

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**MATERNAL DÖNEMDE OLUŞTURULAN DENEYSEL DİYABETİN
FETAL RAT GELİŞİMİ VE YAVRULARIN BİLİŞSEL
FONKSİYONLARINA ETKİSİ**

**Dr. NUSRET SIRMA
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. RAMİS ÇOLAK**

**2008
ELAZIĞ**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ömer Lütfi ERHAN _____

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU _____

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden

Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Ramis ÇOLAK _____

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

..... _____

Bu tez Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) yönetim birimi başkanlığı tarafından 1135 numaralı proje ile desteklenmiştir

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim s¼recinde benden yardım ve desteklerini esirgemeyen İç Hastalıkları Anabilim Dalı Böl¼m Başkanı Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOğLU, tezimin hazırlanması esnasında yardım ve desteklerini esirgemeyen Endokrinoloji Bilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ramis ÇOLAK, Doç. Dr. Yusuf ÖZKAN, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gıyaseddin BAYDAŞ ve araştırma görevlisi Dr. Sema KÖZ, Fen Edebiyat Fak¼ltesi Biyoloji Böl¼m¼ öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet Tuzcu, İç Hastalıkları Anabilim Dalında görev yapan tüm değerli hocalarıma, asistan arkadaşlarıma, eşime, oğlum M. Taha ve kızım Elif'e teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa no
TEŞEKKÜR	iv
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
KISALTMALAR	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	3
3.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı	5
3.2. Klinik Evreler	6
3.3. Etyolojik Tipler	7
3.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus	8
3.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus	9
3.3.3. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri	10
3.3.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus	13
3.4. Bozulmuş Glukoz Toleransı	15
3.5. Bozulmuş Açlık Glukozu	15
3.6. Diyabetin Tanı Kriterleri ve Bozulmuş Glukoz Homeostazisi İle İlişkili Evreleri	16
3.7. Oral Glukoz Tolerans Testi	17
3.8. Gestasyonel Diyabetin Tanı Kriterleri	18
3.9. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	19
3.10. Diyabetik Mikrovasküler Komplikasyonların Mekanizmaları	20
3.10.1. Vasküler Morfoloji ve Fonksiyon Değişiklikleri	20
3.10.1.1. Genel Vasküler Değişiklikler	20
3.10.1.1.1. Vasküler Hücrelerin Apoptozisi ve Büyümesi	20
3.10.1.1.2. Bazal Membran ve Ekstrasellüler Matriks	20
3.10.1.1.3. Endotel Fonksiyonu	21

3.10.1.2.	Doku Spesifik Vasküler Değişiklikler	21
3.10.1.2.1.	Retinadaki Vasküler Değişiklikler	21
3.10.1.2.2.	Diyabette Renal Vasküler Yapılar	22
3.10.1.2.3.	Sinirlerdeki Vasküler Değişiklikler	22
3.10.1.2.4.	Kalpdeki Mikrovasküler Değişiklikler	23
3.10.2.	Diyabette Mikrovasküler Patolojinin Mekanizmaları	23
3.10.2.1.	Sistemik Faktörlerin Neden Olduğu Lokal Değişiklikler	23
3.10.2.1.1.	Hipertansiyon	23
3.10.2.1.2.	Sempatik Sinir Sistemi	24
3.10.2.1.3.	İlerlemiş Glikozilasyon Son Ürünleri (AGEs)	24
3.10.2.1.4.	Vasküler İnflamasyon	25
3.10.2.2.	Değişmiş Metabolizmanın İntrasellüler Sonuçları	25
3.10.2.2.1.	Artmış İntrasellüler Glukoz Konsantrasyonu	25
3.10.2.2.2.	İntrasellüler İndirgenme Durumları ve Oksidatif Stres	25
3.10.2.2.2.1.	Polyol Yolu	26
3.10.2.2.2.2.	Pentoz Fosfat Yolu	26
3.10.2.2.2.3.	Mitokondride Süperoksit Üretimi	26
3.10.2.2.2.4.	Vasküler Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz	26
3.10.2.2.2.5.	Endotelyal Nitrik Oksid Sentetaz Disfonksiyonu	27
3.10.2.2.2.6.	Tirozin Nitrasyonu	27
3.10.2.2.2.7.	Oksidatif Stresin Diğer Kaynakları	27
3.10.2.2.2.8.	Antioksidan Koruma	27
3.10.2.2.3.	Hekzosamin Yolu ve Oksijen Bağımlı Glikozilasyon	27
3.10.2.3.	İntrasellüler Sinyal İletiminde Değişiklikler	27
3.10.2.3.1.	Protein Kinaz-C Aktivasyonu	27
3.10.2.3.2.	Selektif Vasküler İnsülin Rezistansı	28
3.10.2.3.3.	Mitogenin Aktive Ettiği Protein Kinaz	28
3.10.2.4.	Ekstrasellüler Sinyal Moleküllerinin Anormal Regülasyonu	28

3.10.2.4.1.	Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Hücre Büyümesinin Diğer Düzenleyicileri	28
3.10.2.4.1.1.	Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)	28
3.10.2.4.1.2.	Platelet Derived Growth Faktör (PDGF)	29
3.10.2.4.1.3.	Transforming Growth Faktör- β (TGF- β)	29
3.10.2.4.1.4.	Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF)	29
3.10.2.4.1.5.	Growth Hormon / İnsülin Like Growth Faktör	29
3.10.2.4.2.	Renin Anjiotensin Sistemi	29
3.10.2.4.3.	Endotel Kaynaklı Vazodilatatör ve Vazokonstriktör Faktörler	30
3.10.2.4.3.1.	Nitrik Oksid	30
3.10.2.4.3.2.	Prostosiklin	30
3.10.2.4.3.3.	Endotelin-1	30
3.11.	Hücre Adezyon Molekülleri (CAM)	30
3.11.1.	Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri	33
3.11.2.	Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Rolü	35
3.12.	Sinaptik Plastisite	36
3.12.1.	Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM	37
3.13.	Hipokampus	38
3.14.	Öğrenme ve Bellek	40
3.15.	Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller	42
3.16.	Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri	44
3.17.	Glutasyon (GSH)	44
3.18.	Lipid Peroksidasyonu (LPO)	45
3.18.1.	Lipid Peroksidasyonu, Prostaglandinlerin Nonenzimatik Etkileşimi	45
3.19.	Glial Fibriller Asidik Protein	46
4.	GEREÇ ve YÖNTEM	47
4.1.	Deney Hayvanları	47
4.2.	Deneysel Uygulamalar	47
4.3.	Morris Water Maze Testi	48

4.4.	Hipokampus Örneklerinin Alınması	49
4.5.	Hipokampus Örneklerinin SDS-PAGE İle Analizi	49
4.6.	Hipokampus Örneklerinin Western Blot İle Analizi	50
4.7.	Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Lipid Peroksidasyonu Ölçüm Yöntemi	51
4.8.	Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Glutasyon Ölçüm Yöntemi	52
4.9.	İstatistik	52
5.	BULGULAR	53
5.1.	Morris Water Maze Öğrenme Testinin Sonuçları	53
5.2.	Hipokampusda NCAM düzeyleri	55
5.3.	Hipokampusda GFAP düzeyleri	56
5.4.	Hipokampusta Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeyleri	57
6.	TARTIŞMA	59
7.	KAYNAKLAR	67
8.	ÖZGEÇMİŞ	98

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Diabetes mellitusun etyolojik sınıflaması	8
Tablo 2. Diğer spesifik diyabet tipleri	13
Tablo 3. Venöz plazma glukoz konsantrasyonuna göre hiperglisemi kategorileri	17
Tablo 4. Diabetes mellitus tanı kriterleri ve glisemi evreleri	18
Tablo 5. ADA ve WHO gestasyonel diyabetin tanı kriterleri	19
Tablo 6. Diabetes mellitusun komplikasyonları	19
Tablo 7. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi	47
Tablo 8. Deney gruplarının ortalama vücut ve total beyin ağırlıkları	53

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Glisemik bozuklukların etyolojik tipleri ve evreleri	6
Şekil 2.	Üç majör NCAM izotipinin genel yapıları	33
Şekil 3.	Homofilik NCAM moleküllerinin polisializasyonu, homofilik bağlanma ile PSA-NCAM kompleksinin oluşması	34
Şekil 4.	Water Maze Testi: Her iki grubun günlerdeki ortalama platformu bulma süreleri	54
Şekil 5.	Deneklerin probe testte eski platform alanında kalma oranları	54
Şekil 6.	Deneklerin visuel testte platformu bulma süreleri	55
Şekil 7.	Hipokampusda NCAM moleküllerinin alt izoformlarının rölatif yoğunlukları	56
Şekil 8.	Western Blot yöntemi ile beyin dokusunda NCAM molekülünün alt izoformlarının ölçümü	56
Şekil 9.	Yavru sıçanların beyin dokusunda GFAP molekülünün Western blot yöntemi ile analizi ve dansitometrik analizi sonucu	57
Şekil 10.	Erişkin sıçanların beyin dokusunda GFAP molekülünün Western blot yöntemi ile analizi ve dansitometrik analizi sonucu	57
Şekil 11.	Kontrol ve STZ guruplarındaki yavru sıçanlarda hipokampus bölgelerindeki lipid peroksidasyonu (Malondialdehit+4-hidroksialkenal) ve glutatyon düzeyleri	58

KISALTMALAR

DM	:Diabetes Mellitus
STZ	:Streptozotosin
NCAM	:Nöral Hücre Adezyon Molekülleri
GFAP	:Glial Fibriler Asidik Protein
LPO	:Lipid Peroksidasyonu
GSH	:Glutatyon
ROS	:Reaktif Oksijen Türleri
GDM	:Gestasyonel Diabetes Mellitus
HNF	:Hepatik Nükleer Faktör
ADA	:Amerikan Diabetes Associaton
WHO	:World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
OGTT	:Oral Glukoz Tolerans Testi
IGT	:Bozulmuş Glukoz Toleransı
IFG	:Bozulmuş Açlık Glukozu
MODY	:Maturity Onset Diabetes of The Young
AGEs	:Glikozilasyon Son Ürünleri
AT	:Anjiotensin
TGFβ	:Transforming Growth Faktör Beta
CTGF	:Connective Tissue Growth Factor: (Bağ Doku Büyüme Faktörü)
MMP	:Metalloproteinaz
NO	:Nitrik Oksid
VEGF	:Vasküler Endotelyal Growth Faktör
FGF	:Fibroblast Growth Faktör
PDGF	:Platelet-Derived Growth Faktör
ACE	:Anjiotensin Converting Enzim
NADPH	:Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
TNF	:Tümör Nekrozis Faktör
eNOS	:Endotelyal Nitrik Oksid Sentetaz
GLUT	:Glukoz Transport Protein
PKC	:Protein Kinaz-C
DAG	:Diaçilgliserol

GH	:Büyüme Hormonu
IGF	:İnsülin Like Growth Faktör
LTP	:Long Term Potentiation
CAM	:Hücre Adezyon Molekülü
Ig	:İmmünoglobülin
PSA	:Polisialik Asit
MDA	:Malondialdehit
4-HDA	:4-Hidroksialkenal

1. ÖZET

Diabetes mellitus, insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır.

Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının hipokampal sinaptik plastisite ve nörogenezis ile bağlantısını araştırmak için yavru sıçanların beyin dokusunda glial fibriler asidik protein (GFAP), nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM), lipid peroksidasyonu (LPO) ve glutatyon (GSH) moleküllerine bakmayı amaçladık. Öğrenme için Morris Water Maze testi kullanıldı.

Diyabet ve kontrol grubunda öğrenme yeteneğinin arttığı gözlemlendi. Beşinci günde ortalama platform bulma sürelerine bakıldığında, kontrol grubu sürelerinin, diyabet grubu sürelerine göre oldukça düşük olduğu gözlemlendi ($p<0.01$).

NCAM 120, NCAM 140 ve NCAM 180 diyabet grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü (NCAM 180 için $p<0.001$, NCAM 140 için $p<0.001$ ve NCAM 120 için $p<0.05$). Diyabetik yavru sıçanlarda GFAP düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü ($p<0.001$). Hipokampusta LPO düzeylerinin, diyabetik gruptaki yavru sıçanlarda kontrol grubuna göre arttığını ($p<0.001$), GSH düzeylerinin azaldığını ($p<0.001$) tespit ettik.

Sonuç olarak diyabetik anne yavrularında öğrenme fonksiyonları bozulmaktadır. NCAM izoformlarının azalması beyin gelişimini, sinaptik plastisite oluşumunu engelleyebilir ve NCAM'ın öğrenme ve uzun dönem hafızanın oluşmasında rolü olduğunu gösterebilir. GFAP yoğunluğunun azalması, diyabetik anne yavrularında beyin maturasyonunun tamamlanmasını engelleyebilir. Diyabette, gebelik döneminde kan şekeri regülasyonu ile beyin gelişimi ve sinaptik plastisite oluşumu düzenlenebilir ve öğrenme eksikliği, beyin maturasyonunun gecikmesi engellenebilir. Ayrıca diyabetik anne yavrularında LPO düzeyleri yüksek, GSH düzeyleri düşük bulunmuştur. Diyabette, gebelikte antioksidan tedavi yavruları oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyucu olabilir.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, öğrenme, NCAM, GFAP.

2. ABSTRACT

The Effect Of Experimental Maternal Diabetes Mellitus On The Development And Cognitive Functions Of Fetal Rats

Diabetes mellitus is characterized by chronic hyperglycemia with disturbances of carbohydrate, fat, and protein metabolism resulting from defect in insulin secretion, insulin action or both.

We purpose to investigate the relationship of learning and memory deficiency with hippocampal synaptic plasticity and neurogenesis in diabetic mathers offsprings. For this purpose we aim to investigate the levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), neural cell adhesion molecule (NCAM), lipid peroxidation, glutation in offsprings mice brain. Morris Water Maze test was used for measuring learning capacity.

It was seen that learning ability was improved in each diabetic and control groups. Mean period spending for finding the platform was importantly shorter in control group than diabetic group in 5. day ($p < 0.01$).

The levels of NCAM 120, NCAM 140 and NCAM 180 were statistically lower in diabetic group than control group (NCAM 180 $p < 0.001$, NCAM 140 $p < 0.001$ and NCAM 120 $p < 0.05$). The levels of GFAP was statistically lower in diabetic newborn mice than control group ($p < 0.001$). We found the levels of lipid peroxidation importantly higher ($p < 0.001$), and the levels of glutation importantly lower ($p < 0.001$) in hippocampus of diabetic offsprings than control group.

Finally functions of learning is disturbed in diabetic mathers offsprings. Decreasing of NCAM izoforms can block the maturation of brain and formation of synaptic plasticity. This can show the role of NCAM on learning and long period memory. Decreasing of GFAP dansity may prevent brain maturity completment in diabetic offsprings. In diabetic patients regulation of blood glucose during the gestation can arrange the development of brain and synaptic plasticity formation and it also prevent the learning deficiency and brain maturation delay. Furthermore high levels of lipid peroxidation and low levels of glutation was found in diabetic mathers offsprings. Antioxidation therapy may be protective against to harmful effects of oxidative stress during the gestation in diabet.

Key words: Diabetes mellitus, learning, NCAM, GFAP.

3. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM), insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır (1). DM uzun dönemde çeşitli organlarda (gözler, böbrekler, kalp, kan hücreleri) hasarlar, fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikler ile seyreder (1).

Diyabetik hastalarda, ılımlı bir serebral atrofi, beyin sapı lezyonları ve subkortikal lezyonlarda artış bildirilmiştir (2,3). Yetişkinlerde, DM ile birlikte orta düzeyde öğrenme ve hafıza bozukluğu da görülmektedir (4-6). Kronik hiperglisemi boyunca DM, bilişsel bozukluğa neden olmaktadır (7).

Annesi diyabet olan dişi sıçanlarda öğrenme eksikliği tespit edilirken, erkek sıçanlarda ise farklılık tespit edilmemiştir (8). Streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, öğrenme ve hafızada bozukluk (zayıflama) oluşmuştur (9). Diyabetik sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının, hipokampal sinaptik plastisiteye bağlı olduğu görülmüştür (10,11). Öğrenme ve hafıza şekillenmesi (oluşması) esnasında, sinaptik değişimlerin oluşumuna NCAM'ın yol açtığı ileri sürülmektedir (12). Nöral hücre adezyon molekülleri (NCAM), yetişkin beyinlerinde, beyin gelişimi ve sinaptik plastisite esnasında beyin dokusu gelişimini düzenler (13,14). Glial fibriler asidik protein (GFAP) matür astrositlerin major intermediate filamentidir. Astrosit farklılaşması süresince anahtar olaylardan biri GFAP ekspresyonunun yapılmasıdır. GFAP astrosit olgunlaşma belirteci olarak tanınır. GFAP fetal yaşamda son derece az miktarda iken , beynin gelişimi ile yoğunluğu artar (15). STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda GFAP düzeyleri nöronal hasara bağlı olarak artmış bulunmuştur (16).

Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu, sonradan lipid peroksidasyonu (LPO)'nu katalizleyen serbest radikaller üretebilir (17,18). Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilmiştir; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş glutatyon (GSH) mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri görülmektedir (19-22). Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri reaktif oksijen türleri (ROS)'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres hafıza ve öğrenme bozukluklarına yol açar. STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde LPO seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri düşük bulunmuştur (23).

Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının, hipokampal sinaptik plastisite ve nörogenesis ile bağlantısını araştırmak için yavru sıçanların beyin dokusunda GFAP, ayrıca membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini etkileyen LPO ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı koruyan GSH düzeylerine ve erişkin sıçanların beyin dokusunda NCAM ve GFAP moleküllerine bakmayı amaçladık.

3.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı:

Diabetes mellitus, insülin etkisinin ya da insülin salgılanmasının veya her ikisinin bozukluğunun meydana getirdiği karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklara neden olan kronik hiperglisemi olarak tanımlanır (1). DM uzun dönemde çeşitli organlarda (gözler, böbrekler, kalp, kan hücreleri) hasarlar, fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikler ile seyreder (1). DM, kendini ağız kuruluğu, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı, polifaji, ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi semptomlarla gösterir. Çoğunlukla semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Patolojik fonksiyon değişikliklerine neden olan hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir (1). Sonuç olarak DM sıklıkla rutin kan ya da idrar glukoz testinin normal olmayan sonuçlarından ya da komplikasyonun varlığından dolayı tespit edilir. Bazı durumlarda diyabet, gestasyonel diabetes mellitus (GDM) veya gebelikte görülen glukoz intoleransı gibi örneklerde olduğu gibi kolaylıkla fark edilebilir. Bazı kişilerde diyabet gelişme olasılığı glukoz tolerans anomalilerinden önce de tanımlanabilir (1).

Tip 1 DM gelişim aşamasında, örneğin adacık hücre ya da diğer antikorlar gibi immunolojik parametreler, klinik hastalıktan aylarca veya yıllarca önce oluşabilirler (24). Bazı ailelerde belirli diyabet tipleriyle bağlantılı gen mutasyonları tanımlanabilir, örneğin genç ve erken yetişkin diyabetine neden olan hepatik nükleer faktör (HNF) geni ya da glukokinaz genindeki varyasyonlar bu mutasyonlara örnek kabul edilebilir (25). Bu gibi genetik anomaliler her hangi bir zamanda tespit edilebilir.

DM'a, daha önceden ifade ettiğimiz bir çok spesifik nedenlere rağmen etyolojik ve patolojik olarak net bir tanı koymak oldukça zordur. DM, Tip 1 ve Tip 2 olmak üzere iki etyopatogenetik kategoriye ayrılır (26,27). Fakat gruplar arasındaki heterojeniteye bakılırsa bu gruplama kesin ayrım oluşturmamaktadır.

Spesifik etyolojik olarak tanımlanabilen ve giderek artan diyabet çeşitlerinden dolayı, klinik sınıflandırma 1997'de Amerikan Diabetes Assosiaton (ADA) tarafından önerildi (26) ve 1999'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından benimsendi (27) ve bu sınıflandırma 1985'de WHO'nun uluslararası tanımladığı önceki sınıflandırmanın yerini aldı (28). Günümüzde DM, hem klinik evreye hem de

etyolojik tiplerine göre sınıflandırılıyor. Bu klinik evre, diyabetin doğal seyri esnasındaki farklı evrelerde oluşabilecek progresyonu yansıtmaktadır (Şekil 1.).

Evrer	Normoglisemi	Hiperglisemi		
	Normal glukoz regülasyonu	IFG veya IGT	İnsülin gereksiz	İnsülin gerekli
Tip 1				
Tip 2				
Diğer				
Spesifik				
Diğer				
Spesifik				
Gestasyonel Diyabet				

Şekil 1. Glisemik bozuklukların etyolojik tipleri ve evreleri (1)

3.2. Klinik Evreler:

Kendilerinde diyabetin mutlaka oluşacağı bireyler, diyabetin gelişimi esnasında çeşitli klinik evrelerden geçerler. Başlangıçta bu bireyler oral glukoz tolerans testi (OGTT)'ne tabi tutulsalar bile, glukoz regülasyonu normaldir ve gliseminin herhangi bir anormalliği bulunmayabilir. Bu aşamayı glukoz regülasyonun zayıfladığı çeşitli devamlılık periyotları izler. Bunlar belki, açlık glukoz konsantrasyonunun anormal bir haline sahip olabilirler ya da OGTT'ye tabi tutulsalar, bunlarda glukoz toleransının bozukluğu gösterilebilir (1). Diyabet, açlık glisemisi veya glukoz toleransındaki anormallikler veya her ikisi ile karakterize olabilir. Diyabet gelişimi durumunda, bazı hastalarda glisemi, diyet ve fiziksel aktiviteler gibi yaşam biçimindeki bazı değişikliklerle kontrol altında tutulabilirken, bazı hastalarda glisemi kontrolü veya ketozis ve ketoasidozisin engellenmesi için insülin ya da oral hipoglisemik ajanlara ihtiyaç duyulur (1). Eğer ketozisi önlemek için insüline gereksinim duyuluyorsa, bu hastalar yaşam için insüline muhtaç hastalar olarak belirtilirler. Diyabetin bütün çeşitlerinde hiperglisemi kapsamında remisyon bulunabilir. Hastalar, özellikle diyabetin başlangıç durumunda, normoglisemik duruma dönebilirler veya bozulmuş olan glukoz regülasyonu geri dönebilir. Bu olay daha çok Tip 2 diyabetin yeni başlangıç döneminde görülür. Bu hastalarda yaşam stili değişikliği ve/veya glisemiye yönelik yoğun ve hızlı tedavi ile bozulmuş veya normal glukoz toleransındaki anormallikler geri dönebilir (29). Bu durum aynı şekilde kısa bir süre insülin tedavisinden sonra Tip 1 DM'lerde de görülebilir. Hayatta kalmak için daha fazla insülinin gerekmediği çeşitli periyotlar olabilir ve glukoz toleransı düzelebilir (balayı periyodu olarak adlandırılır). Nihayetinde böyle

hastalar hayatta kalabilmek için insüline ihtiyaç duyarlar (30). Gestasyonel diyabetliler, genellikle doğumdan sonra bozulmuş glukoz toleransı (IGT) periyodunu takiben, değişken normoglisemik ve farklı periyotlarda olabilirler. Sonraki gebeliğinde de gestasyonel diyabetin tekrar etme olasılığı vardır. Gestasyonel diyabeti olanlarda, hamile olmadıkları zaman içinde de birkaç yıl içinde diyabet gelişebilir, bu nedenle normoglisemi de olsa bu kadınlar Tip 2 diyabet riskine sahip olarak tanımlanabilirler (31).

Diyabet, etyolojisi göz ardı edilerek klinik evrelerine göre sınıflandırılabilir. Hastalık sürecine bağlı olarak, zamanla gliseminin evreleri değişebilir. Hastalık süreci mevcutken, glukoz metabolizmasında, klinik olarak tanımlanabilir anlamlı anomali olmayabilir. Örneğin, normoglisemik bir bireyde adacık hücreleri, insülin ya da glutamik asit dekarboksilaz'a karşı oluşan antikorlar Tip 1 diyabet gelişimi hakkındaki yüksek bir ihtimali işaret ederler (32). Tip 2 diyabetin gelişiminde olası rol alabilecek sensitif ve spesifik erken belirteçler vardır, fakat hastalık süreci, açıkça oluşan diyabetin gelişmesinden önce tanımlanabilir (1).

Bozulmuş glukoz regülasyonu, metabolik olarak, normal glukoz homeostazisi ile diyabetikler arasındaki evrededir ve bunlar IGT veya bozulmuş açlık glukozu (IFG) olarak sınıflanır (26,27). IFG ve IGT birlikte oluşmalarına rağmen aynı manada değildir ve glukoz regülasyonunun farklı anomalilerini gösterebilirler. Bozulmuş glukoz regülasyonunun bu evrelerinden birine sahip bireyler diyabet gelişiminde yüksek riske sahiptirler (33-35). IGT'ye OGTT ile tanı konulabilir, fakat IFG, diyabet tanısı için gerekli olandan düşük, fakat normal glukoz toleransında bulunandan yüksek olan açlık glukoz konsantrasyonuna karşılık gelir. IGT ya da IFG tespit edilen vakalar genellikle normal ya da hafif yükselmiş glukozile hemoglobin seviyelerine sahiptirler (36). IGT insülin rezistans sendromu veya diğer metabolik belirteçlerin varlığı ile ilişkilidir (37).

3.3. Etiyolojik Tipler:

WHO ve ADA tarafından tavsiye edilen DM' un etyolojik sınıflandırması Tablo 1.'de gösterilmektedir. Bu sınıflandırma daha önce önerilen sınıflandırmadan (ki bu sınıflandırmada insüline bağımlı diyabet ve insülin bağımsız diyabet terimleri kullanılıyordu) oldukça farklıdır. Ayrıca bu terimler yanlış kullanılıyordu ve iyi sınıflandırılmış hastalar da etyolojik karakteristiklerinden ziyade tedavi

ihtiyaçlarına göre sınıflandırılmış oluyordu. Tip 1 ve Tip 2 diyabet terimleri (arap rakamları ile) DM' un genel formları için uyarlanmıştır (1).

Tablo 1. Diabetes mellitusun etyolojik sınıflaması (1)

I. Tip 1 Diabetes Mellitus: β hücre yıkımı genellikle mutlak insülin yetmezliğine neden olur.

- A. Otoimmün
- B. İdiopatik

II. Tip 2 Diabetes Mellitus: Belirgin insülin direnci yanında, göreceli insülin eksikliği ile belirgin insülin sekresyon bozukluğu yanında, göreceli insülin direnci arasında değişebilir.

III. Diğer spesifik tipler (Tablo 2.'de)

- A. β hücre fonksiyonunun genetik defektleri
- B. İnsülin etkisindeki genetik defektler
- C. Ekzokrin pankreas hastalıkları
- D. Endokrin hastalıklar
- E. İlaç ve kimyasal maddelere bağlı gelişen diyabet
- F. Enfeksiyonlara bağlı gelişen diyabet
- G. Otoimmüniteye bağlı nadir diyabet formları
- H. Diyabetle birlikte olan diğer genetik sendromlar

IV. Gestasyonel Diabetes Mellitus

3.3.1. Tip 1 Diabetes Mellitus:

Tip 1 diyabet, β hücre yıkımının olduğu hastalık formudur. Bu tip hastalık genellikle hayatta kalmak için insülin gerektiren diyabet tiplerinin başında gelir. Tip 1 diyabetli hastalar, klinik olarak hastalığın açıkça ortaya çıkmasından önce metabolik olarak normal durumdadırlar fakat bazı otoantikörlerin varlığı sayesinde β hücre yıkımının süreci daha erken gözlenebilir. Tip 1 diyabet genellikle β hücre yıkımına sebep olan otimmün sürece etki eden anti glutamik asit dekarboksilaz, anti adacık hücre ya da anti insülin antikörlerinin varlığı ile karakterizedir. Bu antikörlerin bir veya birkaçına sahip bireyler Tip1 A, immün aracılı Tip 1 diyabet olarak alt gruplara sınıflandırılırlar (26,27).

Özellikle beyaz olmayanlarda, Tip 1 diyabet, herhangi bir otoimmün hastalığın belirtisi olmaksızın, otoimmün antikorların yokluğunda oluşabilir. Tip 1 diyabetin bu formu, progresif seyirli, tekrarlayan ketozis atakları, ketozisin engellenmesi ve hayatta kalım için insüline gereksinim duyan hiperglisemi ile karakterizedir. Bu tip bireyler Tip1 B veya idiopatik diyabet olarak sınıflandırılır (38).

Tip1 A diyabet, spesifik haplotiplerle ya da insan lokosit antijeni kompleksinin DQ-A ve DQ-B lokusundaki allellerle sıkı bir ilişki gösterir (39). β hücre yıkım oranı tamamen değişkendir, bazı bireylerde, özellikle bebeklerde ve çocuklarda hızlıdır, yetişkinlerde yavaştır.

Bazıları ılımlı bir açlık hiperglisemisine sahiptirler, fakat bunların bir kısmı hızlı bir şekilde ketoasidozis veya şiddetli bir hiperglisemi tablosu oluşturabilirler, bir kısmı da, özellikle erişkinler, uzun yıllar rezidü β hücre fonksiyonlarını kaybetmeyebilirler ve bunlar latent otoimmün diyabet olarak adlandırılırlar (40,41). Böyle bireyler, diyabetin teşhisinden sadece birkaç yıl sonra yaşamak için insüline bağımlı olurlar. Tip1 diyabette insülin ve plazma C-peptid seviyeleri çok düşüktür veya ölçülemeyebilir. Ayrıca Tip 1 A diyabet hastaları, pernisyöz anemi, vitiligo, Addison hastalığı, Hashimoto tiroiditi ve Graves hastalığı gibi otoimmün hastalıklarla birlikte olmaya yatkındırlar (1).

Tip1 B ya da idiopatik diyabet, Tip1 A'da olduğu gibi düşük C peptid ve insülin seviyeleri ile karakterizedir. Böyle hastalar ketoasidozise yatkındırlar, buna rağmen laboratuvar olarak tespit edilebilen herhangi bir otoimmün antikora sahip değillerdir. Bu hastaların bir çoğu Afrika ve Asya kökenlidir. Bunlarda epizodik ketozis oluşabilir, fakat insülinopeninin patogenetik mekanizması bilinmemektedir (1).

3.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus:

Tip 2 DM en yaygın görülen diyabet formudur. İnsülinin etkisinde veya insülin salınmasında bozukluk ile karakterizedir. Bu bozukluklardan birisi predominanttır. Sıklıkla iki bozukluk da zamanla oluşur ve klinik olarak diyabet belirgin hale gelir. Diyabetin bu türünün spesifik etyolojisi bilinmemesine rağmen, β hücrelerinin otoimmün yıkımı meydana gelmez. Tip 2 diyabet hastaları genellikle tam insülin eksikliğinden ziyade insülin direncine sahiptir. Tip 2 diyabetli hastalar,

tanı zamanında, genellikle yaşamları süresince, hayatta kalmak için, insülin tedavisine ihtiyaç duymazlar, fakat sonunda çoğu glisemik kontrol için insülin tedavisine gereksinim duyarlar. Diyabetin bu formu, diyabetin seyri süresince progresif β hücre yetersizliğine bağlıdır (42). Ketoasidozis nadiren kendiliğinden oluşur, fakat enfeksiyon veya stres durumunda meydana gelebilir.

Tip 2 diyabet hastalarının çoğu, kendilerinde diyabet gelişirken obezdirler ve obezite insülin direncini şiddetlendirir. Tip 2 diyabetlilere sıklıkla uzun yıllar tanı konmaz, çünkü hiperglisemi derece derece gelişir ve erken evrelerde diyabetin klasik semptomlarını oluşturacak şiddette değildir, böyle hastalar makro ve mikro vasküler komplikasyonların gelişimi açısından risk altındadırlar. İnsülin seviyesi normal veya artmış olabilir, fakat insülin direncinden dolayı kan glukoz seviyesinin kontrolü yetersizdir. Bu nedenle bu hastalar insülinopeni ile aynı değil, bağlantılıdır. İnsülin direnci, kilonun azalması veya farmakolojik tedavi ile gliseminin normalleşmesi sonucu düzelebilir (1). Tip 2 diyabet sıklıkla kadınlarda görülür. Bu kadınların gestasyonel diyabet geçmişleri vardır, ayrıca hipertansiyon, dislipidemi gibi insülin direnci sendromlarının karakteristik yapılarına sahip bireylerdir. Tip 1 diyabet ile ilişkisi olan ve obez olmayan hastalar (ki bunlar genellikle Avrupa kökenlidir), Tip 2 diyabet ile tutarlı klinik görüntü gösterebilir, fakat Tip 1 diyabetlilerde bulunduğu gibi otoantikorlara sahip olabilirler. Tip 1 A diyabeti olan böyle hastalar, otoantikor ayrımı yapılmadıkça Tip 2 diyabet gibi görülebilir (1).

