

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

**DENEYSEL OLARAK DİYABET OLUŞTURULMUŞ RATLARIN  
BEYİN VE SİYATİK SİNİR DOKUSUNA ALFA LİPOİK ASİDİN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. İrem TAŞCI**

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

**ELAZIĞ  
2013**

**DEKANLIK ONAYI**

Prof. Dr. İrfan ORHAN

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Bülent MÜNGEN  
**Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı**

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

Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR  
**Danışman**

\_\_\_\_\_

**Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

**TEŞEKKÜR**

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, Nöroloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent MÜNGEN'e, tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle bana her zaman yardımcı olan ve asistanlık eğitimime büyük katkı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Caner Feyzi DEMİR'e asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Nöroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Prof. Dr. M. Said BERİLGİN, Prof. Dr. Serpil BULUT ve Yrd. Doç. Dr. Murat GÖNEN'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm Uzm. Dr. Hasan Hüseyin ÖZDEMİR'e ve Dr. Metin BALDUZ'a, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım

Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Selçuk İLHAN'a, tezimin biyokimyasal parametrelerinin saptanmasında yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mehtap ÖZÇELİK'e, Nöroloji Anabilim dalında birlikte çalıştığım asistan, hemşire ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde yanımda olan anneme, babama ve kardeşlerime en derin sevgi ve saygılarımı sunarım.

### ÖZET

Diabetes mellitus (DM) insülin salınımındaki ya da aktivitesindeki bozukluğa bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. DM'li hastaların doku ve organlarında biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel

değişiklikler meydana gelmektedir. Endojen olarak sentezlenen alfa lipoik asit (ALA) pek çok mitokondrial enzim kompleksinin kofaktörü olarak görev yapan özel bir proteindir. Yapılan çalışmalarda ALA'nın antioksidan etkileri gösterilmiştir. Bu çalışma, streptozosin (STZ) ile oluşturulan diyabetik rat modelinde beyin ve siyatik sinir dokularındaki değişiklikler üzerine ALA'nın koruyucu etkileri incelemek amacıyla yapılmıştır.

Çalışmada, 28 adet, 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Deney hayvanları; her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Gruplar kontrol, DM, ALA ve DM+ALA olarak isimlendirildi. DM ve DM+ALA gruplarında diyabet oluşturmak için 180 mg/kg dozunda streptozosin, intraperitoneal olarak tek doz uygulandı. ALA ve DM+ALA gruplarına 8 hafta boyunca ALA (100 mg/kg/gün dozunda) oral olarak verildi. 8 haftalık tedaviden sonra tüm gruplardaki sıçanlar dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından ratların beyin ve siyatik sinir dokuları çıkarıldı.

DM grubunda; malondialdehitte (MDA) kontrol grubuna göre anlamlı artış saptandı. DM+ALA grubunda; MDA'da DM grubuna göre anlamlı oranda azalma, glutatyon peroksidaz (GPx) seviyesinde hem kontrol hem de DM grubuna göre artış izlendi. ALA grubunda; MDA'da DM ve DM+ALA gruplarına göre azalma, katalaz (CAT) seviyesinde DM grubuna göre artış, GPx seviyesinde hem kontrol hem de DM grubuna göre artış izlendi, süperoksit dismutaz (SOD) seviyesinde DM+ALA grubuna göre artış izlendi. Yapılan immünohistokimyasal incelemelerde beyin dokusunda apoptozisin DM+ALA grubunda DM grubuna göre daha düşük oranda olduğu gözlemlendi. Siyatik sinir histolojik incelemelerinde DM+ALA grubunda miyelin hasarının DM grubuna göre daha düşük oranda olduğu saptandı.

Sonuç olarak, beyin ve siyatik sinir dokularında DM'nin oluşturduğu oksidatif hasara ve apoptozise karşı ALA'nın koruyucu olduğu gözlemlendi. Diyabetin santral ve periferik sinir sistemindeki komplikasyonlarını önlemek amacıyla ALA içeren tedavi yaklaşımlarının denenmesinin yararlı olabileceği kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus, Alfa lipoik asit, beyin, siyatik sinir, oksidatif hasar

## ABSTRACT

### **THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF ALPHA LIPOIC ACID IN THE SCIATIC NERVE AND BRAIN TISSUE OF RATS WERE CREATED IN EXPERIMENTAL DIABETES**

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia induced impairment of insulin secretion or activity. Biochemical, morphological and functional changes occur in tissues and organs of patients with diabetes. Endogenously synthesized alpha lipoic acid (ALA) is a specific protein, which function as cofactor for several important mitochondrial enzyme complexes. The studies have shown antioxidant effects of ALA. In this study, the protective effects of ALA were investigated in rat brain and sciatic tissue with streptozotocin (STZ) induced experimental diabetes.

Twenty-eight adult male Wistar albino rats were used. Rats were randomly divided into four groups with seven rats per group. The groups were named as control, DM, ALA and DM+ALA. Rats in DM and DM+ALA groups were injected intraperitoneal streptozotocin (180 mg/kg) to establish diabetes mellitus rat model. Rats in ALA and DM+ALA groups were received alpha lipoic acid (100mg/kg/day, per oral) for eight weeks. After treatment for eight weeks, all of rats weighed and then decapitated. The brain and sciatic nerve tissues were removed.

In DM group; level of MDA was statistically more higher than control group. In DM+ALA group; level of MDA was statistically more lower than DM group, level of GPx was higher than control and DM groups. In ALA group; level of MDA was lower than DM and DM+ALA groups, level of catalase (CAT) was higher than DM group, level of GPx was higher than control and DM groups, level of SOD was higher than DM+ALA group. In immunohistochemical examinations of brain tissue; in DM+ALA group, apoptosis was lower than DM group. Histological examination of sciatic nerve, myelin damage in DM+ALA group was significantly more lower than DM group.

In conclusion, it is observed that ALA has protective effects against DM induced oxidative damage and apoptotic changes in the central and peripheral nervous systems. To prevent DM induced central and peripheral nervous systems complications, was concluded that treatment with ALA may be useful to challenge approaches.

**Key Words:** Diabetes mellitus, Alpha lipoic acid, brain, sciatic nerve, oxidative damage

## İÇİNDEKİLER

BAŞLIK	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	
iv	
ABSTRACT	

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	
xv	

<b><u>1. GİRİŞ</u></b>	<b>1</b>
<u>1.1. Diabetes Mellitus</u>	1
<u>1.1.1. Tanım</u>	1
<u>1.1.2. Epidemiyoloji</u>	2
<u>1.1.3. Tanı</u>	2
<u>1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması</u>	4
<u>1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus</u>	4
<u>1.1.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi</u>	5
<u>1.1.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus</u>	6
<u>1.1.4.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi</u>	6
<u>1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları</u>	6
<u>1.1.6. Diabetes Mellitusun Serebral Komplikasyonları</u>	7
<u>1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Santral ve Periferik Sinir Sistemi Komplikasyonlarının Patogenezi</u>	10
<u>1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi</u>	11
<u>1.1.6.1.2. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü</u>	12
<u>1.1.6.1.3. Hipogliseminin Etkileri</u>	12
<u>1.2. Oksidatif Stres</u>	13
<u>1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri</u>	13
<u>1.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin ve Reaktif Nitrojen Türlerinin Zararlı Etkilerinin Azaltılması:</u>	14
<u>1.2.3. Diyabet ve Oksidatif Stres İlişkisi</u>	15
<u>1.2.4. Anti-Oksidanlar</u>	16
<u>1.3. Apoptozis</u>	17
<u>1.3.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi</u>	17
<u>1.3.2. Apoptozisin Regülasyonu ve Apoptoziste Rol Alan Proteinler</u>	19
<u>1.3.2.1. p53'ün Rolü</u>	19
<u>1.3.2.2. Bcl-2/Bax</u>	19
<u>1.3.2.3. Kaspazlar</u>	20
<u>1.3.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu</u>	20
<u>1.3.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi</u>	20
<u>1.3.3.2. Fas-Fas Ligandı veya CD95 Yolu</u>	20
<u>1.3.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)</u>	21
<u>1.3.5. Hastalıklarda Apoptozis</u>	21

<a href="#">1.3.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler</a>	21
<a href="#">1.3.6.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri</a>	22
<a href="#">1.3.6.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı</a>	22
<a href="#">1.3.6.1.2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı</a>	22
<a href="#">1.3.6.1.3. Elektron Mikroskobu</a>	22
<a href="#">1.3.6.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu:</a>	23
<a href="#">1.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler</a>	23
<a href="#">1.3.6.2.1. Anneksin V Yöntemi</a>	23
<a href="#">1.3.6.2.2. TUNEL Yöntemi</a>	23
<a href="#">1.3.6.2.3. M30 Yöntemi</a>	24
<a href="#">1.3.6.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi</a>	24
<a href="#">1.3.6.3. Biokimyasal Yöntemler</a>	24
<a href="#">1.3.6.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi:</a>	24
<a href="#">1.3.6.3.2. "Western" Blotting</a>	24
<a href="#">1.3.6.3.3. "Flow" Sitometri</a>	24
<a href="#">1.3.6.4. İmmünolojik Yöntemler</a>	24
<a href="#">1.3.6.4.1. ELISA</a>	24
<a href="#">1.3.6.4.2. Flourimetrik Yöntem</a>	25
<a href="#">1.3.6.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri</a>	25
<a href="#">1.3.6.5.1. DNA Microarrays</a>	25
<a href="#">1.4. Alfa Lipoik Asit ve Etkileri</a>	25
<a href="#">1.4.1. Lipoik Asidin Tarihçesi</a>	25
<a href="#">1.4.2. Alfa Lipoik Asidin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri</a>	25
<a href="#">1.4.3. Alfa Lipoik Asidin Biyosentezi</a>	26
<a href="#">1.4.3.1. Alfa Lipoik Asidin Sindirimi, Emilmesi ve Taşınması</a>	26
<a href="#">1.4.3.2. Alfa Lipoik Asidin Metabolizması</a>	26
<a href="#">1.4.4. Alfa Lipoik Asidin Fonksiyonları</a>	27
<a href="#">1.4.4.1. Alfa Lipoik Asidin Antioksidan Aktivitesi</a>	29
<a href="#">1.4.4.2. Alfa Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı</a>	30
<a href="#">1.4.4.2.1. Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri</a>	30
<a href="#">1.4.4.2.2. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi</a>	31
<a href="#">1.4.4.2.3. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi</a>	31
<a href="#">1.4.4.2.4. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri</a>	32
<a href="#">1.4.4.2.5. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri</a>	32
<a href="#">1.4.4.2.6. AIDS Tedavisindeki Etkisi</a>	32
<a href="#">1.4.4.2.7. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi</a>	32
<a href="#">1.5. Periferik Sinir Sistemi</a>	33
<a href="#">1.5.1. Periferik Sinir Anatomisi</a>	33

<u>1.5.2. Siyatik Sinir (Nervus Ischiadicus)</u>	34
<b><u>2. GEREÇ VE YÖNTEM</u></b>	<b>36</b>
<u>2.1. Deney Hayvanları</u>	36
<u>2.2. Diyabet İndüksiyonu</u>	37
<u>2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması</u>	37
<u>2.4. Örneklerin Alınması</u>	38
<u>2.5. Biyokimyasal Çalışma</u>	38
<u>2.5.1. Kan glukoz düzeyleri</u>	38
<u>2.5.2. Dokuların Hazırlaması</u>	38
<u>2.5.3. Plazma Lipid Peroksidasyon Tayini</u>	38
<u>2.5.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini</u>	38
<u>2.5.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini</u>	38
<u>2.5.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi</u>	39
<u>2.5.7. Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi</u>	39
<u>2.5.8. Plazma Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi</u>	39
<u>2.6. Histolojik Çalışma</u>	39
<u>2.7. İmmünohistokimyasal Çalışma</u>	40
<u>2.8. TUNEL Metodu</u>	42
<u>2.9. İstatistiksel Analiz</u>	44
<b><u>3. BULGULAR</u></b>	<b>45</b>
<u>3.1. Klinik Bulgular</u>	45
<u>3.2. Biyokimyasal Bulgular</u>	45
<u>3.2.1. Kan Glukoz Düzeyleri</u>	45
<u>3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Madde Düzeyleri</u>	46
<u>3.2.2.1. Malondialdehit Bulguları</u>	47
<u>3.2.2.2. Katalaz Bulguları</u>	47
<u>3.2.2.3. Glutasyon Peroksidaz Bulguları</u>	47
<u>3.2.2.4. Glutasyon Bulguları</u>	48
<u>3.2.2.5. Süperoksit Dismutaz Bulguları</u>	48
<u>3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular</u>	48
<u>3.3.1. Bax İmmünreaktivitesi</u>	48
<u>3.3.2. Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi</u>	50
<u>3.4. TUNEL Bulgular</u>	52
<u>3.5. Siyatik Sinir Histolojik İncelemeleri</u>	55
<b><u>4. TARTIŞMA</u></b>	<b>58</b>
<b><u>5. KAYNAKLAR</u></b>	<b>65</b>
<b><u>6. ÖZGEÇMİŞ</u></b>	<b>84</b>

## TABLO LİSTESİ

**Tablo 1.** DM'nin tanı kriterleri

<a href="#">Tablo 2. Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri (*)</a>	3
<a href="#">Tablo 3. DM'nin etiyolojik sınıflandırılması</a>	4
<a href="#">Tablo 4. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları</a>	7
<a href="#">Tablo 5. Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar</a>	21
<a href="#">Tablo 6. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler</a>	22
<a href="#">Tablo 7. Deney hayvanlarına verilen rat yeminin terkibi</a>	36
<a href="#">Tablo 8. Histolojik takip serileri</a>	40
<a href="#">Tablo 9. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü</a>	41
<a href="#">Tablo 10. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi</a>	42
<a href="#">Tablo 11. TUNEL boyama prosedürü</a>	43
<a href="#">Tablo 12. TUNEL boyama yaygınlığının derecesi</a>	44
<a href="#">Tablo 13. Ratların Deney Süresince Ağırlık Değişimleri</a>	45
<a href="#">Tablo 14. Ratların Deney Süresince Glukoz Değişimleri</a>	46
<a href="#">Tablo 15. Beyin dokusunda bakılan biyokimyasal parametreler</a>	47

## ŞEKİL LİSTESİ

<a href="#">Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü</a>	16
<a href="#">Şekil 2. Antioksidan Savunma Sistemleri</a>	17
<a href="#">Şekil 3. Apoptozis-Nekrozis</a>	18
<a href="#">Şekil 4. TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü</a>	23
<a href="#">Şekil 5. Dihidrolipoik asit-lipoik asit redoks çiftinin etkileri (134)</a>	30
<a href="#">Şekil 6. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi</a>	48
<a href="#">Şekil 7. ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi</a>	49
<a href="#">Şekil 8. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi</a>	49
<a href="#">Şekil 9. DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında Bax</a>	

<a href="#">immunreaktivitesi</a>	50	
<a href="#">Şekil 10. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3</a>		
<a href="#">immunreaktivitesi</a>	51	
<a href="#">Şekil 11. ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3</a>		
<a href="#">immunreaktivitesi</a>	51	
<a href="#">Şekil 12. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Kaspaz 3</a>		
<a href="#">immunreaktivitesi</a>	52	
<a href="#">Şekil 13. DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında bax</a>		
<a href="#">immunreaktivitesi</a>	52	
<a href="#">Şekil 14. Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif</a>		
<a href="#">hücreler</a>	53	
<a href="#">Şekil 15. ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif</a>		
<a href="#">hücreler</a>	53	
<a href="#">Şekil 16. DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında TUNEL pozitif</a>		
<a href="#">hücreler</a>	54	
<a href="#">Şekil 17. DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında TUNEL pozitif</a>		
<a href="#">hücreler</a>	54	
<a href="#">Şekil 18. TUNEL negatif kontrol</a>	55	
<a href="#">Şekil 19. TUNEL pozitif kontrol meme dokusu</a>	55	
<a href="#">Şekil 20. Siyatik Sinir Kontrol Grubu</a>	56	
<a href="#">Şekil 21. Siyatik Sinir DM Grubu</a>	56	
<a href="#">Şekil 22. Siyatik Sinir ALA Grubu</a>	57	
<a href="#">Şekil 23. Siyatik Sinir DM+ALA Grubu</a>		57

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ADA</b>	: Amerikan Diyabet Cemiyeti
<b>AGEs</b>	: İleri glikolizasyon son ürünleri
<b>AIDS</b>	: Edinsel İmmün Yetmezlik Sendromu
<b>AIF</b>	: Apoptozis indükleyici faktör
<b>ALA</b>	: Alfa lipoik asit
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>Apaf-1</b>	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1
<b>APG</b>	: Açlık plazma glukozu
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BA</b>	: Bcl-2 analogu
<b>CAT</b>	: Katalaz
<b>CoA</b>	: Koenzim A
<b>CTL</b>	: Sitotoksik T lenfositleri
<b>DHLA</b>	: Dihidrolipoik asit
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>DTNB</b>	: 5,5-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit
<b>FAD</b>	: Flavin adenin dinükleotid
<b>FADH</b>	: Redükte flavin adenin dinükleotid
<b>Fas L</b>	: Fas ligandı
<b>FR</b>	: Serbest radikal
<b>FÜDAM</b>	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
<b>GABA</b>	: Gama amino bitürik asit
<b>GAD</b>	: Glutamik asit karboksilaz
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
<b>GPx</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>GR</b>	: Glutasyon redüktaz
<b>GSSG</b>	: Glutasyon disülfid

<b>GST</b>	: Glutasyon-s-transferaz
<b>HB</b>	: Hematoksilen boyama
<b>HIV</b>	: İnsan immün yetmezlik virüsü
<b>HLA</b>	: Human lökosit antijen
<b>H2O2</b>	: Hidrojen peroksit
<b>IAA</b>	: Anti insülin antikoru
<b>ICA</b>	: Adacık hücre antikoru
<b>IDDM</b>	: İnsüline bağımlı Diabetes mellitus
<b>IDF</b>	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
<b>IFG</b>	: Bozulmuş açlık glukozu
<b>IGT</b>	: Glukoz tolerans bozukluğu
<b>i.p.</b>	: İntraperitoneal
<b>IRS-1</b>	: İnsülin reseptör substrat 1
<b>LA</b>	: Lipoik asit
<b>LDL</b>	: Düşük dansiteli lipoprotein
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MPP+</b>	: 1-metil-4-fenilpiridinium
<b>MPT+</b>	: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin
<b>Mrna</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>NADH / NAD+</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid: nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NADPH</b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
<b>NBT</b>	: Nitroblue tetrazolium
<b>NIDDM</b>	: İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus
<b>NK</b>	: Natural killer
<b>NMDA</b>	: N-Metil D-Aspartat
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>OGTT</b>	: Oral glukoz tolerans testi
<b>PARP</b>	: Poli ADP riboz polimeraz
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>PDH</b>	: Pirüvat dehidrogenaz
<b>PG</b>	: Plazma glukozu
<b>PKC</b>	: Protein kinaz C
<b>PS</b>	: Fosfatidil serin
<b>RNS</b>	: Reaktif nitrojen türleri
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>SSS</b>	: Santral sinir sistemi

<b>STZ</b>	: Streptozosin
<b>TBA</b>	: Tiyobarbitürik asit
<b>TNF</b>	: Tümör nekroz faktör
<b>TRIAL</b>	: Apoptozisi indükleyen reseptör ligand
<b>TURDEP</b>	: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması
<b>UCP</b>	: Uncoupling protein

ii

## 1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) insülin salınımındaki ya da aktivitesindeki bozukluğa bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (1). İnsülin eksikliğinin yanı sıra insüline karşı gelişen direnç, DM gelişiminde rol oynayarak karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını da etkilemektedir (2). Bu nedenlerle DM' li hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelmektedir (3). Karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ile mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreder (4).

Uzun süreli diyabetik hastalarda nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif bozukluklar şeklinde serebral değişiklikler görülebilmektedir. DM, serebrovasküler olay gibi akut serebral hastalıklara sebep olabildiği gibi daha sinsi gelişen bu yüzden de kolay fark edilemeyen kronik serebral değişikliklere de sebep olabilmektedir. Oksidatif stres, vasküler fonksiyon bozukluğu ve ileri glikolizasyon son ürünlerinin (AGEs) birikimi gibi olaylar diyabetin serebral komplikasyonlarının patogenezinde rol oynamaktadır (5, 6).

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

Alfa lipoik asit (ALA), hem yağda hem de suda çözünebilen güçlü bir antioksidan maddedir. ALA'nın hem okside formu hem de indirgenmiş formu antioksidan aktivite göstermektedir. ALA'nın diyabetten korunmada, glikoz kontrolünde ve nöropati gibi kronik hiperglisemiye bağlı komplikasyonlardan korunmada etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (7).

Biz bu çalışmada ALA'nın DM'nin beyin ve siyatik sinir dokularındaki oksidatif hasara ve apoptozise karşı koruyucu etkisini incelemeyi amaçladık.

### 1.1. Diabetes Mellitus

#### 1.1.1. Tanım

Diabetes mellitus, hiperglisemiyle ve endojen insülinin yetersiz sekresyonu veya yetersiz etkisiyle karakterize kronik bir metabolik hastalıktır (8). Özellikle lipid, karbonhidrat ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreder (9).

Diabetes mellitusun klinik belirtileri polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybıdır. Ağır formları tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidoz ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi klinik tablolar meydana gelebilir. Bazen DM retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonların meydana gelmesiyle tanı alabilir (9). Son yıllarda yapılan çalışmalar, DM' nin santral sinir sistemindeki (SSS) işlevlerinde aksaklıklara sebep olduğunu ortaya koymaktadır (10). DM ile birlikte olan metabolik değişiklikler pek çok organı ilgilendiren fizyopatolojik değişikliklere bağlı olarak, kişi ve toplum üzerinde ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (11).

#### 1.1.2. Epidemiyoloji

Diabetes mellitusta erken dönemde tanı konması ve tedavi programlarının belirlenmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi gereklidir (12).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yaptığı çalışmalara göre 100 milyon civarındaki diyabetli hasta sayısının önümüzdeki on yılın sonunda 200 milyona ve 21. yüzyılın başlarında da 300 milyona ulaşması beklenmektedir (13, 14). ABD'de 1980 yılından 1996 yılına kadar diğer multifaktöriyel hastalıkların; yaşa göre düzeltilmiş mortalite hızları düşme eğilimi sergilerken veya en azından artış göstermezken, aynı yıllar arasında diyabete bağlı ölümlerin %30 oranında arttığı görülmüştür ve DM ölüm sebepleri arasında yedinci sırada yer almıştır (15). Ülkemizde yapılan en geniş çalışma Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırmasıdır (TURDEP). 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 (16).

### 1.1.3. Tanı

Amerikan Diyabet Cemiyeti (ADA)'nın 2012 yılı raporlarına göre DM'nin tanı kriterleri Tablo 1'deki gibidir (17).

**Tablo 1.** DM'nin tanı kriterleri (17)

- 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
- En az 8 saatlik açlık sonrasında plazma glukoz düzeyinin  $\geq 126$  mg/dl (7,0 mmol/L) olması
- 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
- HbA1c  $\geq$  % 6,5 olması

Eğer hasta asemptomatik ise veya minimal semptom varsa ve açlık plazma glukoz konsantrasyonları tanısız değilse, diyabet tanısı için oral glukoz tolerans testi (OGTT) gerekli olur.

