalar sonunda tiyamin biyosentetik mutantlar oksidatif strese daha toleranslıdır ve farklı abiyotik stres durumlarında oksidatif stresi azaltan tiyamin ve TPP önemli rol oynar (134).

Tiyamin, tiyamin fosfat ve tiyamin bağımlı enzimlerdeki azalma oksidatif stresi çoğaltır ve nörodejenerasyona sürükler (134). Çünkü;

- a- Tiyamin eksikliği oksidatif stresi artırır.
- b- Tiyamin bağımlı enzimler ve süreçler oksidatif strese duyarlıdır.
- c- Tiyamin oksidatif stresi tersine çevirir
- d- Diğer antioksidanlar tiyamin eksikliğinin yol açtığı değişiklikleri tersine çevirir.

#### **1.4.8. Antioksidanlar tiyamin eksikliğine karşı koruma sağlar**

İn vitro ve invivo şartlarda tiyamin eksikliğine karşı kullanılan antioksidan tedaviler, tiyamin reaksiyonunun en azından bir kısmını bölge güdümlü antioksidan olarak kullanılması fikrini verirler. Kültür nöronlarındaki tiyamin eksikliği, tiyamin fosfatı azaltır, tiyamin bağımlı KGDHC enzim aktivitelerini düşürür, laktat salınımını artırır, pH'ı düşürür transketolase ve önemli hücre ölümlerine sebep olur. Antioksidanlardan E vitamini ya da butillenmiş hidroksianisol tiyamin yoksunu nöronlara önemli derecede nörokoruma sağlar (135).

Intraselüler adezyon molekülü-1 ve endotelial nitrik oksit sentaz oksidatif stres tarafından aktive edilirler. Tiyamin eksikliğinden dolayı oluşan nöronal hücre kaybına karşı bu moleküllerin eksik olduğu genetik nakavtlar (genetic knockout) nöronal koruyucu özellik gösterir (136). Tiyamin eksikliğinden oluşan nöronal hücre ölümünde ROS (reaktif oksijen türleri) önemli rol oynamaktadır (134).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

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

### 2.1. Deney Hayvanları

Deneysel hayvanlarda kullanılan en az 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek ratlar, FÜDAM'dan temin edildi. Hayvanların buldukları 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 ise 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 8'de belirtilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

**Tablo 8.** Deney hayvanlarına verilen sıçan 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 D<sub>3</sub>, 12 mg E, 0,8 mg K<sub>3</sub>, 0,8 mg B<sub>1</sub>, 2,4 mg B<sub>2</sub>, 1,2 mg B<sub>6</sub>, 0,006 mg B<sub>12</sub> 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

Çalışma gruplarını oluşturacak 14 adet sıçanda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar,

Pharmacia, France) intraperitoneal olarak 0,4 ml (0,1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4,5) çözdürülerek 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 sıçanlar, 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. Çalışma Gruplarının Oluşturulması**

Deneyel çalışmalar, toplam 21 adet sıçan üzerinde gerçekleştirildi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Sıçanlar; kontrol (Grup I), diyabetik (Grup II) ve diyabet + vitaminB1(tiyamin) (Grup III) olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

**1. Grup (n=7) kontrol grubu:** 6 haftalık deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

**2. Grup (n=7) diyabet grubu:** 50 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilip, 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

**3. Grup (n=7) diyabet + vitamin B1 grubu:** 50 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilip 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olan bu hayvanlara diyabet oluşumu itibariyle 6 hafta boyunca vitamin B1 tiyamin (thiamine hydrochloride, DMS.) 25mg/kg/gün oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında 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) ve xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından ratların beyin dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokuları histolojik çalışma için % 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.

## 2.6. 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 9). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü.

**Tablo 9.** 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	.....

## 2.7. İmmünohistokimyasal Çalışma

Beyin dokusunda bax immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 10).

**Tablo 10.** 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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	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 hematoksilen	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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse 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 araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) 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 11).

**Tablo 11.** İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

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

## 2.8. 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 12).

Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) 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 13).

**Tablo 12.** TUNEL boyama prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etiv	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 <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	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 medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	.....

**Tablo 13.** TUNEL boyama yaygınlığının derecesi

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

## **2.9. İstatistiksel Analiz**

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri student t ve ANOVA testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Klinik Bulgular

Grup I'e ait sıçanların vücut ağırlıklarında deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Grup II ve Grup III'de ise Grup I ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ( $p<0.05$ ) (Tablo 14).

**Tablo 14.** STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final ağırlık değerleri

	<b>Grup I</b> <b>(n=7)</b>	<b>Grup II</b> <b>(n=7)</b>	<b>Grup III</b> <b>(n=7)</b>
<b>Başlangıç vücut ağırlığı</b> <b>(gr)</b>	231,14±11,47	239,29±8,76	246,71±3,90
<b>Final vücut ağırlığı (gr)</b>	333,57±5,54 <sup>a</sup>	209,43±5,88 <sup>b</sup>	216,00±3,59 <sup>b</sup>

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

#### 3.2. Biyokimyasal Bulgular

##### 3.2.1. Kan glukoz düzeyleri

Grup II ve Grup III'e ait sıçanların kan glukozu değerlerinde deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı ( $p<0.001$ ). Grup I ile kıyaslandığında Grup II ve Grup III'e ait sıçanların kan glukozu değerlerinde deneyin sonunda anlamlı bir artış vardı ( $p<0.001$ ) (Tablo 15).

**Tablo 15.** STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final kan glukoz değerleri

	<b>Grup I</b> <b>(n=7)</b>	<b>Grup II</b> <b>(n=7)</b>	<b>Grup III</b> <b>(n=7)</b>
<b>Başlangıç kan glukozu (mg/dl)</b>	104,57± 4,31	100,86± 3,16	104,86 ± 3,65
<b>Final kan glukozu (mg/dl)</b>	106,43± 2,40	395,43±23,43 <sup>a,b</sup>	393,57±16,05 <sup>a,b</sup>