Tip 2 diyabet gelişme riski yaşla, obezite ile ve fiziksel aktivite eksikliği ile artar. Tip 2 diyabet güçlü bir ailesel bütünlük içerir, bu nedenle Tip 2 diyabetli anne/babaya veya kardeşe sahip kişiler (ki bunlar obezite, hipertansiyon, dislipidemi olan bireyler ve gestasyonel diyabet geçmişi olan kadınlar) büyük risk altındadırlar (1). Tip 2 diyabetin sıklığı ırklar ve etnik gruplar arasında oldukça değişkenlik gösterir. Latin Amerikalılar, Polinezya Asya-Hindistan, veya Afrika-Amerikan kuşağındaki kişiler, Avrupa kökenlilere göre daha yüksek risk altındadırlar. Ayrıca hastalık yetişkinlerde görülür. Avrupa kökenli olmayan kişilerde başlama yaşı daha erken olma eğilimindedir (43). Hastalık çocuklarda ve adolesanlarda da olmak üzere herhangi bir yaşta oluşabilir (44-47).

3.3.3. Diğer Spesifik Diyabet Tipleri:

Diyabetin diğer spesifik tipleri; kendilerinde, temel defekt veya hastalığın süresi nispeten spesifik bir yolda teşhis edilebilen diyabet hastalarıdır. Bu kategori

diğer spesifik durumlardaki veya etyolojisi bilinmeyen sendromlara veya çeşitli hastalara bağlı sekonder diyabet tiplerinin bir karışımıdır.

Diyabetin diğer spesifik tiplerinin nedenleri ve sınıflaması, Tablo 2.'de gösterilmektedir. Bunlar spesifik monogenetik defektlerle ilişkili değişik diyabet tipleridir ve β hücre fonksiyonlarında genetik defekt ile karakterizedir. Bunların çoğu erken yaşlarda hiperglisemi ve kalıtımın otozomal dominant oluşuyla karakterizedir. Bunlar çoğunlukla geç çocukluk veya erken erişkinlik çağında oluşan diyabet (MODY=maturity onset diabetes of the young) olarak bilinirler. Bunlar insülin sekresyonunda azalma veya insülin etkisinde defekt olmaması veya minimal defekt olması ile karakterizedir. Otozomal dominant kalıtım gösterirler, fakat heterojendirler. Çok sayıda spesifik genetik defekt tespit edilmiştir. Bunlar, HNF4 α (MODY1), glukokinaz (MODY2), HNF1 α (MODY3), insülin promoting faktör-1 (MODY4) ve HNF3 β genleri (MODY5)'i içerir (25).

Diğer β hücre fonksiyonu genetik defekti, mitokondrial DNA'daki mutasyondan kaynaklanır. Mitokondrial DNA değişimi 3243. pozisyondaki Leu-Ala genindedir, sağlıkla birlikte görülen DM'a neden olur (48). Aynı mitokondrial kalıtım MELAS (Mitokondriyal myopati, ensefalopati, laktik asidoz, inme (stroke) benzeri sendrom) sendromunda da vardır, fakat diyabet bu sendromun bir parçası değildir (49).

Diyabetin bazı formları, insülinin veya insülin etkisinin genetik defekti ile ilişkili otozomal dominant kalıtmıdır (50). Diyabetin bu formunda, proinsülin insüline çevrilememektedir. Genelde glukoz intoleransı hafiftir. Çok az ailede insülin geninde spesifik mutasyon, anormal yapıda insülin ve sonuçta insülinin reseptöre bağlanmasında bozulma tespit edilmiştir. Bu diyabet tipinde normal veya hafif bozulmuş glukoz metabolizması olabilir, fakat sirkülasyonda insülin veya C-peptid seviyesi yüksektir. İnsülin reseptör geninin spesifik mutasyonlarının bir çoğu tanımlanmıştır, bunlar insülin etkisinde bozukluk (azalma) oluştururlar (51). Diyabetin çok nadir sebepleri olmalarına rağmen, bunlar, eğer sirkülasyondaki insülin seviyesi fazla yüksekse ve eğer insülin rezistans sendromunun diğer klinik özellikleri, örneğin; akantozis nigrikans, ovarian disfonksiyon, hiperandrojenizm, lipodistrofi veya aşırı hipertrigliseridemi varsa göz önünde tutulmalıdır. Eğer Sjögren Sendromu, sistemik lupus eritematozis, Ataksi- Telenjiektazi gibi diğer otoimmün hastalıklar mevcutsa, insülin reseptör otoantikorlarından kaynaklanan diyabet

olasılığı göz önünde bulundurulmalıdır. Genetik nedenli insülin etki defekti, leprechaunizm, Rabson Mendenhall sendromu ve lipoatropik diyabetiklerde bulunur (1).

DM ekzokrin pankreas hastalığına sekonder oluşabilir. 1985 WHO sınıflamasında malnutrisyona bağımlı diyabetin bir alt grubu olan fibrokalkuloz pankreatopati şimdi bu kategoride yerini alıyor. Pankreatit, pankreatektomi, pankreasın neoplastik hastalıkları, kistik fibrozis ve hemokromatozis diyabete neden olabilir. Ekzokrin pankreas yetersizliğinin spesifik formlarından olan ve PEK geninin anormalliğine bağlı Wolcott-Rallison sendromu erken başlayan diyabet ve multipl epifizyel displaziye neden olur (52).

DM çeşitli endokrinopatilerin sonucu oluşabilir. Cushing sendromu, akromegali, feokromositoma, glukagonoma, hipertiroidizm ve somatostatinoma ile birlikte olabilir.

Bazı ilaçlar veya kimyasallar diyabet gelişimi ile ilişkilidir. Bunlardan bazıları glukokortikoidler, nikotinik asit, diazoksid, fenitoin, pentamidindir. Bu ilaçlar veya kimyasalların, direkt olarak diyabet oluşturduğu veya diyabetin, bu ilaçlarla bir araya geldiğinde tesadüfen mi görüldüğü kuşkuludur (53).

Bazı enfeksiyonlar diyabete sebep olabilir. (konjenital rubella ve sitomegalovirus enfeksiyonları) (54). Bazı genetik sendromlarla birlikte diyabet görülebilir.

Tablo 2. Diğer spesifik diyabet tipleri (1)

β hücre fonksiyonu genetik defektleri	Ekzokrin pankreas hastalıkları
20. kromozom, HNF4α (MODY1)	Fibrokalkuloz pankreatopati
7. kromozom, glukokinaz (MODY2)	Pankreatit
12. kromozom, HNF1α (MODY3)	Travma/pankreatektomi
13. kromozom, IPF1 (MODY4)	Neoplazi
17. kromozom, HNF3β (MODY5)	Kistik fibrozis
Mitokondrial DNA, A3243G mutasyon	Hemokromatozis
Diğerleri	Wolcott-Rallison sendromu
İnsülin etkisinin genetik defektleri	Diğerleri
Tip A insülin rezistansı	Endokrinopatiler
Leprechaunizm	Cushing sendromu
Rabson-Mendenhall sendromu	Akromegali
Lipoatrofik diyabet	Feokromositoma
Diğerleri	Glukagonoma
	Hipertiroidizm
Diyabet ile ilişkili diğer genetik sendromlar	Somatostatinoma
Down sendromu	Diğerleri
Friedreich ataxia	İlaç veya kimyasal nedenler
Huntington hastalığı	Nikotinik asit
Klinefelter sendromu	Glukokortikoidler
Lourence-Moon-Biedl sendromu	Tiroid hormonu
Myotonik distrofi	α-adrenerjik agonistler
Porphyria	β-adrenerjik agonistler
Prader-Willi sendromu	Tiazidler
Turner sendromu	Fenitoin
Wolfram sendromu	Pentamidin
Diğerleri	Pyriminil
İmmün aracılı diyabetin nadir formları	İnterferon-α
İnsülin otoimmün sendrom	İnfeksiyonlar
Anti-insülin reseptör antikorları	Konjenital rubella
Stiff-man sendromu	Cytomegalovirus
Diğerleri	

HNF4α; hepatik nükleer faktör 4α, MODY; maturity onset diabetes of the young, HNF 1α; hepatik nükleer faktör 1α, IPF1; insülin promoting faktör 1, HNF3β; hepatik nükleer faktör 3 β.

3.3.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus:

GDM, gebelik döneminde başlayan veya ilk olarak gebelikte teşhis edilen hiperglisemi ile birliktelik içinde olan karbonhidrat intoleransıdır (26,27). Bu tanımlama daha önce tanımlanmamış glukoz intoleransını veya gebelik öncesi diyabet olasılığını ortadan kaldırmaz. Gebelik öncesi diyabet olduğunu bilen hamile kadınlar, GDM değildir.

Hamileliğin erken dönemlerinde, açlık ve postprandial glukoz konsantrasyonu hamile olmayan kadınlara göre normal olarak düşüktür. Bu zaman

içinde açlık veya postprandial glukoz seviyesindeki herhangi bir yükseliş gebelik öncesi diyabetin varlığını yansıtabilir. Fakat gebeliğin bu evresindeki anormalliği belirtmek için gerekli spesifik kriterler saptanmamıştır.

GDM için yüksek risk grubundaki kişiler; glukoz intoleransı hikayesi olan yaşlı kadınlar, önceki hamileliklerinde gestasyonel yaşın uzun olduğu bebek doğurmuş yaşlı kadınlar, Tip 2 diyabetin yüksek riskine sahip etnik gruplardan gelen kadınlar veya açlık veya tesadüfi kan glukoz seviyesinin yüksek olduğu hamile kadınlardır.

GDM, fetüste ve annede zarar verici sonuçlara neden olabilir. Artmış açlık glukoz konsantrasyonu, hamilelik esnasında tanımlanmış veya önceden meydana gelmiş diyabet, hamileliğin son 4-8. haftasında intrauterin fetal ölüm ve konjenital anomalileri de içeren diğer komplikasyonlarla ilişkilidir (55). Şiddetli açlık hiperglisemisi olmayan GDM, artan perinatal mortalite ile ilişkili değildir, fakat GDM fetal makrozomi riskini artırır (56). Neonatal hipoglisemi, sarılık, polisitemi ve hipokalsemi GDM'un diğer ölümcül komplikasyonlarıdır. GDM veya hamilelik öncesi Tip 2 diyabeti olan kadınların çocukları genç erişkin veya adolesan dönemlerinde obezite, glukoz intoleransı ve diyabet için yüksek risk grubundadırlar (57). Diyabet için yüksek risk özelliklerine sahip kadınlar, örneğin obezitesi olan, GDM geçmişi olan, glukozürisi olan, kuvvetli ailesel diyabet hikayesi olanlar hamilelikte en kısa sürede glukoz testine tabi tutulmalıdırlar. Yüksek riskli populasyonlarda olan hamile kadınlarda, hamileliğin ilk trimesterinde, önceden bilinmeyen diyabet veya glukoz intoleransını tanımlamak uygundur. Hamileliğin herhangi bir zamanında 126 mg/dL veya daha yüksek açlık plazma glukoz seviyesine veya tesadüfi alınan kanda 200 mg/dL veya daha yüksek plazma glukoz seviyesine sahip kadınlar, diyabet tanısının glukoz seviyesi eşiği ile karşılaşılırlar. GDM için resmi sistematik test genellikle gebeliğin 24-28. haftaları arasında uygulanır. Gebeliğin 24-28. haftaları arasında resmi GDM testi uygulanacak kadınlar; 25 ve üstü yaşlardaki kadınlar, kilolu kadınlar, diyabet prevalansının yüksek olduğu etnik grupta olan kadınlar, diyabetlilerle birinci derece akrabalığı olan kadınlar, anormal glukoz intoleransı hikayesi olan kadınlardır (58). Doğumu takiben GDM'lu kadınlar yeniden sınıflandırılmalıdır. GDM'li bazı kadınlar doğumu takiben diyabet ya da bozulmuş glukoz regülasyonuna sahip olacaklardır, fakat çoğunluğunda glukoz

regülasyonu normale döner. Böyle kadınlar bununla birlikte, sonraki yıllarda diyabete ilerleme açısından yüksek risk taşırlar (31,59).

3.4. Bozulmuş Glukoz Toleransı:

IGT, bozulmuş glukoz regülasyonunun bir safhasıdır. IGT, glukoz toleransının, olması gereken seviyenin üstünde fakat diyabetin beklenen tanısal seviyesinden düşük olduğu kişilerde görülür (26,27). IGT, açlık glukoz konsantrasyonunun temeline dayandırılarak tanımlanamaz, bu tür bireylerin kategorize edilmesinde OGTT'ne ihtiyaç duyulur. Hepsi olmasa da IGT'li kişiler diyabet gelişimi açısından yüksek riske sahiptirler (60). Bazıları normal glukoz toleransına döner, bazılarında da IGT yıllarca devam eder. IGT'li kişilerde, kendileriyle aynı yaşta olan normal glukoz toleransına sahip kişilere göre arteriyel hastalıkların gelişme riski yüksektir (61). Fakat bu bireylerde diyabet oluşmadıkça, diyabetin çok spesifik retinopati, nefropati gibi mikrovasküler komplikasyonları çok nadir olarak gelişir (26,62).

IGT, obezlerde, obez olmayanlara göre daha sık görülür ve insülin rezistansı ve hiperinsülinemi ile birlikte dir. IGT'in nedenleri, belirli medikal tedavileri, birçok spesifik genetik sendromları veya diyabet ile ilişkili diğer durumları da içeren geniş bir çeşitliliktedir (Tablo 2.). Her şeye rağmen IGT, normal glukoz toleransı ile Tip 2 DM gelişimi arasında geçici bir aşama gösterir.

IGT'li kişiler, Tip 2 DM gelişiminde yüksek riske sahip oldukları için, bu bireyler arasında çeşitli randomize klinik çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar göstermiştir ki, diyabetin gelişimi, hayat tarzına müdahale edilerek azaltılabilir veya ertelenebilir (örneğin fiziksel aktiviteler artırılarak ve kilo verilerek) (63-65). IGT'li hastalarda Tip 2 diyabet insidansını azaltan metformin (65), akarboz (66) ve glitazonlar (67) gibi çeşitli ilaçlar vardır.

3.5. Bozulmuş Açlık Glukozu:

IFG bozulmuş glukoz homeostazisinin bir aşamasıdır. Bu kategori 1997 ADA ve 1999 WHO sınıflamasında, açlık glukoz seviyesi, normalden yüksek fakat diyabetliler için tanısal değerin altındaki bireyleri tanımlamak için kullanıldı (26,27).

Açlık plazma glukoz konsantrasyonu 100-125 mg/dL (5,6-7 mmol/L) olan bireyler, şimdi IFG'ye sahip kişiler olarak düşünülüyor (68). Eğer bir OGTT yapılırsa, bu kişilerin bazılarında IGT olacağı, bazılarının da diyabet olacağı

görülebilmektedir (2. saat sonunda plazma glukoz konsantrasyonu ≥ 200 mg/dL veya $\geq 11,1$ mmol/L) (Tablo 4.).

IFG'nin kategorileri 1997'de ADA tarafından tanımlandı, bununla eş zamanlı olarak, diyabetin tanısı için açlık plazma glukoz konsantrasyonu 126 mg/dL ($\geq 7,0$ mmol/L)'ye düşürüldü. IFG için, açlık plazma glukoz konsantrasyonu 110-125 mg/dL (6,1-7 mmol/L) olarak belirlendi, fakat 2003'de 100-125 mg/dL (5,6-7 mmol/L) olarak değiştirildi. IFG ve IGT popülasyonunun değişik alt grupları olarak tanımlandı (69). Her iki kategoride bulunan kişiler Tip 2 diyabet gelişimi için yüksek risk grubunda bulunsalar da (33-35,70), birçok popülasyondaki IFG'li oranı IGT'lilerden azdır (69,70).

3.6. Diyabetin Tanı Kriterleri ve Bozulmuş Glukoz Homeostazisi İle İlişkili Evreleri:

Eğer bir hastada susuzluk, poliüri, açıklanamayan kilo kaybı, uykuya meyil veya koma ve glukozüri varsa diyabet teşhisi, açlık hiperglisemisinin gösterilmesiyle konabilir (26,27). Eğer açlık glukoz konsantrasyonu diyabet için tanısal birimler içinde ise OGTT teşhis için gerekli değildir. Güvenilir bir test yapılmalıdır, çünkü bir diyabet tanısı, hastalar için ömür boyu süren ve hatırı sayılır sonuçlar taşır. Bireyler arası farklılık veya tam olmayan bir açlık yanlış tanı ile sonuçlanabilir. Eğer hasta asemptomatik veya minimal semptom varsa ve açlık kan veya plazma glukoz konsantrasyonları tanısal değilse, diyabet tanısının konması veya dışlanması için OGTT gerekli olur (Tablo 3.).