**Tablo 2.** Diabetes mellitus ve glukoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri (\*) (18)

	Aşık DM	İzole IFG(**)	İzole IGT	IFG IGT	ve DM Yüksek	Riski
<b>APG(<math>\geq 8</math> saat açlıkta)</b>	$\geq 126$ mg/dl	100-125 mg/dl	$< 100$ mg/dl	100-125 mg/dl	-	
<b>OGTT 2.saat PG (75 g glukoz)</b>	$\geq 200$ mg/dl	$< 140$ mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-	
<b>Rastgele PG</b>	$\geq 200$ mg/dl					
+Diyabet semptomları	-	-	-	-	-	
<b>A1C(***)</b>	$\geq 6.5$ ( $\geq 48$ mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4(39-46 mmol/mol)	

(\*)Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile 'mg/dl' olarak ölçülür. Aşık DM tanısı için dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli iken İzole IFG, İzole IGT ve IFG + IGT için her iki kriterin bulunması şarttır. (\*\*)2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve IFG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir. (\*\*\*)Standardize metotlarla ölçülmelidir.

DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.saat PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobin

A1c, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance), WHO: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu.

#### 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 diyabetes mellitus (GDM) tür (11). ADA'nın 2012'de kabul ettiği DM'nin etiyolojik sınıflandırması Tablo 3'de gösterilmiştir (17).

**Tablo 3.** DM'nin etiyolojik sınıflandırılması (17)

- I- Tip 1 diyabet
  - a) İmmunolojik
  - b) İdiopatik
- II- Tip 2 diyabet
- III- Diğer spesifik tipler
- IV- Gestasyonel diyabet (GDM)

##### 1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi ile gelişen otoimmün bir hastalık olan Tip 1 DM, pankreasta gelişen inflamasyon sonucu ilerleyici beta hücre harabiyeti ve total insülin yetersizliği ile karakterizedir (19). Bundan ötürü bu tip diabetes mellitusa insüline bağımlı DM adı da verilmektedir (19). Tip 1 diyabete

öncülük eden otoimmün olay klinik belirtilerin ortaya çıkmasından yıllar önce başlar. Semptomatik tip 1 diyabetin ortaya çıkması için beta hücreleri hacminde %80-90 azalma olması gereklidir (20). Genellikle otuz yaşın altında ortaya çıkar. Tip 1 diyabet, tüm diyabetlilerin yaklaşık % 7-10 oranlık bölümünü kapsar (21).

##### 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. Diyabetiklerin 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 molekülüne ekspresyon ederler. (22-26). Beyaz ırk için HLA B8, HLA B15, HLA DR3 ve HLA DR4, zenci ırk için HLA DR7, Japonlar için HLA DR9 diyabete yatkınlık sağlayan antijenlerdir.

**b) Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler:** Beta hücrelerinde immün toleransın bozulmasına ve otoimmünitenin aktivasyonuna neden olan etkenlerin başında virüsler özellikle kabakulak, konjenital rubella ve koksaki B, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelir (22-26).

**c) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu:** Toksinlerle veya doğal yapısı bozulan beta hücreleri, salgıladıkları sitokinlerle (IFN-a, IFN-g, TNF-a, nitrik oksit (NO), IL-1 vb.) ya da antijenik peptidlerle immün sistemi uyarır. Bu olay sonucunda destrüktif insülitis başlar (22-26).

**d) İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü:** Geç faz aktif immün dönemde, inflamasyon ve mono nükleer hücre infiltrasyonu süreci insülitis olarak nitelendirilir. Adacıklarda önce makrofajlar CD8 sitotoksik T lenfositleri daha sonra CD4 lenfositleri TH1, NK (Natural Killer) hücreleri ve B lenfosit infiltrasyonu olur. Hasar, hastalığın başlangıç yaşı küçük olanlarda, puberte döneminde, sekonder enfeksiyon varlığında ve kız çocuklarında daha hızlıdır (22-26).

**e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikoları:** Günümüzde prelinik dönem Tip 1 diyabet tanısında sensitivite ve spesifitesi yüksek altın standart olarak alınan üç otoantikor; ICA (Adacık hücre antijeni), IAA (Anti-insülin antikoru) ve anti GAD (Glutamik asit dekarboksilaz) otoantikolarıdır (22-26). Otoantikoların çoğu IgG tipindedir. ICA'nın, Tip 1 DM'li hastalarda titresi zamanla düştüğü için ve zamanla ICA (-) olduğu için Tip 1 DM ile Tip 2 DM'nin erken yaşta başlayan formunun ayırıcı tanısında önemli bir laboratuvar bulgusudur (27- 29). Bu hastalarda islet hücrelerine karşı otoantikordan başka daha az sıklıkla insülin, proinsülin,

glukagon, glutamik asit dekarboksilaz (GAD), mikro bakteriyel ısı şoku proteini-65, 38 kD salgı granülü proteini ve karboksipeptidaz H proteinlerine karşı da otoantikolar saptanmıştır (22-26).

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

Tip 2 diyabetikler, tüm diyabetiklerin ortalama % 85'ini oluşturmaktadır (30). İnsüline bağımlı olmayan DM'dir. Genellikle 45 yaşından sonra ortaya çıkar. Hastalarda glikoz intoleransı bulgu vermeksizin uzun süredir mevcuttur ve metabolik düzeyde bozuklukların gelişmesine sebep olur (31, 32).

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

Tip 2 diyabette beta hücrelerinin kan glukoz seviyesine yanıtı anormaldir. Bu hastalarda temel bozukluk insülinin fizyolojik etkilerine karşı periferik dokularda, özellikle de çizgili kaslarda direnç gelişmesidir. Yaşlanma, sedanter yaşam, obezite, psişik ve fiziksel stresler, glukokortikoid ve seks hormonu yapısındaki bazı ilaçlar, akromegali, Cushing hastalığı ve benzeri endokrinopatiler, gebelik, glikoz toksitesine yol açan uzun süreli hiperglisemi ve genetik yatkınlık insülin direncini oluşturan etkenlerdir. Bu çevre faktörleri ile genetik faktörler üç mekanizma ile tip 2 DM' ye yol açar. Bu mekanizmalar periferik dokularda insülin direnci gelişimi, pankreastan insülin salınımında kusur ve karaciğerde glukoz üretiminde artıştır (33-35).

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

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları vardır. Uzun süreli diyabet vasküler yapıyı bozar. Vasküler yapının bozulmasıyla diyabetin kronik mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonları ortaya çıkar. Hiperglisemi dört ana mekanizma ile diyabetin komplikasyonlarına yol açmaktadır. Bu mekanizmalar; poliol yolunun aktivasyonu, hücre içinde AGEs oluşumunun artması, protein kinaz C aktivasyonu (PKC) ve heksozamin yolunun aktivasyonudur. DM'nin akut ve kronik komplikasyonları Tablo 4'te gösterilmiştir (36).

**Tablo 4.** Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları (36)

#### **A) Akut (Metabolik) Komplikasyonlar:**

- \* Diyabetik ketoasidoz
- \* Hiperosmolar non-ketotik koma
- \* Laktik asidoz koması
- \* Hipoglisemi koması

#### **B) Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar:**

##### **1) Makrovasküler komplikasyonlar:**

- \* Kardiyovasküler hastalıklar (Hipertansiyon, Koroner kalp hastalığı)
- \* Serebrovasküler hastalıklar
- \* Periferik damar hastalığı

##### **2) Mikrovasküler Komplikasyonlar:**

- \* Diyabetik nefropati
- \* Diyabetik retinopati
- \* Diyabetik nöropati

##### **3) Diğer Kronik Komplikasyonlar:**

- \* Diyabetik ayak
- \* Erektile disfonksiyon ve diğer seksüel fonksiyon bozuklukları
- \* Gastrointestinal problemler
- \* Kemik ve mineral metabolizma bozuklukları
- \* Psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklar

##### **1.1.6. Diabetes Mellitusun Serebral Komplikasyonları**

Diabetes Mellitusun santral sinir sistemi (SSS) komplikasyonlarının insülin eksikliği ve kronik hiperglisemi kaynaklı olduğu kabul edilmekle birlikte tip 1 DM hastalarında, insülin enjeksiyonu sonrasında meydana gelen hipoglisemik epizodların da DM ile ilişkili SSS komplikasyonlarına katkıda bulunabileceği ileri sürülmüştür (37). SSS'deki diyabetik komplikasyonlar periferik sinir sistemindekinin aksine kolay fark edilemez (38). Diyabetik hastalarda akut ve kronik metabolik ve vasküler bozukluklar beyin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar verebilir (39, 40).

Diyabetik olgularda serebrovasküler hastalık riski artmıştır. Ayrıca hiperglisemik ve hipoglisemik ataklar da akut serebral fonksiyon bozukluğuna neden olur (38, 39). Bu serebral bozukluklar; nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif düzeyde gösterilmiştir.

Deneysel ve klinik çalışmalar sonucu tip 1 DM'nin SSS'de neden olduğu değişiklikler aşağıda özetlenmiştir.

#### **a) Nöron kayıpları ve yapısal değişiklikler:**

Deneysel diyabet oluşturulan hayvanlarda beyin ve medulla spinaliste nöronal atrofi, subkortikal alanda ve beyin sapında lezyonlar, aksonal dejenerasyon, glikojen birikimi, ensefalomalazi, demiyelinizasyon, glial hücrelerde hasar oluşumu gibi değişiklikler olduğu bildirilmiştir (41-44). Diyabetik hayvanlarda neokortekste nöron kayıpları nedeniyle beynin ağırlığında azalma olduğu rapor edilmiştir (45).

Streptozosin (STZ) ile oluşturulmuş diyabetik ratların striatumunda asetilkolin sentez ve salınımı azalma tespit edilmiştir. Kognitif bozukluklar asetilkolin metabolizmasındaki oluşan değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Tip 1 diyabetik hayvanlarda neokorteks, hipokampus, arkuat ve ventromediyal çekirdek ve prefrontal korteks nöronlarının yoğunluğunda belirgin bir azalma olduğu belirtilmiştir (45, 46).

İn vivo ve in vitro çalışmalar, söz konusu nöron kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığını göstermektedir. Tip 1 DM'de nöronal yoğunluğun azalmasının DM'nin süresi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (46, 47). İnsülinin hücreler üzerindeki apoptozisi önleyici etkinliği göz önünde bulundurularak, tip 1 DM'deki insülin eksikliğinin, nöronal apoptozisin artmasına neden olabileceği düşünülmüştür (48). Hiperglisemik koşullarda glukozun, herhangi bir enzime gereksinim duymadan ortamdaki proteinlere bağlanarak kontrolsüz glikolizasyon reaksiyonlarına neden

olduğu ve AGEs olduğu bilinmektedir (49). Glikolizasyon uğrayan protein serbest oksijen radikali oluşumuna neden olmaktadır (50). Ayrıca, diyabetik sıçanlarda beyni oksidatif hasardan koruyan SOD ve CAT enzimlerinin aktivitelerinin azaldığı bilinmektedir (51).

#### **b) Nörokimyasal değişiklikler:**

Streptozosin ile oluşturulan diyabetik hayvanlar ile yapılan çalışmalar, DM'nin beyindeki monoamin yapısındaki nörotransmitterlerin miktarlarında değişikliklere neden olduğunu ortaya koymaktadır (52). Diyabetik hayvanlarda serotonin miktarının; hipokampus, hipotalamus, pons, medulla ve kortekste artarken striatum ve serebellumda değişmediği bildirilmiştir (53, 54). Mikrodiyaliz çalışmalarında STZ ile diyabet oluşturulan hayvanların ventromediyal hipotalamuslarında gama-amino butirik asit (GABA) konsantrasyonunun arttığı bildirilmektedir (55). STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlarda serebral kortekste, glutamatın N-metil D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin sayılarında azalma olduğu rapor edilmiştir (56). Diyabetik hayvanların beyinlerinde, dopamin miktarının hipotalamus, striatum ve korteks gibi alanlarda azaldığı bildirilmiştir (57). Diyabetik hayvanların beyinlerindeki monoamin miktarlarında oluşan anormalliklerin, insülin tedavisi sonrasında normale döndüğünü ileri süren raporlar bulunmaktadır (53).

#### **c) Serebrovasküler değişiklikler:**

Diyabetik hastalarda beynin farklı bölgelerinde serebral kan akımında oluşan farklılıklar beyinde mikrovasküler düzeyde oluşan yapısal değişiklikler, kan beyin bariyerinin geçirgenliğinde görülen artış gibi serebral değişikliklerin de DM kaynaklı SSS komplikasyonlarının ortaya çıkmasına katkıda bulunduğu düşünülmektedir (58).

#### **d) Diabetes Mellitusta SSS'deki Görülür Elektrofizyolojik değişiklikler:**

Streptozosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda SSS nöronlarının iletim hızında bozulma olduğu bildirilmektedir (39, 59). Dokulardaki fazla miktarda glukoz, polioliol yolağı aracılığı ile sorbitol ve fruktoza dönüştürülmektedir (60). Glukozun sorbitol ve fruktoza dönüştürülmesinin, çeşitli mekanizmalar ile Schwann hücrelerinde hasara ve sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olduğu bildirilmiştir (61). Diyabetik hastalarda uyarılmış potansiyeller ve olay ilişkili potansiyellerin ölçülmesiyle, elektrofizyolojik anormalliklere ilişkin veriler elde edilmiştir.

Diyabetik hastalarda santral ve periferik orijinli evoked potansiyellerin latanslarında artış olmaktadır. Latanslardaki bu artış diyabetin SSS'de sinyal iletimini bozduğunu göstermektedir. P300 dalgasında olduğu gibi olay ilişkili potansiyellerin latansları da uyarılmış potansiyellere ilave olarak 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 latansı öngörülebilir ve böylece elektrofizyolojik ve kognitif bozukluklar arasında ilişki değerlendirilebilir (38, 39).

Tip 1 DM hastalarında SSS'de uyarı potansiyellerinin ileti hızında ve veri işleme fonksiyonunda gecikme olduğu bildirilmiştir (62). Klinik çalışmalar öğrenme, bellek, problem çözme gibi zihinsel işlevlerde oluşan bozuklukların Tip 1 DM hastalarında genel populasyona oranla daha yaygın olduğunu göstermektedir (63).

#### **e) Ağrı algısında görülen değişiklikler:**

Santral ve periferik sinir sistemlerindeki hasar sonucu ortaya çıkan nöropatik ağrı, DM'nin en yaygın komplikasyonlarından (64).

Streptozosin ile diyabet oluşturulan hayvanların ağrı eşiklerini ölçmek üzere pek çok çalışma yapılmıştır. Klinik çalışmalar DM hastalarında; hiperaljezinin, allodininin ve spontan ağrının görülme oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir (65, 66).

#### **f) Davranışsal değişiklikler:**

Diyabetik hayvanlarda bellek ve öğrenme ile ilgili bilişsel işlevlerde aksamalar olduğu tespit edilmiştir (67, 68). Bu hayvanlarda; problem çözme, dikkat, dış ortamla ilgili uyarıların oluşturulması, bilginin yorumlanması ve depolanması gibi işlevlerde aksamalar olduğu belirtilmiştir (69). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlardaki öğrenme ve bellek bozukluklarının, sinaptik iletkenlikteki değişim, apoptotik hipokampal nöron kaybı ve hipokampal sinaptik plastisitede oluşan değişikliklere bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (46, 68, 70). Diyabetik hayvanlardaki davranış değişikliklerinin, başlıca monoaminler gibi nörotransmitterlerin beyindeki düzeylerinde ve işlevlerindeki farklılıklar ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (71-74).

### **1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Santral ve Periferik Sinir Sistemi Komplikasyonlarının Patogenezi**

Diabetes mellitus santral ve periferik sinir sisteminde akut ve kronik komplikasyonlara sebep olan metabolik bir hastalıktır. En sık görülen nörolojik komplikasyonu duyuşsal, motor ve otonomik periferik sinirlerin tek başına veya birlikte etkilendiği nöropatidir. Periferik nöropati dışında direkt santral sinir sisteminin etkilendiği metabolik komplikasyonlar (diyabetik ketoasidoz ve hipoglisemi) ve serebrovasküler hastalıklar da hastalığın seyrinde görülebilir. Pek çok patogenetik faktör bu komplikasyonların oluşumunda bir arada rol oynuyor gibi görünmektedir.

#### **1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi**

Periferik diyabetik nöropati multifaktöriyel patogeneze sahip bir komplikasyondur. İn vitro çalışmalar ve hayvan çalışmaları nöropatinin başlamasında ve ilerlemesinde etkili olan enzimatik ve non enzimatik olayları ortaya çıkarmıştır. Diyabetik nöropatinin patogenezinde rol oynayan olaylar şunlardır:

**1) Aldoz redüktaz aktivitesinde artış sonucu ortaya çıkan sorbitol ve fruktoz birikimi; nikotinamid adenin dinükleotid (NAD (P)) redoks dengesizlikleri ve sinyal iletiminde değişiklikler:** Diyabete bağlı oluşan ekstraselüler hipertonic stresi dengelemek için hücre intraselüler sorbitol birikimini artırarak intraselüler osmolariteyi artırır. Sorbitol birikimi aldoz redüktaz aktivitesini artırır ve intraselüler miyoinositol ve taurin miktarında düşüşe sebep olur. Miyoinositol miktarında azalma intraselüler fosfoinositid sinyalizasyonuna yol açar. Taurin azalması inhibitörü olduğu PKC aktivitesinde artışa sebep olur. Aldoz redüktaz aktivitesi sonucu glukozun sorbitole dönüşümü NADPH' nin NADP' ye oksidasyonu ile glutatyon redüktaz ile gerçekleşen antioksidatif savunmayı kısıtlar. Sonuç olarak tüm bu değişiklikler süperoksid anyonu ve hidroksil radikali gibi serbest radikalleri artırıp, detoksifikasyonu azaltarak oksidatif doku hasarına sebep olur (75, 76).

**2) Glukozun otooksidasyonu, AGEs oluşumu:** Oksidatif stres demir ve bakır gibi serbest geçiş metalleriyle glukozun otooksidasyonu ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuyla artar (75, 76). AGEs miktarı diyabetik nöropatiyi de içeren pek çok vasküler komplikasyonla ilişkilidir. ROS, AGEs oluşumunu artırırken AGEs de ROS'u besleyip otooksidatif glikolizasyonu artırır (77). Hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlerine AGEs'in bağlanmasıyla transkripsiyon faktörü NFkB'nin translokasyonu meydana gelir. Bu durum muhtemelen endotelial disfonksiyona, sitokin aktivasyonuna, nöron kan akımında bozulmaya ve iskemiye neden olur (78).

**3) Protein kinaz C aktivasyonu:** Diyabetik sinirlerde PKC aktivasyonunun rolü oldukça karmaşıktır. Stresle aktive olan protein kinazlar osmotik uyarım sonucuyla PKC'yi uyarabilirler. Ayrıca PKC sorbitol birikimi, taurin ve glutatyonun azalmasıyla aktive olabilir. Miyoinositolün azalması PKC'nin nöronal aktivitesini azaltır. PKC aktivasyonu düşük düzeylerde sinir kan akımını ve sinir iletimini artırırken yüksek düzeylerde nörokimyasal regülasyonu etkileyerek sinir fonksiyonunu bozar (75, 76).

**4) Oksidatif Hasar:** Diyabetteki oksidatif stres aldoz redüktaz aktivitesi sonucu glukozun sorbitole dönüşmesi; glutatyon, taurin ve NADPH'nin azalması, glukoz otooksidasyonu ve SOD ile GPx aktivitesinin azalması sonucu oluşur. Sonuçta bu glukoz bağımlı mekanizmalar ROS ile sinerjist etki göstererek diyabetik nöropatinin patogenezinde rol oynarlar (79).

#### **1.1.6.1.2. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü**

İnme, diyabeti olmayan hastalara kıyasla diyabetli hastalarda 2-6 kat daha sık görülmektedir ve diyabete bağlı ölümlerin yaklaşık %25'inde rol oynamaktadır. Bu durum muhtemelen aterosklerozun ve hipertansiyonun diyabet hastalarında daha sık görülmesine bağlıdır. Diyabetlilerin yarısından fazlasında hipertansiyon görülür (80).

Yapılan otopsi çalışmalarında diyabetlilerde; küçük damar hastalığını düşündürecek infratentoriyel alanlarda küçük ensefalomalazik alanların olduğu serebral infarktın görülme sıklığının 1,5-2 kat arttığını göstermiştir (81). Tek başına diyabete bağlı olarak ortaya çıkan göreceli inme riski normalin iki katına yakındır. Diyabet teşhisi olmayıp IGT olanlarda bile inme riskinde artış gözlenmiştir (82). Hiperglisemi aterogenezi tetikleyerek iskemik inmeyi artırır. Diyabette hemorajik inme oluş sıklığı artmamıştır aksine daha az sıklıkta olduğu olasıdır (82). Sonuç olarak diyabet diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak iskemik inmeyi artırır. Hatta inmenin morbidite ve mortalitesinde artış yaptığı görülmüştür. Bunun temelinde ise hiperglisemi veya insülinin aterojenik etkisi, kan koagülasyonunda ve viskozitesinde meydana gelen değişiklikler, mikrovasküler hastalığın arteriyel duvarlar üzerindeki etkisi ve diyabetlilerin aterogeneze genetik yatkınlığındaki artış bulunmaktadır (80, 83).

#### **1.1.6.1.3. Hipogliseminin Etkileri**

Hipoglisemi diyabetlilerde en sık aşırı yapılan insülin dozları sonrası ortaya çıkarken erken diyabetiklerde ve böbrek yetmezliği olanlarda postprandial hipoglisemi şeklinde de ortaya çıkar (84). Oral antidiyabetik kullananlarda da hipoglisemi görülebilir. Hipoglisemi durumunda akut metabolik ensefalopatinin dört değişik şekli tanımlanmıştır. Bunlar; sakin veya manik deliryum, nörolojik hiperventilasyon ve deserebrasyon ile giden ancak okülovestibuler ve okülosefalik reflekslerin korunduğu multifokal beyin sapı disfonksiyonu, taraf değiştirebilen veya değiştirme eğiliminde olan altta yatan vasküler patolojinin gösterilemediği fokal kusurlarla giden koma ile veya koma olmadan görülen felç benzeri olaylar, hipoglisemi sonrası ortaya çıkan tek veya çoklu nöbetlerdir (85, 86). Plazma glukoz düzeyiyle nörolojik belirtiler arasında direkt bir korelasyon olmamakla birlikte 30-40 mg/dL'nin altında davranış değişiklikleri ve konfüzyon; daha düşük düzeylerde stupor ve koma; 10 mg/dL'nin altında ise derin koma ortaya çıkar (87). Hipoglisemide beyin zedelenmesi asidik aminoasitlerin rol aldığı eksitotoksik olaylarla oluşmaktadır. Bu tarz etkilenme iskemi ve hipokside de gözlenmektedir. Hipoglisemi sırasında meydana gelen seçici nöronal hasarın bir eksitatuvar aminoasit 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 (88).

## 1.2. Oksidatif Stres

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşlenmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküllerdir. Serbest radikaller ve oksijenin radikal olmayan türevleri birlikte ROS olarak adlandırılır.

Diyabet etiolojisinde oksidatif stres önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. Normal metabolik süreçte serbest radikaller vücutta üretilir ve çevresel faktörlerle etkileşim içindedirler. Antioksidanlar serbest radikallerin yol açtığı hasara karşı vücudu savunmaktadırlar.

Diyabetin etiolojisinde oksidatif stresin rolü olduğu ve diyabetin ilerlemesine neden olduğu, deneysel diyabet oluşturulan sıçanlarda ve diyabeti bulunan olgularda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir (89).

### 1.2.1. Reaktif Oksijen Türlerinin Biyolojik Etkileri

**1- Pozitif Etkiler:** ROS, fagositoz sırasında antijenlere karşı rol oynar (90). Bu rol inflamasyon sırasında artar (91). ROS aynı zamanda enzim aktivasyonlarını içine alır ve kas kontraksiyonunda temel rol oynar (92, 93).