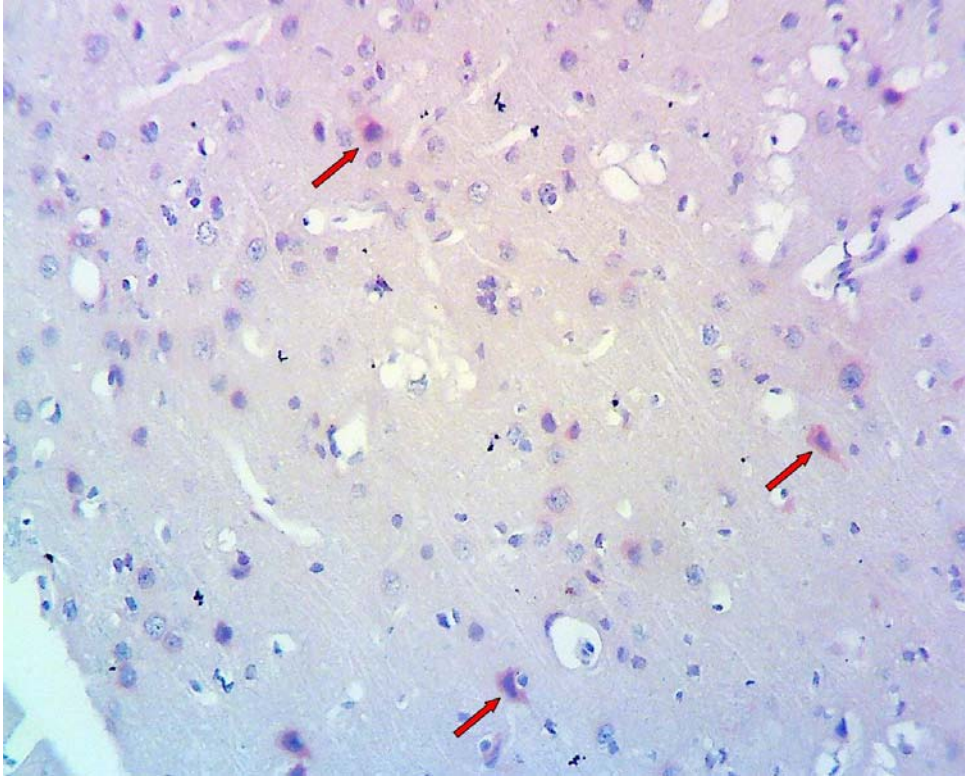
Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

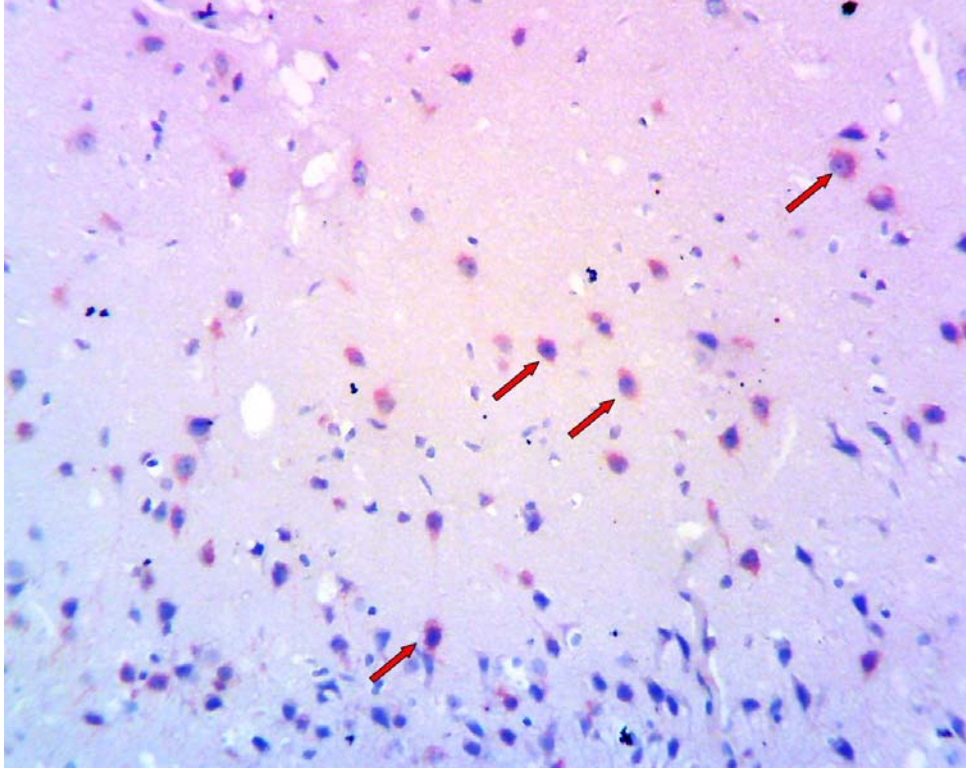
<sup>b</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.001$ ).

### 3.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

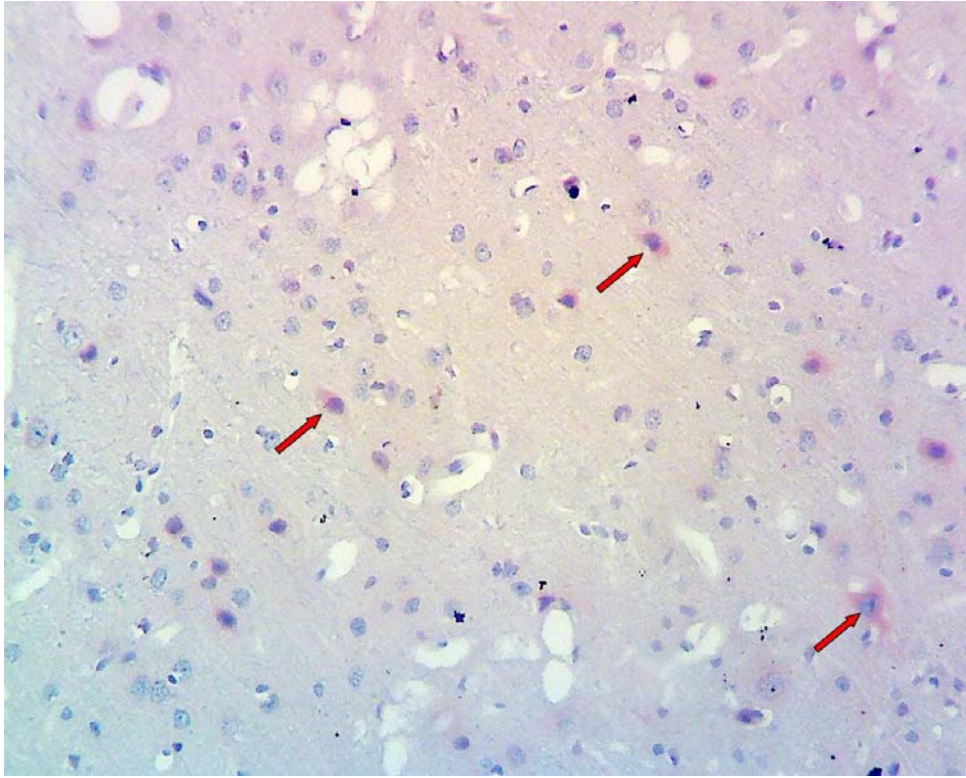
Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; kontrol grubunda beyin korteksinde bax immünreaktivitesinin +1 yoğunluğunda olduğu gözlemlendi (Şekil 5). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda bax immünreaktivitesinde beyin korteksinde belirgin bir artış vardı ve +3 yoğunluğunda olduğu görüldü (Şekil 6). Tiyamin verilen tedavi grubunda ise bax immünreaktivitesi beyin korteksinde DM grubuna göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +1 olarak değerlendirildi (Şekil 7).