Normal glukoz toleransı, yalnızca açlık glukoz tanımlaması temel alınarak saptanamaz. Sağlıklı bireylerde, açlık glukoz seviyeleri, kapiller veya venöz plazmada 100 mg/dL ($< 5,5$ mmol/L)'den, tam kanda 90 mg/dL (< 5 mmol/L)'den düşüktür, fakat bu limitlerin üstünde değerleri olan kişiler IGT gösterebilir (27).

Tablo 3. Venöz plazma glukoz konsantrasyonuna göre hiperglisemi kategorileri (1)

	Açlık Plazma Glukoz Seviyesi			Uygulanmaz
	Normal ^a	Bozulmuş ^a	Diyabet	
Yemekten 2 saat sonra plazma glukoz seviyesi	<100 mg/dL (<5,5 mmol/L)	100-125 mg/dL (5,6,9mmol/L)	≥126 mg/dL (≥7,0mmol/L)	
<140 mg/dL (<7,8 mmol/L)	Normal ^b	IFG	Diyabet	Normal
140-199 mg/dL (7,8-11 mol/L)	IGT ^b	IFG/IGT ^c	Diyabet	IGT
≥200 mg/dL (≥11,1 mmol/L)	Diyabet ^b	Diyabet ^b	Diyabet	Diyabet
Uygulanmaz	Normal	IFG	Diyabet	Bilinmiyor

IFG; bozulmuş açlık glukozu, IGT; bozulmuş glukoz toleransı

a; 1997 ADA ve 1999 WHO' a açıklık plazma glukoz değerleri; normal < 110 mg/dL (6,1 mmol/L), bozulmuş 110-125 mg/dL (6,1-6,9 mmol/L). Tablodaki değerler 2003 de ADA Expert komitesi tarafından tavsiye edilmiştir (68).

b; bu sınıflama sadece oral glukoz tolerans testi uygulanırsa tespit edilebilir.

c; bu kategori, ADA tavsiyelerine göre IFG ve IGT, WHO'ya göre IGT olarak sınıflandırılır.

3.7. Oral Glukoz Tolerans Testi:

OGTT, sabah vaktinde, her zamanki olağan fiziksel aktivite ve en az 3 günlük sıkı bir diyet (>150 gr günlük karbonhidrat) yaptıktan sonra yapılmalıdır. Test öncesi gece boyunca 10-16 saatlik açlık olmalıdır, fakat hasta su içebilir. Hastalar test esnasında sigara içmemelidir. Test sonucunu etkileyebilen faktörler kaydedilmelidir (örn. medikasyon, inaktivite, enfeksiyonlar).

Açlık kan örneği alındıktan sonra, hastalar 5 dakikalık süre içinde 150-300 mL su ile 75 gr glukoz içmelidirler. Çocuklar için glukoz miktarı 1,75 gr/kg olmalıdır (toplam 75 gr'ın üzerinde). Kan örnekleri testten önce (açlık) ve testin başlangıcından sonra ikinci saatte alınmalıdır (1).

Glukoz konsantrasyonu hemen ölçülmedikçe kan örneği sodyum floridli bir tüpte toplanmalı ve plazmayı ayırmak için hemen santrifüj edilmelidir. Glukoz ölçümü yapılan kadar plazma dondurulmalıdır. OGTT sonuçları Tablo 3. ve Tablo 4.'te verilen kriterlere göre yorumlanmalıdır.

Tablo 4. Diabetes mellitus tam kriterleri ve glisemi evreleri ^a (1)

	Glukoz konsantrasyonu, mg/dL Kapiller tam kan ^b	(mmol/L) Venöz plazma
Diabetes Mellitus		
Açlık	≥110 (≥6,1)	≥126 (≥7,0)
Glukozdan 2 saat sonra	≥200 (≥11,1)	≥200 (≥11,1)
Bozulmuş Glukoz Toleransı		
Açlık	<110 (<6,1)	<126 (<7,0)
Glukozdan 2 saat sonra	140-199 (7,8-11,0)	140-199 (7,8-11,0)
Bozulmuş Açlık Glisemisi		
Açlık	Uygulanamaz ^c	100-125 (5,6-6,9) ^c
Glukozdan 2 saat sonra	<140 (<7,8) ^d	<140 (<7,8) ^d
	<200 (<11,1) ^e	<200 (<11,1) ^e

a; 75 gr oral glukoz yüklemenden sonra ikinci saatteki değerler.

b; glukoz seviyeleri venöz tam kanda ölçülürse, yükleme dozu için cut-off değerleri değişkendir (27).

c; 2003 ADA tavsiyeleri (68), eşdeğer kapiller tam kan değerleri önerilmemiştir.

d; 1999 WHO tavsiyeleri (27).

e; 1997 ADA tavsiyeleri (26).

3.8. Gestasyonel Diyabetin Tam Kriterleri:

Diyabet olduğu bilinmeyen kadınlarda, gebeliğin 24-28. haftaları arasında GDM tarama testi yapılır. GDM değerlendirmesi iki yaklaşımdan biriyle yapılır. Biri hamile olmayanlardaki gibi 75 gr oral glukoz ile yapılan OGTT'dir. Birleşik Devletlerde yaygın olarak kullanılan alternatif bir metot iki evre göstermektedir. Öncelikle 50 gr oral glukoz yükünden 1 saat sonra plazma glukoz konsantrasyonunun ölçülmesidir. Venöz plazma glukoz değerleri 140 mg/dL veya daha yüksek olan kadınlara bir sonraki gün 100 gr veya 75 gr glukoz ile OGTT yapılır. Birleşik Devletlerde, obstetrisyenler arasında genele yayılmış 100 gr'lık OGTT kullanımı olduğu için ADA tarafından GDM' de tanısal değerler için 100 gr veya 75 gr oral glukoz kullanımı tavsiye edilmiştir (58) (Tablo 5.). WHO bir tek standart, bir gecelik açlıktan sonra 75 gr OGTT'yi tavsiye etmektedir. 250-300 mL su içinde 75 gr glukoz ağız yolu ile verilir, 2. saat sonunda plazma glukoz ölçümü yapılır (27). Bu testler farklı kadınlardaki yüksek riskli gebelikleri ve olumsuz fetal sonuçların farklı risklerini tanımlarlar (71,72).

75 gr test kullanımı dünyanın birçok yerinde geniş bir kabul görür, fakat Birleşik Devletlerde daha az kullanılır. WHO'nun görüşüne göre eğer bir kadın 2 saatlik plazma glukoz değerlerinde 140 mg/dL veya daha yukarı ($\geq 7,8$ mmol/L) değere sahipse veya açlık plazma glukoz değerleri 126 mg/dL ve yukarı ($\geq 7,0$

mmol/L) değere sahip ise veya tam kandaki glukoz ölçüm değerleri eşit ise, GDM olarak kabul edilir (Tablo 5.).

Tablo 5. ADA ve WHO gestasyonel diyabetin tanı kriterleri (1)

	ADA klinik uygulamaları ^a (58)		WHO (27)
	75 gr oral glukoz yükleme mg/dL(mmol/L)	100 gr oral glukoz yükleme mg/dL(mmol/L)	75 gr oral glukoz yükleme mg/dL(mmol/L)
Açlık	95 (5,3)	95 (5,3)	≥126 (≥7,0)
1. saat	180 (10,0)	180 (10,0)	
2. saat	155 (8,6)	155 (8,6)	
3. saat	uygulanamaz	140 (7,8)	≥140 (≥7,8)

a: iki veya daha fazla venöz konsantrasyonu karşılaştırılmalı veya pozitif tanı için genişletilmelidir. Test 8-14 saatlik açlıktan ve üç günlük kısıtlı olmayan diyet (≥150 gr karbonhidrat/gün) ve limitsiz fiziksel aktivite sonrası yapılır. Hasta oturmalı ve sigara içmemelidir.

ADA; American Diabetes Association, WHO; World Health Organization

3.9. Diabetes Mellitusun Komplikasyonları

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlarla seyreden bir hastalıktır. Kronik dejeneratif komplikasyonlar, en ciddi sağlık sorunlarından birini oluşturur. Uzun süre diyabeti olan olgularda tüm damarlarda bozukluklar gelişir. Değişiklikler hem kapiller ve arteriollerini yapan vasküler hücreleri, hem de bunların bazal membranlarını tutar. Bütün mikrovasküler yapılar tutulmuş olmasına karşın, klinik olarak ancak retina, renal glomerüller ve büyük sinirlerde patoloji ortaya çıkar (1). DM komplikasyonları Tablo 6.'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Diabetes mellitusun komplikasyonları

Akut komplikasyonlar
1. Hipoglisemi ve hipoglisemi koması
2. Diyabetik ketoasidoz koması
3. Hiperosmolar nonketotik koma
4. Laktik asidoz koması
Kronik komplikasyonlar
1. Diyabetik nefropati
2. Diyabetik retinopati
3. Diyabetik nöropati
4. Diyabetik ayak
5. Kardiyovasküler hastalık ve hipertansiyon

3.10. Diyabetik Mikrovasküler Komplikasyonların Mekanizmaları:

3.10.1. Vasküler Morfoloji ve Fonksiyon Değişiklikleri:

3.10.1.1. Genel Vasküler Değişiklikler:

3.10.1.1.1. Vasküler Hücrelerin Apoptozisi ve Büyümesi:

Proliferatif retinopatide endotel hücrelerin büyümesi açıktır, fakat diyabetik nefropati veya diyabetik kalbin mikro damarlarında endotel hücrelerin kaybı gözlenmiştir. Diğer yandan retinal mikrovasküler yapıların konsantrik hücreleri, retinal kapiller perisitler, diyabetik retinopatide kaybedilir, fakat vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonu aterosklerotik lezyonlarda artar.

Diyabetik hastaların retinal kapillerlerinde apoptotik yollar, endotel hücrelerinden ziyade perisitlerde aktive olurlar (73,74). Perisitlerdeki apoptozise galaktoz (75) ve hem yüksek glukoz konsantrasyonu (74) hem de ilerlemiş glikozilasyon son ürünleri (AGEs: advanced glycation end-products) (76) ile beslenme neden olabilir. Diyabetik hastaların kalp biyopsi örneklerinde endotel hücrelerinin ve kardiyomyositlerin apoptozisi birkaç kat artmıştır (77).

3.10.1.1.2. Bazal Membran ve Ekstrasellüler Matriks:

Diyabetik mikroanjiopati içindeki bir klasik morfolojik bulgu, bazal membranın kalınlaşmasıdır (78). Bu olay genelleştirilir ve hem vasküler hem nonvasküler dokuları etkiler. Bazal membran, doku bütünlüğünü korur, proliferasyon gibi hücre fonksiyonları değiştirir ve filtrasyon bariyeri oluşturur. Bazal membran, hücreleri interstisyel boşluktan veya farklı tipteki hücrelerden ayırır. Bazal membran böbrekteki glomerullerde, Bowman kapsülünün epitelyal hücreleri ve kapillerlerin endotel hücreleri arasına yerleşir. Bazal membran retinada, kapiller endotel hücreleri ve perisitleri ayırır. Bazal membran proteinleri, çeşitli hücre tipleri tarafından sentez edilir. Bazal membranın kimyasal bileşenleri, kollojenler öncelikle tip-IV, kandroitin, heparin sülfat, proteoglikanlar ve laminin gibi çeşitli glikoproteinlerdir (79-81).

Retinadaki kapiller bazal membran, yaşla birlikte kalınlaşır (82), fakat diyabetik hastalarda ve diyabetik hayvan modellerinde hızlanan oranda kalınlaşır (83). Böbreklerde ekstrasellüler matriks artışı, glomeruler bazal membran kalınlaşması, mezangium genişlemesi ve tubulointerstisyel fibrozis gibi aşıkardır (81). Normal ekstrasellüler matriksin önemli bir parçası olmayan bazı ekstrasellüler proteinler diyabette tarif edilmiştir. Bununla birlikte diyabetlilerde aşırı tespit edilmiş

birçok ekstrasellüler proteinler, normal mezangium ve bazal membranın parçalarıdır. Kollojen tip IV ve fibronektin diyabetlilerde aşırı salgılanmaktadır (81).

Diyabetiklerde ekstrasellüler matriks proteinlerinin salınımı artmıştır. Glomerullerde üretimi artan diğer önemli mediatörler anjiotensin (AT)-II, transforming growth faktör- β (TGF β) ve bağ doku büyüme faktörü (Connective Tissue Growth Factor, CTGF)' dir (81). Ek olarak ekstrasellüler matriks protein degradasyonu ve metalloproteinazlar (MMP) tarafından katalizlenmesi azalır. MMP' ların mRNA salınımı diyabetiklerde ve diyabetik hayvan modellerinde azalmıştır (81). MMP plazmin tarafından veya MMP2 varlığında membran tip MMP1 tarafından aktive edilir. Diyabetiklerde hem plazminin hem de membran tip MMP1 aktivitesi azalmıştır (84). Ayrıca MMP1'in doku inhibitörü diyabetiklerde artmıştır (85).

3.10.1.1.3. Endotel Fonksiyonu:

Kan akımı, otonom sinir sistemi ve dolaşımdaki hormonlar tarafından regüle edilmesinden başka, endotelden salınan maddeler tarafından da kontrol edilir. Diyabetin her iki tipinde de endotel bağımlı vazodilatasyon azalır. Artmış glukoz kontrastrasyonu ile ilişkili kısa periyotlardan sonra endotel disfonksiyonu görülebilir. Yüksek glukoz konsantrasyonundan altı saat sonra, ex vivo tavşan aortasında (86) ve sağlıklı insanlarda endotel bağımlı vazorelaksasyon azalır (87).

Nitrik oksid (NO), endotel bağımlı vazodilatasyonun önemli bir mediatörüdür. Kedilerde, koroidal kan akımı fasial sinir ile uyarıldığı zaman, kan akışındaki artışın tamamen NO'e bağımlı olduğu görülmüştür (88). Diyabetiklerde, NO bağımlı kan akışının azalması sonucunda, retinal kan akımında da düşüş olabildiği gözlemlenmiştir (89).

Erken STZ bağımlı diyabette, vasküler sızıntı, artan NO üretimine bağımlı olarak ortaya çıkar (90).

3.10.1.2. Doku Spesifik Vasküler Değişiklikler:

3.10.1.2.1. Retinadaki Vasküler Değişiklikler:

Endüstrilemiş toplumlarda, diyabetik retinopati, körlüğün başta gelen nedenlerindedir (91). Retinal mikrodamarların yapısındaki ve fonksiyonundaki patolojik değişimler, diyabetik retinopatinin en büyük nedeni olarak kabul edilir (92,93). Kapiller bazal membranın kalınlaşmasını içeren yapısal değişiklikler, damar geçirgenliğini, retinal perisitlerin kaybını ve kapiller mikroanevrizmaların oluşumunu artırır. Bu yapısal değişikliklere, retinal kan akışındaki azalma, kapiller

oklüzyon, anjiogenezis, hemoraji, fibrotik doku oluşumu, retinal ayrılma eşlik eder. Bu olayların bazıları tek başına veya birlikte oluştuklarında tam veya kısmi görme kaybına neden olabilir (92).

Fizyolojik şartlarda retinal kapillerler, 1:1 oranındaki endotel hücreleri ve kontraktıl perisitlerden oluşur (94,95). Bu oran, nonproliferatif retinopatinin ılımlı şiddetteki evrelerinde, 1:10 oranına kadar düşer (96,97). Perisit kaybı alanları, genellikle mikroanevrizma oluşumu ile birlikte dir. Perisitler ve kapiller endotel hücreleri arasında yaygın bir etkileşim vardır ve endotel hücreleri ve vasküler yapının bütünlüğünün devamı için perisitlerin varlığı gereklidir. (98-100). Perisitlerin kaybı, mikroanevrizma, asellüler kapillerler, retinal kan akımı azalmasına, permeablite artışına ve lökostazise neden olur (98,100).

3.10.1.2.2. Diyabette Renal Vasküler Yapılar:

Akut glomeruler hipertrofi, diyabetin erken dönemlerinde meydana gelir (101,102), fakat mezangial matrikste ki progresif artış ile filtrasyon alanında azalma ile sonuçlanan kapiller yüzey alanında bir kayıp mevcuttur. Bazal membran yapısındaki değişiklikler, permeablite değişikliğine, glomeruler matriks birikimine neden olur, sonuçta glomeruler oklüzyon, fibrozis ve filtrasyon kapasitesinde azalma olur.