**2- Negatif Etkiler:** Lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA oksidasyonu, serbest radikallerin (FR) neden olduğu kas yorgunluğudur. ROS, sağlam hücrelerde inflamasyonu başlatabilir. Bu bozukluklar katarakt, kanser, Alzheimer veya Parkinson hastalıkları gibi dejeneratif patolojilere neden olur (94). ROS lipitler, proteinler ve DNA üzerinde zararlı etkilere neden olur.

**a) Lipid Peroksidasyonu:** Lipoprotein peroksidasyonu, damar sertliği patogeneğinde önemli bir faktördür (95). ROS, LDL oksidasyonunu başlatır (96). ROS her tip hücreye, özellikle kas hücrelerine ve eritrositlere zararlıdır (97). Lipid peroksidasyon markırları oksidatif hasarın indikatörü olarak kullanılır. Lipid hidroperoksitler üretildikleri alandan difüze olabilen MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal gibi çok sayıda aldehite ayrışabilir ve bunlar da proteinleri veya DNA'yı okside ederek daha ileri hasara neden olur (98).

**b) Protein Oksidasyonu:** Protein ve amino sit oksidasyonu, protein karbonil miktarını artırır (99). Proteinlerdeki oksidatif hasar amino asit yan zincirlerinin oksidasyonuna ve polipeptidlerin parçalanmasına neden olur (100).

**c) Deoksiribonükleik Asit Oksidasyonu:** Reaktif oksijen türleri, DNA ipliklerinin ayrılmasına sebep olur ve onarma mekanizmalarına zarar verir (101). DNA oksidasyonu mutasyonları arttırarak kanser oluşumuna yol açabilir (102).

### 1.2.2. Serbest Oksijen Radikallerinin ve Reaktif Nitrojen Türlerinin Zararlı Etkilerinin Azaltılması:

Hücrelerde metabolik olaylar sonucunda devamlı olarak FR ve reaktif nitrojen türleri (RNS) üretilir. Alınan oksijenin % 1-5' i ROS oluşumuna neden olur (103). FR hücre içerisinde üretimi o kadar fazladır ki, ani yıkımlardan ve ölümden kaçınmak için hücrede bir koruma sisteminin varlığı gereklidir. Çok sayıda koruma süreci tanımlanmıştır:

1) Endojen FR üretiminin azaltılması; bu, mitokondride FR sızıntısının azaltılması

2) Metabolizma hızının azaltılması

3) Oksidatif hasarda anahtar hedeflerin dirençlerinin artırılması

4) Antioksidanlar tarafından sağlanan FR karşı korumanın artırılmasıyla gerçekleştirilir (104). Fizyolojik koşullarda hücreler oluşan FR ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Bu sistemler şu şekilde sınıflandırılabilir:

**a) Enzimatik Antioksidanlar:** Glutatyon-S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), GPx, CAT, SOD.

**b) Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:** C vitamini, E vitamini, A vitamini, lipoik asit, flavinoidler, melatonin, ürik asit, albümin, haptoglobulin, sistein, seruloplazmin, transferin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubiquinon (koenzim Q10), bilirubin, mannitol ve hemopeksin (105). Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde, enzimatik olmayan antioksidanlar ise hücre dışında daha etkilidir.

5) Tamir, geri dönüşüm ve yeniden şekillendirme süreci.

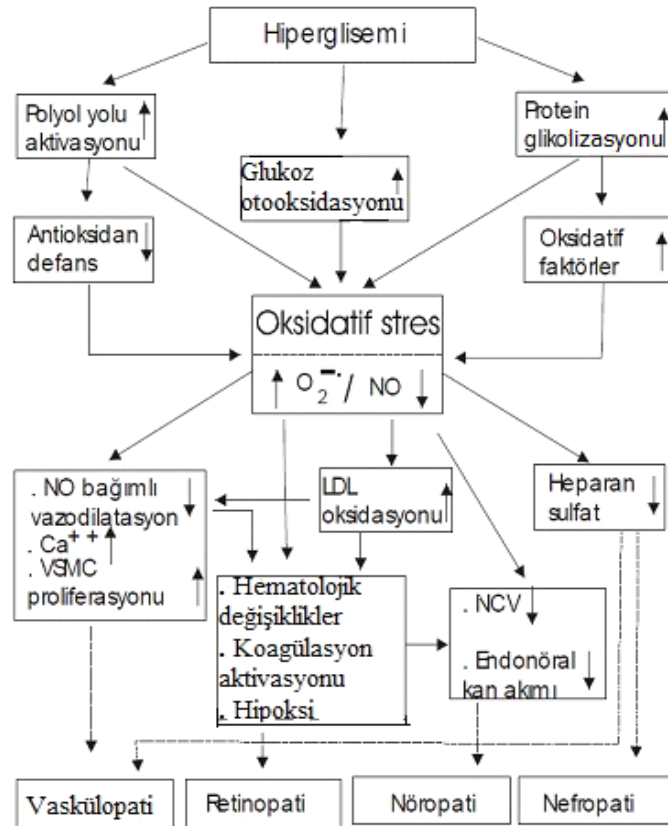
6) Hücrenin nükleik asit, protein ve lipit unsurları için tamir süreci (104).

### 1.2.3. Diyabet ve Oksidatif Stres İlişkisi

Diyabet ve komplikasyonları ile ilgili yapılan çalışmalarda FR üretiminin arttığı tespit edilmiştir. Bu durum nonenzimatik glikolizasyon, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarı gibi mekanizmalarla meydana gelmektedir (106). Tip 1 ve 2 diyabetlilerde eritrosit ve plazmada GSH ve GPx aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (107). Beta hücreleri oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olarak kabul edilmiş olup izlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (108). Hipergliseminin direkt sonucu olarak FR oluşumunun arttığını savunan çalışmalar vardır (109). Oksidan maddeler oluşturarak Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip eden STZ, deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılır (110).

Diyabetin neden olduğu artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan aktivite beyin patolojik olaylara karşı daha duyarlılaşmasına sebep olur. Deneysel olarak oluşturulmuş hiperglisemik ratların beyinlerinde oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir. Tip 1 diyabetik hastaların serumlarında da süperoksit üretiminin arttığı ve glisemik kontrolün etkinliğinin artırılmasıyla bu artışın azaldığı gözlenmiştir (111).

Oksidatif stresin diyabet komplikasyonlarının patogenezindeki rolü Şekil 1’de gösterilmiştir (112).



Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü (112)

### 1.2.4. Anti-Oksidanlar

“Antioksidan Savunma Sistemleri” olarak adlandırılan bazı savunma mekanizmaları ROS’ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta geliştirilmiştir (113). Vücuttaki antioksidan savunma sistemleri Şekil 2’de gösterilmiştir (113).



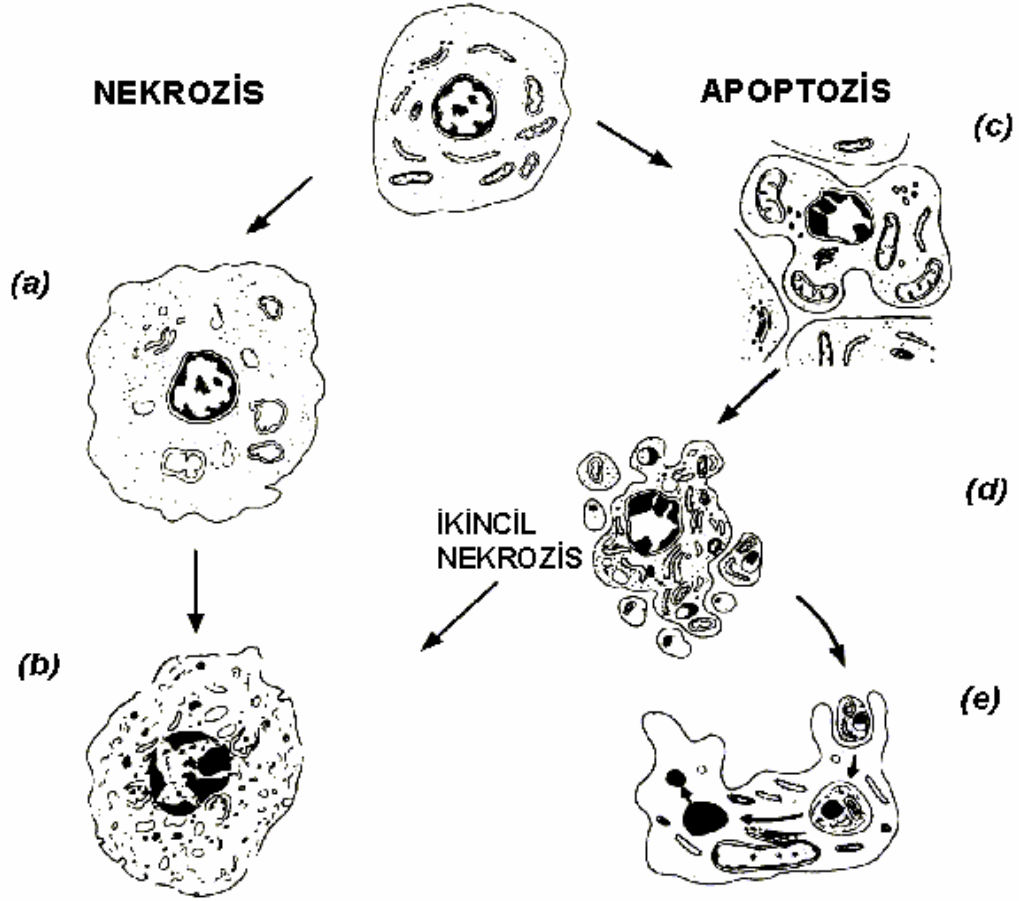
**Şekil 2.** Antioksidan Savunma Sistemleri (113)

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılardır, asıl antioksidan savunmayı sağlayan SOD, GST, GPx, GR, CAT ve sitokrom oksidaz gibi FR toplayıcı enzimleri içeren hücre içi savunma sistemleri ile albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içeren hücre dışı savunma sistemleridir. Bu sistemler birlikte oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı azaltırlar. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (113).

### **1.3. Apoptozis**

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

Yaşayan organizmada iki temel hücre ölümü vardır. Bunlar; apoptozis ve nekrozistir. Apoptoziste çok odaklı, tek tek hücre ölümü vardır. Bu, programlanmış hücre ölümüdür ve geriye dönüşümsüzdür. Fizyolojik ya da patolojik uyarılar ile başlatılır. Oluştığı bölgede diğer hücre yapılara zarar vermez ve inflamasyona sebep olmaz. Apoptoziste nükleus kromatini yoğunlaşmış, hücre büzülerek küçülmüş, nükleus içi DNA kırılmıştır. Sitoplazmadaki organellerin bütünlüğü korunurken, bunların bir araya gelerek yoğunlaştıkları gözlenir. Mitokondrilerin yapısı sağlamdır. Büzülen hücre parçalanır, apoptotik cisimler açığa çıkar. Apoptotik cisimler membranlarla korunmuş DNA parçalarından oluşur. Bu cisimler makrofajlar ya da komşu epitel hücreler tarafından yutulur (114).



Şekil 3. Apoptozis-Nekrozis (115)

Mekanizması hala tam olarak çözülemese de programlı hücre ölümünün; hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olayların aktive olmasıyla başladığı ileri sürülmektedir (116). 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 (117).

Apoptozis aktivasyonu veya inhibisyonuna yönelik çalışmalar yapılarak; kanser, Edinilmiş İmmün Yetmezlik Sendromu (AIDS) ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi yöntemleri ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir.

Apoptozis belli uyarılar sonucu oluşan, enerjiye bağımlı moleküler olaylar döngüsünün son noktasıdır ve dört aşamadan oluşmaktadır (118).

1. Apoptozisi başlatan sinyal yolları

2. Kontrol ve İntegrasyon: İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküller, apoptozisi inhibe ve stimüle etmek yoluyla hücrenin akıbetini belirler.

3. Ortak İnfaz Fazı: “caspase” ailesinden proteazlar tarafından yönetilen ölüm programını içerir (“caspase”: “c” sistein proteaz mekanizmasını, “aspase” aspartik asit amino asitinden ayırma kabiliyetini belirtir).

4. Ölü hücrenin fagositoz yoluyla ortadan kaldırılması

### 1.3.2. Apoptozisin Regülasyonu ve Apoptoziste Rol Alan Proteinler

Apoptozisin regülasyonu, sıkı bir şekilde gen kontrol aşamaları ile korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile regüle edilir. Bu aşama genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb.) veya sitokinlerin bulunmaması gibi (eritropoietin vb.) farklı uyarılarla aktive olur. DNA’daki tek veya çift iplik parçacıkları, nükleozitlerin azlığı ve DNA’ya bağlı transkripsiyon faktörü p53 ile başlar. Ardından bir dizi olay sonucunda hücre apoptotik yola girer (119).

#### 1.3.2.1. p53’ün Rolü

p53’ün spesifik genomik bölgelere tetramer yaparak bağlanır ve bunun sonucu olarak negatif büyüme etkisi olan genlerin ekspresyonunu artırır. Hücre siklusunun durdurulması veya hücre ölümü, zedelenmiş DNA’nın replike olmasını engelleyerek, genomun bütünlüğünün korunmasını sağlar. Bu olay, p53’ün tümör supresör geni olması açısından önemli olduğu kadar, kemoterapiye bağlı DNA hasarı sonucu indüklenen apoptozise yol açmasından dolayı da önemlidir. Bir tümör

supresör geni olan p53, insan kanserlerinde en fazla mutasyona uğrayan genidir. p53 geni karsinojenler, sitostatik ajanlar, radyasyon, ultraviyole ışığı, hipoksi veya onkogenler gibi çeşitli uyaranlar ile indüklenebilir. Bunun sonucu olarak, transkripsiyon faktörü olan p53 proteini, hücre siklusunun durdurulmasında ve apoptoziste rol oynayan birtakım genlerin ekspresyonunu artırır (120).

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

Apoptozis döngüsü işlevini iki esas mekanizma ile görür: Birincisi “caspase” yolu, ikincisi ise mitokondri disfonksiyonu ile tanımlanan organel disfonksiyonu yoludur. Bcl-2 ailesi ve üyeleri, mitokondri düzeyinde işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir. Yapılan genetik transfer deneyleri, Bcl-2'nin hemapoetik büyüme faktörü verilmeyen hemapoetik hücre kültüründe apoptozisi engellediğini göstermiştir. Daha sonra transgenik fare deneylerinde Bcl-2'nin hücre yaşam süresini uzattığı görülmüştür. Son yıllarda Bcl-2 ailesine dahil olan ve 3 sınıfa ayrılabilen önemli proteinler tespit edilmiştir (121).

1) Birinci grupta; Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w gibi anti-apoptotik proteinler yer almaktadır. Bu proteinler, Bcl-2 homologu (BH) olan BH1'den BH4'e kadar olan bölgeler içerirler.

2) İkinci grupta; Bax, Bak, Bad gibi pro-apoptotik proteinler bulunur.

3) Üçüncü grupta; homolog bölge olarak sadece BH3'ü içeren Bik, Bid, Bim gibi proapoptotik proteinler yer alır.

#### **1.3.2.3. Kaspazlar**

Kaspaz sistemi apoptozis için gerekli olan bir grup sistein proteaz enziminden oluşur ve aspartik asitten sonra gelen peptid bağını kırarlar. Hücre içinde inaktif halde bulunurlar ve proteolitik aktivite ile birbirlerini aktifleştirirler. Kaspazlar, apoptoziste hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan enzimler olarak bilinirler. Apoptotik proteaz aktive edici faktör-1'in (Apaf-1) indüksiyonu, mitokondriden sitokrom c salınmasıyla gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu, kaspaz-9 monomerlerinin biraraya gelmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Ayrıca mitokondriden salınan apoptozis indükleyici faktörler (AIF) bazı nükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna neden olurlar (122).

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

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

Bu apoptotik yol salgısal özelliindedir. Tümör hücrelerinin ve patojenle enfekte olmuş hücrelerin ortadan kaldırılmasında rol almaktadır. Granzim ve Perforinler, sitotoksik T lenfositler (CTL) ve NK hücrelerinin sitoplazmik salgı granüllerindeki proteinlerdir (119).

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

Apoptozisin salgıdan bağımsız görev yapan mekanizmasıdır. Hücre zarı üzerindeki “ölüm reseptörlerinin“ uyarılmasıyla bağlantılıdır. Tümör nekroz faktör (TNF) grubundan olan Fas (CD95), hücre yüzeyi reseptörlerindedir ve pek çok hücrede bulunur. TNF grubunun bir üyesi olarak bilinen Fas ligandı (FasL) , sitotoksik T hücreleri ve NK hücrelerinde bulunur. FasL' nin Fas reseptörüne bağlanması ile apoptotik süreç başlar (119).

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

Apoptozis indükleyici faktör, DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşmasına neden olarak kaspazdan bağımsız bir şekilde apoptozisi başlatır (123).

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

Apoptozisin patolojik ve fizyolojik birçok durumda rol oynadığı bilinmektedir. Fizyolojik olarak apoptosis; deri, bağırsak mukozası ve immün sistem gibi dokulardaki çoğalan hücrelerin sayısını ve sürekliliğini devam ettirmekle birlikte periferik ve santral sinir sisteminin gelişiminde de etkin rol oynar (124). Gelişim esnasında oluşan programlanmış hücre ölümü ilk kez sinir sisteminde tanımlanmıştır (125).

Apoptozis, düzensiz hücre ölümüyle birlikte akut ve kronik birçok hastalığa yol açmaktadır. Apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar Tablo 5'de gösterilmiştir (126).

**Tablo 5.** Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar (126)

**\* Malign ve Pre-Malign Durumlar \* İmmun Sistem Bozuklukları**

Solid Tümörler  
B Hücre Lenfomaları  
Kronik Lenfositik Lösemi  
Prostat Hipertrofisi  
Kemoterapiye Direnç

**\* Nörolojik Bozukluklar**

Felç  
Alzheimer Hastalığı  
Ataxia Telangiectasia

**\* Kalp Hastalıkları**

İskemik Kardiak Hasar  
Kemoterapiyle İndüklenen  
Miyokardiyal Baskılanma

AİDS  
Tip 1 Diabetes Mellitus  
Lupus Eritematozus  
Sjogren Sendromu  
Glomerülonefritis

**\* İntestinal Bozukluklar**

Dizanteri

**\* Böbrek Hastalıkları**

Polikistik Böbrek Hastalığı  
Anemi / Eritropoezis

---

### 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 antikörlerin kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler Tablo 6'da gösterilmiştir (127).

**Tablo 6.** Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler (127)

- |  |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"><li>* Morfolojik görüntüleme yöntemleri</li><li>* İmmünohistokimyasal yöntemler</li><li>* Biyokimyasal yöntemler</li><li>* İmmunolojik yöntemler</li><li>* Moleküler biyoloji yöntemleri</li></ul> |
|--|

#### 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; 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" dir (127).

**2- Giemsa Boyama:** Giemsa ile boyamada HB'de olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır (127).

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

Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanırırlar (127).

##### 1.3.6.1.3. Elektron Mikroskobu

Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak

gözlendiği 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 (127).

#### **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 (127).

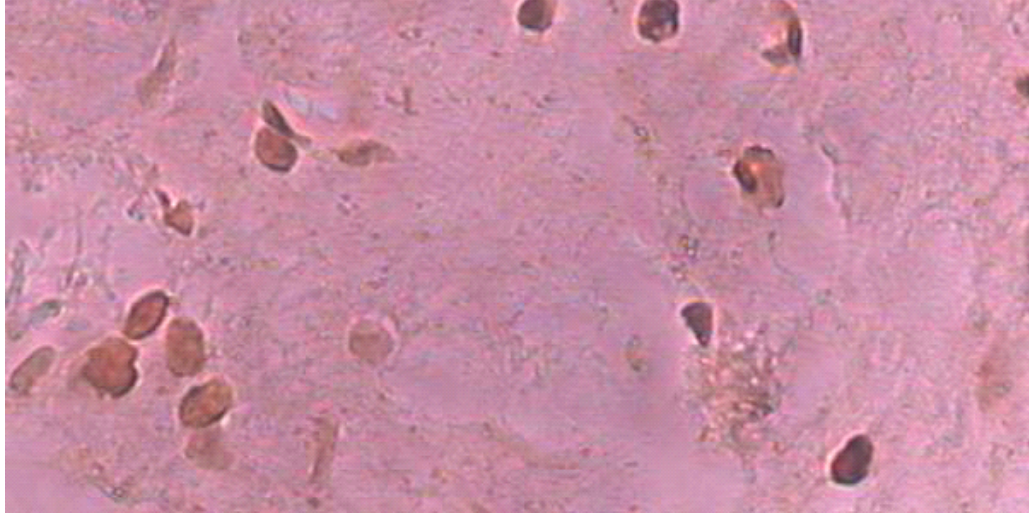
#### **1.3.6.2. Histokimyasal Yöntemler**

##### **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 (127).

##### **1.3.6.2.2. TUNEL Yöntemi**

Deoksiribonükleik asit 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 metotla saptanabilir (127).



**Şekil 4.** TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü (127)

##### **1.3.6.2.3. M30 Yöntemi**

Apoptotik hücreler, sitokeratin 18' in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine dayanan M30 yöntemiyle belirlenir (127).

##### **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 (127).

#### **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 (127).

##### **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 metotla belirlenebilir (127).

##### **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;

- \* Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- \* Anneksin V kullanılarak (127).

#### **1.3.6.4. İmmünolojik Yöntemler**

##### **1.3.6.4.1. ELISA**

Gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek ELISA yöntemiyle mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (127).

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

**Kaspaz Aktivasyonu (Hücre Kültürü):** Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (127).

#### **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 (127).

#### **1.4. Alfa Lipoik Asit ve Etkileri**

##### **1.4.1. Lipoik Asidin Tarihçesi**

Alfa lipoik asit vücutta doğal olarak üretilmesine rağmen araştırmacılar 1930 yılına kadar ALA'nın farkında değillerdi. 1937 yılında lactobasillusun gelişimi için gerekli olan, growth faktör denen patates ekstratının içeriğinde bulunmuştur (128). 1951 yılında Reed ve arkadaşları karaciğer rezidüsünün 100 kilogramından 30 miligram ALA elde etmişlerdir (129). Takip eden yıllarda moleküler yapısı açıklığa kavuşmuş ve 1, 2 ditiyolen-3 pantotenik asit olarak adlandırılmıştır (130, 131).

##### **1.4.2. Alfa Lipoik Asidin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri**

Alfa lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan, doğal olarak vücutta sentezlenen bir bileşiktir. Sekiz karbonlu bir bileşiktir ve ditiyolen halka yapısında iki sülfür atomu içerir (132). Okside ve redükte olmak üzere iki formu bulunmaktadır. ALA'nın bu iki formu oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ile birbirine dönüşebilmektedir (133). Hem redükte hem de okside formlar biyolojik aktivite göstermesine rağmen dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktif form olarak kabul edilmektedir (130). ALA bazı yiyeceklerde bulunan ve aynı zamanda vücutta da sentezlenebilen doğal bir maddedir. Mitokondriyal kompleksleri bol olan hayvan ve bitki dokularında bol miktarda bulunur. Bitkiler içinde en fazla ALA içerenler sırasıyla ıspanak, brokoli ve domatestir. Hayvan dokuları içerisinde en fazla böbrek, kalp ve karaciğerde bulunur (130).