Şekil 5. Kontrol grubunda beyin korteksinde bax immünreaktif hücreler(→).X200



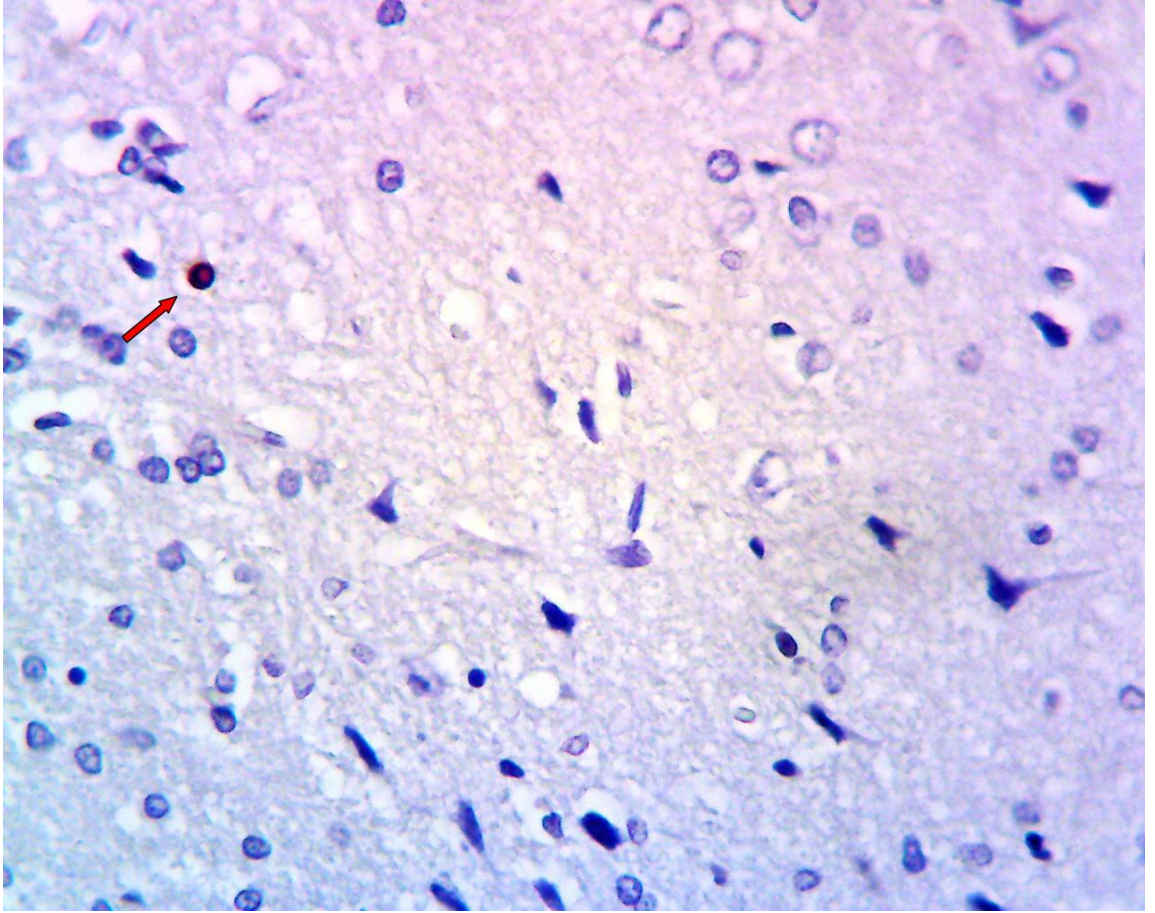
**Şekil 6.** Diyabet grubunda beyin korteksinde artmış bax immünreaktif hücreler(→)  
X200



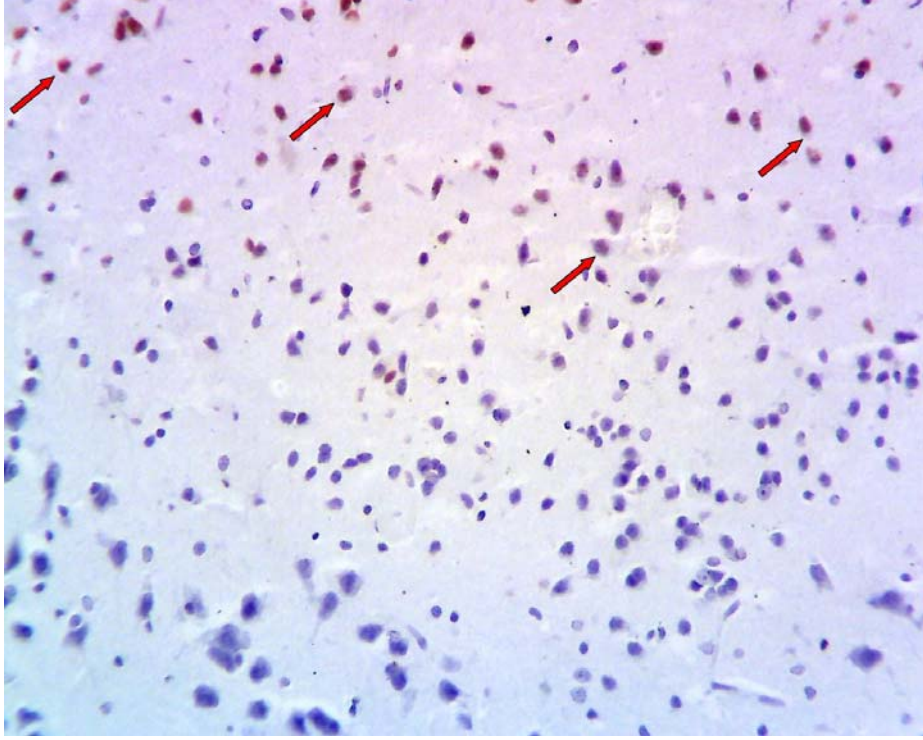
**Şekil 7.** Diyabet + vitamin B1 grubunda beyin korteksinde bax immünreaktif hücreler (→). X200

### 3.4. TUNEL Bulgular

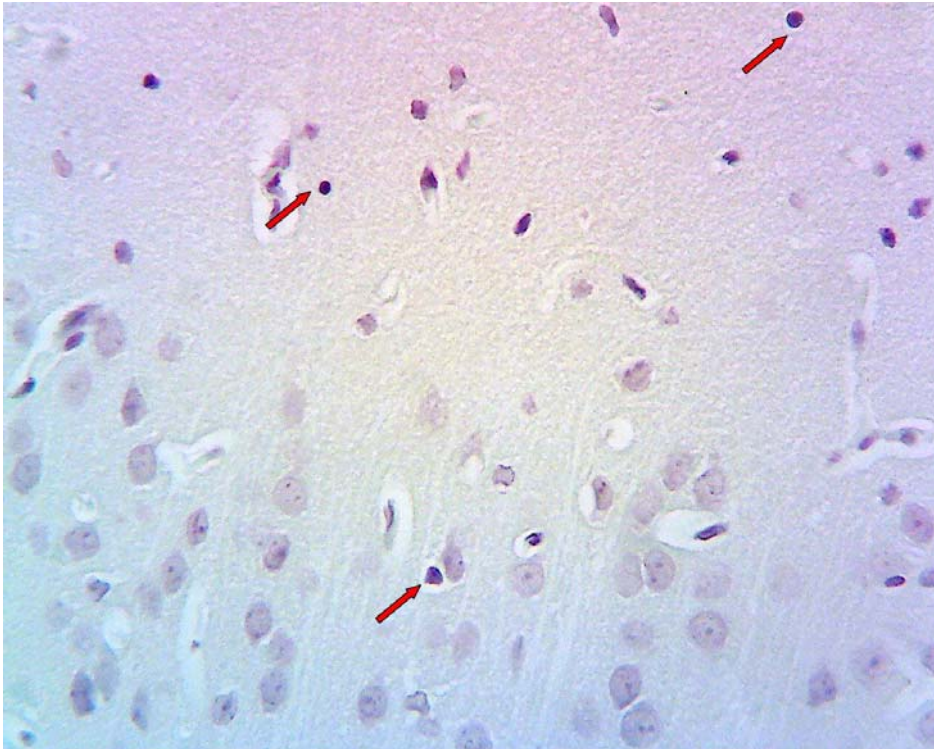
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 8). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda belirgin bir artış vardı ve +3 yoğunluğunda olduğu görüldü (Şekil 9). Tiyamin verilen tedavi grubunda ise DM grubuna göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 10). Pozitif kontrol için meme dokusu (Şekil 11) kullanıldı. Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 12).