Glomeruler bazal membran, bowman kapsülü vasıtasıyla tubuler bazal membran ile devam eder. Erken diyabetik renal hastalıkta, bazal membran kalınlaşması ve mezangium genişlemesi dominant morfolojik özelliklerdir. Glomeruler bazal membran kalınlaşması ilk olarak Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanmıştır (103). Diyabetik nefropati patolojisindeki hemodinamik faktörler, sistemik ve glomeruler basınç artışıdır. Kapiller permeablite değişkendir, moleküler ağırlıkları 40-150 kDa olan proteinlerin atılımı artmıştır. Sonuç olarak diyabette albumin atılımı erkenden artar ve glomeruler filtrasyon hızı yükselir, bu durum insülin tedavisi ile (104) veya adacık hücre transplantasyonu ile (105) normale döndürülebilir.

Glomeruler hemodinamideki değişiklikler kısmen dolaşımdaki AT-II ve endotelin-1 gibi parakrin faktörlere bağımlıdır (106).

3.10.1.2.3. Sinirlerdeki Vasküler Değişiklikler:

Diyabetik nöropatinin, diyabetik hastalardaki prevalansı %50'den fazladır (107). Patogenezi multifaktöriyeldir, hem nöronları etkileyen hipergliseminin neden olduğu patolojik değişiklikler (108), hem de azalmış nörovasküler kan akışı yoluyla

iskeminin neden olduğu nöral hasar (109) olarak düşünülebilir. Vasküler elementlerden dolayı, diyabetik nöropati, mikrovasküler komplikasyon olarak düşünülür. Histolojik olarak diyabetli hastaların endonöriumlarında, endotel hücre alanında ve kapiller lümen darlığında artış gösterilebilir (110).

3.10.1.2.4. Kalpteki Mikrovasküler Değişiklikler:

Diyabetli hastalar, kronik kalp yetmezliği yüksek prevalansına (111), akut myokard infarktüsü sonrası kalp yetmezliği yüksek insidansına ve infarktüs tekrarlanması riskine sahiptir (112). Çok yaygın koroner aterosklerozis ve hipertansiyon yüksek prevalansı veya çok büyük infarktlar bu populasyonda diyabet olmaksızın açıklanamaz. Sebepler büyük ihtimalle diastolik disfonksiyon (113) ve myokardial iskemi esnasındaki yetersiz neovaskülarizasyondur (114).

Bir otopsi çalışması gösteriyor ki, myokard infarktüslü diyabetik olmayan hastalardaki kapiller yoğunluğu, normal kalplerden daha yüksektir, fakat myokard infarktüsü geçirmiş diyabetik hastaların kapiller yoğunluğu normal kalpten daha düşüktür (115). Aynı gözlemler diyabetin hayvan modellerinde de yapılmış (116,117) ve artmış kapiller permeablite rapor edilmiştir (118). Kardiyak anjiogenesis ve kollateral oluşumu; vasküler endotelyal growth faktör (VEGF), fibroblast growth faktör (FGF), platelet-derived growth faktör (PDGF) ve anjiopietinleri içeren geniş spektrumlu proanjiogenik ve antianjiogenik faktörler tarafından idare edilir (119).

Diyabette diffüz kardiyak fibrozis gözlenir (120) ve bu fibrozis diastolik disfonksiyona katkıda bulunabilir. Diyabetik kalpte de, diyabetik böbrek patolojisinde olduğu gibi ekstrasellüler matriks artışı görülür (121,122).

3.10.2. Diyabette Mikrovasküler Patolojinin Mekanizmaları:

İnsülin etkilerinin parsiyel kaybı (β hücre yıkımı, disfonksiyonu veya periferik insülin rezistansına bağlı), hiperglisemi izlenmesi ve metabolizmanın diğerk rahatsızlıkları, hücre fonksiyonlarında, ekstrasellüler matrikste, organ fonksiyonlarında, vücut fizyolojisinde çok derin sonuçlara neden olur (1).

3.10.2.1. Sistemik Faktörlerin Neden Olduğu Lokal Değişiklikler:

3.10.2.1.1. Hipertansiyon:

Mikrovasküler disfonksiyon ve patoloji hipertansiyonu başlatabilir. Örneğin, diyabetlilerde gözlenen glomeruler hiperfiltrasyon sistemik hipertansiyona neden olabilir. Hipertansiyon indirekt olarak mikrovasküler komplikasyonların nedeni

olabilir. Hipertansiyon tek başına mikrovasküler komplikasyonların gelişimi için yeterli değildir (1).

3.10.2.1.2. Sempatik Sinir Sistemi:

Sempatik sinir sisteminin aşırı aktivitesi, diyabetin her iki tipinde de, hipertansiyonun gelişiminde katılımcı bir faktör olabilir (123). Buna ek olarak, insülinin sempatik sinir sisteminin aktivasyonu sırasında vazokonstrüktör etkilere sahip olduğu düşünülür, fakat sempatik aktivasyonun insülin tarafından uyarılması, insülin rezistansı durumlarında değişkendir (124). Diyabetin geç evrelerinde, sempatik denervasyona vasküler tepkiler değişebilir (124). Aşırı sempatik aktivite, insülin rezistansı ve otonomik disfonksiyonun nicel olarak diyabetteki vasküler fonksiyona katkıda bulunup bulunmadığı bilinmiyor.

3.10.2.1.3. İlerlemiş Glikozilasyon Son Ürünleri (AGEs):

Şekerler tarafından ekstrasellüler ve intrasellüler proteinlerin irreversible olarak değiştirilmesi, AGEs oluşumu ile sonuçlanabilir (125). Bu reaksiyon, nonenzimatik bir halde Amadori ürünü (1-amino 1-deoxyfructose adducts to lysine) vasıtasıyla, glukoz ve protein arasında yer alabilir. Bununla birlikte hızlı reaksiyonların çoğu proteinlerle, 3-deoxyglucosone, glyoxal ve methylglyoxalın da dahil olduğu intrasellüler dikarboniller arasında gerçekleşir. ROS ile bu işlemler hızlandırılır (126), belki gliseraldehid fosfat dehidrogenaz inhibisyonu (bunların başında triose fosfat formasyonunun artımı ve methylglyoxal üretiminin artımı) ile hızlandırılır (127). Karboksimetil-lizin en yaygın AGEs dir (128,129). Diğer non enzimatik değişim, proteinlerin çapraz bağlarında oluşur. Çünkü proteinlerin uzun turnoveri nedeniyle kollojen gibi ekstrasellüler proteinler kısmen AGEs değişikliğine hassastır. Diyabetin her iki tipinde de, retina (130) ve glomeruller (131) gibi birçok dokuda AGEs açıklanmıştır. AGEs, NO yıkımını kolaylaştırarak vasküler uyarıya müdahale edebilir (132). Ek olarak AGEs, endotelial hücrelerde FGF'ün indirgenmesi ile intrasellüler proteinlerin fonksiyonlarını zayıflatır (133). AGEs ayrıca ekstrasellüler matriksin özelliklerini değiştirir (kollojen, laminin, heparansülfat etkilenir).

AGEs formasyonunun bir inhibitörü olan aminoguanidin diyabetin hayvan modellerinde, nefropati (134) ve retinopatiji (135) önlemede etkili görülmüştür. İlginçtir ki anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü ramipril tedavisi, AGEs formasyonu inhibitörü gibi, renal AGEs birikimini azaltır. Aminoguanidin belki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz aktivasyonunu önler

(NADPH formunu azaltır) (136). Diyabetik mikrovasküler komplikasyonların tedavisi için AGEs inhibitörü kullanılan klinik denemelerin sonuçları, henüz yeterli değildir.

3.10.2.1.4. Vasküler İnflamasyon:

Diyabette, damarlarda inflamasyon sürecinin tipik elementleri aşıkardır (137). Lökositler için yol gösterici olan vasküler adezyon moleküllerinin, damar duvarından salınımı artmıştır, bu artıştaki asıl neden erken inflamasyonu kontrol etmektir. İntrasellüler adezyon molekülü-1'in bloke edilmesi, lökostazis ve retinal vasküler sızıntıyı önler. Proinflamatuvar sitokin tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda, lökostazis ve retinal vasküler sızıntıya neden olur (138). Bazı hayvanlarda, yüksek doz aspirin, siklooksijenaz-2 inhibitörü meloksikam veya TNF- α reseptör blokörü etanercept, artmış intrasellüler adezyon molekülü-1 salınımını, lökostazisi, kapiller sızıntıyı ve endotelial nitrik oksid sentetaz (eNOS) upregülasyonunu önler (138). İnflamasyon bundan dolayı diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarının gelişiminde bir rol oynayabilir, fakat bilgiler yetersizdir.

3.10.2.2. Değişmiş Metabolizmanın İntrasellüler Sonuçları:

3.10.2.2.1. Artmış İntrasellüler Glukoz Konsantrasyonu:

Hipoglisemik ilaç tedavisinin aralıklı denemeleri kesinliği tartışılmaz bir şekilde hiperglisemi ile mikrovasküler komplikasyonların gelişimi ve progresyonuna bağlıdır (139-141). Düşük kan glukoz seviyesi aterosklerotik komplikasyonları önlemede daha az başarılıdır, bu faktörün makrovasküler komplikasyon gelişimi için hiperglisemiden daha önemli olduğu ileri sürülür.

Artmış sellüler glukoz uptake ve artmış intrasellüler glukoz konstrasyonu, sellüler homeostazis değişikliklerine neden olur. Dokularda insülin rezistansının önlenmesi glukoz uptake'ni azaltır. İnsülin rezistansı aşırı intrasellüler glukoz konstrasyonundan sakınmak için kompensatuar mekanizma gibi görünmektedir (142). Aort endoteli ve düz kas hücreleri GLUT-1 (glukoz transport proteindir, insüline bağımlı değildir.) salgılar, fakat GLUT2 ve GLUT 5 salgılamaz (143).

3.10.2.2.2. İntrasellüler İndirgenme Durumları ve Oksidatif Stres:

Oksidatif stres, ROS ve sellüler antioksidan savunma sistemi arasındaki dengesizliktir (144,145). Oksidatif stres, glukoz metabolizmasının değişiminden sonuçlanabilir veya glukoz metabolizmasında direkt olarak yer almayan çeşitli enzimlerin, disregülasyon veya aktivasyonuna sekonder olabilir. Diyabette intrasellüler GSH'nun indirgenmiş formunda eksiklik vardır (146). Fakat nefropati

ve retinopatinin şiddeti ile ilişkili ekstrasellüler plazma süperoksit dismutaz artar (147). Oksidatif stres, diyabetin komplikasyonları tarafından etkilenmiş organlarda görülür, böylece diyabetli hastaların gözlerinde vitreusta oksidatif metabolitlerin düşük seviyeleri, iyi kan glukoz kontrolü ile birlikte (148). Oksidatif strese karşı müdahalenin, hayvan modellerinde organ hasarını önlediği gösterilmiştir (149-152).

3.10.2.2.2.1. Polyol Yolu:

Artmış sellüler glukoz uptake'ı polyol yolu boyunca glukoz akışını artırır. Polyol yolu, sorbitol yolu olarak da bilinir ve bu yolda aldoz redüktaz reaksiyonu ile NADPH tüketilir, sorbitol redüktaz reaksiyonu ile nikotinamid adenin dinükleotid indirgenir (153).

Aldoz redüktaz inhibisyonu diyabetik köpeklerde (154) ve diyabetli hastalarda (155) nöropatiyi azaltır. Fakat diyabetik hayvan modellerinde eski çalışmalar retinopati veya nöropati üzerindeki etkiyi dikate alan ümit verici bir durum göstermesine rağmen, diyabetli hastalarda böyle etkiler görülmemiştir (154,156).

3.10.2.2.2.2. Pentoz Fosfat Yolu:

Artmış glukoz konsantrasyonu değişik bir mekanizmayla glukoz-6 fosfat dehidrogenazı inhibe edebilir. Glukoz-6 fosfat dehidrogenaz intrasellüler NADPH'ın primer kaynağı olan pentoz fosfat yolundaki ilk reaksiyonu katalizler (157-159).

3.10.2.2.2.3. Mitokondride Süperoksit Üretimi:

Mitokondride sitrik asit siklusu, nikotinamid adenin dinükleotid ve flavin adenin dinükleotid üretir, bunlar mitokondri iç zarında, proton gradienti yaratarak hareket eden elektron transport zincirinin elektron vericileridir. Eğer intrasellüler glukoz konsantrasyonu artarsa, proton gradienti yüksek olur, elektron zincirinde elektron transportu Coenzim Q üzerinden inhibe olur (160). Sonuçta elektronlar moleküler oksijene transfer olur ve süperoksit üretirler.

3.10.2.2.2.4. Vasküler Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz:

Vasküler duvardaki süperoksidin en önemli kaynağının, NADPH oksidaz olduğu düşünülüyor. Bu NADPH oksidaz, fagositik NADPH oksidaza benzer, fakat nikotinamid adenin dinükleotid'i bir substrat gibi görür (161). Bu oksidaz, endotel hücreleri (162) ve damar düz kas hücrelerinden salınır (139). Tip 1 ve Tip 2 diyabetik rat modellerinde vasküler NADPH oksidazın aktivitesi ve salınımı artmıştır (163,164).

3.10.2.2.2.5. Endotelial Nitrik Oksid Sentetaz Disfonksiyonu:

Oksidatif stres, NO degradasyonu ile NO bağımlı endotel fonksiyonlarını inhibe eder (165). Alternatif olarak, eNOS kofaktörü olan tetrahidro bioptherinin aktif ve indirgenmiş formunun intrasellüler konsantrasyonunun azalmasında öncülük eder.

3.10.2.2.2.6. Tirozin Nitasyonu:

Süperoksit, NO ile yüksek oranda reaksiyona girer. Bu ürün yüksek oranda reaktif peroksinitratdır. İntasellüler moleküller ile reaksiyona girebilir. Böyle hedeflerden biri proteinlerin tirozin rezidüleridir, bu reaksiyon tirozin nitasyonu ile sonuçlanabilir (90).

3.10.2.2.2.7. Oksidatif Stresin Diğer Kaynakları:

Yüksek glukoz konsantrasyonu, ksantin oksidaz aktivasyonu (166), glukoz otooksidasyonu (167), keton cisimlerinin formasyonu sonrasında (168) veya LPO sırasında (144) oksidatif stresi yönetebilir.

3.10.2.2.2.8. Antioksidan Koruma:

Antioksidan koruma diyabetiklerde ROS'un üretimine karşı kompensatuar mekanizma gibi artmış olabilir.

3.10.2.2.3. Hekzosamin Yolu ve Oksijen Bağımlı Glikozilasyon:

Nükleer ve sitozolik proteinlerin posttranslasyonel değişiklikleri serin ve treonin rezidüleri üzerinde oksijen bağımlı glikozilasyon gibi meydana gelir. Bu dinamik değişiklikler proteinlerin fonksiyonlarını değiştirirler (169). Diyabetlilerde bazı proteinlerin oksijen bağımlı glikozilasyonu artmıştır.

3.10.2.3. İntasellüler Sinyal İletiminde Değişiklikler:

3.10.2.3.1. Protein Kinaz-C Aktivasyonu:

Diyabetiklerde, vasküler dokularda protein kinaz-C (PKC) aktive edilir. PKC'nin en az 12 izoformu vardır ve bunların 9'u fosfolipid diaçilgliserol (DAG) tarafından aktive edilir. Diyabetiklerde vasküler dokularda intrasellüler DAG, gliseraldehid 3-fosfat ve fosfotidik asit yoluyla (170) veya non esterifiye yağ asitlerinden glukozun de nova sentezi sırasında artabilir (171,172). Teorik olarak, PKC diyabetiklerde DAG sentezinden bağımsız aktive olabilir.

Vasküler PKC aktivasyonu, endotelial disfonksiyona neden olur (173). Yüksek glukoz konsantrasyonları esnasında, bozulmuş endotel bağımlı relaksasyon, PKC inhibitörü ile önenebilir (173). STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda, PKC-B'nin selektif inhibitörünün oral verilmesi endotel disfonksiyonunu önler (174).

DAG'ın artmış konstrasyonu ve PKC aktivasyonu proksimal tubul hücrelerinde artmış AT-II salınımı ile sonuçlanır (175).

3.10.2.3.2. Selektif Vasküler İnsülin Rezistansı:

Zayıf, sağlıklı kişilerde, insülin iskelet kasında kan akımını stimule eder (176), fakat bu etki obez veya Tip 2 diyabetlilerde körelmiştir (177). İnsülinin uyardığı kan akışının, iskelet kaslarında insülin tarafından uyarılan glukoz uptake ile sınırlanıp sınırlanmadığı tartışmalıdır (178). Retinal ve böbrek kan akımı ayrıca sistemik hiperinsülinemi ile uyarılır (179,180).

İnsülin ile uyarılmış vazorelaksasyon, kan damarlarında endotelden salınan NO aracılı direkt etkidir ve hormonlardan veya otonom sinir sistemi aktivasyonundan bağımsızdır (181-183).