##### **1.4.3. Alfa Lipoik Asidin Biosentezi**

Alfa lipoik asit bakteriden insana kadar olan tüm organizmalarda sentezlenir. İnsanlarda sentez yeri karaciğer ve diğer dokulardır (134). Ökaryot hücrelerde lipoik asitin biosentez yolu mitokondride bulunur. Bununla beraber bitkilerde biosentez yolunun plastidlerde de bulunduğu hipotezi vardır (135). ALA mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentezlenmektedir. ALA'daki sekiz karbon birimi oktanoik asitten sağlanmaktadır ve iki sülfür bantlarının bağlanmasıyla lipoik asit ortaya çıkar. Mitokondriyal -oksidasyon reaksiyonunun ALA metabolizmasında major rol oynadığı tespit edilmiş ve 12 metaboliti saptanmıştır. ALA'ya bağlı dehidrogenazlar hakkında elde edilebilir geniş bilgiler olmasına rağmen bu koenzim biosentezinde yer alan enzimler hakkında çok az şey bilinmektedir (136).

##### **1.4.3.1. Alfa Lipoik Asidin Sindirimi, Emilmesi ve Taşınması**

Alfa lipoik asit oral alındığında veya intravenöz kullanıldığında hızla absorbe edilir ve hücre içine girerek burada daha aktif formu olan dihidrolipoik aside (DHLA) indirgenir. ALA'nın reuptake'i perfüze rat karaciğeri ve izole hepatositlerde çalışılmıştır. İki ayrı transport mekanizması bildirilmiştir. Bunlardan birincisi

taşıyıcılı yoluyla transpottur. Bu taşıyıcı ptein 75 m den daha küçük bir taşıyıcıdır. İkinci yol pasif difüzyon yoludur. Bu yolda daha yüksek konsantrasyonlu alandan düşük konsantrasyonlu alana geçiş olur (137).

#### 1.4.3.2. Alfa Lipoik Asidin Metabolizması

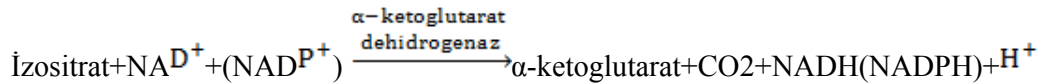
Alfa lipoik asit oral yolla verildiğinde % 93'ünden fazlası barsaktan emilir, karaciğerde metabolize olarak % 20-30'u ilk geçiş etkisine uğrar. ALA emilmesini takiben 1, 2 ditiyolen halkasının indirgenmesiyle DHLA formuna indirgenir, sonradan s- metilasyona uğrayabilir. ALA ve DHLA her ikisi de aynı zamanda - oksidasyona uğrar. Hem ratlarda hem de insanlarda ALA idrarla atılır, ana metaboliti 4, 6 bismetilmerkaptotoksanoik asittir. Ratlarda oral verilen radyoaktif ALA'nın yaklaşık % 80'i idrarda tespit edilmiştir (138). ALA 50-600 mg arasında kullanıldığında doz orantılı olarak Tmax' a 0,5-1 saatte ulaşır. ALA'nın nispeten düşük biyoyararlanımı yüksek ilk geçiş etkisiyle %20-30'unun elimine olmasına bağlanabilir. Bulgular lipoik asidin karaciğerde metabolizmasının oldukça geniş olduğunu göstermektedir (139). ALA'nın 600 mg oral dozunu takiben plazma konsantrasyonu tipik olarak 10-24 arasında olmaktadır. ALA'nın yararlı etkileri 10 konsantrasyonda tespit edilmiş ve maksimal etki 300 'de gözlenmiştir (139). Böylece ALA tekrarlanan oral dozlarında maksimum plazma düzeyine hızla ulaşmaktadır.

#### 1.4.4. Alfa Lipoik Asidin Fonksiyonları

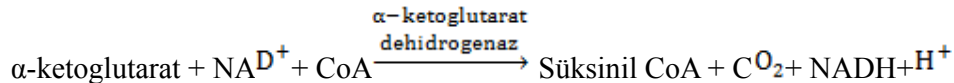
Alfa lipoik asit açıl taşıyıcıdır olur iki elektron taşımakla görevlidir. ketoglutarat dehidrogenaz ile pirüvat dehidrogenaz (PDH) olarak bilinen iki multienzim kompleksi içinde yer alır (140). ALA pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev almaktadır. Pirüvat önce karboksil grubunu kaybeder ve hidroksietil türevi halinde enzime bağlı tiyamin pirofosfata bağlanır. Daha sonra elektronlar ve asetil grubu dihidrolipoil transasetilaz enzimine bağlı olan ALA'ya transfer edilerek 6 asetildihidrolipoik asit meydana gelir. Daha sonra lipoik asit üzerinde bulunan asetil grubunu koenzim A'ya transfer edilmesiyle redükte DHLA meydana gelmektedir. ALA'nın okside şekle dönüşmesi dihidrolipoil dehidrogenaz tarafından gerçekleşmektedir. ALA karboksil grubundan dihidrolipoil dehidrogenaz enzimidaki lizin aminoasidinin -amino grubuna bir amid bağı ile bağlanır. Bu bağlanma ATP bağımlı sentetaz tarafından, koparıma ise bir hidrolaz tarafından gerçekleştirilmektedir (133). ALA açıl gruplarını bağlar ve onları diğer enzim kompleksine transfer edilmesini sağlar. Bu işlem boyunca lipoik asit DHLA'ya indirgenir ki bu sonradan NADH'nin oluşumu altında lipoamid dehidrogenaz ile reokside olur. Bu şekilde ALA ve DHLA bir redoks çifti gibi davranır ve NAD'a dehidrogenazın substratından elektron taşır (139). İnsan hücrelerinde R-LA oksidatif metabolizmada ana rol oynayan mitokondriyal proteinlerde lipoillisin formunda bağlı olarak bulunur. R-LA doğal olarak 5 mitokondriyal proteinin yapısında kofaktör olarak bulunur:

1-Pirüvat kompleksinin açıl transferaz bileşimi

2- ketoglutarat



3-Bağlı zincirli ketoglutarat dehidrogenaz kompleksleri



4-Pirüvat dehidrogenaz kompleksinde protein X

5-Glisin bölünme sisteminde H protein (138).

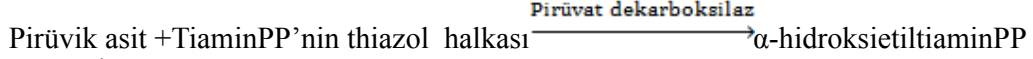
Alfa lipoik asit sitrik asit döngüsünde kullanılan asetil CoA'nın sentezinden sorumlu olan PDH enzim komplekslerinin aktivitesinde önemli rol oynar (136). PDH enzim kompleksi 3 enzimden oluşur:

1. Pirüvat dekarboksilaz (E1)

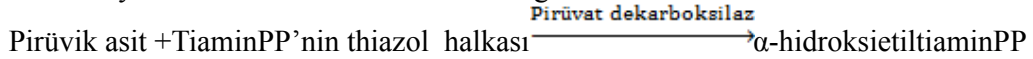
2. Dihidrolipoil transasetilaz (E2)

### 3. Dihidrolipoil dehidrogenaz (E3)

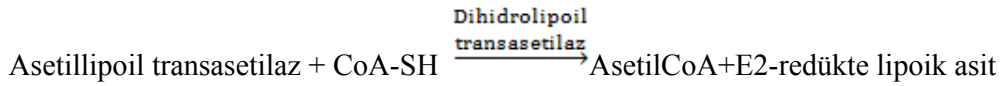
Pirüvat dehidrogenaz enzim sistemi anaerobik ve aerobik solunum sistemi arasında hem aracı hem de regüle edici bir enzim olarak görev yapmaktadır. Pirüvik asidin asetil-S-CoA'ya dönüşmesi esnasında sırayla aşağıdaki reaksiyon basamakları meydana gelmektedir. Reaksiyonun ilk basamağında pirüvatın karboksil grubu CO<sub>2</sub> halinde molekülden ayrılır. Geriye kalan hidroksietil türevi ise tiyaminin thiazol halkasına bağlanıp alfa hidroksietil tiyamin pirofosfat enzim kompleksi oluşturur. Bu reaksiyonda görev yapan enzim pirüvat dekarboksilazdır.



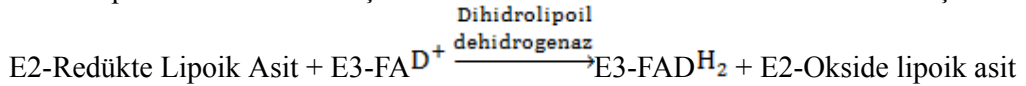
İkinci basamakta E1-tiyamin PP'nin aktif asetaldehit kompleksi, dihidrolipoil transasetilaz enziminin prostetik grubu olan okside lipoik aside taşınır. Bu reaksiyon ile ALA'daki disülfid bağı açılarak, hidroksietil türevi 2 hidrojenini kaybeder ve asetil grubu (CH<sub>3</sub>-C=O) haline gelir. Bu asetil grubu ise lipoik asidin bir koluna bağlanır. Böylece asetillipoil transasetilaz kompleksi meydana gelir. ALA'nın diğer kolundaki kükürt ise redüklenerek serbest -SH grubu haline dönüşür. E1-tiyamin PP grubu ise bu reaksiyon sonucunda tekrar serbest hale geri döner.



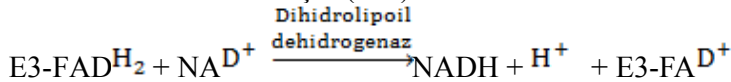
Üçüncü basamakta asetillipoil transasetilaz kompleksi serbest CoA-SH ile reaksiyona girerek ALA'nın bir kolundaki asetil grubu CoA'nın 3- merkaptotilamin kısmının serbest -SH grubuna transfer edilir ve asetil CoA oluşur. E2-lipoik asit kompleksi redükte durumda serbest hale geçer.



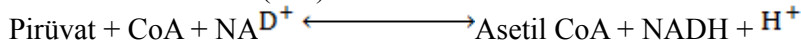
Dördüncü basamakta E2-redükte lipoik asit kompleksi üçüncü enzim olan dihidrolipoil dehidrogenazın sıkıca bağlı olan koenzim E3-FAD ile reaksiyona girer. Burada okside FAD+ elektron akseptörü olarak görev yapar ve redükte lipoik asit kollarındaki hidrojen ve elektronları kendi yapısına katar. Reaksiyon sonunda E2-oksidede lipoik asit haline dönüşürken okside-FAD+de E3-FADH<sub>2</sub> haline dönüşür.



Son basamak olan beşinci basamakta E3-FADH<sub>3</sub> kompleksi redükte halden tekrar okside hale dönüşürken okside durumda bulunan NAD<sup>+</sup> de redükte NADH+H<sup>+</sup> haline dönüşür (133).



Pirüvat dehidrogenaz, pek çok yüksek ökaryotlarda fosforilasyon-defosforilasyon döngüsünün taşıdığı spesifik regülatör enzimlerle düzenlenmektedir. ALA in vivo olarak ditiyol formuna indirgenir, bu bileşik aynı zamanda biyolojik olarak aktif formdur (141).



Pirüvat dehidrogenaz ve ketoglutarat dehidrogenaz gibi multienzim dehidrogenaz kompleksinde doğal kofaktör olarak fonksiyon görür (139). PDH oksidatif glukoz metabolizmasında önemli bir basamak olan pirüvatın asetil CoA'ya oksidatif dekarboksilasyonunu katalize eden yer olan mitokondride yerleşmiştir (135).

#### 1.4.4.1. Alfa Lipoik Asidin Antioksidan Aktivitesi

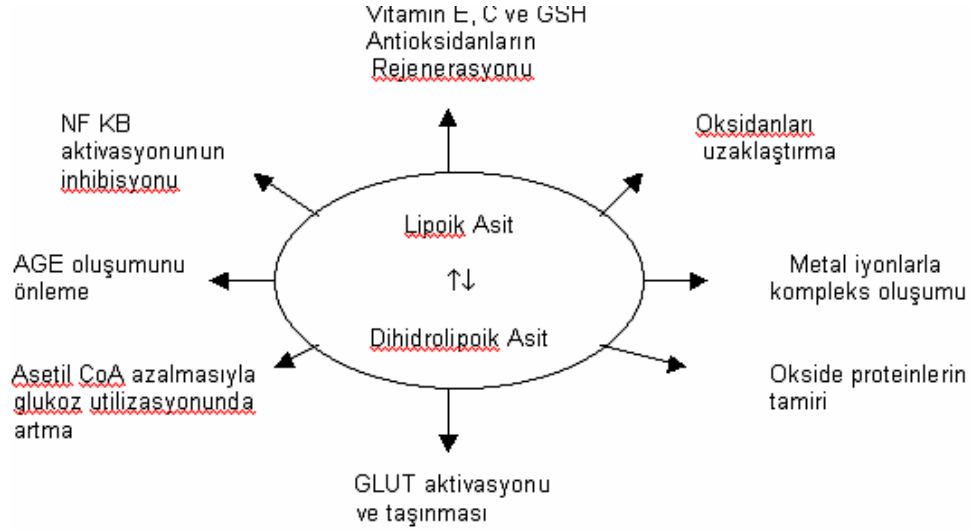
Mitokondriyal dehidrogenaz reaksiyonlarında önemli bir rol oynayan ALA son zamanlarda önemli bir antioksidan olarak dikkat çekmektedir. Lipoat veya onun redükte formu dihidrolipoat; süperoksit radikalleri, hidroksil radikalleri, peroksil radikalleri ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen bileşikleriyle reaksiyona girer.

Ayrıca lipoat miyogloblin, prolaktin, tiyoredoksin ve NF kappa B transkripsiyon faktör gibi proteinlerin indirgeyici düzenleyicisi olarak fonksiyon görür (142).

Lipoik asit ve onun redükte formu DHLA dokularda serbest haldedir. DHLA güçlü bir redüktandır ve böylece okside antioksidanları rejenere edebilir. Antioksidanlar, radikalleri uzaklaştırdıkları zaman kendileri radikal hale gelirler.

DHLA direkt ve indirekt olarak askorbat, glutatyon, koenzim Q10 ve vitamin E'yi rejenere edebilir (139).

Sistein, glutatyon sentezinde hız kısıtlayıcı basamakta kullanılan kofaktör olarak bilinmektedir. ALA hücreye hızla alınır ve ortamda serbest olarak bulunan DHLA'ya redükte olur. Daha sonra DHLA sistini sisteine indirger. Hücre sisteini sistinden on kat hızlı alır, GSH'nin biyosentezi hızla meydana gelir (143).



Şekil 5. Dihidrolipoik asit-lipoik asit redoks çiftinin etkileri (139)

#### 1.4.4.2. Alfa Lipoik Asidin Klinikte Kullanımı

##### 1.4.4.2.1 Diyabet ve Diyabetik Nöropatinin Tedavisindeki Etkileri

Belki de ALA'nın en geniş klinik kullanımı diyabetin ve komplikasyonlarının tedavisinde kaydedilmiştir (144). ALA son zamanlarda diyabetin tedavisi, katarakt, makular dejenerasyon ve ağrılı periferel sinir dejenerasyonu olan nöropatiyi içeren diyabet komplikasyonlarını önlemede Avrupa'da kullanılmaktadır (142). Diyabetikler sıklıkla uyuşukluk, bazen ekstremitelerinde yanıcı bir ağrıyı içeren dejeneratif sinir tutulumu olan periferel nöropati yüzünden acı çekerler. Çalışmalar ALA'nın bu sinir disfonksiyonuna bağlı semptomların azalmasına yardım edebildiğini göstermektedir (144). Ağrının rahatlamasının ardındaki kesin mekanizma net değildir.

İn vitro ve in vivo pek çok çalışmada ALA'nın antihiperlisemik etkileri araştırılmıştır. ALA'nın kas hücreleri içine glukoz girişini artırıp glikolizis hızını azalttığı ve genel glukoz kullanımını arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca karaciğerden kana glukoz serbestlenmesini sağlayan glukoneogenezi baskılar. Tip II diyabetli insanlarda ALA alımının fruktozamin düzeylerini azalttığı ve insülin seviyesini arttırdığı kanıtlanmıştır (138). Almanya'da plasebo kontrollü üçlü çalışmada Tip II diyabetli 74 hastaya 600, 1200, 1800 mg ALA ve plasebo verilmiştir. Dört hafta sonra tedavi olan bütün gruplarda plaseboya göre glukoz seviyelerinde düzelme görülmüştür. ALA grupları arasında belirgin fark izlenmemiştir. Tedavi grupları incelendiğinde ortak sonuç olarak, plasebo grubuna göre glukoz geri alınımında ve insülin uyarımında % 27 artış görülmüştür. Ayrıca hiçbir tedavi grubunda ciddi yan etki görülmemiştir (134).

##### 1.4.4.2.2. Hafıza ve Beyin Fonksiyonlarına Etkisi

Alman araştırmacılar ALA'nın yaşlı farelerde uzun dönemli hafıza üzerinde pozitif etkileri olduğunu bulmuşlardır. Henüz genç farelerde benzer yararları gösterilememiştir. Araştırmacılar ALA'nın genel hafızayı düzeltmekten ziyade uzun dönem hafıza bozukluklarında etkili olduğunu göstermişlerdir. Diğer araştırmacılar ALA'nın beyin dokularını oksidatif hasardan koruduğuna dair kanıtlar bulmuşlardır. Rochester Üniversitesi medikal merkezindeki araştırmacılar Parkinson ve Huntington hastalıkları gibi akut ve kronik nörolojik bozuklukların tedavisinde olası bir role

sahip olabileceğini belirtmişlerdir (142). Parkinson Hastalığının oluşumu ve ilerlemesinde; mitokondriler, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alan FR ile meydana gelen oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Güçlü antioksidanlar ve bunlardan biri olan ALA dopa toksisitesinin etkili blokerlerindedir. Huntington hastalığının patogenezinde oksidatif hasarı suçlayan

güçlü kanıtlar bulunmaktadır. ALA, Huntington hastalıklı transgenik fare modellerinde yaşam süresini uzatmıştır. Bu bulgular Huntington hastalarında lipoik asidin yararlı etkilere sahip olabileceğini öne sürmektedir (145).

#### **1.4.4.2.3. Ateroskleroza Karşı Koruyucu Etkisi**

Ateroskleroz; arterlerde plakların oluşumu ile karakterize bir durumdur. FR arteriyel kolesterol plaklarında LDL (düşük dansiteli lipoproteinler) birikiminin oksidasyonu ile ateroskleroza meydana getirir. Caroline Üniversitesi' nin yaptığı bir çalışmada bildiricilerin iki grubunda aterojenik diyet ile beslenerek aterosklerotik lezyonlar oluşturulmuştur. Bu gruplardan birine lipoik asit verilmiş ve kontrol grubuna göre aterojenik lezyonlarda % 75 gerileme olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar ALA'nın, vitamin E'nin rejenarasyonunun ve LDL kolesterolün oksidasyonunun önlenmesi ile ateroskleroza karşı koruyucu olduğu sonucuna varmışlardır (146).

#### **1.4.4.2.4. İnme ve Kalp Krizinde Etkileri**

Alfa lipoik asidin; inme ve kalp krizlerinde yetersiz oksijenizasyona bağlı hasardan dokuları koruduğu gösterilmiştir. Bilim adamları lipoik asit ile tedavi edilen hayvanlarda ölüm hızının lipoik asit ile tedavi edilmeyenlerin yalnızca 1/3'ü kadar olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer çalışmalarda kalp krizinden sonra ölüm ve doku hasarının önlenmesinde ALA'nın rolü olduğunu bulunmuştur (142).

#### **1.4.4.2.5. Kansere Karşı Koruyucu Etkileri**

KontROLSÜZ FR vücut boyunca çoğalıp hücre membranlarını, organları ve bağışıklık sistemini etkiler. DNA'yı etkileyerek, kanser ve diğer dejeneratif hastalıkların oluşumuna neden olur (147). FR hücre membranlarını bozduğu için hücrenin fonksiyonel içeriğinin hasarlı membrandan sızmasına neden olur. FR maruz kalan hücrelerin DNA yapıları mutasyona uğrayarak kontROLSÜZ çoğalıp ve kanser meydana gelir. ALA antioksidan özellikleri sayesinde kanser oluşumunu azaltan bir rol oynayabilir. Lipoik asit aynı zamanda kanser başlamadan önce kanser meydana getirecek genetik programa sahip hücreleri durdurma potansiyeline de sahiptir (148).

#### **1.4.4.2.6. AİDS Tedavisindeki Etkisi**

Bilim adamları ALA'nın HIV-1 (insan immün yetmezlik virüsü)'in ve DNA'ya direkt bağlanan diğer virüslerin replikasyonunu engelleyebildiğini bulmuşlardır (142). Almanya' da yürütülen bir çalışmada araştırmacılar vitamin C ve glutatyon düzeylerinde önemli azalmalar olan hastalara 14 gün günde 450 mg lipoik asit vermişlerdir. Bu gözlemler kan peroksidasyon ürünlerinde artma ve beyaz kan hücre sayılarında düzelme ile uyumludur (149). Son bir çalışmada AIDS'li 12 kişiye ALA verilmiş, glutatyon düzeyleri % 100, vitamin C düzeyleri % 90, T4 hücreleri % 66 artmıştır ve oksidatif stres katılanların % 70'inde azalmıştır (142). ALA'nın HIV ile enfekte 11 hastalı bir grupta antioksidan düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir. Bunun temelinde ALA'nın antioksidanları rejenere etme özelliği yatmaktadır (149).

#### **1.4.4.2.7. Radyasyona Karşı Koruyucu Etkisi**

Alfa lipoik asidin radyasyona maruz kalma ile meydana gelen serbest radikal hasarını azalttığını gösteren Çernobil radyasyon kurbanlarını içeren Rus çalışmasının sonuçları ilginçtir. 16 çocuklu bir gruba 28 gün boyunca günde 400 mg lipoik asit verilmiş, 12 çocuklu kontrol grubuyla karşılaştırıldığında radyoaktif izotopların idrarla atılmasında ve beyaz kan hücrelerinde FR aktivitesinde azalmalar görülmüştür (150).

### **1.5. Periferik Sinir Sistemi**

#### **1.5.1. Periferik Sinir Anatomisi**

Periferik sinirler, omurilik ön boynuzdaki motor nöronların, dorsal ganglionlardaki duysal nöronların ve sempatik ganglionlardaki sempatik nöronların bağ doku ile çevrili olan akson denilen uzantılarından oluşan ve sonlandıkları hedef organa göre motor, duyu ya da otonomik fonksiyonları olan yapılardır (151). Sinir sistemini fonksiyonel ünitesi nöron denilen sinir hücresidir. Her bir nöron perikaryon veya soma denilen hücre gövdesi, dendrit ve akson olmak üzere 3 kısımdan oluşur.

Motor sinirlerin hücre gövdeleri omurilik ön boynuzda, duyu sinirlerinin ise arka kök ganglionlarında bulunur. Hücre gövdesinde yerleşik reseptör görevi yapan çok sayıdaki sitoplazmik çıkıntılara dendrit denir. Dendritler, çevreden gelen uyarıları hücre gövdesine iletirler ve nöronlar arasındaki iletişimi sağlarlar. Sinir hücrelerinin perifer ile iletişimini sağlayan uzantıya akson denir. Genelde her bir nöronun pek çok

dendriti olmasına karşın bir tane aksonu vardır (152, 153). Schwann hücreleri nöroektoderm kökenli olup periferik sinir sisteminin uydu hücreleridir. Akson çevresinde yer alan konsantrik karakterdeki fosfolipid bir tabaka olan miyelin kılıfını sentezlerler. Miyelinli ya da miyelinsiz olsun, bütün nöronların aksonları ucuca dizilmiş Schwann hücreleri ile sarılmışlardır (153). Büyük çaplı sinirlerin hemen hepsi miyelinli iken, çapı 1 mikrometreden ( $\mu\text{m}$ ) küçük aksonlar genellikle miyelinsizdir. Miyelinli aksonlarında miyelinsiz bölümleri vardır. Bu kısımlar, iki Schwann hücresi arasında kalan bölge olan Ranvier boğumları ve akson çıkış bölgesi olan akson tepeciğidir. Bu bölgeler sinir ileti hızı açısından önemlidir. Ranvier boğumları, uyarının sıçrayıcı (saltatuar) şekilde iletimi ile çok hızlı taşınmasını sağlar (151, 153). Bir sinirin miyelinli olması aksiyon potansiyelinin iletim hızını arttırmaktadır (151).