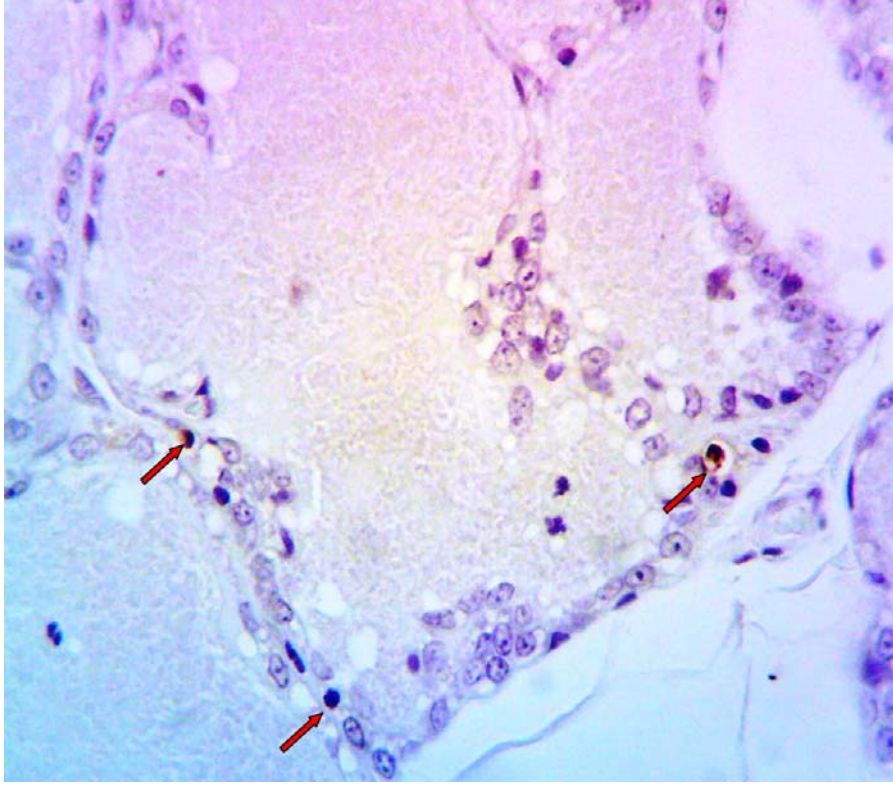
Şekil 8. Kontrol grubunda beyin korteksinde TUNEL pozitif hücre (→). X200



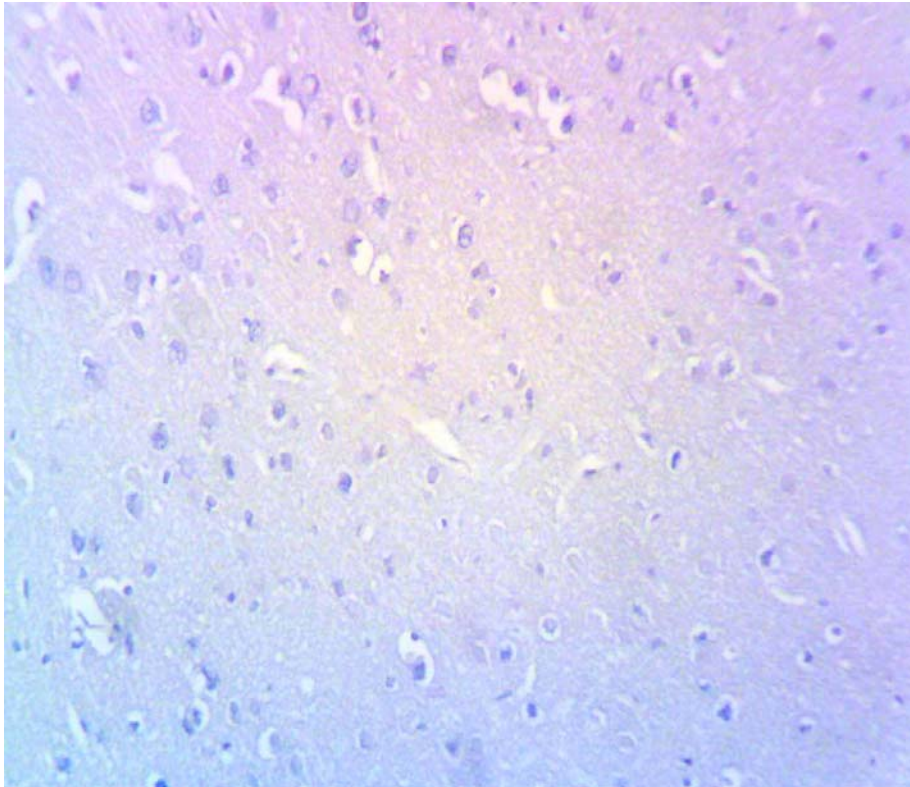
**Şekil 9.** Diyabet grubunda beyin korteksinde artmış TUNEL pozitif hücreler (→)X200



**Şekil 10.** Diyabet + vitamin B1 grubunda beyin korteksinde TUNEL pozitif hücreler (→). X200



**Şekil 11.** TUNEL pozitif kontrol. Meme Dokusu. X200



**Şekil 12.** TUNEL negatif kontrol. X200

#### 4. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus özellikle hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış ateroskleroz ile birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan kronik metabolik bir hastalıktır (15).

Oksidatif stres; vücuttaki oksidanlar ile antioksidanlar arasında bulunan dengenin oksidanlar yönünde değişmesi sonucu oluşan birtakım moleküler değişikliklerin tanımıdır (137, 138).

Serbest radikaller özellikle hücrelerin lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbonhidrat yapılarının bozulmalarına neden olur. Serbest radikaller tüm önemli bileşiklerde etkili olmakla birlikte oksidatif stresin en önemli nedenleri olarak bilinir (139).

Son yıllarda oksidatif stresin; DM, obezite, kanser, yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon, apoptozis, kardiyovasküler hastalıklar ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (140).

Diyabetin etiyolojisinde oksidatif stresin rolü olduğu ve diyabetin ilerlemesine neden olduğu, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabeti bulunan olgularda serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun arttığı tespit edilmiştir (69).