İnsülin hızlı posttranslasyonel mekanizmalarla, örneğin eNOS gen ekspresyonu ile olduğu gibi (184) endotelyal NO üretimini artırır (185).

3.10.2.3.3. Mitogenin Aktive Ettiği Protein Kinaz:

Yüksek glukoz konsantrasyonlarında c-jun NH₂-terminal kinaz, damar düz kas hücreleri (186) ve endotelyal hücrelerde aktive olur (187). C-jun NH₂-terminal kinaz apoptozise öncülük eder (187).

3.10.2.4. Ekstrasellüler Sinyal Moleküllerinin Anormal Regülasyonu:

3.10.2.4.1. Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Hücre Büyümesinin Diğer Düzenleyicileri:

3.10.2.4.1.1. Vasküler Endotelyal Growth Faktör (VEGF):

Vasküler endotelyal growth faktör, başlangıçta vasküler permeabiliteye aracılık eden bir faktör olarak tanımlanırdı. VEGF nin angiogenesis potent mediatörü olduğu bulunmuştur (188). Diyabetik retinopatide, VEGF neovaskülarizasyon ve artmış vasküler geçirgenliğin (bunlar görme kaybında anahtar faktörlerdir) anahtar düzenleyicisidir. Diyabetli hastalarda, oküler sıvılarda VEGF konsantrasyonu ve salınımı artar (normal retinalarda nadiren tespit edilir) (189). Diyabetli hastaların retinalarında, özellikle endotel hücreleri ve perivasküler bölgelerde artar (190). Retinal VEGF reseptörleri diyabet olmayan hayvanlarda tespit edilmez, fakat STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda güçlü bir şekilde salındığı görülür (191). Diyabetli hastaların ve STZ ile diyabet oluşturulmuş ratların böbreklerinde artmış VEGF seviyesi ve reseptörü bulunur (192,193).

3.10.2.4.1.2. Platelet Derived Growth Faktör (PDGF):

Platelet derived growth faktör'un vitreustaki konsantrasyonu proliferatif retinopatili hastalarda artar (194). PDGF parakrin/otokrin mekanizmalarla retinal endotel hücrelerinin büyüme faktörü gibi davranır (195). PDGF salınımı yüksek glukoz konstrasyonlu perisit kültürlerinde ve STZ ile diyabet oluşturulmuş ratların retinasında artar (196). Yüksek glukoz konstrasyonu çeşitli vasküler hücrelerde PDGF-B reseptörlerinin salınımını artırır (197).

3.10.2.4.1.3. Transforming Growth Faktör- β (TGF- β):

Transforming growth faktör- β , Tip-2 diyabetlilerin böbreklerinden salgılanır, fakat net bir renal salınım sağlıklı insanların böbreklerinde de vardır (198). Tip 2 diyabetli retinopatili hastalarda TGF- β mRNA salınımı yüksektir.

3.10.2.4.1.4. Bağ Doku Büyüme Faktörü (CTGF):

Bağ doku büyüme faktörü diyabetik nefropatili hastaların glomerullerinde vardır, sağlıklı bireylerde yoktur (199). Yüksek glukoz konsantrasyonu mezangial hücrelerde CTGF salınımına neden olur, bu olay TGF- β antikoru ile engellenebilir (200,201). Glomerulosklerozis için tanımlanmış mekanizmalarla, diyabetiklerde CTGF aracılığı ile myokardiyal fibrozis oluşturan mekanizmalar paralellik gösterir.

3.10.2.4.1.5. Growth Hormon / İnsülin Like Growth Faktör:

Tip 1 diyabette büyüme hormonu (GH) hipersekresyonu olur ve diyabetik nefropatiye sebep olabilir (202). GH'nun hipersekresyonu insülin like growth faktör (IGF-1)'ün azalmış plazma konsantrasyonunun bir sebebi olabilir (202). IGF-1 dokulardan lokal olarak aşırı salınmış olabilir. Diyabetik hayvanlarda böbreklerde IGF-1 üretimi artar ve IGF-1, mezangial hücrelerden ekstrasellüler matriks proteinlerinin üretimini uyarır (81). GH ve IGF-1 diyabetik retinopatide rol oynayabilir.

3.10.2.4.2. Renin Anjiotensin Sistemi:

Çok sayıdaki klinik çalışma, ACE inhibitörleri, AT-I reseptör blokerleri veya kombine tedavilerin renal hastalık oluşmasını önleyebildiğini veya renal yetmezliğin progresyonunu geciktirdiğini göstermiştir (203). Bazı çalışmalar diyabetik retinopatide ACE inhibitörleri ile tedaviyi destekler (203).

Tip 2 diyabetli hastalarda nefropatinin varlığı için, hipertansiyon bağımsız bir risk faktörüdür (204). Diyabetik nefropatiyi önleyen ACE inhibitörlerinin etkileri, sadece antihipertansif etkileri ile açıklanamaz (205). Teorik olarak nefropatiyi önlemede ACE inhibitörlerinin mekanizması, bir bradikinin proteolizisi gibi

olabilirdi. Proksimal tubullerde ve mezangial hücrelerde yüksek glukoz konsantrasyonunda AT-II sekresyonu artar (175,206). Diyabetiklerde AT-II üretiminin artması, reninin düşük sistemik plazma konsantrasyonu ile açıklanabilir (207), AT-II negatif feed back mekanizma ile renin üretimini baskılar (208).

3.10.2.4.3. Endotel Kaynaklı Vazodilatatör ve Vazokonstriktör Faktörler:

3.10.2.4.3.1. Nitrik Oksid:

Glukoz bağımlı endotelial vazodilatatör disfonksiyonu görülür, ROS'ni de içine alan geniş kapsamlı nedenleri vardır. NO ile direkt reaksiyona girerler. NO üretimindeki azalmadan sorumlu mekanizma anlaşılmamıştır. eNOS proteinlerinde downregülasyon rapor edilmiştir (209). Fakat eNOS mRNA ve protein upregülasyonu, artmış süperoksit üretiminin eşlik ettiği (NO indirgenebilir) sonuçlar, bu bulguları yalanlamaktadır.

3.10.2.4.3.2. Prostosiklin:

Yüksek glukoz konsantrasyonunda kültüre edilmiş endotel hücrelerinde tirozin nitrosasyonu, prostasiklin sentetazın aktivitesini azaltır (210,211). Bu apoptozis ve adezyon moleküllerinin salınımını artırır. Belki Prostoglandin H2 gibi prostasiklin prekürsörlerinin konsantrasyonunu artırarak bu etkiyi yapar (210).

3.10.2.4.3.3. Endotelin-1:

Tip 2 diyabetlilerde endotelial disfonksiyonun önemli bir nedeni de endotel kaynaklı endotelin-1'in artmış salınımıdır. En etkili vazokonstriktör olarak bilinir (212).

3.11. Hücre Adezyon Molekülleri (CAM):

Hücre adezyon molekülleri, birçok hücrenin yüzeyinden salınan glikoprotein moleküllerinden oluşan yapılardır. Bunlar hücrelerin birbirlerine, endotel hücrelerine veya ekstrasellüler matrikse bağlanmalarını sağlayan yüzey proteinleridir. Geniş çapta yapılan birçok çalışmada adezyon moleküllerinin homofilik ve heterofilik mekanizmalar ile hücre-hücre ve hücre-substrat gibi farklı bağlantılar oluşturduğu gözlenmiştir (213). Adezyon moleküllerinin reseptörlerine ve ligandlarına bağlanmaları ile oluşan cevap ve etkileşim sayesinde rol oynadıkları bazı fonksiyonları şöyle sıralayabiliriz;

- Doku/organ gelişimi ve hücre çoğalması,
- Embriyogenez,
- İmmün ve enflamatuvar hücrelerin enflamasyon bölgesine göçü,

- İmmün yanıtın başlatılması ve yayılması,
- Ekstrasellüler matriksten hücreye bilgi akışı,
- Yara iyileşmesi,
- Kanser metastazı.

Moleküler biyoloji çalışmalarında transmembran düzeyinde birçok CAM bulunmuştur. Bunlar integrin, kadherin, selektin ve immünooglobülin süper ailesidir (214).

İntegrinler hücrel matriks proteinleriyle etkileşim halinde olan bir protein ailesidir. İntegrin fonksiyonunun bozulması ergin ratlarda hipokampusun CA1 bölgesindeki long term potentiation'un (LTP) bozulmasına sebep olur (215). İntegrinler ayrıca motor sinir terminallerinde serbest kalan nörotransmitterin artmasını uyaran güç demek olan kısa dönem sinaptik plastisiteye katkıda bulunur (216). Son çalışmalarda tirozin kinaz sinyallerini etkilediği bulunan integrin-associated proteinin ratlarda hafıza performansını etkilediği çok açık bir şekilde görülmüştür (217,218).

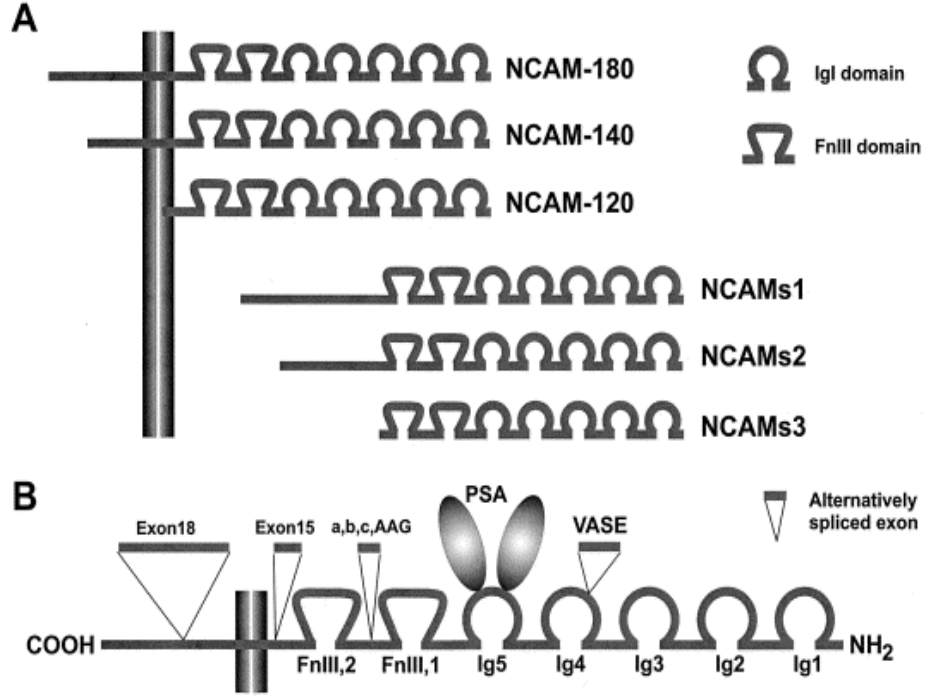
Kadherinler, hücre tanınmasında ve gelişme esnasındaki bağlantılarda önemli bir rol oynadığı bilinen protein ailesidir. Kadherinler erginlerde hipokampus ve ön beyinde eksprese edilirler ve sinaptik kısımlarda lokalize olurlar (219-222). Kadherinlerin sinaptik lokalizasyonda yer almadaki ısrarı sinaptik plastisitede potansiyel bir rolünün olduğunu göstermektedir (223). Kadherin fonksiyonunun engellenmesi temel sinaptik özelliklere etki etmeksizin sadece LTP'yi etkilediği için kadherinlerin sinaptik plastisitede sadece yapısal görevi olmasından ziyade bir sinyal rolü bulunduğu düşüncesini olası kılar. Kadherinlerle etkileşim halinde olan sitoplazmik protein ailesinden olan kateninler, kadherinler tarafından başlatılan sinyal olaylarının aracılardır. Kateninler genç ve ergin nöronların sinapslarında bulunmaktadırlar (223,224).

Aktive immünooglobülinler (Ig) yaklaşık olarak 100 aminoasit içeren iki beta tabakasından oluşmuştur. Ig homolog ünitesi sabit (C1-set, C2-set), değişken (V-set) ile intermediate (I-set) kısımlarını içerir (214,225) (Şekil 2.). Bu yapı anti paralel β -zincirleri ve sayısı farklı olan, sistein etrafında aminoasit dizilerini içerir. Bunlar hücre içindeki iskelet sistemine bağlanan tek geçişli transmembran glikoproteinlerdir. Bazı çalışmalarda Ig familyasının hem sinaptogenez hem de sinaptik plastisiteye katıldığı bildirilmiştir (226,227). Ig süperailisi üyeleri tarafından aracılık edilen hücre-hücre bağlantıları sadece nöronlar arasında değil aynı zamanda

nöronlarla glialar arasında da bulunabilir. Nöronlarla glialar arasındaki bağlantılar sinaptik düzenlemelere de ayrıca katılabilirler (228,229).

CAM'leri hücre dışı matris komponentlerinin yanısıra hücrelerle diğer hücrelerin arasındaki bağlantılara aracılık ederler ve böylelikle sinaptik plastisitedeki değişiklikleri etkilerler. Bunların yanısıra, CAM'lerinin nöron gelişmesinin dahil olduğu ilk etapdaki hücrel cevaplarda hücreler arası sinyal transdüksiyon akımını aktive ettiği gözlemlenmiştir (230). Bunlara ek olarak belirli CAM'lerinin ekspresyonları nöronal aktiviteyle etkilenebilir (231). CAM'leri hücre içi ve dışı sinyallere aracılık ederler. CAM'ın gelişme esnasında nöronal bağlantıların formasyonu için önemli olduğu ve son zamanlarda yapılan çalışmalarla NCAM'ın sinaptik plastisiteye katıldığı öne sürülmüştür (232-234).

NCAM'leri iyi bilinen CAM'lerinden biridir (235). NCAM' de, Ig süper ailesi içinde incelenen protein yapılarıdır. NCAM molekülü N terminaline özgü 5 adet C2 bölgesi içerir. NCAM yapıları, ekstrasellüler kısmına tutunmuş uçlarında 5 adet Ig bölgesi (Ig-I) ve 2 adet fibronektin homolog bölgesi (Fn-III) içermektedir (Şekil 2.) (225). 5 Ig bölgesi de polisialik asit (PSA) içeren bölgelere sahiptir, bu bölgeler hafıza ve öğrenmede önemli roller üstlenir. NCAM salınımı sadece sinir sisteminde değil, ayrıca beyin omurilik sıvısı, amniyon sıvısı, plazma, kalp kası ve çizgili kas gibi yapılarda da bulunur. NCAM ekspresyonunun kalbin innervasyonu ve morfogenezinin dahil olduğu çoğu morfogenetik olayda da önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (236-238). NCAM'ın yüksek seviyeleri mizaç bozukluğu, şizofrenli hastaların beyin-omurilik sıvısında, kimyasal beyin tahribi durumunda gözlemlenmiştir (14,239). Bu yüzden NCAM'ın beyin patolojisi ve plastisitesinde önemli bir rol oynadığı düşünülür (240). Bu moleküller ayrıca hücrel göç, aksonal gelişme, sinaptik plastisite ve çevresel aksonların rejenerasyonuna katılırlar (241-244). NCAM sadece merkezi sinir sisteminde yapısal organizasyona katılmaz aynı zamanda ergin beyinde sinaptik modifikasyonlara da katılır. Bunlara ek olarak periferel sinirlerin çıkarılmasından sonra NCAM ekspresyonunun yükseldiği gözlemlenmiş ve bu da NCAM'ın rejenerasyona katkıda bulunabildiği düşüncesine bizleri yönlendirmiştir (245-247).



Şekil 2. (A) Üç major NCAM izotipinin genel yapıları; hücre zarı ile ilişkisi. (B) NCAM izotiplerinin alternatif birleşmeler ile farklı adezyon molekülleri ve PSA ile olan bağlantısı (225).