Periferik sinir sistemi, santral sinir sisteminin dışına çıkan aksonların oluşturduğu periferik sinirler ile santral sinir sisteminin dışında nöronların toplu olarak bulunduğu ganglion adı verilen yapılar oluşturur. Medulla spinalisten çıkan otuz bir çift spinal sinir ile beyin ve beyin sapından çıkan on iki çift kranial sinir ve bunların dalları periferik sinir sistemini oluştururlar. Periferik sinir sisteminde her bir aksonu en dıştan endoneurium adı verilen ve bağ dokusundan oluşan bir yapı sarar. Perineurium denilen bağ dokusu yapısındaki bir başka yapı birkaç yüz aksonu sararak fasikülüsleri oluşturur. Epineurium birkaç fasikülüsü dıştan sararak periferik siniri oluşturur (154).

Periferik sinirler efferent ve afferent sinirler olarak gruplandırılır. Afferent sinirler reseptör organlardan gelen duyarları santral sinir sistemine, efferent sinirler santral sinir sisteminin oluşturduğu motor cevapları efektör organlara iletirler (154, 155) Spinal sinirler medulla spinalise ön ve arka kökler aracılığı ile bağlanırlar. Kökleri oluşturan liflere fila radicularia denilir. Bu köklerden önde bulunanına radix anterior, arkada bulunanına radix posterior denilir. Ön ve arka kökler ganglion spinalenin hemen dışında birleşip spinal siniri (truncus nervi spinalis) meydana getirirler ve foramen intervertebraleden geçerek vertebral kanalı terkederler. Kökler, pia mater ve arachnoidea mater spinalis'in uzantıları tarafından çevrelenmiştir ve bu zarlar spinal sinirin dura mater spinalis'i deldiği yere kadar uzanırlar. Spinal siniri oluşturan her bir kök, dura mater spinalis'i ayrı ayrı deler (155).

### **1.5.2. Siyatik Sinir (Nervus Ischiadicus)**

Vücuttaki en kalın sinirdir. Plexus sacralis'in devamı şeklinde olan nervus ischiadicus, pelvisi foramen infrapiriforme' den terkeder. Musculus piriformis'in alt kenarından uyluğun alt 1/3'üne kadar uzanır, burada uç dalları olan n. tibialis ile n. Fibularis (peroneus) communis olmak üzere ikiye ayrılır. N. tibialis daha kalın olup n. ischiadicus' un devamı şeklinde görülür. N. ischiadicus gluteal bölgede m. gemellus superior, m. gemeellus inferior, m. obtrator internus ve m. quadratus femoris'in arkasında, m. gluteus maximus'un ön tarafından geçer. Burada n. cutaneus femoris posterior ve a. glutea inferior ile beraber seyreder. Uylukta m. adductor magnus'un arkasında ve m. biceps femoris'in önünde bulunur. M. biceps femoris'in uzun başı, siniri yukarıdan aşağıya ve içten dışa doğru arkadan çarparlar. Plexus sacralis'in arka bölüm liflerinden n. fibularis communis, ön bölüm liflerinden ise n. tibialis oluşur. Bu iki sinir birlikte, n. ischiadicus adı altında fossa poplitea yakınına kadar, bir kılıfla sarılı olarak uzanır. Ancak fossa poplitea yakınında birbirinden ayrılırlar. Ayak derisinin tümü ile bacak derisinin büyük kısmına duyusal lifler, uyluğun arka tarafındaki kaslar ile bacak ve ayağın tüm kaslarına motor ve duyusal lifler gönderir (155).

Rat siyatik siniri, pelviste ön ve arka dallara ayrılan sakral pleksusun (5, 6 ve kısmen 4. lomber sinirler tarafından oluşturulur) arka dalıdır. Siyatik sinir devamında ise nerves tibialis, nerves common peroneales ve kollateral dallara ayrılır (156).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi' nde (FÜDAM) Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan onay alındıktan sonra Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte yapıldı (23.12.2011/143).

### 2.1. Deney Hayvanları

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

**Tablo 7.** Deney hayvanlarına verilen rat yeminin terkibi

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

\*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

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

## 2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneysel çalışmalar, toplam 28 adet rat üzerinde gerçekleştirildi. İlk ağırlık ölçümleri yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Ratlar; kontrol (Grup I), DM (Grup II), ALA (Grup III) ve DM + ALA (Grup IV) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

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

**2. Grup (n=7) DM grubu:** Sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş 180 mg/kg dozunda STZ i.p. olarak tek doz halinde verildi. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz seviyesi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve kan glukoz seviyeleri kaydedildi.

**3. Grup (n=7) ALA grubu:** 8 haftalık deney süresince hergün oral gavaj yoluyla 100 mg/kg ALA verildi. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve kan glukoz seviyeleri kaydedildi.

**4. Grup (n=7) DM+ALA:** Sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş 180 mg/kg dozunda STZ i.p. olarak tek doz halinde verildi. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz seviyesi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Diyabet oluşumunun ardından 8 haftalık deney süresince hergün oral gavaj yoluyla 100 mg/kg ALA verildi. Çalışmanın başlangıcında, 4. haftada ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve kan glukoz seviyeleri 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 ve siyatik sinir dokuları çıkarıldı. Çıkarılan beyin ve siyatik sinir dokuları biyokimyasal çalışma için -80C°'de saklandı. Histolojik çalışma için ise % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

## 2.5. Biyokimyasal Çalışma

### 2.5.1. Kan glukoz düzeyleri

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

### 2.5.2. Dokuların Hazırlaması

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

### 2.5.3. Plazma Lipid Peroksidasyon Tayini

Malonildialdehit, Matkovics ve ark. (157) tarafından modifiye edilen Placer ve ark.'nın (158) yöntemine göre ölçüldü. Bu yöntem lipid peroksidasyonunun aldehit ürünlerinden biri olan MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyonu temeline dayanır. Oluşan MDA, TBA ile pembe renkli bir kompleks oluşturmakta ve çözeltinin absorbansı 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülerek lipid peroksidasyonunun derecesi saptanmaktadır.

#### 2.5.4. Süperoksit Dismutaz Aktivitesinin Tayini

Bu metotta SOD aktivite ölçümü ksantin- ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksit radikalının nitroblue tetrazolium'u (NBT) indirgeyerek renk oluşması esasına dayanan Sun'un (159) bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu şekilde üretilen süperoksit radikalının NBT'yi indirgemesi 560 nm'de maksimum absorbans veren mavi renkli formazon oluşumu ile sonlanır.

#### 2.5.5. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesinin Tayini

Glutasyon peroksidaz aktivite düzeyi Lawrance ve Burk'ın (160) yöntemine göre ölçüldü. Hemolizattaki GPx, GSH'ı GSSG (Glutasyon disülfid)'ye okside ederken Cumenehidroperoksit kullanır. Renk ajanı olarak 5,5-ditiyo-bis [2-nitrobenzoik asit] (DTNB) solüsyonu ile karıştırılması sonucu hem kör hem de örneklerde meydana gelen sarı renk kompleksinin 412 nm'de spektrofotometre ile okunması sonucu belirlenir.

#### 2.5.6. Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Katalaz aktivitesi Aebi'nin (161) yöntemine göre yapıldı. CAT enzimi hidrojen peroksiti (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) yıkarak su (H<sub>2</sub>O) ve oksijene (O<sub>2</sub>) dönüştürür.

#### 2.5.7. Glutasyon Düzeyinin Belirlenmesi

Redükte glutasyon düzeyi Sedlak ve Lindsay'ın (162) tarif ettiği şekilde belirlendi. Bu metot renk ajanı olarak DTNB eklendiğinde sülfhidril gruplarının oldukça stabil sarı renk oluşturması temeline dayanan spektrofotometrik bir yöntemdir.

#### 2.5.8. Plazma Protein Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Plazma protein miktarı Lowry (163) yöntemine göre ölçüldü. Alkali bakır tartarat ayırıcı peptid bağları ile kompleks yapar. Her 7 veya 8 amino asit artığı 1 atom bakır bağlar. Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor- mavi renk şekillenir. Oluşan renk spektrofotometrede 546 nm'de okunur.

#### 2.6. Histolojik Çalışma

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

**Tablo 8.** Histolojik takip serileri

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

**Tablo 9.** İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H <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 mm 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; caspase 3 Rabbit polyclonal IgG, Abcam, ab2302, London, UK) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse / rabbit IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve 3-Amino-9-ethyl carbazole kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Novel N-800M mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

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

**Tablo 10.** İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

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

## 2.8. TUNEL Metodu

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

**Tablo 11.** TUNEL boyama prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H <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

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

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

**Tablo 12.** TUNEL boyama yaygınlığının derecesi

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

### 2.9. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 21.0 programı kullanıldı. Veriler ortalama±standart sapma (ort±SD) olarak ifade edildi. Gruplar arası farklılığı karşılaştırma için one-Way ANOVA testi, sonrasında post-hoc Tukey testi kullanıldı.  $P < 0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Klinik Bulgular

Kontrol ve ALA gruplarına ait ratların vücut ağırlıklarında deneyin 4. ve 8. haftalarında başlangıca göre anlamlı bir artış izlendi ( $p<0.05$ ). DM ve DM+ALA gruplarında ise kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma izlendi ( $p<0.05$ ) (Tablo 13).

**Tablo 13.** Ratların Deney Süresince Ağırlık Değişimleri

	Grup (Kontrol) (n=7)	I Grup II (DM) (n=7)	Grup III (ALA) (n=7)	Grup IV (DM+ALA) (n=7)
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	273,8±4,4	277,7±4,31	295,2±4,35	306,2±1,25
4.Hafta vücut ağırlığı (gr)	341,6±6,12 <sup>a</sup>	281,1 ±5,34 <sup>b</sup>	336,4±5,82 <sup>a</sup>	307,7±4,3 <sup>b</sup>
Final vücut ağırlığı (gr)	364,4±5,58 <sup>a</sup>	275,8 ±4,76 <sup>b</sup>	364,6±5,12 <sup>a</sup>	302,3±5,55 <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

Gruplandırılma sırasında ölçülen kan glukoz değerleri 250 mg/dl üzerinde olan denekler diyabet olarak kabul edildi. Deneyin 4. Haftasında yapılan ölçümlerle yüksek kan glukoz değerlerinin DM gruplarında korunduğu teyit edilerek çalışmaya devam edildi. DM ve DM+ALA gruplarına ait ratların kan glukoz değerlerinde deneyin 4. ve 8. haftalarında başlangıca göre anlamlı bir artış izlendi ( $p<0.05$ ). Kontrol grubu ile kıyaslandığında DM ve DM+ALA gruplarına ait ratların kan glukoz değerlerinde deneyin 4. ve 8. haftalarında anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Kontrol ve ALA grubu kan glukoz düzeylerinde ise deney süresi boyunca anlamlı farklılık oluşmadı (Tablo 14).

**Tablo 14.** Ratların Deney Süresince Glukoz Değişimleri

	Grup (Kontrol) (n=7)	I Grup II (DM) (n=7)	Grup III (ALA) (n=7)	III Grup IV (DM+ALA) (n=7)
Başlangıç kan glukozu (mg/dl)	94,40 ± 2,90	93,51 ± 4,85	95,10 ± 3,25	95,6 ± 7,15
4. Hafta kan glukozu (mg/dl)	98,20 ± 5,25	387,20 ± 15,15 <sup>ab</sup>	96,70± 6,00	390,45 ± 18,65 <sup>ab</sup>
Final kan glukozu (mg/dl)	96,20 ± 5,50	415,40 ± 12,85 <sup>ab</sup>	95,30 ± 5,55	410,95 ± 12,20 <sup>ab</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, ( $p<0.05$ ).

##### 3.2.2. Oksidan ve Antioksidan Madde Düzeyleri

Alfa lipoik asidin ve diyabetin oksidatif sistemi etkileyen biyokimyasal parametreler üzerine etkileri Tablo 15'de verilmiştir.

**Tablo 15.** Beyin dokusunda bakılan biyokimyasal parametreler

	MDA (nmol/g)	CAT (k/g)	GPx (U/g)	GSH (nmol/g)	SOD (U/mg)
Grup I (Kontrol) (n=7)	57,50±6.18	8,96±3,978	21,18±7,43	12,73±1,745	5,37±1,507
Grup II (DM)	113,45±13,44	6,575±1,705	18,00±2,93	14,82±1,79	4,79±1,80

(n=7)	a				
<b>Grup III</b> <b>(ALA)</b> (n=7)	50,89±11,23	13,72±2,88	31,125±2,69	13,50±3,624	6,642±1,249
	bc	b	ab		c
<b>Grup IV</b> <b>(DM+ALA)</b> (n=7)	76,426±6,723	8,28±1,008	30,50±2,39	11,21±0,688	5,00±,329
	b		ab		

<sup>a</sup> Kontrol grubuna göre anlamlılık,

<sup>b</sup> DM grubuna göre,

<sup>c</sup> DM+ALA grubuna göre anlamlılık vardır, p<0.05

### 3.2.2.1. Malondialdehit Bulguları

Yapılan analizlerde MDA değerlerinin DM grubunda kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda artış olduğu (p<0.05), ALA grubunda ise kontrole göre anlamlı fark oluşmadığı fakat DM ve DM+ALA grubuna göre anlamlı olarak düşük değerlere sahip olduğu gözlenmiştir (p<0.05). DM+ALA grubunda DM grubuna göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma olduğu (p<0.05) gözlenmiştir.

### 3.2.2.2. Katalaz Bulguları

Yapılan analizlerde CAT değerlerinde ALA grubunda DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artış olduğu izlenmiştir.(p<0.05)

### 3.2.2.3. Glutatyon Peroksidaz Bulguları

Yapılan analizlerde GPx değerleri ALA ve DM+ALA gruplarında hem kontrol grubuna hem de DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış olduğu izlenmiştir. (p<0.05)

### 3.2.2.4. Glutatyon Bulguları

Yapılan analizlerde gruplar arasında GSH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir.

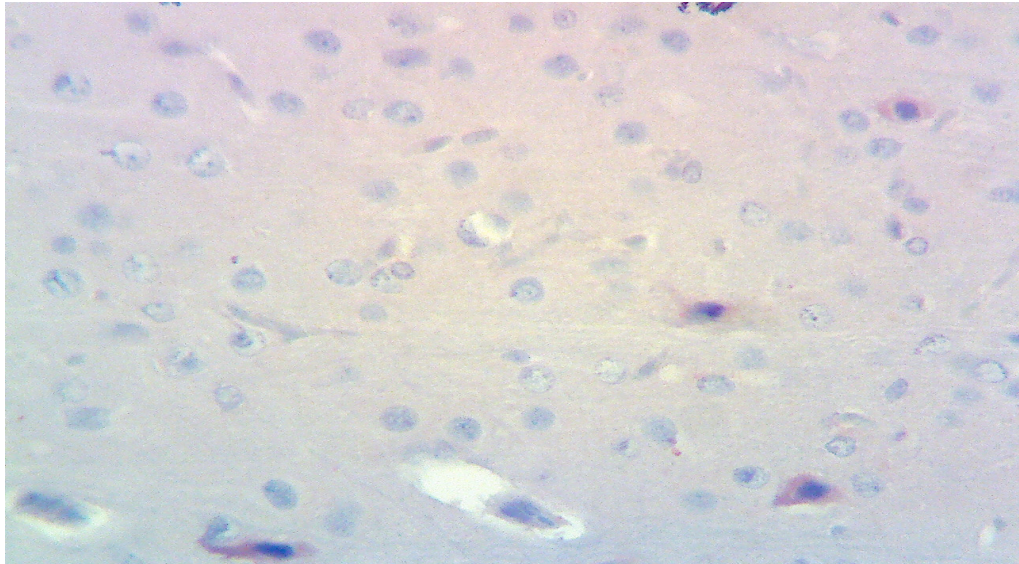
### 3.2.2.5. Süperoksit Dismutaz Bulguları

Yapılan analizlerde gruplar arasında SOD analizinde ALA grubunda DM+ALA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir.

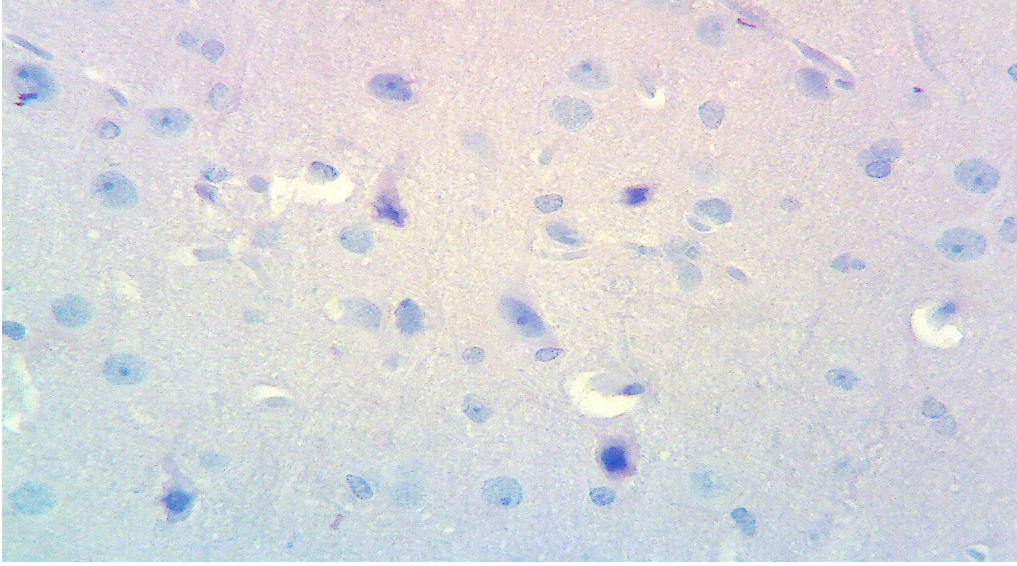
## 3.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

### 3.3.1. Bax İmmünreaktivitesi

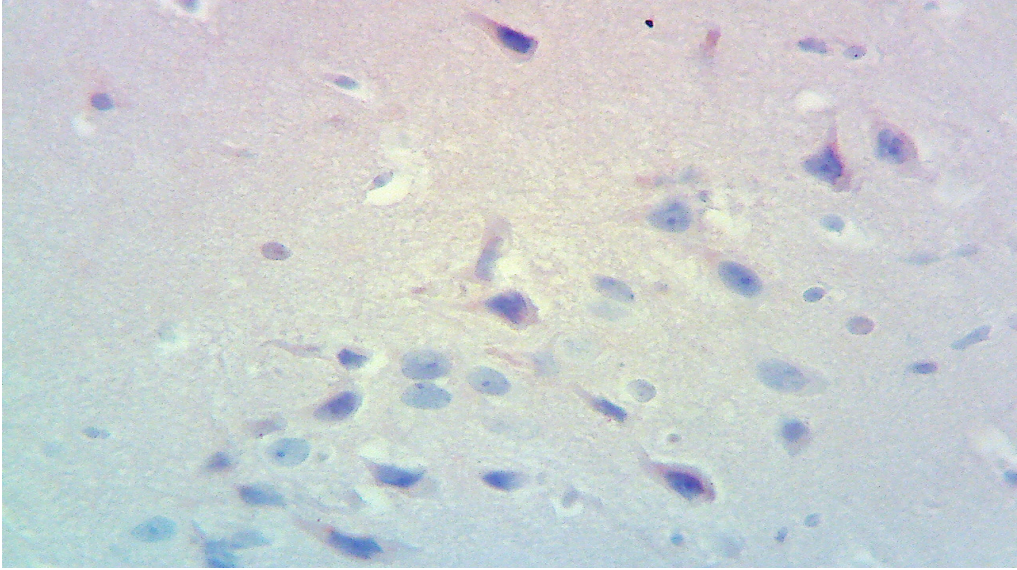
Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; Bax immünreaktivitesi kontrol ve ALA gruplarında +1 yaygınlığında gözlendi (Şekil 6, 7). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda Bax immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 8). ALA'nın tedavi olarak verildiği DM+ALA grubunda ise DM grubuna göre Bax immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 9).