Diyabete bağlı apoptozisin mekanizması net olmamakla birlikte oksidatif stresin apoptozise neden olabileceği son yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. (141, 142).

Apoptozisin uyarılmasında oksidatif stres güçlü bir mediatördür. Oksidatif stres tarafından oluşturulan mitokondriyal hasar ile sitokrom c salınımı ve ardından kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (143).

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, serbest radikal üretimini arttırdığı saptanmıştır. Bunu nonenzimatik glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku

hasarı ile gerçekleştirmektedir (70). Diyabette, toksik serbest radikaller ile hücrel defansın azalması uzun zamandır bilinmektedir (71).

Yapılan çalışmalarda ROS inaktivasyonu yoluyla astrositlerin nöronal yaşamı koruyabileceği rapor edilmiştir (144).

Santral sinir sistemi (SSS) komplikasyonlarının oluşumunda artmış oksidatif stresin temel rol oynadığı düşünülmektedir (45, 47). Oksidatif stres ROS oluşumuna neden olmakla birlikte SSS'de de inme, Alzheimer ve Parkinson Hastalığı gibi akut ve kronik nörolojik hastalıklarda nörotoksisite için bir son basamak olarak belirtilmiştir (145). Nöron kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığı *invivo* ve *invitro* çalışmalarla gösterilmiştir. Tip 1 DM'de nöronal yoğunluğun azalması diyabetin süresi ile koreledir ve apoptozisten kaynaklanan nöronal kaybın zaman ilerledikçe arttığı bildirilmiştir (50, 54).

Tiyaminin biyolojik aktif şekli olan Tiyamin pirofosfat (TPP), Tiyamin'e ATP den bir pirofosfat grubunun transferiyle oluşur. Tiyamin pirofosfat, alfa ketoasitlerin oksidatif dekarboksilasyonunda ve transketolaz reaksiyonunda alfa-ketollerin yıkımı ve oluşumunda koenzim olarak rol oynar (108).

Doğal kaynaklardan alınan serbest tiamin, suda çözünür ve önemli bir kısmı duodenumdan olmak üzere bağırsaklardan absorbe edilir (103, 104). Emilim mekanizması henüz tam olarak anlaşılammış olmasına rağmen tiyaminin hem aktif hem de pasif diffüzyonunun bu olayda rol oynadığı düşünülmektedir (103). Tiyaminin düşük konsantrasyonlarında, aktif transport söz konusudur. Oysa yüksek konsantrasyonlarda tiyamin barsak duvarından pasif olarak geçer. Absorbe edilen tiyamin, vena porta yolu ile taşıyıcı bir protein aracılığıyla karaciğere taşınır (103).

Tiyamin eksikliğinde (beriberi), dokularda pirüvik asit ve bazı aminoasitlerin kullanılması azalırken yağların kullanılması artar. Bu nedenle, tiyamin özgül olarak karbonhidratların ve birçok aminoasitlerin son metabolizmaları için gereklidir. Bu besinlerin kullanımlarının azalmış olması tiyamin eksikliğinde görülen birçok bozukluklardan sorumludur (109).

Tiyamin eksikliği merkezi ve periferik sinir sisteminde lezyonlara yol açar. Merkezi sinir sistemi enerjisinin hemen hemen tamamı karbonhidratların metabolizmasına bağlıdır. Tiyamin eksikliğinde sinir dokusunun %50- 60 oranında azalan glikoz tüketimi, yağ metabolizmasında türeyen keton cisimlerinin kullanımı

ile karşılanır. Tiyamin eksikliğinde merkezi sinir sisteminin nöron hücrelerinde sıklıkla kromatoliz ve şişme gözlenir. Kötü beslenen nöron hücrelerine özgü bu değişiklikler, merkezi sinir sisteminin çeşitli bölümleri arasındaki iletişimi bozabilir (109). Ayrıca tiyamin eksikliği belirgin inflamatuvar yanıtta hücre kaybının olduğu zedelenme veya zedelenme olmaksızın oluşan oksidatif stresi artırır (116).

Redükte olmuş glutasyon; hücre içerisinde oksidan ajanların etkisini azaltarak hücrenin etkili proteinlerini oksidasyona karşı korur, antioksidan özellik gösterir. Bu esnada glutasyon oksitlenir. Bu glutasyonun görevini yerine getirebilmesi için tekrar redükte olması gerekmektedir. Bu amaçla NADPH'lar kullanılır. NADPH için pentoz fosfat yolu önemlidir ve tiyamin de bu yola etki ettiği için bir antioksidan olarak kabul edilebilir (146, 147).

Tiyamin bağımlı enzimler oksidatif stres türlerine çok duyarlı gibi görünür. KGDHC (alfa ketoglutarat dehidrogenaz kompleksi) oksidatif strese karşı en duyarlı enzimler arasında yer almaktadır (148).

Biz bu çalışmamızda Tiyaminin oksidatif hasarın arttığı DM'de merkezi sinir sistemindeki koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık. Deneysel diyabet modelleri genellikle pankreasın beta hücrelerine toksik olan STZ ile oluşturulmaktadır (149). Biz de *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotik olan STZ'yi kullandık.

Diyabette lipid peroksidasyonunun arttığı çoğu araştırmacıların ortak fikridir. Bazı yayınlarda bazı antioksidan enzimlerin azaldığı, arttığı veya değişmediği şeklinde çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (150).

DM'de oluşan oksidatif streste süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitrik oksit gibi serbest radikaller rol oynar. Birçok çalışmada lipid peroksidasyonunun kontrolü diyabetin komplikasyonları ile lipid peroksidasyonu arasında ilişkiyi göstermiş olmasından dolayı önem taşımaktadır (151).

Lipit peroksidasyonunda ve sonrası oluşan ürünlerin membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine hasar vermekle birlikte membran geçirgenliği ve mikrovizkozitesini anlamlı şekilde etkilediği belirlenmiştir (126, 152).

Diabetes Mellitus'ta tiyamin miktarının azaldığı bildirilmiştir. Deneysel DM'de yüksek doz tiyamin verilmesinin tiyamin eksikliğini düzelttiği gösterilmiştir (114).

Gibson ve ark.'nın (134) yaptığı çalışmalarda; tiyamin biyosentetik mutantlar oksidatif strese daha toleranslıdır, dolayısıyla; farklı abiyotik stres durumlarında oksidatif stresi azaltan stres-yanıt moleküllerinde tiyamin ve TPP önemli rol oynamaktadır.

Tiyamin eksikliği olan hayvan beyinlerinde oksidatif stres belirteçleri olan ICAM-1(inter-cellüler adhesion molecule), hemeoxygenase, eNOS, iNOS, ve mikroglyal aktivasyonun arttığı gösterilmiştir. Bu belirteçlerin bazılarındaki yükseliş, nöronal ölümlerin önüne geçer. Aynı zamanda oksidatif stresin tüm belirteçleri AD (Alzheimer Disease)'li beyinlerde varlık gösterir (153).