3.11.1. Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Yapısı ve Özellikleri:

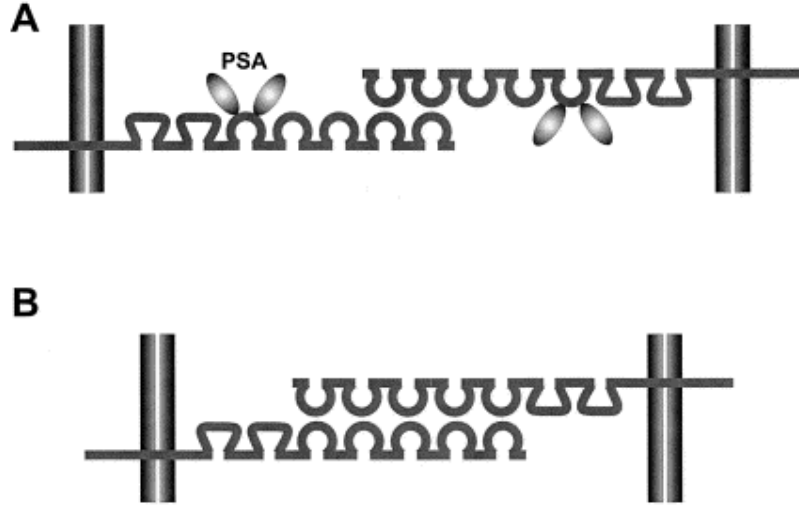
Nöral hücre adezyon molekülleri, nöronal plastisitede sinaps oluşumuna katılan moleküllerin başında gelir. NCAM'ın hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimleri ile nöron gelişmesini arttırmada düzenleyici olarak hareket eden yüzey glikoproteinleri olduğu bilinmektedir (248-251). Farklı bağlantılarla oluşmuş beyinde molekül ağırlıkları 120, 140, 180 kDa olan 3 major NCAM izoformu bulunmuştur (225,252). Bunlardan NCAM-180 ve NCAM-140 formları hücre dışından hücre içine doğru COOH zincirleri ile uzanmış transmembran proteinleri iken, NCAM-120 sadece hücre membranına kadar uzanır. NCAM-120 molekülü ise glikosilfosfatidil inositol vasıtasıyla membrana tutunurlar ve sitoplazmada ilerlerler (Şekil 2.). Aynı şekilde tüm NCAM yapılarının ekstrasellüler kısmına tutunmuş uçlarında 5 adet Ig bölgesi (Ig-I) ve 2 adet fibronektin homolog bölgesi (Fn-III) içermektedir (Şekil 2.) (225).

Bu protein yapılar güçlü bir şekilde sinir sisteminden bolca üretilirler (253). Aşırı NCAM ekspresyonu fonksiyonel değişiklik olmaksızın nöromusküler sinapsların yapı ve büyüklüğünde artışa neden olur (254). NCAM hücre membranına bağlandıktan sonra transmembran sinyalini ortaya çıkarır. Böylece NCAM'lar adezyonu diğer hücrelerle aracı olarak ve ekstrasellüler matrikste veya aktive

intrasellüler sinyallerde görev alarak yaparlar (225,253). Kısaca hücreler arası sinyal transdüksiyonunu aktive ederler.

Alternatif bağlantılarla plazma membranına moleküller farklı şekillerde tutunurlar (213). Alternatif uç uca bağlanma ile NCAM yapılarının değişik bölgelerine tutunan birkaç protein yapısı daha vardır. Bunlar Exon 15, Exon 18, a, b, c, AAG ve Ig bölgesine tutunan VASE ve PSA'dır (225). Özellikle olarak dördüncü Ig bölgesi 7.ve 8. eksonlar tarafından kodlanır, bu eksonların arasına da VASE denilen 30 bazlık ekson girebilir (Şekil 2.).

Ekstrasellüler kısmıyla NCAM hem homofilik hem de heterofilik cis ve trans etkileşimlerine aracılık eder. Bu yapının NCAM tarafından transsellüler homofilik tanıma aracılığıyla edebilen antiparalel dimerlerden şekillenen bir aksi form olabileceğini ifade etmektedir. Fakat molekül ekstrasellüler matriks sayısına ve heterofilik etkileşimler arasındaki diğer CAM'lerine bağlı olabilir.



Şekil 3. Homofilik NCAM moleküllerinin polisializasyonu. (A) Homofilik bağlanma ile PSA-NCAM kompleksinin oluşması, iki Ig domaini birleşir. (B) PSA yokluğunda NCAM yapısındaki beş Ig domainin resiprokal olarak birleşmesi (225).

Sonuç olarak NCAM homofilik ve heterofilik interaksyonlar ile hücre adezyonunu idare eder (225). Homofilik aktivasyon Ca^{+2} dan bağımsız bir mekanizma ile olurken, NCAM veya NCAM antikorlarının belli nöral hücrelerde intrasellüler Ca^{+2} artışına neden olduğu gösterilmiştir (225,255). Bu bağlanmada iki NCAM molekülünün Ig5 modülü ve Ig3 modülü arasında resiprokal bir etkileşim olduğu düşünülmektedir (Şekil 3.) (225).

NCAM ekspresyonu bazı önemli özel dokularda değişik şekillerde kendini gösterir. Tüm NCAM izoformları insanda 11., ratlarda 8. ve farede 9. kromozomda bulunan tek bir gen ile kodlanmaktadır. Fakat alternatif bağlantılar ve translasyon sonrası modifikasyonlarla farklı izoformları üretilebilir (256). NCAM geni en az 25 ekson içerir (257-260). 7.4, 6.7, 5.2, 4.3 ve 2.9 kb'lık beş NCAM-mRNA sınıfı, poliadenilasyonu ve alternatif bağlantısıyla kemirgen hayvanlarda meydana gelmiştir. 1-14'e kadar tanımlanan 14 ekson bütün NCAM-mRNA'larında yaygın olarak görülmüştür. 15-19 eksonlarını gösteren 3 uç eksonunun kullanılmasıyla farklı COOH uçlarına sahip yukarıda sayılan üç büyük NCAM polipeptidini kodlayan mRNA'lar üretilir (261-263). 7.4 kb'lık mRNA sınıfında ekson 14, 19, 18, 17, 16 eksonları tarafından takip edilir ve bu mRNA sınıfı uzun sitoplazmik bölgeye sahip transmembran NCAM-180'i gösteren NCAM türlerini kodlar. 6.7 kb'lık mRNA sınıfı 1-14 eksonlarına ek olarak 16, 17, 19 eksonlarını içerir, fakat ekson 18'i içermez (264). Bu mRNA sınıfı NCAM-180'den daha küçük bir sitoplazmik bölgeye sahip NCAM-140'ı gösteren bir transmembran NCAM türünü kodlar. 5.2 ve 2.9 kb'lık mRNA sınıflarının her ikisinde 1-15 eksonlarını içerir, ancak 16-19 eksonlarından yoksundur. Bu iki sınıf mRNA alternatif poliadenilasyonu yüzünden büyüklükleri farklıdır. Her iki sınıfta glikozilfosfatidil inositol yoluyla membranı birleştiren NCAM-120'yi kodlar (264).

Sonuç olarak bu karmaşık yapılanmalar ve alternatif ekson kullanımı ile, transkriptin sonunda bilinen 3 major NCAM formu beyinde oluşur (265).

3.11.2. Öğrenme ve Hafızanın Şekillenmesinde Nöral Hücre Adezyon Moleküllerinin Rolü:

Yapılan son çalışmalarda hipokampal mossy fiber sistemde NCAM ve PSA yapımının farelerde ayrıntılı analizinde, NCAM yapımının sadece nöronal regülasyon için önemli değil, ayrıca göç (migrasyon) gibi yapısal değişiklikler, aksonal büyüme ve fasikülasyon ile plastisite aktivitesi içinde gerekli olduğu gösterilmiştir (213).

Öğrenme üzerine NCAM'ın katılımının daha fazla kanıtı NCAM antikorlarının intraventriküler enjeksiyonu ile ratlarda, enjeksiyondan 6-8 saat sonra öğrenme ve uzun dönem hafızaya zarar verdiği, 48 saat sonra yapılan pasif sakınma cevabı testi ile gösterilmiştir (266). Aynı deneysel çalışma tavuklarda da yapılmış ve hafıza kaybına (amnezi) neden olmuştur (267). Aynı şekilde NCAM'dan yoksun bırakılan farelerde uzaysal öğrenme ve bulma yeteneğinin bozulduğu, Morris water

maze testlerinde öğrenmelerinde geri kalmalar olduğu tespit edilmiştir (213,268). Bununla beraber öğrenmedeki bu yetersizliğin neden kaynaklandığı bilinmemektedir. NCAM'ın posttranslasyonel modifikasyonunda öğrenme ile ilgili değişiklikler gözlemlenmiştir.

NCAM sadece gelişme esnasında merkezi sinir sisteminin yapısal organizasyonuna katkıda bulunmaz, aynı zamanda beyindeki tahrip olmuş sinaptik modifikasyonlara da yardımcı olur. Bu nedenle NCAM yapımının, özellikle PSA-NCAM'ın öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda ne kadar gerekli olduğu anlaşılmaktadır (269).

3.12. Sinaptik Plastisite:

Sinir sisteminin gelişmesi nöronal döngüyü oluşturmak için yol gösteren sinaptik bağların yeniden oluşmasının devam ettirilmesiyle karakterize edilir. Erginlerde sinaptik plastisite, öğrenme ve hafıza oluşumu gibi fizyolojik ve patolojik şartların tanımlanması ve nöronal döngünün tamamlanmasıyla anlaşılır (270). NCAM'leri ve onun polisiale olmuş formunun (PSA-NCAM) nöronal plastisite ve sinapslarda çok önemli bir rol oynadığı bilinir (12).

Nöronal plastisite beyin fonksiyonlarından öğrenme ve hafıza formasyonunda önemli görevler alır (265). Kortikal nöronların farklılaşması ve iyileşmesi, sinaptik plastisitenin aktivite artışı için PSA-NCAM'ın güçlü bir şekilde yapımı oldukça önemlidir. Kortikal haritaların yeniden organizasyonunun temelini oluşturan mekanizmaları fonksiyonel iyileşmeler ile birleştirirler. Burada NCAM ve PSA-NCAM gibi birçok molekül rol oynar. Bunlar nöronal ağ plastisitesinde ilişki kurmaya yararlar, böylece kortikal yeniden organizasyona katkıda bulunurlar (255).

Çözünebilen NCAM tipleri beyinde, beyin omurilik sıvısında ve plazmada bulunur (9,225). NCAM'leri, hücre migrasyonunu, nöron uzanımını ve fasikülasyonunu etkileyerek beyinde sinapsların oluşumunda olası rol oynarlar. Ayrıca NCAM'ın etkisinin bloke edildiği farelerde olfaktor bulbusun ve hipokampustaki mossy fiber sistemin gelişiminin geri kaldığı gösterilmiştir (225). Bu nedenle NCAM molekülleri beyin gelişmesi esnasında merkezi sinir sisteminin yapısal organizasyonuna girerken, olgun beyinde ise sinapsların yeniden oluşum ve düzenlenmesine katılmaktadırlar. Bu moleküllerin sinaptik plastisite dışında hücre göçü, aksonal büyüme, periferel aksonların yenilenmesinde de görev aldıkları düşünülmektedir (213).

3.12.1. Sinaptik Plastisite ve PSA-NCAM:

NCAM formları içinde sinaptik plastisitede rol alan en önemli molekül PSA-NCAM'dır (225,271). PSA, alfa-2-8-linked sialik asit artıklarının uzun homopolimerazıdır (213). NCAM izoformlarının %30'unu PSA oluşturmaktadır. Bu nedenle PSA-NCAM terimi sıklıkla kullanılmaktadır. PSA'nın buradaki rolü karşılıklı membranlar arasındaki adezyonların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktır. Polisialize olmuş yapı NCAM'ın adhezif etkilerini artırır (213,272).

Sinaptik plastisite ve nöronal aktiviteye bağlı nörogenezis olayında önemli rol alan PSA-NCAM'ın, özellikle beyinin belli bölgelerinde düzeylerinin artmış olduğu gözlenmiştir. Bu bölgeler hipokampal formasyonda rol alan olfaktor sistem ve dentat gyrustur (273-276). Yaşa bağlı olarak ortaya çıkan hafıza bozuklukları hipokampal plastisitedeki azalma ile birlikte. Merkezi sinir sisteminin oluşumunda NCAM'ın polisialize olmamış hali rol alırken, gelişimi sırasında PSA-NCAM bolca sentezlenir. Kemirgenlerde hipokampal formasyonda, yeni oluşan nöronların farklılaşma ve matürasyonunda da PSA-NCAM yapımının aktif rol aldığı gösterilmiştir (248,275). Dişli granül hücrelerinin polisializasyonu ise yaşla birlikte azalır. Ancak yaşla bağlantılı aktif azalmanın polisializasyondaki azalmayla direkt bir ilişkisi bulunmamaktadır (277,278).

Kafa travması sonrası fonksiyonel iyileşme ve tamirde, nöronal bağlantıların yapı ve fonksiyonel plastisitesinde de PSA-NCAM görev alır (255). PSA-NCAM'ın güçlü bir şekilde yapımı beyin yapılarında göze çarpan doku reorganizasyonunda ve plastisitede önemli roller üstlenir. NCAM polisializasyonunun artışı, yetişkin ratlarda hem pasif kaçınma cevabının öğrenilmesinden sonra ve hem de Morris water maze testinde uzaysal öğrenmeden sonra gösterilmiştir (279,280).

Bu artış ratların dentat gyrusunun granül hücrelerinde tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada polisializasyondaki bu yükselme, hipokampal oluşumda dişli granül hücrelerinin bulunduğu yerde ve öğrenmeye katılan kortikohipokampaldan şekillenebilen entorhinal korteksteki nöronlarda lokalize olmuştur (213,281). NCAM polisializasyonunun artışı aynı şekilde öğrenmeye katılan kortikohipokampal yolda PSA-NCAM yapımını da aktive etmektedir (279). Ancak bu formasyon için hipotalamo-pitüiter-adrenal aksın önemli olduğu ortaya konulmuştur (213). Polisializasyonun artışı uygulamadan sonra yukarıda belirtilen her iki öğrenme testi içinde sadece 10-12 saat gözlemlenmiştir. Bunun nedeni de muhtemelen nörogenezin artmasından önce, oluşan öncül nöronlardan kaynaklanmaktadır (279).

Hipokampal formasyonun beyindeki esas hedefi glikokortikoid salınımıdır. Bu hormonlar periferik yolla adrenal bezlerden salınırlar ve tüm vücutta ciddi etkileri vardır (282). Ratlarda major salınan glikokortikoid, kortikosteron olup stres ve fizyolojik cevapları kolaylaştırmada düzeyleri artar. Kognitif fonksiyonlar ve LTP cevabında bir U şekli vardır, hipotalamo-pitüiter-adrenal aks aktivitesinin düzensizliğinde kognitif yetersizlikler ve LTP’de değişiklikler olur (283). Bu etkiler kortikosteronun hipokampal formasyondaki yapısal plastisitede olan major etkileridir (282). Örneğin kortikosteronun baskılanması veya adrenalektomi sonrasında dentat gyrusta nöroenezin arttığı görülmüşken, tersine eksojen yöntemler ve stresle oluşturulan yüksek hormon seviyesi aynı yapılarda nöroenezini azaltmaktadır (284).

Genellikle uzun dönem hafızanın oluşmasındaki yapısal değişikliklerin nöronal bağlantılarla oluştuğuna inanılmaktadır. Uzun dönem hafızanın oluşmasında ve öğrenmede NCAM’ın rolü ile ilgili son zamanlarda ciddi çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (269). Öğrenme ve hafızanın oluşumunda temel mekanizma olan sinaptik plastisiteye NCAM’lerinin aracılık ettikleri artık bilinmektedir (269,285). Öğrenme sürecinde nöronal bağlantılarda yapısal değişikliklerin oluşması uzun dönem hafızanın yerleşmesini sağlar. Bu nöronal bağlantı ve yeniden organizasyon işleminde NCAM’leri çok önemli görevler üstlenir (286).

NCAM yapımının, özellikle PSA-NCAM’ın öğrenmenin ve uzun dönem hafızanın oluşumunda ne kadar gerekli olduğu anlaşılmaktadır (269). Kısaca olayı şöyle izah edebiliriz; PSA-NCAM’ın artışı, adezyonda azalmaya ve nöron uyarılmasında artışa neden olmaktadır. Nöroenezin indüklenmesi ile hipokampal formasyon artmakta, öğrenme ve hafıza işlemleri de olumlu etkilenmektedir. Sonuçta PSA-NCAM, uzun dönem hafızanın kurulması esnasında nöronal bağlantıların yapısal modellerinin yeniden oluşumuna katkıda bulunmuş olur (287). En önemlisi PSA-NCAM oluşumu, hızlı bir şekilde Ca^{+2} bağımlı nöronal aktiviteyi şekillendirebilmektedir (255,288,289).

3.13. Hipokampus:

Hipokampus, serebral korteksin değişik bir tipinden oluşan uzunca bir yapıdır. Gerçekte, temporal lob korteksin bir bölümünün, yan ventrikülün ventral yüzünü oluşturmak üzere içeriye doğru katlanmasından ibarettir. Hipokampusun bir ucu amigdaloit nükleuslara dayanır, kenarlarından biriyle de temporal lobun ventromedial korteksi olan parahipokampal gyrusla kaynaşır.