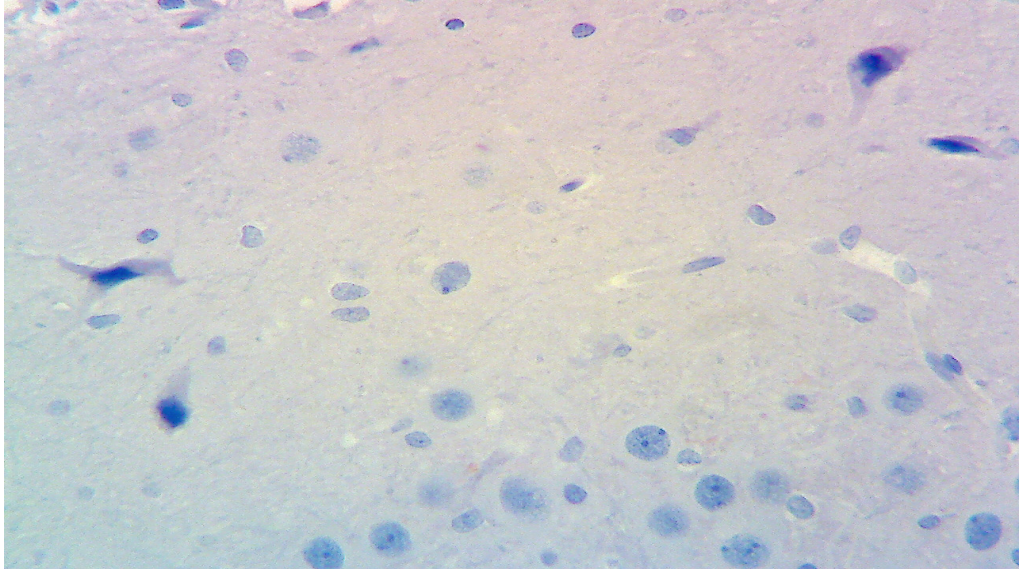
**Şekil 6.** Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi



**Şekil 7.** ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi



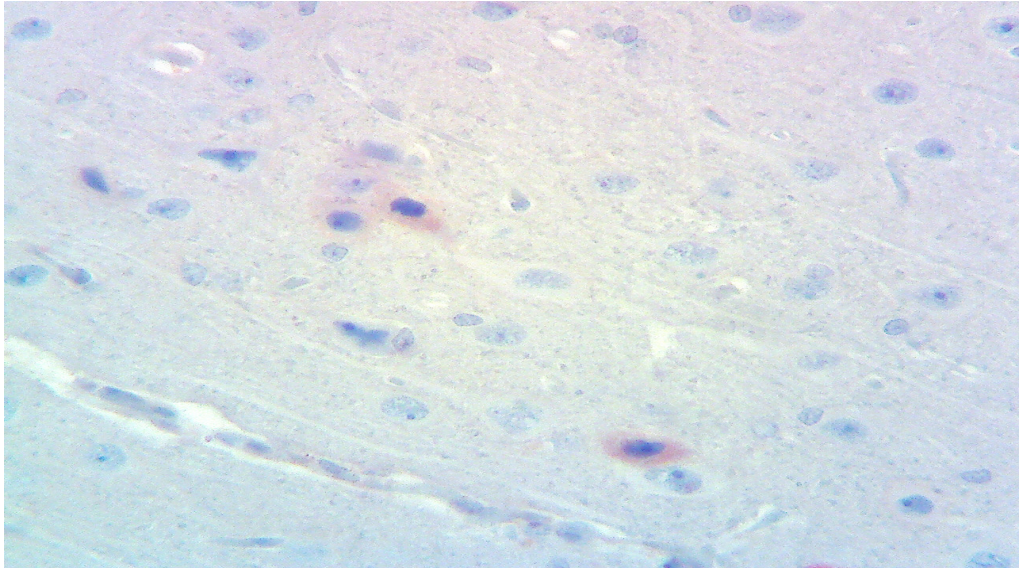
**Şekil 8.** DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi



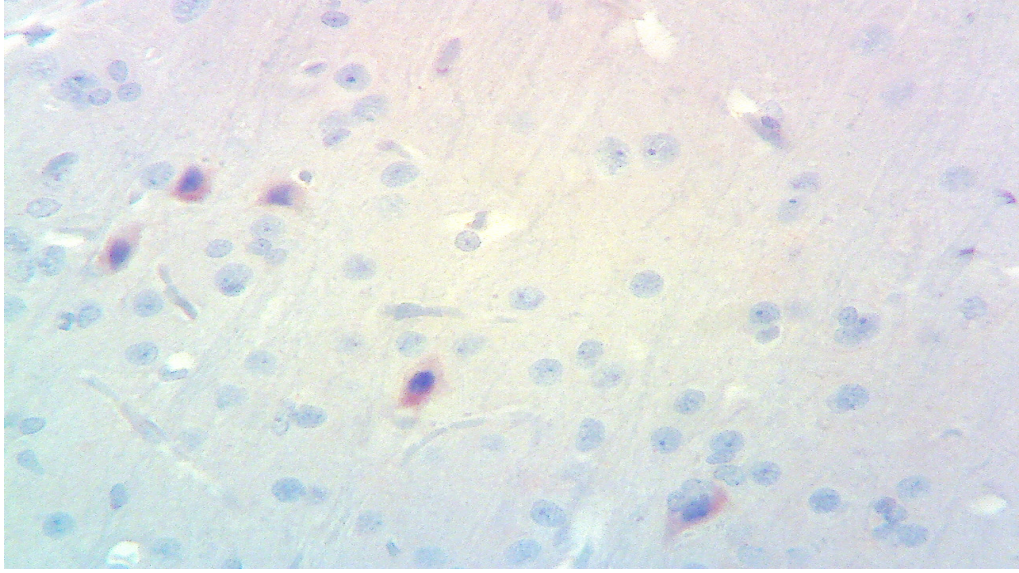
**Şekil 9.** DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında Bax immunreaktivitesi

### **3.3.2. Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi**

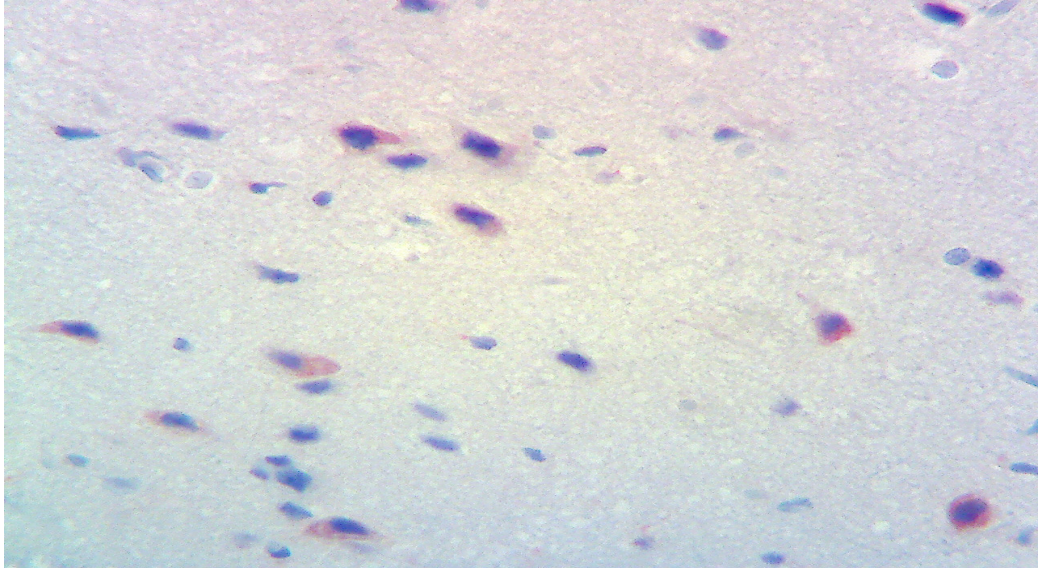
Kaspaz 3 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; Kaspaz 3 immünreaktivitesi kontrol ve ALA gruplarında +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 10, 11). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DM grubunda Kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı ve +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 12). ALA'nın tedavi olarak verildiği DM+ALA grubunda ise DM grubuna göre Kaspaz 3 immünreaktivitesinde belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 13).



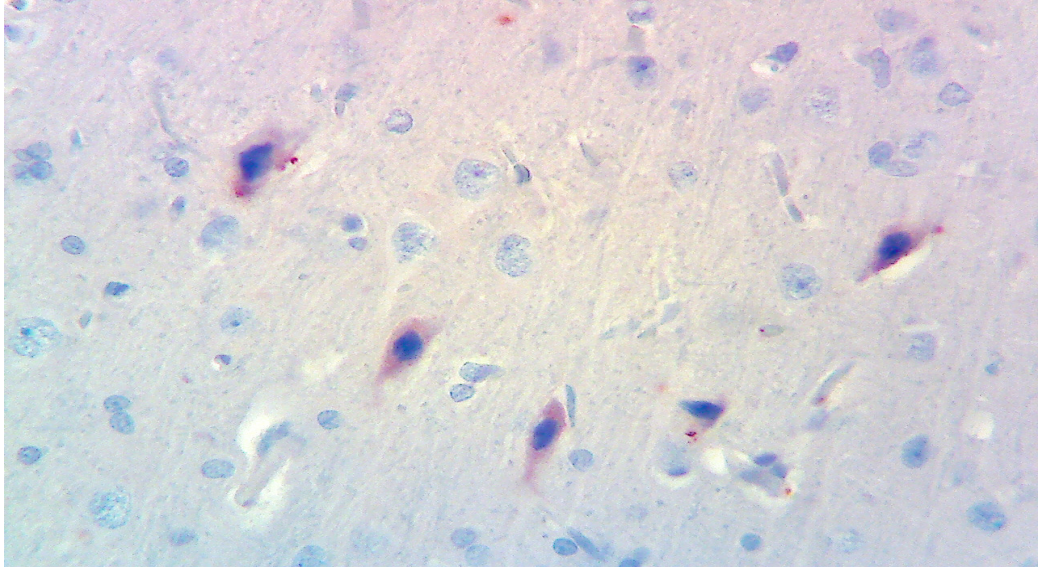
**Şekil 10.** Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3 immunreaktivitesi



**Şekil 11.** ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında Kaspaz 3 immunreaktivitesi



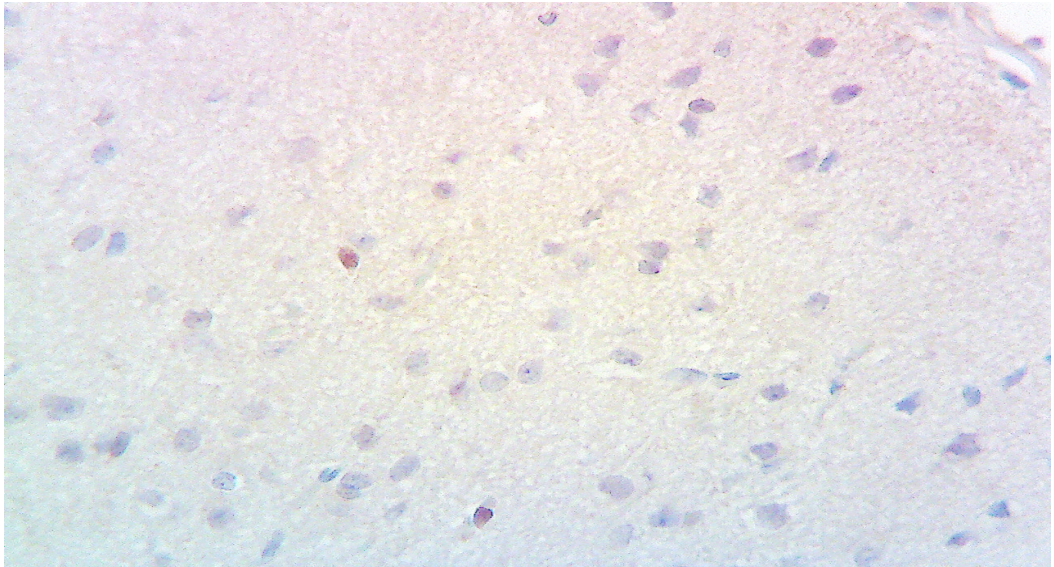
**Şekil 12.** DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında Kaspaz 3 immunreaktivitesi



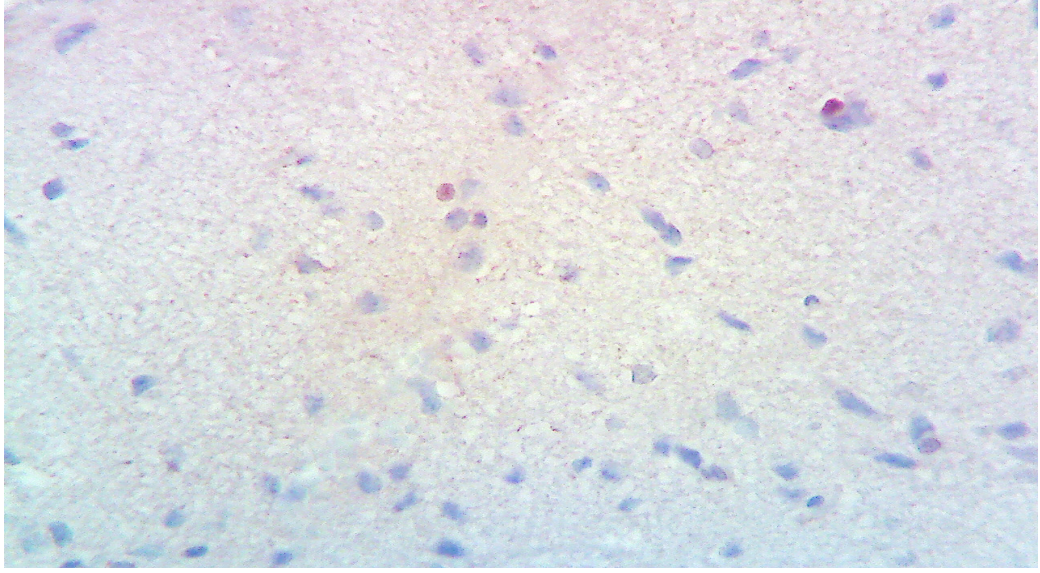
**Şekil 13.** DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında bax immunreaktivitesi

#### **3.4. TUNEL Bulgular**

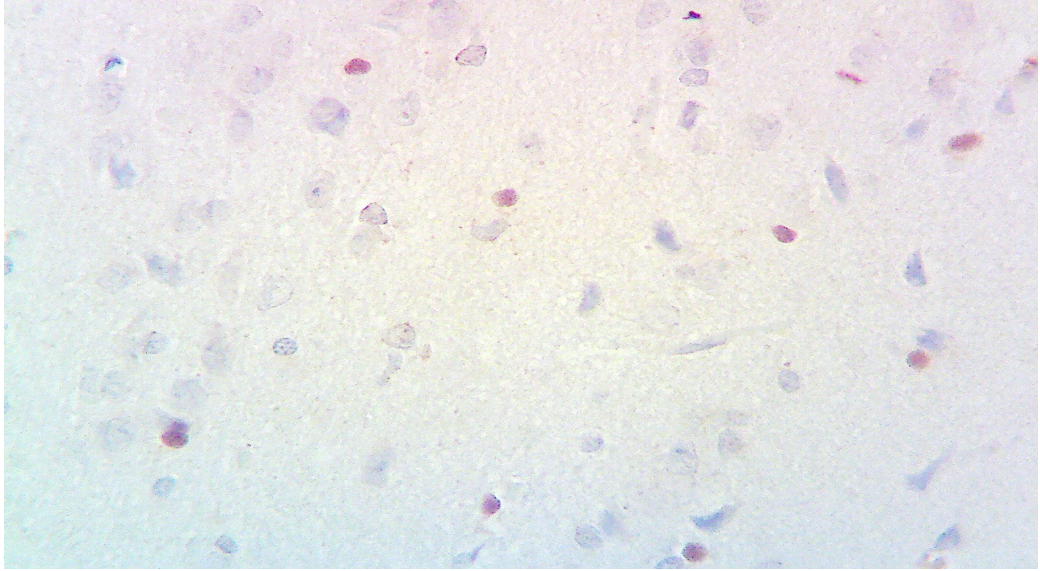
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol ve ALA gruplarında +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 14, 15). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitifliği DM grubunda +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 16). ALA'nın tedavi olarak verildiği DM+ALA grubunda ise DM grubuna göre belirgin azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 olarak değerlendirildi (Şekil 17). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 18). Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı (Şekil 19).



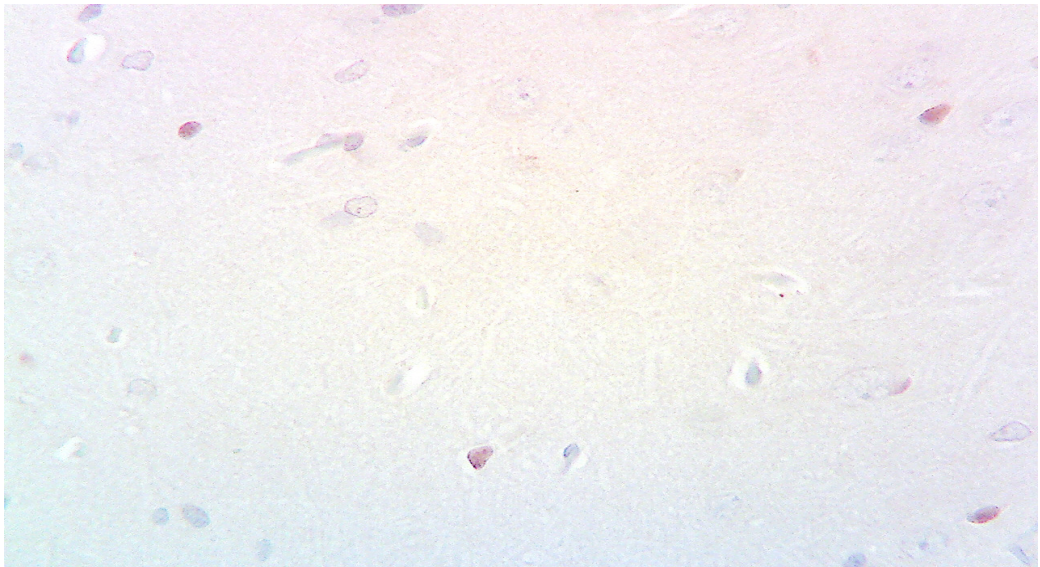
**Şekil 14.** Kontrol grubuna ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



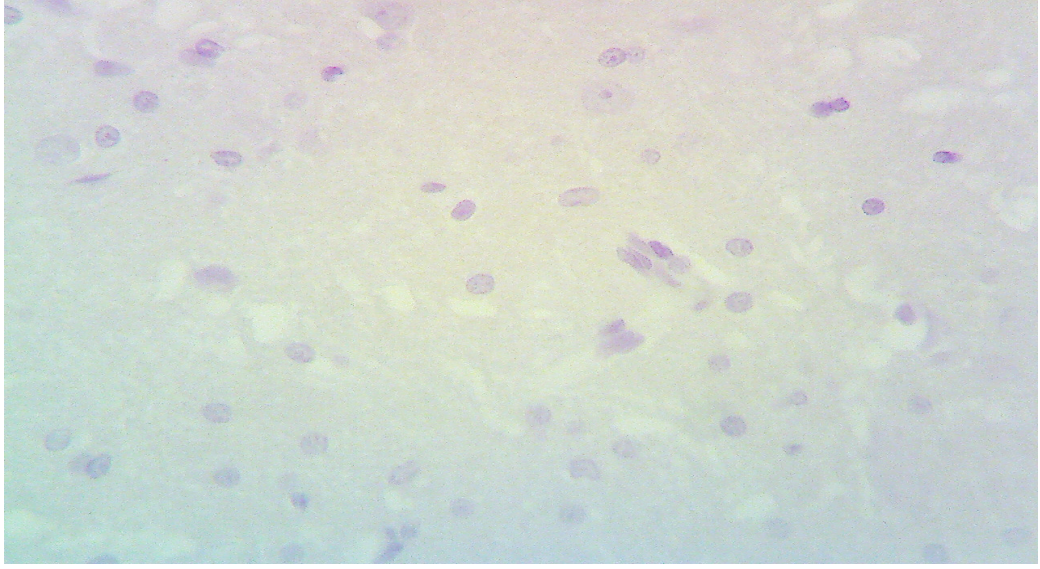
**Şekil 15.** ALA verilen gruba ait beyin dokusunda +1 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



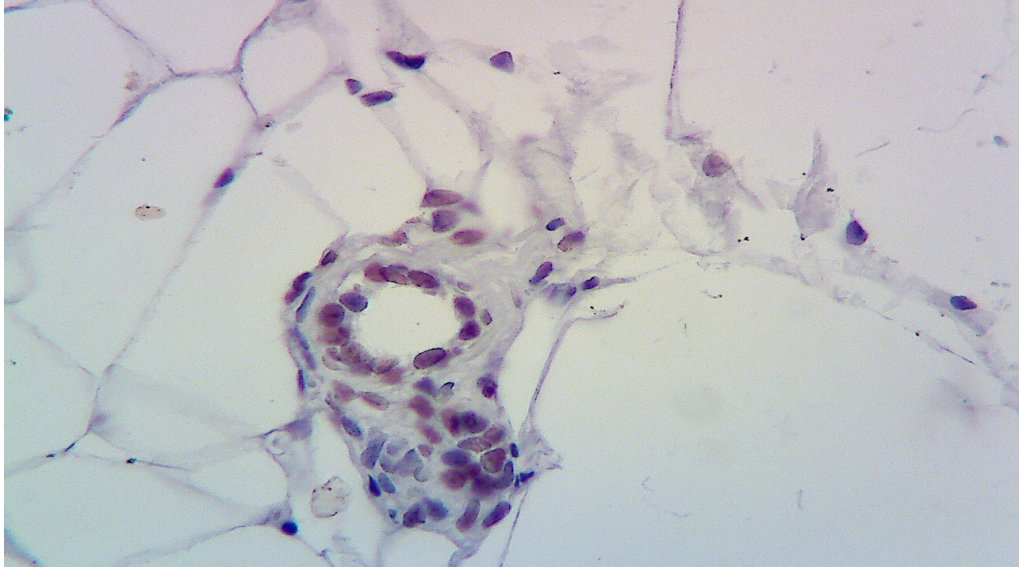
**Şekil 16.** DM grubuna ait beyin dokusunda +3 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



**Şekil 17.** DM + ALA grubuna ait beyin dokusunda +2 yaygınlığında TUNEL pozitif hücreler



**Şekil 18.** TUNEL negatif kontrol

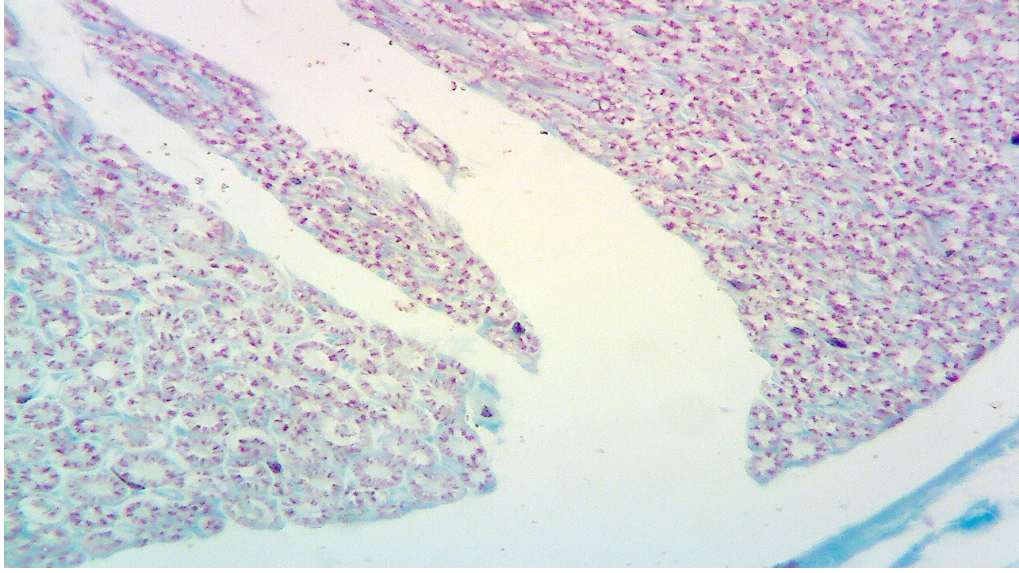


**Şekil 19.** TUNEL pozitif kontrol meme dokusu

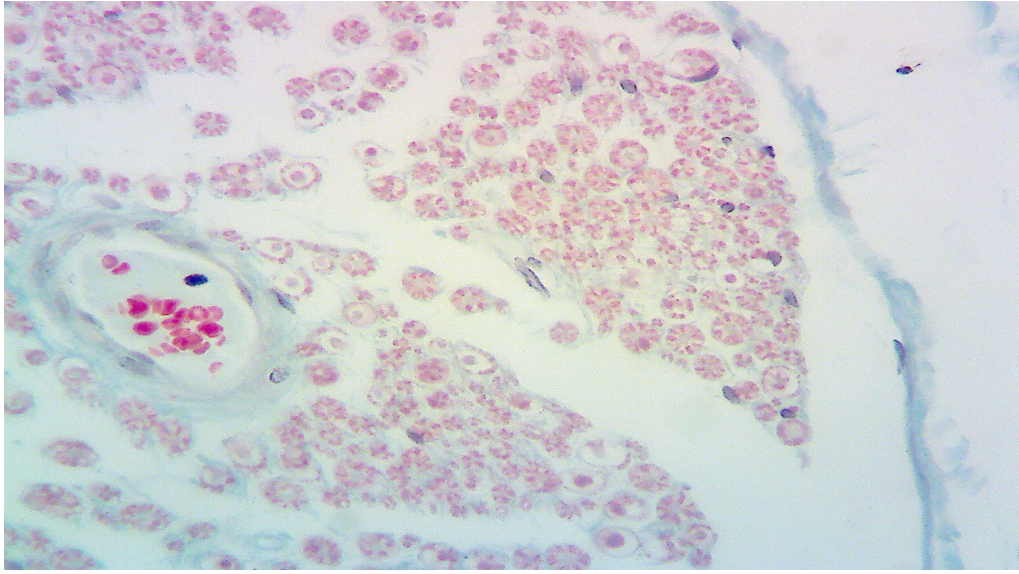
### **3.5. Siyatik Sinir Histolojik İncelemeleri**

Ratların siyatik dokularından 2 adet farklı seviyeden 2 mm kalınlığında kesitler alındı. Doku örnekleri mikrodalga ışınımı yardımıyla kimyasal fiksasyona maruz bırakıldı. Bu doku örneklerinden 2'şer adet parafin kesit alındı. Kesitlerden birine hematoksilin-eozin boyaması yapılarak fiksasyon kalitesi değerlendirildi. 2 kesit Weil'in metodu literatürde belirtildiği gibi konvansiyonel şartlarda ve mikrodalga ışınımı yardımıyla boyandı (164).