Ekizoğlu ve ark. (154) diyetle sağlanan yarı açlığın ve günlük tiyamin alımının beyin farklı bölgeleri üzerindeki etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması amacıyla yaptıkları çalışmada beyin dokusunda malondialdehid, Nitrit-Nitrat ve GSH düzeylerini araştırmışlar ve deney gruplarında artmış oksidatif stres ve apoptoz tespit etmişlerdir. Tiyaminin verilmesinin nöronal doku üzerinde koruyucu etkisi olduğu, oksidatif stres ve apoptozu azalttığını göstermişlerdir.

Çalışmamızda, sıçanların beyin korteksinde pro-apoptotik olduğu bilinen Bax'ın ve apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan TUNEL boyamasının sonucunda; STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda Bax ve TUNEL pozitif hücrelerde kontrole göre belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Tiyamin verilen tedavi grubumuzda ise diyabetik gruba göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

Bax immünreaktivitesinin deneysel diyabetik beyin dokusunda arttığını gösteren farklı çalışmalarda vardır. Xue ve ark. (155) STZ ile oluşturulan deneysel diyabette Bax immünreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Diyabetik ratlarda diyabetin süresinin nöronal apoptozis oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir ve bu apoptozisin intrasitoplazmik kalsiyum birikimi ile mitokondrial disfonksiyon, reseptör ile olan veya olmayan mekanizmalar veya IGF aktivitesinin süpresyonu ile olan iskemi gibi değişik hücrel mekanizmalar aracılığıyla indüklenebileceği rapor edilmiştir (156).

Hipergliseminin bir sonucu olarak deneysel diyabetik sıçanlarda kronik oksidatif stres oluşur. Deneysel diyabetik ratlarda oksidatif stresin ve antioksidanların nöron hasarına olan etkileri gözlenmiştir. Hipergliseminin ROS formasyonu oluşturduğu, bunda hücre membranının lipid peroksidasyonunu

başlattığı ve DNA hasarı yaptığı sonuçta oksidan proteinler tarafından nöronal ölümün arttığı belirtilmiştir (157).

Oksidatif stres oluşumu ile birlikte kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişir. Bu değişiklik ile mitokondrium ve DNA hasarı sonucu hücre apoptozise sürüklenir (158).

Hücrenin hasara uğraması ve apoptozise gitmesi esnasında mitokondri membran potansiyelinde oksidatif stresin katıldığı bazı değişiklikler olur. Bu değişiklikler sonrasında sitokrom c, sitozole salınır. Sitokrom c'nin sitozole salınması Bcl-2 ailesinin apoptozisi engelleyici üyeleri (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Bu esnada Bcl-2'nin pro apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) sitokrom c salınmasını artırmak için çalışırlar. Hücrenin ölmesi ile yaşaması bu dengeyle bağlantılıdır. Bu proteinlerden proapoptotik olanların artışı hücreyi ölüme sürükler (159-163).

Tiyamin ve oksidatif stres ilişkisi DM'de belirlenmiştir. Diabetes mellitusun komplikasyonları tiyamin eksikliğine benzer olup artmış reaktif oksijen türleriyle ilişkilidir (128).

Cullen ve ark.'nın (164) yaptığı çalışmalarla alkoliklerde görülen Wernicke Korsakoff sendromunun tiyamin eksikliğindeki nöropatolojiye bağlı olarak beyindeki oksidatif stressi arttırdığını göstermişlerdir.

Deneysel diyabette antioksidanların nöronları koruduğu yapılan çalışmalarla belirtilmiştir (165).

Bu çalışmada STZ verilen deneysel diyabetik sıçanların beyin korteksinde belirgin olarak hücresel hasar olduğu görülmüştür. Oksidatif hasarı engellemek için verilen tiyaminin, DM'nin oluşturduğu apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir.

Sonuçta DM'nin oluşturduğu hücre hasarına karşı tiyaminin beyin korteksinde koruyucu etkilerinin olmasının gösterilmesi diyabetin komplikasyonları açısından ele alındığında önemli bir bakış açısı kazandırabilecektir. Diyabette tiyamin ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, gelecekte, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla, tiyamin kullanımı ile ilişkili tedavi yaklaşımları da denenebilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. World Health Organisation, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus and it's Copmlications, Switzerland: Geneva, 1991: 57.
2. Tripathi BK, Srivastava AK, Diabetes mellitus: complications and therapeutics, Med. Sci. Monit 2006; 12, 130-147.
3. Kovacs M, Goldston D, Obrosky DS, Bonar LK. Psychiatric disorders in youths with IDDM: rates and risk factors, Diabetes Care 1997; 20: 36– 44.
4. McCarthy AM, Lindgren S, Mengeling MA, Tsalikian E, Engvall JC. Effects of diabetes on learning in children, Pediatrics 2002; 109: 9-10.
5. Blanz BJ, Rensch-Riemann BS, Fritz-Sigmund DI, Schmidt MH. IDDM is a risk factor for adolescent psychiatric disorders, Diabetes Care 1993; 16: 1579–1587.
6. Ceriello A, Quatraro A, Giugliano D. Diabetes mellitus and hypertension: the possible role of hyperglycaemia through oxidative stress, Diabetologia 1993; 36: 265–266.
7. Sima A, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes, Eur. J. Pharmacol 2004; 490: 187-197.
8. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. Endocrine Reviews 2004; 25: 612–628.
9. 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.
10. Sacks DB. Diabetes Mellitus. In: Burtis CA, Ashwood ER, (ed). Tietz Texbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Co 1999: 766-776.
11. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential markers of oxidative stress in stroke. Free Radical Biology & Medicine 2005; 39: 841 – 852.
12. Memişoğulları R, Bakan E. Levels of ceruloplasmin, transferrin, and lipid peroxidation in the serum of patients with Type 2 diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications 2004; 18: 193– 197.

13. Opera EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *R Soc Health* 2002; 122: 28-34.
14. Jhala SS, Hazell AS. Modeling neurodegenerative disease pathophysiology in thiamine deficiency: consequences of impaired oxidative metabolism. *Neurochem Int* 2011; 58: 3: 248-260.
15. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 237-243.
16. Foster DW. Diabetes mellitus. Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. (eds), *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 14. Edition. New York: Mc Graw Hill Companies, 1998: 2: 2060-2080.
17. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik. Birinci Baskı. Ankara: Medical Network & Nobel, 1996: 368-385.
18. Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006: 275-427.
19. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001:1: 51-62.
20. King H, Rewers M. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. In: Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. *Diabetes Care* 1993; 16: 157-177.
21. King H, Aubert RF, Herman WH. Global burden of diabetes. *Diabetes Care* 1998; 21: 1414-1431.
22. 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.
23. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). *İç Hastalıkları*. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005: 2279-2295.

24. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: 5-10.
25. Alberti KG, Zimmet PZ. World Health Organization: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: *World Diabet Med* 1998; 15: 539-553
26. Eastman RC, Vinicor F. 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.
27. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. Khan CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (editors). *Joslin's Diabetes Mellitus*. 14th ed. Boston: Lippincott William and Wilkins, 2005; 333-339.
28. Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması. Erdoğan G (editör). *Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik*. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 342-348.
29. Açıkalın İ. İç Hastalıkları. Ankara: Hacettepe Yayın Birliği, 1988; 222-248.
30. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 4-42.
31. American Diabetes Association. Insulin administration. *Diabetes Care* 2004; 22: 94-102.
32. Balasa B, Gunst K van, Jung N. Islet- specific expression of IL-10 promotes in nonobese diabetic mice independent of fas, perforin, TNF receptor-1, and TNF receptor-2 molecules. *J Immunol* 2000; 165: 2841-2849.
33. Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C. Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellüler adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol* 2002; 168: 3641-3648.

34. Binder C, Brange J. Insulin chemistry and pharmacokinetics. Fifth Edition. Porte D. Sherwin RS (Eds). Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus. Stamford: Appleton & Lange 1997: 689-708.
35. Cebrera-Rode E, Sarmiento L, Tiberti C, Molina G, Barrios J, Hernandez D, et al. Type1 diabetes islet associated antibodies in subjects infected by echovirus. Diabetologia 2003; 46: 1348-1353.
36. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, et al. The role of fas in autoimmune diabetes. Cell 1997; 89: 17-24.
37. Williams G, Pickup JC. Handbook of Diabetes Mellitus. Third Edition. Published by Blackwell, 2004:1-5
38. Laakso M. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi ve tanısı. Goldstein BJ, Müller-Wieland D (eds). Textbook of Type 2 Diabetes. New York: Martin Dunitz Group, 2003: 1-12.
39. Groop LC, Widen E, Ferrannini E. İnsulin resistance and insulin deficiency in pathogenesis of type 2 diabetes errors of metabolism or of methods. Diabetologia 1993; 36: 1326-1331.
40. De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H (eds). International Textbook of Diabetes Mellitus. Second Edition. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1997; 81: 635-689.
41. Altuntaş Y. Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflaması. Yenigün M (editör). Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 51-62.
42. Başkal N. Diabetes mellitusta akut metabolik dekompanseasyonlar. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2311-2321.
43. Gedik O. Diabetes mellitus'un komplikasyonları. Erdoğan G (editör). Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik. 2. Baskı. Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 367-383.
44. Diabetes Mellitus Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Kitabı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara: Hacettepe Yayın birliği, 1997.

45. Biessels GJ. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms. *The Netherlands Journal of Medicine* 1999; 54: 35-45.
46. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologica* 1994; 37: 650-653.
47. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neuroscience* 2000; 23: 542-549.
48. Li ZG, Sima AA. C-peptide and central nervous system complications in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2004; 5: 79-90.
49. Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 187-197.
50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 2002; 3: 241-245.
55. Ryan CM. Neurobehavioral complications of type 1 diabetes examination of possible risk factors. *Diabetes Care* 1998; 11: 86-93.
56. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Devl Neuroscience* 2000; 18: 383-399.

57. Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 2000; 43: 500-506.
58. McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992; 41: 557-570.
59. Auer RN. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 1986; 17: 699-708.
60. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 113-124.
61. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology. The Journal Biological Chemistry* 2001; 177: 125-134.
62. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E. Brain insulin receptors and spatial memory. *Biological Chemistry* 1999; 274: 34893-34902.
63. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 2001; 25: 311-325.
64. Levy J, Gavin JR, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *Am J Med* 1994; 96: 260-273.
65. Lee ET, Keen H, Bennett PH. Follow-up of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* 2001; 44: 3-13.
66. EliaS PK, EliaS MF, D'Agostino RB. NIDDM and blood pressure as risk factors for poor cognitive performance. The Framingham Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 1388-1395.
67. Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L. Essential Hypertension and cognitive function. The role of hyperinsulinemia. *Hypertension* 1993; 22: 771-779.
68. Birrel AM, Heffeman SJ, Ansellin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, Yue DK. Functional and structural abnormalities in the nerves of type 1 diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.

69. 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 Sci* 1992; 50: 335-339.
70. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
71. Pedulla M, d'Aquino R, Desiderio V, de Francesco F, Puca A, Papaccio G. MnSOD mimic compounds can counteract mechanical stress and islet beta cell apoptosis, although at appropriate concentration ranges. *J Cell Physiol* 2007; 212: 432-438.
72. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733-1742.
73. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 1998; 47: 1578-1585.
74. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 119-124.
75. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 927-932.
76. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
77. Rosen P, Du X, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 103-111.
78. Du X, Stocklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappa B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 752-763.

79. Ceriello A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med* 1997; 14: 45-49.
80. Davidoff AJ, Rodgers RL. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1990; 15: 633-642.
81. Das K, Chainy GB. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1537: 1-13.
82. Altan N, Bugdayci G, Tutkun FK, Sancak B, Nazaroğlu NK. The effect of the sulfonylurea glyburide on nitric oxide in streptozotocin-induced diabetic rat. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 319-321.
83. 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 Research* 2000; 862: 292-300.
84. Daloğlu AG. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda E Vitamini ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in (Cape) Antioksidan Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, 2003.
85. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1341-1348.
86. Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5: 110-115.
87. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
88. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
89. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-107.
90. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, et al. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9431-9435.

91. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
92. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-1538.
93. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-1777.
94. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 577-628.
95. Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwann JC, Ng PY, Guo K, et al. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J* 2005; 24: 2815-2826.
96. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 120-129.
97. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.
98. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-75.
99. Philip J Barr, L David Tomei. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; 12: 487-493.
100. Ulukaya E, Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003;15-26
101. Dabak M, Karapınar T. Fonksiyonel Rumene Sahip Sağlıklı Sığırlarda Transketolaz Test Değerlerinin Araştırılması. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2009; 23: 43-45.
102. Kaneko JJ. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. USA: Academic Press Inc, 1989.

103. Mc Dowell LR. Vitamin in Animal Nutrition Comparative Aspects to Human Nutrition. USA: Academic Press Inc, 1989.
104. Ersoy E, Bayşu N. Biyokimya. A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, No: 408, Ankara: Ankara Üniversitesi Matbaası, 1986.
105. Edwin EE, Gwyneth L. Reviews of the progress of dairy science. J Dairy Res 1971; 38, 79-90.
106. Dickie CW, Berryman JR. Polioencephalomalacia and photosensitization associated with kochia scoparia consumption in range cattle. JAVMA 1979;175, 463-465.
107. Dickie CW, Nelson RJ, Frazee DG, Krugman LD, Bronner E. Polioencephalomalacia in range cattle. JAVMA 1979; 175, 460-462
108. Lippincott's Illustrated reviews serisinden A Tokullugil, M.Dirican, E.Ulukaya (Çeviri editörleri). 2. Baskı. Nobel Tıp Kitapevleri,1997: 321-322.
109. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavusoğlu H, Çağlayan Yeğen B (Çeviri Editörleri). 11. Baskı, İstanbul, Yüce Yayınları A.Ş & Nobel Tıp Kitapevleri, 2006: 875-876.
110. Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı. İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006: 813-814.
111. Karapinar T, Dabak M, Kizil O. Thiamine status of feedlot cattle fed a high-concentrate diet. Department of Internal Medicine, Elazig: Fırat University, Can Vet J. 2010; 51: 1251-1253.
112. Muralt AV. The role of thiamine in neurophysiology. Amr NY Acad Sci 1962; 98: 499-507.
113. Kurtdede, A, Kalınbacak, A. Bir inekte Thiamine (B<sub>1</sub> Vitamini) bağlı duyarlılık. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi 1991; 62: 31-35.
114. Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, Rabbani N, Antonysunil A, Larkin J, et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. Diabetologia. 2007; 50: 2164-2170.

115. Hohmann S, Meacock PA. Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependent enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1385: 201-219.
116. Karuppagounder SS, Shi Q, Xu H, Gibson GE. Changes in inflammatory processes associated with selective vulnerability following mild impairment of oxidative metabolism. *Neurobiol Dis* 2007; 26: 353–362.
117. Martin P, Singleton CK, Hiller-Sturmhöfel S. The role of thiamine deficiency in alcoholic brain disease. *Alcohol Res Health* 2003; 27: 174–181.
118. Navarro D, Zwingmann C, Hazell AS, Butterworth RF. Brain lactate synthesis in thiamine deficiency: a re-evaluation using <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosci* 2005; 25: 33–41.
119. Gibson GE, Blass JP. Thiamine-dependent processes and treatment strategies in neurodegeneration. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9: 1605–1619.
120. Frank RA, Kay CW, Hirst J, Luisi BF. Off-pathway, oxygen-dependent thiamine radical in the Krebs cycle. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 1662–1668.
121. Ke ZJ, Gibson GE. Selective response of various brain cell types during neurodegeneration induced by mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem Int* 2004; 45: 361–369.
122. Oliveira FA, Galan DT, Ribeiro AM, Santos Cruz J. Thiamine deficiency during pregnancy leads to cerebellar neuronal death in rat offspring: role of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. *Brain Res* 2007; 1134: 79–86.
123. Ba A, Seri BV, Han SH. Thiamine administration during chronic alcohol intake in pregnant and lactating rats: effects on the offspring neurobehavioral development. *Alcohol Alcohol* 1996; 31: 27–40.
124. Chorny S, Parkhomenko J, Chorna N. Thiamine deficiency caused by thiamine antagonists triggers upregulation of apoptosis inducing factor gene expression and leads to caspase 3-mediated apoptosis in neuronally differentiated rat PC-12 cells. *Acta Biochim Pol* 2007; 54: 315–322.

125. Karuppagounder SS, Xu H, Pechman D, Chen LH, Degiorgio LA, Gibson GE. Translocation of amyloid precursorprotein C-terminal fragment(s) to the nucleus precedes neuronal death due to thiamine deficiency-induced mild impairment of oxidative metabolism. *Neurochem Res* 2008; 33: 1365–1372.
126. 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.
127. Brown DR. Neurodegeneration and oxidative stress. Prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathol* 2005; 43: 229–243.
128. Schmid U, Stopper H, Heidland A, Schupp N Benfotiamine exhibits direct antioxidative capacity and prevents induction of DNA damage in vitro. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24: 371–377.
129. Bâ A. Metabolic and structural role of thiamine in nervous tissues. *Cell Mol Neurobiol* Nov 2008; 28: 923-931.
130. Jung IL, Kim IG Thiamin protects against paraquat-induced damage: scavenging activity of reactive oxygen species. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 19-26.
131. Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV, Zabrodskaya SV Antioxidant properties of thiamin. *Bull Exp Biol Med* 2000; 130: 874-876.
132. Mehta R, Shangari N, O'Brien PJ Preventing cell death induced by carbonyl stress, oxidative stress or mitochondrial toxins with vitamin B anti-AGE agents. *Mol Nutr Food Res* 2008; 52: 379-385.
133. Sheline CT, Choi DW. Cu<sup>2+</sup> toxicity inhibition of mitochondrial dehydrogenases in vitro and in vivo. *Ann Neurol* 2004; 55: 645-653.
134. Gibson GE, Zhang H. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochem Int* 2002; 40: 493-504.
135. Pannunzio P, Hazell AS, Pannunzio M, Rao, KV, Butterworth RF. Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. *J Neurosci Res* 2000; 62, 286–292.

136. Calingasan NY, Huang PL, Chun HS, Fabian A, Gibson GE. Vascular factors are critical in selective neuronal loss in an animal model of impaired oxidative metabolism. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000; 59, 207–212.
137. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 110-118.
138. Altan N, Yiğit S, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılıç N. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocin-induced diabetic rat muscle. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 795-796.
139. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109: 33-44.
140. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010; 7: 15-25.
141. Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 25: 241-250.
142. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
143. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
144. Öniz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. *Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi* 2004; 14: 1-20.
145. Suemori S, Shimazawa M, Kawase K, Satoh M, Nagase H, Yamamoto T, et al. Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006; 47: 3975–3982.
146. Bakker SJ, Heine RJ, Gans Ro. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40: 741-742.
147. Pomero F, Molinar Min A, La Selva M, Allione A, Molinetti GM, Porta M. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001; 38: 135-138.

148. Schoonen WG, Wanamarta AH, Van Der Klei-Van Moorsel JM, Jakobs C, Joenje H. Respiratory failure and stimulation of glycolysis in Chinese hamster ovary cells exposed to normobaric hyperoxia. *J Biol Chem* 1990; 265, 1118–1124.
149. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512: 121–134.
150. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 612–628.
151. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation mechanisms inhibition, and biological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 668–676.
152. 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 Review* 1998; 106: 1229-1234.
153. Gibson GE, Haroutunian V, Zhang H, Park LC, Shi Q, Lesser M, et al. Mitochondrial damage in Alzheimer's disease varies with apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 2000; 48, 297–303.
154. Ekizoğlu O. Yarı açlık modeli oluşturulan sıçanlarda beyin farklı bölgelerindeki oksidatif ve apoptotik süreç, tiamin etkisi. Uzmanlık tezi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Adli Tıp Anabilim Dalı, 2008.
155. 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.
156. Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide Prevents Hippocampal Apoptosis in Type 1 Diabetes *Int Jnl Experimental Diab Res* 2002; 3: 241–245.
157. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 537: 106–110.
158. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.

159. Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966.
160. Hoijman E, Rocha VL, Keller SMI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004; 145: 418-425.
161. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroentrol Hepatol* 2000; 15: 109-120.
162. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
163. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Ganas Dev* 2001; 15: 2922-2933.
164. Cullen KM, Halliday GM. Neurofibrillary tangles in chronic alcoholics. *Neuropathol. Appl. Neurobiol* 1995; 21: 312-318.
165. Piotr Piotrowski, Krystyna Wierzbicka, Mieczyslaw S. Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants *Folia Neuropathol* 2001; 39: 147-154.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Şanlıurfa'nın Siverek ilçesinde doğdum. İlk, Orta ve Lise öğrenimimi Elazığ'ın Sivrice ilçesinde tamamladım. 1995 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2002 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Erzurum Şenkaya İlçesinde yaklaşık 2 yıl görev yaptıktan sonra 2004-2005 yılları arasında vatani görevimi yaptım. 2007 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak Ağustos ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitimime devam etmekteyim. Yabancı dilim İngilizcedir.