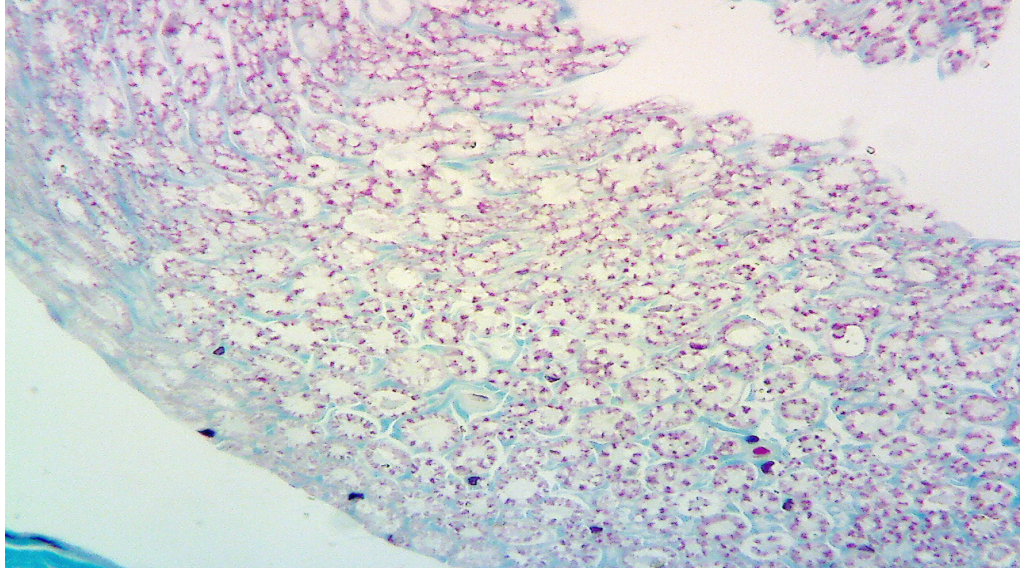
Dokuların histolojik incelemesinde kontrol grubunda miyelin kılıfta belirgin bir kayıp gözlenmedi (Şekil 20). Miyelin kaybının DM grubunda kontrol, ALA ve DM+ALA gruplarına göre daha fazla olduğu görüldü (Şekil 21). ALA grubunda kontrol grubuna göre belirgin bir farklılık gözlenmedi (Şekil 22). DM+ALA grubunda ise miyelin kaybının kontrol ve ALA gruplarına göre fazla olduğu ancak DM grubuna göre daha az yoğunlukta olduğu izlendi (Şekil 23).



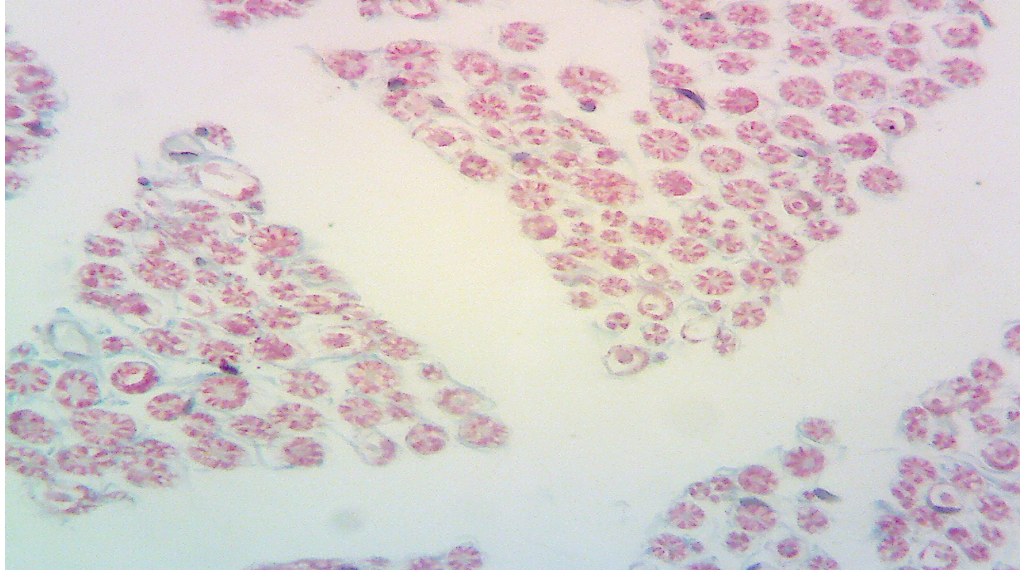
**Şekil 20.** Siyatik Sinir Kontrol Grubu



**Şekil 21.** Siyatik Sinir DM Grubu



Şekil 22. Siyatik Sinir ALA Grubu



Şekil 23. Siyatik Sinir DM+ALA Grubu

#### 4. TARTIŞMA

Diabetes melitus insülin salınımındaki ya da aktivitesindeki bozukluğa bağlı olarak gelişen hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (1). DM'nin patofizyolojisinde bozulmuş insülin salınımı ve insülin direnci rol oynar. İnsülin direncinin gelişmesinde genetik faktörler ve inflamatuvar faktörler, serbest yağ asitleri, hiperglisemi gibi çevresel faktörler etkilidir. İnsülin reseptör ve insülin reseptör substrat 1 (IRS-1) polimorfizmi, beta 3 reseptör geni ve uncoupling protein (UCP) gen mutasyonları bilinen genetik nedenlerdir (165). DM, karbonhidrat, lipit ve protein metabolizmasını da etkileyerek mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonların oluşmasına neden olur (2, 4). Hiperglisemi dört ana mekanizma ile diyabetik komplikasyonlara yol açmaktadır. Bu mekanizmalar; poliol yolunun aktivasyonu, hücre içinde AGEs oluşumunun artması, PKC aktivasyonu ve heksozamin yolunun aktivasyonudur (36). DM kronik bir hastalık olduğundan diyabetik insanlardaki uzun dönem incelmeleri çok zaman alacağı için deneysel diyabet modelleri oluşturularak çalışmak daha avantajlıdır (166).

Alfa lipoik asit; enerji üretimi ve metabolizmada yer alan mitokondriyal enzimlerde bir kofaktör olarak görev yapan, doğal olarak vücutta sentezlenebilen bir bileşiktir. ALA açıl grubu taşıyıcısı olup iki elektron taşımakla görevlidir. ketoglutarat dehidrogenaz ile PDH olarak bilinen iki multienzim kompleksi içinde yer alır (138).

Alfa lipoik asit antioksidan moleküller arasında taktır, çünkü hem redükte hem de okside formları koruyucu etkiye sahiptir. Bununla beraber ALA'nın redüksiyonu ile oluşan DHLA, ALA'dan daha çok antioksidan özelliğe sahiptir. Yalnız DHLA endojen antioksidanları rejenere eder ve oksidatif hasarı tamir ederken hem DHLA hem de ALA metal şelasyonu ve ROS'u uzaklaştırabilme yeteneğine sahiptir. ALA Fe+2 ve Cu+2 şelasyonu ile antioksidan aktivite gösterirken, DHLA Cd+2 şelasyonu da yapabilir (134). DHLA aynı zamanda tokoferolun bulunduğu mikrozomal lipid peroksidasyonuna karşı koruyucudur. Bu sistemde DHLA direkt olarak tokoperoksil radikallerini indirgeyebilir. Ultraviyole (UV) ışınına maruz kalan lipozomlarda tokoperoksil radikalının DHLA'nın varlığında indirgendiği tespit edilmiştir (167). DHLA'nın antioksidan aktivitesinin yanında prooksidan özelliği de vardır. Vitamin E ve vitamin C'ye benzer şekilde ALA'nın prooksidan aktivitesi, muhtemelen transizyon metallerin redüksiyonuna aracılık etmektedir. Diğer antioksidanlarla kombinasyonunda DHLA'nın ubisemiquinonu ubiquinale, semidehidroaskorbati askorbata ve GSSG'yi GSH'ye rejenere ettiği bilinmektedir (168). ALA aynı zamanda vitamin E'yi rejenere eden vitamin C ve glutasyonu etkileyerek membranları korur. Diyabet, iskemi-reperfüzyon hasarı, katarakt oluşumu, HIV aktivasyonu, sinir dejenerasyonu ve radyasyon hasarı gibi oksidatif stres modellerinde ALA verilmesinin yarar sağlayabileceği gösterilmiştir (141).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, DM'nin, SSS işlevlerinde çeşitli aksaklıklara sebep olduğunu ortaya koymaktadır (10). Oksidatif stres, vasküler fonksiyon bozukluğu ve AGEs birikimi gibi olaylar diyabetin serebral komplikasyonlarının patogeneğinde rol oynamaktadır (5, 6).

Diyabet ve komplikasyonlarının patogeneğinde rol oynayan artmış oksidatif stresin kaynağı olarak; kronik hiperglisemiye sekonder glukozun otooksidasyonu, sorbitol yolunun aktivitesi ve bu yolda NADPH tüketimi, proteinlerin progresif glikolizasyonu ve sonunda AGEs oluşumu, hipergliseminin yol açtığı psödohipoksi hali, PKC'nin aktivasyonu, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres gibi çeşitli mekanizmalar gösterilmiştir (169, 170).

Diyabete bağlı oluşan ekstraselüler hipertonic stresi dengelemek için hücre intraselüler sorbitol birikimini artırarak intraselüler osmolariteyi artırır. Sorbitol birikimi aldoz redüktaz aktivitesini artırır ve intraselüler miyoinositol ve taurin miktarında düşüşe sebep olur. Miyoinositol miktarında azalma intraselüler fosfoinositid sinyalizasyonuna yol açar. Taurin azalması inhibitörü olduğu PKC aktivitesinde artışa sebep olur. Aldoza redüktaz aktivitesi sonucu glukozun sorbitole dönüşümü NADPH'nin NADP'ye oksidasyonu ile glutasyon redüktaz ile gerçekleşen antioksidatif savunmayı kısıtlar. Sonuç olarak tüm bu değişiklikler süperoksid anyonu, hidroksil radikali gibi FR artırır, detoksifikasyonu azaltarak oksidatif doku hasarına sebep olur (75, 76). Yapılan çalışmalarda AGEs ve FR'nin PKC'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogeneğinde rol aldığı öne sürülmektedir (171). Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati, nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir (172).

Diyabetteki oksidatif stres aldoz redüktaz aktivitesi sonucu glukozun sorbitole dönüşmesi, glutasyon, taurin ve NADPH'nin azalması, glukoz otooksidasyonu ve SOD ile GPx aktivitesinin azalması sonucu oluşur (79). Antioksidan enzimler içerisinde SOD enziminin serbest oksijen radikallerine karşı savunmada ilk basamak olabileceği ve hücreler ya da organizmalar oksidatif strese maruz kaldığında hemen indüklenebileceği düşünülmektedir (173). Tip 1 ve tip 2 diyabetlilerde plazma SOD ve CAT aktivitelerinin önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bazı çalışmalar diyabetik hastalarla sağlıklı kişiler arasında antioksidan durum açısından önemli fark olmadığını göstermiştir (174). Kontrol grubuna göre tip 2 diyabetlilerde

SOD aktivitesinin arttığını, CAT aktivitesinin ise azaldığını iddia eden çalışmalar da vardır (175). Yaptığımız çalışmada gruplar arasında SOD analizinde ALA grubunda DM+ALA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir. Katalaz aktivitesinde ise ALA grubunda DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda artış olduğu izlenmiştir ( $p<0.05$ ).

Tip 1 ve 2 diyabetlilerde eritrosit ve plazmada GSH ve GPx aktivitelerinin azaldığı gösterilmiştir (107). Li ve ark.'nın (176) yapmış olduğu çalışmada ratlarda deneysel olarak oluşturulan diyabetik kardiyomyopati modelinde ALA verilmesiyle miyokart mitokondrilerinde md-SOD aktivitesi ve GSH seviyesinde artış ile oksidatif strese baskılanma izlenmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada beyin dokusunda bakılan GSH analizlerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Ancak GPx değerleri ALA ve DM+ALA gruplarında hem kontrol grubuna hem de DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ( $p<0.05$ ).

Pek çok çalışma diyabetik komplikasyonlar ve lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur (177).

Diyabette membranlarda bulunan yağ asitleri ve kolesterolün doymamış bağları FR reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir. İlk önce yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve lipid radikalini oluşturur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek lipid peroksid radikalini oluşturur. Lipid peroksid radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur. Ayrıca lipid peroksidler ortamdaki hidrojen atomları ile de reaksiyona girerek lipid hidroperoksidleri de oluştururlar (177). Lipid peroksidler daha sonra MDA ve 4-hidroksi nonenal gibi yıkım ürünlerine dönüşürler. Bu yıkım ürünleri de DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilir ve mutajeniktirler. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir (178). Lipid peroksidasyonun göstergesi olan hidroperoksidler her iki tip diyabette de yükselir (179). Ayrıca hiperglisemik ortamda glikozilasyona uğrayan proteinler ROS oluşumuna neden olmaktadır (50).

Wang ve ark.'nın (180) yapmış olduğu çalışmada ALA tedavisi alan diyabetik ratların renal hücrelerinde azalmış MDA içeriği ve artmış SOD aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca mitokondrial membran potansiyel bozukluğunun ve  $Ca^{+2}$ 'nin indüklediği mitokondrial şişmenin azaldığı tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada MDA değerlerinin DM grubunda kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda arttığı ( $p<0.05$ ), ALA grubunda ise kontrole göre anlamlı fark oluşmadığı fakat DM ve DM+ALA grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). DM+ALA grubunda DM grubuna göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda azalma olduğu ( $p<0.05$ ) gözlenmiştir.

Sundaram ve ark.'nın (181) yapmış olduğu ve çok sayıda hastanın değerlendirilmesi açısından önemli olan, 467 tip 2 diyabet hastanın dahil olduğu bir çalışmada, hasta plazma ve eritrosit lipid peroksidasyonlarının anlamlı olarak yükseldiği bulunmuştur. Giardino ve ark. (182) hücre içi AGEs oluşumu ile lipid peroksidasyonu arasında sıkı bir ilişki olduğunu, lipid peroksidasyonunun önlenmesi ile AGEs oluşumunun da önlenildiğini bildirmişlerdir.

Yapmış olduğumuz çalışma; ALA'nın MDA seviyesini azaltıp, CAT, GPx ve SOD seviyelerini arttırarak oksidatif stresin sebep olduğu hasarı engellediğini düşündürmektedir

Apoptozis döngüsü işlevini iki esas mekanizma ile görür. Birincisi "caspase" yolu, ikincisi ise mitokondri disfonksiyonu ile tanımlanan organel disfonksiyonu yoludur. Bcl-2 ailesi ve üyeleri, mitokondri düzeyinde işlev gören ve apoptoziste çok önemli rol oynayan moleküllerdendir (120). Kaspazlar, apoptoziste hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan enzimler olarak bilinirler. Apaf-1'in indüksiyonu, mitokondriden sitokrom c salınmasıyla gerçekleşir. Apaf-1'in oligomerizasyonu, kaspaz-9 monomerlerinin biraraya gelmesini sağlar. Böylece aktifleşen kaspaz-9, kaspaz-3'ü aktifleştirir. Ayrıca mitokondriden salınan AIF bazı inükleazları aktifleştirerek DNA degradasyonuna neden olurlar (121).

Tip 1 diyabetik hayvanlarda neokorteks, hipokampus, arkuat ve ventromediyal çekirdek ve prefrontal korteks nöronlarının yoğunluğunda belirgin bir

azalma oluştuğu belirtilmiştir (45, 46). Deneysel diyabet oluşturulan hayvanlarda beyin ve medulla spinaliste nörönel atrofi, subkortikal alanda ve beyin sapında lezyonlar, aksonal dejenerasyon, glikojen birikimi, ensefalomalazi, demiyelinizasyon, glial hücrelerde hasar oluşumu gibi değişiklikler oluştuğu bildirilmiştir (41-44). İn vivo ve in vitro çalışmalar, söz konusu nörönel kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığını göstermektedir. Tip 1 DM’de nörönel yoğunluğu azalmasının DM’ nin süresi ile ilgili olduğu bildirilmiştir (46).

Artmış ROS, Kaspaz-3 aktivitesini arttırarak ve Bcl-2 gen ekspresyonunu azaltarak apoptozis mekanizmasında görev alır (183).

Sun ve ark.’nın (184) yapmış olduğu çalışmada aralıklı yüksek glukoz ve sürekli yüksek glukoz maruz kalan Schwann hücrelerinde apoptozis geliştiği ve ALA tedavisiyle Bax ekspresyonu, sitokrom-c ve AIF translokasyonunda azalma olurken Bcl-2 ekspresyonunda artış olduğu izlendi. ALA tedavisi alan grupta Schwann hücrelerinde azalmış Kaspaz 3 ve Kaspaz 9 aktivitesi ve PARP (poly ADP ribose polymerase) bölünmesinde azalma izlenmiştir. Bu bulgular ALA’nın Schwann hücrelerindeki apoptozisi oksidatif hasarı azaltarak ve mitokondrial yolu inhibe ederek azalttığını göstermiştir.

Li ve ark.’nın (185) yapmış olduğu çalışmada 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), ve nörotoksik metaboliti olan 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) nin PC12 nöröneları denilen dopaminerjik nöröneları tahrip ederek insanlarda ve kobaylarda Parkinson hastalığı benzeri semptomlar oluşturduğu ve ilk 1 saatte ALA verildiğinde ALA’nın mitokondrial membran geçirgenliğini ve intraselüler ROS seviyesini azaltarak apoptozisi önlediği tespit edilmiştir.

Yaptığımız çalışmada, farelerin beyin korteksinde yapılan TUNEL, Bax ve Kaspaz-3 immünohistokimyasal incelemelerinin sonucunda; DM grubunda apoptotik hücre sayısında kontrol grubuna göre belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. ALA+DM grubunda DM grubuna göre anlamlı bir azalma olduğu görölmüştür. ALA grubunda ise kontrol grubuna benzer şekilde bulgular elde edilmiştir.

Diabetes Mellituslu hastaların yaklaşık olarak % 50’sinde diyabetik nöropati gelişir. Metabolik ve iskemik faktörlerin beraber etkileşimi ile nöropati geliştiği düşünölmektedir. Hiperglisemi metabolik yolların kullanımını arttırır. Bu yollardan biri proteinlerin non-enzimatik yolla glikolizasyonudur. Oluşan bileşikler hücre içinde ve yapısal proteinlerde kalıcı fonksiyonel hasara neden olur. Bu yolla glikolizasyona uğrayan proteinlere AGEs adı verilir. Glikolize proteinlerin damar duvarında birikimi sonucu nitöz oksit aktivitesinde azalma oluşur (186). Hiperglisemi durumunda glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATPaz enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem taşımaktadır (187). Hiperglisemi vasküler direnci arttırarak endonörönel hipoksiye neden olur. Hipoksi Na-K ATPaz aktivitesini azaltıp aksonal iletimi bozarak sinir ileti hızında yavaşlamaya neden olur (188).

Reaktif oksijen türevleri ve oksidatif stres, nörotrofik desteği direkt veya indirekt yolla bozarlar. FR endoteliumda birikerek nitöz oksit inhibisyonuna ve Schwann hücrelerinde apoptozise aracılık ederek periferik sinir lifi kaybına neden olur. Oksidatif stres, glukozun aldoz redüktaz ile sorbitol oluşumunu hızlandırıp, SOD, GPx eksikliğine yol açar. Hiperglisemide aldoz redüktaz enzim aktivitesinin artması ile GPx eksikliği meydana gelir ve sonuç olarak FR oluşumu artar (186).

Frøkjær ve ark.’nın (189) yapmış olduğu çalışmada uzun süredir tip 1 DM’li olan hastaların korteksinde sensoriyel alanlarda incleme olduğu tespit edilmiş ve bu incelmanın diyabetiklerdeki periferik nöropatinin altta yatan sebeplerinden olabileceği düşünölmüştür.

Araştırmacılar ALA’nın nöropatiyi geri döndürebildiğini, glukoz kullanımına yardımcı olduğunu bulmuşlardır (141). Bununla beraber ALA’nın sinir hücrelerindeki FR hasarını önlediği düşünölmektedir (143). Almanya’da yürütölen çift kör, plasebo kontrollü, randomize, çok merkezli bir çalışmada 63 tane periferik nöropatili Tip 2 diyabet hastasının % 85’inde intravenöz günlük 600 mg lipoik asit verildikten 3 hafta sonra semptomlarda belirgin azalma olduğu görölmüştür. ALA’nın gastrointestinal sistemde iyi absorbe edildiği göz önünde tutulursa oral dozda da benzer sonuçlar bekleneceği öngörölmüştür (143). Bir Mayo kuruluşunun

çalışmasında ALA verilen hastaların bir ay sonra kan dolaşımının normalleştiği, aynı zaman da sinir iletiminin geliştirdiği bulunmuştur (141).

Yaptığımız çalışmada, ALA'nın deneysel olarak diyabet oluşturulan ratların siyatik sinirleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Histolojik incelemeler sonucunda diyabet oluşturulan ratların siyatik sinirlerinde miyelin kılıf kaybı izlenmiş olup tedavi verilen gruplarda miyelin kaybının daha az olduğu gözlenmiştir. Bu durum ALA'nın DM'nin oluşturduğu periferik sinir hasarı üzerine koruyucu etkisi olduğunu düşündürmüştür.

Sonuç olarak ALA'nın hem santral hem de periferik sinir sistemi hücrelerinde oksidatif stresi azaltmak suretiyle apoptozisi ve oksidatif hasarı engelleyerek nöroprotektif etki oluşturduğu düşünülebilir. Ancak bu bulguların yapılacak yeni çalışmalarla desteklenmesi gereklidir.

## 5. KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care 2006; 29: 43.

2. Hasselbank DM, Glatz JFC, Luiken JJFP, Roemen THM, Vusse GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. Biochem J 2003; 371: 753-760.

3. Yedigün M. Diabetes Mellitus. İstanbul: Haseki Hastanesi Vakfı, 1993: 3-45.

4. Foster DW. Diabetes mellitus. Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, et al (editors). Harrison's Principle of Internal Medicine. 14. Baskı, New York: Mc Graw Hill Companies, 1998; 2: 2060-2080.

5. Biessels GJ. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms. The Neth J Med 1999; 54: 35-45.

6. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neurosci 2000; 23: 542-549.

7. Biewenga GP, Haenen GI, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. Gen Pharmacol 1997; 29: 315-331.

8. Laakso M. Cardiovascular disease in type 2 diabetes challenge for treatment and prevention. J Intern Med 2001; 249: 225- 235.

**9.** Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 237-243.

**10.** Kovacs M, Goldston D, Obrosky DS, Bonar LK. Psychiatric disorders in youths with IDDM: rates and risk factors. Diabetes Care 1997; 20 (1): 36- 44.

**11.** Özata M, Yörem A. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006: 275-427.

**12.** Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 51-62.

**13.** King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. Diabetes Care 1993; 16: 157-177.

**14.** King H, Aubert RF, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431.

**15.** McKinlay JB, Marceau LD. A tale of 3 tails. Am J Public Health 1999; 89: 295-298.

**16.** 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.

**17.** American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2012; 35: 11-12.

**18.** Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu. Diabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu. 6. Baskı, Ankara. BAYT Yayıncılık. 2013

**19.** McCrimmon RJ, Ryan CM, Frier BM. Diabetes and cognitive dysfunction. Lancet 2012; 379: [2291-2299](#).

**20.** Sacks DB. Carbohydrates. Burtis CA, Ashwood ER (editors). Tietz Textbook of Clinical Chemistry. 2. Baskı, Philadelphia: Saunders, 1994: [928-1001](#).

**21.** American Diabetes Association. Insulin administration. Diabetes Care 2004; 22: 94-102.

**22.** Balasa B, Gunst KV, Jung N, Balakrishna D, Santamaria P, Hanafusa T, et al. 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](#).

**23.** Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C, Halbwachs-Mecarelli L, Bach JF, Chatenoud L, et al. Long-term reversal of established autoimmunity

upon transient blockade of the LFA-1/intercellüler adhesion molecule-1 pathway. J Immunol 2002; 168: [3641-3648](#).

**24.** Binder C, Brange J. Insulin chemistry and pharmacokinetics. 5. Baskı, Porte D. Sherwin RS (editors). Ellenberg & Rifkin's Diabetes Mellitus. Stamford: Appleton & Lange, 1997: 689-708.

**25.** 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.

**26.** Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA, et al. The role of fas in autoimmune diabetes. Cell 1997; 89: 17-24.

**27.** Yılmaz MT. Tip 1 diyabetin otoimmün patogenezi. Aktüel Tıp Dergisi 1996: 7: 512-516.

**28.** Isselbacher DL, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS. (editors). Harrison's Principles of Internal Medicine. 13. Baskı, New York: Mc Graw-Hill Inc, 1994: 678.

**29.** Ayalp P. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Kendi Kendine Kan Glukozu Ölçüm Sıklığı ile Hemoglobın A1c Arasındaki İlişki. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Aile Hekimliği Bölümü, 2008.

**30.** [Kaminitz A](#), [Yolcu ES](#), [Stein J](#), [Yaniv I](#), [Shirwan H](#), [Askenasy N](#). Killer Treg restore immune homeostasis and suppress autoimmune diabetes in prediabetic NOD mice. [J Autoimmun](#) 2011; 37: 39-47.

**31.** Greene DA. Acute and chronic complications of diabetes mellitus in older patients. Am J Med 1986; 80: 39-52.

**32.** Porte D, Hadler JB. The Endocrine pancreas and diabetes mellitus. Williams RH (editor). Textbook of Endocrinology. Philadelphia: WB Saunders Co, 1981: 716-783.

**33.** Tanyeri F. Diabetes Mellitusun sınıflandırılması ve Prevalansı. Aktüel Tıp Dergisi, 1996: 7: 500-503.

**34.** Pickup JC, Williams, G. Textbook of diabetes. 2. Baskı, Cambridge: Blackwell Science DLD, 1997; 1: 45-98.

**35.** Gündoğdu S, Açbay Ö. Tip 2 diyabetin evreleri ve takip kriterleri. Aktüel Tıp Dergisi 1996: 8: 557-559.

**36.** Gedik O. Diabetes mellitus'un komplikasyonları. Erdoğan G (editör). Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005: 367-383.

**37.** Brands AM, Kessels RP, Haan EH, Kappelle LJ, Biessels GJ. Cerebral dysfunction in type 1 diabetes: effects of insulin, vascular risk

factors and blood-glucose levels. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 159-168.

**38.** Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologica* 1994; 37: 643-650.

**39.** Biessels GJ. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms. *The Neth J Med* 1999; 54: 35-45.

**40.** Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 2000; 23: 542-549.

**41.** Araki, Y, Nomura M, Tanaka H, Yamamoto H, Yamamoto T, Tsukaguchi I, Nakamura H. MRI of the brain in diabetes mellitus. *Neuroradiology* 1994; 36: 101-103.

**42.** Bestetti G, Rossi GL. Hypothalamic lesions in rats with long-term streptozotocin-induced diabetes mellitus: A semiquantitative light- and electronmicroscopic study. *Acta Neuropathol* 1980; 52: 119-127.

**43.** Fernyhough P, Gallagher A, Averill SA, Priestley JV, Hounsom L, Patel J, Tomlinson DR. Aberrant neurofilament phosphorylation in sensory neurons of rats with diabetic neuropathy. *Diabetes* 1999; 48: 881-889.

**44.** Reagan LP, Magarinos AM, McEwen BS. Neurological changes induced by stress in streptozotocin diabetic rats. *Ann NY Acad Sci* 1999; 893: 126-137.

**45.** Jakobsen J, Sidenius P, Gundersen HJ, Osterby R. Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1987; 36: 597-601.

**46.** Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AAF. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res* 2002; 946: 221-231.

**47.** Li ZG, Zhang W, Sima AAF. C-peptide enhances insulin-mediated cell growth and protection against high glucose-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Diabetes Metab Res Rev* 2003; 19: 375-385.

**48.** Bertrand F, Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Prunier C, Robin H, Capeau J, et al. Insulin antiapoptotic signaling involves insulin activation of the nuclear factor kappa B-dependent survival genes encoding tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 and manganese-superoxide dismutase. *J Biol Chem* 1999; 274: [30596-30602](#).

**49.** Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992; 15: 1835-1843.

**50.** Lipinski B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *J Diabetes Complicat* 2001; 15: 203-209.

- 51.** Kumar JS, Menon VP. Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism* 1993; 42: 1435-1439.
- 52.** Bitar M, Koulu M, Rapoport SI, Linnoila M. Diabetes induced alteration in brain monoamine metabolism in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 432-437.
- 53.** Barber M, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, MohanKumar SM, MohanKumar PS. Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Res* 2003; 964: 128-135.
- 54.** Lackovic Z, Salkovic M, Kuci Z, Relja M. Effect of long lasting diabetes mellitus on rat and human brain monoamines. *J Neurochem* 1990; 54: 143-147.
- 55.** Ohtani N, Ohta M, Sugano T. Microdialysis study of modification of hypothalamic neurotransmitters in streptozotocin-diabetic rats. *J Neurochem* 1997; 69: 1622-1628.
- 56.** Bean L, Zheng H, Patel KP, Monaghan DT. Regional variations in NMDA receptor downregulation in streptozotocin-diabetic rat brain. *Brain Res* 2006; 1115: 217-222.
- 57.** Gallego M, Setien R, Izquierdo MJ, Casis O, Casis E. Diabetes-induced biochemical changes in central and peripheral catecholaminergic systems. *Physiol Res* 2003; 52: 735-741.
- 58.** Keymeulen B, Jacobs A, De Metz K, De Sadeleer C, Bossuyt A, Somers G. Regional cerebral hypoperfusion in long-term type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relation to hypoglycemic events. *Nucl Med Commun* 1995; 16: 10-16.
- 59.** Rubini R, Biasiolo F, Fogarolo F, Magnavita V, Martini A, Fiori MG. Brainstem auditory evoked potentials in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 1992; 16: 19-25.
- 60.** Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1987; 316: 599-606.
- 61.** Altan N, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turk J Biochem* 2006; 31: 51-56.
- 62.** Comi G. Evoked potentials in diabetes mellitus. *Clin Neurosci* 1997; 4: 374-379.
- 63.** McCarthy AM, Lindgren S, Mengeling MA, Tsalikian E, Engvall JC. Effects of diabetes on learning in children. *Pediatrics* 2002; 109: 9.
- 64.** Clark CM, Lee DA. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995; 332: 1210-1217.

**65.** Benbow SJ, Chan AW, Bowsher D, MacFarlane IA, Williams G. A prospective study of painful symptoms, small-fibre function and peripheral vascular disease in chronic painful diabetic neuropathy. *Diabet Med* 1994; 11: 17–21.

**66.** Marchettini P, Teloni L, Formaglio F, Lacerenza M. Pain in diabetic neuropathy case study: whole patient management. *Eur J Neurol* 2004; 11 (Suppl.1):12-21.

**67.** Bellush LL, Rowland NE, North D. Stress and behavior in streptozotocin diabetic rats: biochemical correlates of passive avoidance learning. *Behav Neurosci* 1989; 103: 144-150.

**68.** Biessels GJ, Kamal A, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, Gispen WH. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocindabetic rats: effects of insulin treatment. *Brain Res* 1998; 800: 125-135.

**69.** Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, Morris RG. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. *Nature* 1995; 378: 182-186.

**70.** Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. *Eur J Pharmacol* 2004; 490: 187-197.

**71.** Ahmad Q, Merali Z. The spontaneously diabetic Wistar BB rat manifests altered grooming and catalepsy responses: implication of impaired dopamine function. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1988; 12: 291-298.

**72.** Gomez R, Vargas CR, Wajner M, Barros HM. Lower in vivo brain extracellular GABA concentration in diabetic rats during forced swimming. *Brain Res* 2003; 968: 281-284.

**73.** Miyata S, Hirano S, Kamei J. Abnormal benzodiazepine receptor function in the depressive-like behavior of diabetic mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2005; 82: 615-620.

**74.** Mooradian AD. Diabetic complications of the central nervous system. *Endocrinol Rev* 1988; 9: 346-356.

**75.** Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 2004; 25: 612.

**76.** Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005; 54: 1615.

**77.** Ramasamy R, Vannucci SJ, Yan SS, Schmidt AM. Advanced glycations end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration and inflammation. *Glycobiology* 2005; 15: 16-28.

**78.** Hudson BI, Schmidt AM. RAGE a

novel target for drug intervention in diabetic vascular disease. *Pharm Res* 2004; 21: 1079-1086.

**79.** Greene DA, Obrosova I, Stevens MJ, Feldman EL. Pathways of glucose-mediated oxidative stress in diabetic neuropathy. Packer L, Rosen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A (editors). *Antioxidants in Diabetes Management*. New York: Marcel Dekker, 2000: 111.

**80.** Baliga BS, Weinberger J. Diabetes and stroke. Risk factors pathophysiology. *Curr Cardiol Rep* 2006; 8: 23-28.

**81.** Lernfelt B, Forsberg M, Blomstrand C, Mellström D, Volkmann R. Cerebral atherosclerosis as predictor of stroke and mortality in representative elderly population. *Stroke* 2002; 33: 224.

**82.** Abbott RD, Donahue RP, MacMahon SW, Reed DM, Yano K. Diabetes and the risk of stroke. The Honolulu Heart Program. *JAMA* 1987; 257: 949-952.

**83.** Idris I, Thomson GA, Sharma JC. Diabetes mellitus and stroke. *Int J Clinpract* 2006; 60: 48-56.

**84.** Corsonello A, Pedone C, Corica F, [Mazzei B](#), [Mari V](#), [Incalzi RA](#). Estimating glomerular filtration rate might help to avoid hypoglycemia. *J Am Geriatr Soc* 2006; 54: 1469-1470.

**85.** Malouf R, Brust JC. Hypoglycemia: causes, neurological manifestations, and outcome. *Ann Neurol* 1985; 17: 421-430.

**86.** Pazevic JP, Hambrick RL, Roskam SA. Hypoglycemic hemiplegia. *J Am Osteopath Assoc* 1990; 90: 539-541.

**87.** Auer RN. Hypoglycemic brain damage. *Metab Brain Dis* 2004; 19: 169-175.

**88.** Gedik O. Diabetes Mellitus Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu Kitabı. Ankara: Hacettepe Yayın Birliği, 1997: 7.

**89.** 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.

**90.** Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgilli F, Pallauf J, et al. Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr* 1999; 52: 203-222.

**91.** Malm C. Exercise-induced muscle damage and inflammation: fact or fiction. *Acta Physiol Scand* 2001; 171: 233- 239.

**92.** Jenkins RR. Free radical chemistry: Relationship to exercise. *Sports Med* 1988; 5: 156-170.

**93.** Coombes JS, Powers SK, Rowell B,

Hamilton KL, Dodd SL, Shanely RA, et al. Effects of vitamin E and alpha-lipoic acid on skeletal muscle contractile properties. *J Appl Physiol* 2001; 90: 1424-1430.

**94.** Golden TR, Hinerfeld DA, Melov S. Oxidative stress and aging: Beyond correlation. *Aging Cell* 2002; 1: 117-123.

**95.** Young IS, McEneaney J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans* 2001; 29: 358-362.

**96.** Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 1983; 24: 1070-1076.

**97.** Tavazzi B, Di Pierro P, Amorini AM, Fazzina G, Tuttobene M, Giardina B, et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem* 2000; 267: 684-689.

**98.** Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003; 189: 41-54.

**99.** Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 790-796.

**100.** Bloomer RJ, Goldfarb AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: A review. *Can J Appl Physiol* 2004; 29: 245-263.

**101.** Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1-14.

**102.** Fehrenbach E, Northoff H. Free radical, exercise, apoptosis, and heat shock proteins. *Exerc Immunol Rev* 2001; 7: 66-89.

**103.** Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicol* 2003; 189: 41-54.

**104.** Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative stress profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1055: 136-158.

**105.** Halliwell B, Gutteridge JMC (editors). Oxidative stress, in *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3. Baski, New York: Oxford University Press, 1999: 246-350.

**106.** Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.

**107.** Memişoğulları R, Taysi S, Bakan E, Capoğlu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. *Cell Biochem Funct* 2003; 21: 291-296.

**108.** 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.

**109.** Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.

**110.** Davidoff AJ, Rodgers RL. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1990; 15: 633-642.

**111.** Reagan LP, Yee DK, Swzeda LI. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Res* 2000; 862: 292-300.

**112.** 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.

**113.** Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5: 110-115.

**114.** Reme CE, Grimm C, Hafezi F, Marti A, Wenzel A. Apoptotic Cell Death in Retinal Degenerations. *Prog Ret Eye Res* 1998; 17: 443-464.

**115.** Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-23.

**116.** Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.

**117.** Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-107.

**118.** Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-1462.

**119.** Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.

**120.** Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 485-495.

**121.** Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck* 2001; 23: 409-25.

**122.** Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 2000; 10: 649-655.

**123.** 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](#).

**124.** Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*

2000; 1: 120-129.

**125.** Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.

**126.** Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology* 1994; 12: 487-493.

**127.** Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2003: 15-26.

**128.** Snell EE, Strong FM, Peterson WH. Growth factors for bacteria. *Biochem J* 1937; 31: 1789-1799.

**129.** Reed LJ, Busk BG, Gunsalus IC, Schnakenberg GHF. Crystalline a lipoic-acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1950; 114: 93.

**130.** Bullock MW, Brockmann JA, Patterson EL, Pierce JV, Macchi ME. Proposed structures for protogen-A and protogen-B. *J Am Chem Soc* 1954; 76: 1827-1828.

**131.** Morris TW, Reed KE, Cronan JE. Lipoic acid metabolism in *Escherichia coli*: the *lpIA* and *libB* genes define redundant pathways for ligation of lipoyl groups to apoprotein. *J Bacteriol* 1995; 177: 1-10.

**132.** Cadenas E. Handbook of antioxidants. 2. Baskı, New York: Marcel Dekker Inc, 2001; 23: 473.

**133.** Gözükara EM. *Biyokimya*. Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları, 1989: 55, 56, 705, 845-848.

**134.** Biewenga G, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *Gen Pharmac* 1997; 29: 315-331.

**135.** Yasuno R, Wada H. The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 2002; 517: 110-114.

**136.** Perham RN. Domains, motifs and linkers in 2-oxo-acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* 1991; 30: [8501-8512](#).

**137.** Peinado J, Sies H, Akerboom TP. Hepatic lipoate uptake. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273: 389-395.

**138.** Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of  $\alpha$ -lipoic acid (ALA). *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 46: 29-41.

**139.** Kramer K. *Nutritional Health and Disease Prevention*. New York: Marcel Dekker Inc, 2001; 8: 113.

**140.** Ersoy E, Baysu N. *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Yayınları, 1986: 454.

**141.** Wolz P, Krieglstain J. Neuroprotective effects of alpha- lipoic and its enantiomers demonstrated in rodent models of focal cerebral ischemia. *Neuropharmacology* 1996; 35: 369-375.

**142.** Packer L, Witt E, Tritschler HJ. - Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 227- 250.

**143.** Haenen GRMM, Bast A. Protection against lipid peroxidation by a microsomal glutathione-dependent labile factor. *FEBS Lett* 1983; 159: 24-28.

**144.** Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Augustin HJ, Diatze GJ. Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996; 104: 284–288.

**145.** Kazancıgil A, Gedikoglu G, Bayraktar K. *Klinik Bilimler İstanbul: Deva Holding*, 1996: 1551- 1552.

**146.** Maitro J, Serbinova E, Tritschler H, Packer L. Alpha lipoic acid prevents buthionine sülfoximineinduced cataract formation in newborn rats. *Free Rad Biol Med* 1995; 18: 823-829.

**147.** Perez YS, Legleu CC, Cuellar CG, Carreon JP, Garcia SH, Neyoy MS, et al. Oxidative stres in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of Preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogenesis. *Cancer letters* 2005; 217: 25-32.

**148.** Shih JCH. Atherosclerosis in Japanese quail and the effect of lipoic acid. *Fed Proc* 1983; 42: [2494-2497](#).

**149.** Berkow R (editor). *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy*. New Jersey: Merck&Co Inc. Rahway, 1982: 1024-1026 .

**150.** Fuchs J, Schofer H, Milbradt R. Studies on lipoate effects on blood redox state in human immunodeficiency virus infected patients. *Arzneim-Forsch* 1993; 43: 1359-1362.

**151.** Shenaq SM, Kim JYS. Repair and grafting of peripheral nevre. Mathes SJ (editor). *Plastic surgery*. 2. Baskı, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006: 719–743.

**152.** Lundborg G. Nerve regeneration and repair: A review. *Acta Orthop Scand* 1987; 58: 145–169.

**153.** Terzis JK, Smith KL. Repair and grafting of the peripheral nevre. McCarthy JG, May JW, Litter WJ (editors). *Plastic surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1990: 630–97.

**154.** Taner D. *Fonksiyonel Nöroanatomi*. 1. Baskı, Ankara: ODTÜ geliştirme vakfı yayıncılık ve iletişim AŞ, 1998: 33-126.

**155.** Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi, 2001: 224-260.

**156.** Çınar Ö. Ratlarda Oluşturulan Siyatik Sinir Travma Modelinde Ketorolak Trometamin'in Etkileri. Uzmanlık Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, 2008.

**157.** Matkovics B, Szabo I, Varga IS. Determination of enzyme activities in lipid Peroxidation and Glutathione Pathways (in Hungarian). Lab Diag 1988; 15: 248-249.

**158.** Placer ZA, Cushmann LL, Johnson BC. Estimation of Products of lipid peroxidation in biochemical systems. Anal Biochem 1966; 16: 359-364.

**159.** Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. Clin Chem 1988; 34: 497- 500.

**160.** Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. Bioch Bioph Res Com 1976; 71: 952-958.

**161.** Aabi H. Catalase in vitro. Methods Enzymology 1984; 105: 121-126.

**162.** Sedlak J, Lindsay RHC. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. Anal Biochem 1968; 25: 192-205.

**163.** Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.

**164.** Lowe J. Techniques in Neuropathology. Bancroft JD, Stevens A (editors). Theory and Practise of Histological Techniques. 4. Baskı, Edinburg: Churchill Livingstone, 1996: 341-81.

**165.** Kaku K. Pathophysiology of type 2 diabetes and its treatment policy. JMAJ 2010; 53: 41-46.

**166.** Öztürk Y, Altan VM, Yıldızoğlu Arı N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. Pharmacol Rev 1996; 48: 69-112.

**167.** Ou P, Tritschler HJ, Wolff SP. Thioctic (lipoic) acid: a therapeutic metal-chelating antioxidant. Biochem Pharmacol 1995; 50: 123-126.

**168.** Bast A, Haenen GRMM. The toxicity of antioxidants and their metabolites. Environ Toxicol Pharmacol 2002; 11: 251-258.

**169.** Memisogullarları R, Taysı S, Bakan E, Capaoglu I. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus. Cell Biochem Funct 2003; 21: 91.

**170.** Lee AY, Chung SS. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. FASEB J 1999; 13: 23-30.

**171.** Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47: 859-866.

**172.** Bukan N, Sancak B, Bilgihan A, Kosova F, Buğdaycı G, Altan N. The effects of the sulfonyleurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods Find Exp and Clinl Pharmacol* 2004; 26: 519-22.

**173.** Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J. Importance of Se-GPx, Catalase, Cu-Zn SOD for cell survival against oxidative stres. *Free Radic Biol Med* 1994; 17: 235-48.

**174.** Willems D, Dorchy H, Dufrasne D. Serum antioxidant status and oxidized LDL in well-cotrolled young type 1 diabetic patients with and without subclinical comp lications. *Atherosclerosis* 1998; 137: 61-64.

**175.** Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Büyükberber S, Savli H, et al. Plasma lipid prooxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2002; 39: 117-122.

**176.** [Li CJ](#), [Zhang QM](#), [Li MZ](#), [Zhang JY](#), [Yu P](#), [Yu DM](#). Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. *Chin Med J* 2009; 122: [2580-2586](#).

**177.** Şekeroğlu MR, Şahin H, Dülger H, Algün E. The effect of dietary treatment on erythrocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and serum lipid peroxidation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2000; 33: 669-674.

**178.** Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001; 54: 176-186.

**179.** Santini SA, Marra G, Giardina B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997; 46: 1853-1858.

**180.** [Wang L](#), [Wu CG](#), [Fang CQ](#), [Gao J](#), [Liu YZ](#), [Chen Y](#), et al. The protective effect of  $\alpha$ -lipoic acid on mitochondria in the kidney of diabetic rats. *Int J Clin Exp Med* 2013; 6: 90-97.

**181.** Sundaram RK, Bhaskar A, Vijayalingam S, Viswanathan M, Mohan R, Shanmugasundaram KR. Antioxidant status and lipid peroxidation in type II diabetes mellitus with and without complications. *Clin Sci* 1996; 90: 255-60.

**182.** Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Amino guanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998; 47: 1114-1120.

**183.** Takahashi A, Masuda A, Sun M, Centonze VE, Herman B. Oxidative stress-induced apoptosis is associated with alterations in mitochondrial caspase activity and Bcl-2-dependent alterations in mitochondrial pH (pH<sub>m</sub>). Brain Res Bull 2004; 62: 497-504.

**184.** [Sun LQ](#), [Chen YY](#), [Wang X](#), [Li XJ](#), [Xue B](#), [Qu L](#), et al. The protective effect of alpha lipoic acid on Schwann cells exposed to constant or intermittent high glucose. Biochem Pharmacol 2012; 84: 961-973.

**185.** [Li DW](#), [Li GR](#), [Lu Y](#), [Liu ZQ](#), [Chang M](#), [Yao M](#), et al.  $\alpha$ -lipoic acid protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup> induced apoptosis by attenuating reactive oxygen species formation. Int J Mol Med 2013; 32: 108-114.

**186.** Sima A, Pierson C. Pathogenesis and Pathology of Diabetic Neuropathy. Gries A, Cameron N (editors). Textbook of Diabetic Neuropathy. Diabetic Neuropathy. Stuttgart-NewYork: Thieme, 2003: 97-114.

**187.** Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF. Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. N Engl J Med 1987; 316: 599-606.

**188.** Kilo S, Berghoff M, Hilz M. Endothelial control of the microcirculation in diabetic peripheral neuropathy. Neurology 2000; 54: 1246-1248.

**189.** [Frøkjær JB](#), [Brock C](#), [Søfteland E](#), [Dimcevski G](#), [Gregersen H](#), [Simrén MM](#), [Drewes A](#). Macrostructural brain changes in patients with longstanding type 1 diabetes mellitus - a cortical thickness analysis study. Exp Clin Endocrinol Diabetes 2013; 121: 354-360.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlk Orta ve Lise öğrenimimi Elazığ merkezde tamamladım. 2003 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne başladım ve 2009 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak İstanbul'un Bağcılar İlçesinde 3 ay görev yaptıktan sonra 2009 yılında Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım.