Hipokampusun, serebral korteks bölümlerinin çoğu ile olduğu kadar, limbik sistemin temel yapıları olan amigdaloid, hipotalamus, septum ve korpus mamillare ile de sayısız bağlantısı vardır. Hemen her tip duysal algı, anında hipokampusun çeşitli bölümlerinin aktivasyonuna neden olur ve hipokampus birçok çıkış sinyallerini, hipotalamus ve limbik sistemin öteki bölümlerine dağıtır, özellikle en büyük çıkış yollarından biri fornikse gider. Böylece hipokampus da, amigdaller gibi duysal giriş sinyallerinin uygun limbik reaksiyonları doğuracak ek bir kanaldır.

Hipokampusun bir başka özelliği de, çok zayıf elektriksel uyarıların, stimülasyonu kesildikten sonra saniyelerce devam eden lokal epileptik nöbetler meydana getirmesidir. Bu durum, hipokampusun normal fonksiyon durumlarında bile uzun süren sinyaller verebileceğini düşündürmektedir (290). Hipokampal epilepsi sırasında kişi çeşitli psikosomatik etkiler algılamaktadır. Bunlar arasında; koklama, görme, işitme, dokunma ve başka tipte halüsinasyonlar bulunur. Kişi bilincini kaybetme ve bu halüsinasyonların gerçek dışı olduğunu bilse bile, bunları bastıramaz, kontrol edemez. Hipokampusun bu aşırı duyarlılığının nedenlerinden biri belki de, beynin başka bölgelerindeki korteksten farklı olarak altı tabaka yerine ancak üç normal tabakası olan bir korteks tipinde olmasıdır.

Hipokampus, epilepsinin tedavisi amacıyla birkaç vakada cerrahi olarak çıkarılmıştır. Bu şahıslar daha önce öğrenmiş oldukları aktivitelerin çoğunu yeterli bir şekilde yapabilirler. Bununla beraber hemen hemen yeniden hiçbir şey öğrenemezler. Gerçekten kendileriyle her gün birlikte olan kişilerin bile isimlerini veya yüzlerini öğrenemezler. Ancak bir an için ya da aktiviteleri sırasında ne olduğunu anımsayabilirler. Böylece, yalnız kısa süreli primer bellekleri vardır. Bunlarda uzun süreli sekonder bellek oluşturma yetenekleri tamamen ya da büyük ölçüde ortadan kalkmıştır. Bu durum anterograd amnezi olarak isimlendirilmiştir. Hipokampusun bozulması, daha önce kazanılmış bellekte de bazı eksikliklere yol açar, yakın zamanlara ait bellek, uzak geçmişe göre biraz daha kuvvetlidir.

Hipokampus olfaktor korteksin bir parçası olarak gelişmiştir. En aşağı sınıf hayvanlarda, hangi besinlerin yenileceği, belirli objelerin kokusundan tehlikeli olabilecekleri, kokunun seksüel bakımdan davet edici olup olmadığını belirlemede ve hayati önem taşıyan öteki birçok kararların alınmasında önemli rol oynar. Böylece, beynin en erken gelişiminde, hipokampus kritik karar verici nöronal mekanizmayı oluşturarak, giriş sinyallerinin önemli tiplerini ve önem derecelerini belirleme fonksiyonunu yürütür. Belki de beyinin öteki bölümleri geliştikçe, öteki duysal

alanlardan hipokampusa gelen bağlantılar bu karar verme yeteneği ile ilgili rolü devam ettirmektedir.

Hipokampusun, kısa süreli belleğin uzun süreli belleğe çevrilmesine neden olan dürtüyü sağladığı ileri sürülmüştür. Yani bazı tip sinyalleri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşır. Mekanizma ne olursa olsun, hipokampus olmadan, uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır (291).

Öğrenme ve hafıza, limbik sistem de dahil olmak üzere, merkezi sinir sisteminin birçok bölgeleri ile ilgili kompleks fonksiyonlardır. Yeni edinilen bilgilerin depolanmasında hipokampusun önemli rolü olduğu bilinmektedir. Hipokampusu etkileyen lezyonu olan hastalarda kısa süreli hafızanın uzun süreli hafızaya dönüştürülmediği gözlenmiştir. Lezyonun sol hipokampusta olduğu durumlarda daha çok sözel hafıza etkilenirken, sağda olduğu durumlarda ise görsel hafıza etkilenmektedir (292).

Her türlü duyuşsal algı, anında hippocampusun çeşitli bölümlerini aktive eder. Korteks ile alt sinirsel oluşumlar arasında algılama, limbik sistem, soyut düşünme ve algılama, öğrenme, hafıza (data depolama), uzaysal hafıza gibi verilerin aktarılmasında hem köprü hemde kavşak rolü oynar (293).

3.14. Öğrenme ve Bellek:

Hayvanlara ve özellikle insana ait bir nitelik, davranışını deneyimlere göre değiştirebilme yeteneğidir. Öğrenme bunu gerçekleştirebilmek için bilgi kazanabilme, bellek bu bilgiyi koruma ve depolamadır. Açıkça görüleceği gibi bu iki olay birbiri ile yakından ilişkilidir ve her ikisinin birlikte ele alınması gerekir.

Fizyolojik bakış açısından bellek, net (eksplisit) ve gizli (implicit) olarak iki tipe ayrılabilir. Tanıma belleği veya deklaratif bellek olarak da adlandırılan net bellekte, bilinç eşleniktir ve hipokampus ile beyinin medial temporal loblarının diğer bölümlerinde depolamaya bağımlıdır. Olaylara (epizodik) ve sözcük, kural, dile ait (semantik) bellek olarak alt gruplara ayrılır. Gizli bellek uyanıklığı içermez ve buna varlığı anlaşılmayan veya refleksif bellek de denir. Bunun depolanması, en azından bazı durumlarda, hipokampusta işlemlemeyi içermez ve diğer şeylerin yanısıra, beceri, alışkanlık ve koşullu refleksleri kapsar. Öte yandan, bisiklet sürme gibi etkinlikler, tam olarak öğrenilinceye kadar başlangıçta tanıma belleği oluşturup daha sonra refleksif belleğe geçer.

Eksplisit bellek ile implicit belleğin çeşitli formları şunları içerir:

- Saniyeler ile dakikalar boyu süren, bu sırada hipotalamustaki veya başka yerlerdeki işlemlerin, kavşak etkinliğindeki uzun süreli değişikliğe dayandığı kısa süreli bellek,

- Belleğin yıllarca ve bazen yaşam boyu depolandığı uzun süreli bellek.

Kısa süreli bellek sırasında anı kalıntıları travmalar ve çeşitli ilaçlarla bozulabilir, halbuki uzun süreli anı kalıntıları bozulmaya belirgin şekilde dirençlidir. Çalışan bellek, kişi bir bilgiye dayanan girişim planlarken bilgiyi hazır tutan kısa süreli bir bellek tipidir.

İmplicit bellek, bir kez kazanıldıktan sonra bilinçsiz ve kendiliğinden gerçekleşir hale geçen beceri ve alışkanlıkları kapsar. Bu bellek, daha önce karşılaşmış olma sonucu sözcük veya cisimlerin tanınmasını kolaylaştıran durumu da içerir. Bunun bir örneği, ilk birkaç harfin söylenilmesi sonucu bir kelimenin daha kolay hatırlanmasıdır. İmplicit belleğin diğer çeşitleri, asosiyatif olan ve olmayan formlara ayrılabilir. Asosiyatif olmayan öğrenmede organizma tek bir dürtü ile öğrenirken asosiyatif öğrenmede organizma bir dürtünün diğer dürtü ile olan ilişkisini öğrenir.

Alışkanlık (habitüasyon), nöral bir uyarının defalarca yinelendiği basit bir öğrenme şeklidir. Bir uyarı ilk kez uygulandığında, o canlı için yeni olup bir tepkime uyandırır. Bu uyarı yinelenen olursa, giderek daha az elektriksel cevap oluşturur. En sonunda denek uyarana alışır ve buna aldırış etmez. Duyarlanma (sensitizasyon) bir anlamda bunun tersi olan bir olaydır. Yinelenen uyarın, eğer hoş veya hoş olmayan bir başka uyarınla bir veya daha fazla birlikte verilirse daha büyük bir cevap meydana getirir. Uyarınların uyandırma değerinin benzeri yoğunlaşmasının insanda meydana geldiği bilinmektedir. Çeşitli tür gürültüler arasında uyuyan annenin bebeği ağlayınca hemen uyanması buna örnektir. Alışkanlık asosiyatif olmayan bir öğrenme örneğidir. Asosiyatif öğrenmenin klasik örneği koşullu reflektir. Koşullu bir refleks, önceden cevap oluşturmayan veya çok hafif bir cevap oluşturan bir dürtüye karşı, bu dürtünün, bu cevabı normal olarak uyandıran bir diğer dürtüyle tekrar tekrar eşleştirilmesiyle kazanılan bir refleks cevaptır (294).

Bellekte kilit öge, seçilmiş kavşak bağlantılarının gücünde değişiklik olmasıdır. En basit olanlar hariç bütün bellek biçimlerinde, bu değişiklik protein sentezini ve genlerin etkinleştirilmesini içerir. Bu olay, kısa süreli bellekten uzun süreli belleğe geçiş sırasında görülür. Hayvanlarda, her eğitim oturumunu izleyen beş dakika içinde anestezi uygulanır, elektroşok verilir veya protein sentezini bloke eden ilaç, antikor

veya oligonükleotidler kullanılırsa, uzun süreli öğrenilmiş cevapların kazanılması önlenir. Bu girişimler, eğitim oturumlarından dört saat sonra yapılırsa kazanım üzerine herhangi bir etki görülmez. İnsanda bu olayların karşılığı, beyin sarsıntısı veya elektroşok tedavisinden hemen önce gerçekleşmiş olaylara ait belleğin yitimidir (retrograd amnezi). Bu amnezi, deney hayvanlarındakinden daha uzun dönemleri kapsarsa da uzak bellekler el değmemiş olarak kalır (294).

Hafıza ve öğrenme yaşla bağlantılı nörodejeneratif hastalıklarla bozulur. Bu hastalıkların belirli bölgelerde ROS'nin aşırı bulunmasının bir sonucu olduğuna inanılır. Beyin, radikal oksijen oluşumunun nisbeten yüksek olması, kolaylıkla okside olabilen lipidlerin yüksek konsantrasyonlarda varlığı ve antioksidan savunma sisteminde nisbeten olan eksiklik yüzünden oksidatif strese hassastır (295-297).

3.15. Deneysel Diyabet ve Serbest Radikaller:

Diyabetin ortaya çıkışında oksidasyonun rolü olduğuna dair bulguların çoğu deneysel diyabette kullanılan iki ilaç olan alloksan ve STZ ile yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu kimyasal maddelerin her ikisi de oksidan madde meydana getirerek Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ederler. Hücre tarafından yeterli miktarda tutulan alloksan, askorbat ve tiollerle reaksiyona girerek onların antioksidan etkilerini engeller ve oksidanların üretimi ile β hücre hasarına neden olur. Bir glukonitrozüre olan STZ'nin etki mekanizması ise daha az anlaşılmıştır. Ancak STZ'nin uygun olmayan NO cevapları meydana getirdiği, NO cevabının neden olduğu adacık hücre yıkımının artmasının diyabeti oluşturduğu düşünülmektedir. DM'un başlangıcında sıklıkla pankreas adacık hücrelerinde inflamasyon vardır ve bu insülitiste fagositlerden salınan serbest radikaller önemli rol oynar. Sitokinler de β hücrelerinde serbest radikallerin oluşumuna yol açarlar (298-301). STZ ilişkili diyabet, Tip-1 diyabet için bir deneysel model olarak karakterize edilir ve endojen kronik stresin örneğini sağlar (302,303). STZ ilişkili diyabette ilerlemiş yapısal ve fonksiyonel anormalliklerin hem periferik hem de merkezi sinir liflerinde meydana geldiği tanımlanmıştır (304,305).

Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim ve normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korur (306). Oksidatif stres, radikal üretimi ve radikal yok edici sistem arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır.

Örneğin; serbest radikal üretiminin yükselmesi veya antioksidan aktivitenin düşmesi ki her iki durumda da oksidatif stres meydana gelebilir. Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonradan lipid peroksidasyonunu katalizleyen serbest radikaller üretebilir (17,18). Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilmiştir; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş GSH mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri görülmektedir (19-22). Ancak canlı ortamda yüksek oksidatif stres asla açık olarak gösterilememiştir. Tiyobarbütürik asit analiz maddesi kullanılarak hayvan ve insan modellerinde yapılan çalışmalarla, diyabetik yapıda lipoproteinler ve membranlarda LPO'nun yükselmiş olduğu gösterilmiştir (307).

Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri ROS'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Bunun ana kaynakları glukoz otooksidasyonunun ve metabolitlerinin dahil olduğu metabolitlerdir. Bunların yanısıra ilerlemiş glikasyon, değişken prostanoid üretimi ve anormal veya etkisiz mitokondriyal fonksiyon vardır (308). Periferel sinirler için ROS direkt olarak nöronları ve Schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabet ile birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar. Bu yüzden diyabetik ratlarda siyatik sinir LPO'nu yükselmiştir ve süperoksit dismutaz seviyeleri ve indirgenmiş GSH formu, GSH peroksidaz ve redüktazda bir değişiklik olmamasına rağmen azalmıştır. Daha uzun bir dönemde bu dorsal sinir kökü gangliyonlarında son zamanlarda gözlemlendiği gibi onların mitokondrileri ve hücre yapıları üzerine kötü etkilerinin yanı sıra, demiyelinizasyon ve aksonapati gibi kümülatif nörodejeneratif değişikliklere yol açabilir. ROS ayrıca periferel sinirlerin de dahil olduğu, birçok organın perfüzyonunu sağlayan damar fonksiyonları üzerine de etki yapar. Bu etki, deneysel modellerde sinir fonksiyonunda en başta beliren bozukluklardan sorumludur.

NO, ROS için önemli bir vasküler hedefdir. Süperoksit NO'ı nötralize eder ve peroksinitrit formu endotel tahribine sebep olabilen hidroksil radikallerinin bir kaynağıdır. Bu yüzden oksidatif stres, hiperglisemiye akut maruz kaldıktan sonra bile bazı deneysel preparatlarda açıkça görülen vasküler endotele bağlı gevşemeyi azaltır.

Kontrol edilmeyen hiperglisemili diyabet hastalarında kardiyovasküler hastalıklar, retinopati, nefropati ve nöropati riski daha yüksektir. Bu hastalıkların bazıları genetikdir, diğerleri membranın glikasyonunun yükselmesi, sorbitol akümüasyonu ve hiperglisemi tarafından sebep olunan aldoz redüktazın aktivasyonu ile bağlantılı olabilen bazı proteinlerle ilişkilidir. Protein glikasyonu,

lipoproteinlerin oksidasyonu, trombosit kümeleşmesi ve kanın hiperkoagülabilitesi gibi risk faktörleri bir ölçüde hipergliseminin direk sonuçlarına ve DM'da vasküler hastalıkların gelişmesine farklı derecelerde katkıda bulunurlar.

Oldukça önemli bir metabolik düzensizlik olarak bilinen ve hiperglisemi ile karakterize edilen diyabet olgularında serbest radikal oluşumunda artış olmaktadır. Diyabette serbest radikal üretiminin arttığı ve radikal bağlayıcı sistemlerde azalma olduğu ileri sürülmüştür. Bu gelişmeler diyabet komplikasyonlarının patogeneğinde serbest radikallere olan ilgiyi arttırmıştır (309).

3.16. Diyabetik Ratlarda Öğrenme Eksiklikleri:

Diyabetle birlikte ortaya çıkan oksidatif stres, hafıza ve öğrenme bozukluklarına yol açar. Bu olaya serbest radikallerin etkisi büyüktür. Eğer diyabetin başlangıcında insülin pelletlerinin subkutan implantasyonu yapılırsa kan glukoz seviyeleri 25 mmol'den normal seviyesine (7 mmol) düşürüldüğü için tamamıyla öğrenme eksiklikleri önlenmiş olur. Ama bu uygulamaya diyabet uyarısından 10 hafta sonra başlanırsa, ki bu zaman öğrenmenin bozulmuş olduğu zaman aralığıdır, bu durumda sadece az miktarda gelişme vardır. Morris water-maze performansında yaşlı ratlarda görülen bazı bozukluklar, diyabetik serebral fonksiyon bozukluğu ve yaşlanma arasında bir etkileşimin var olduğunu göstermiştir ki bu bozukluklar genç-ergin ratlarda umulan etkilerden daha büyüktür (310).

STZ ilişkili diyabetik ratlarda diyabet uyarısından 10 hafta sonra Morris water maze testinde öğrenme eksiklikleri görülmeye başlamıştır (310,311). İşin uzaysal versiyonuna bakıldığında ise diyabetik ratların Morris water maze testinde son eğitimlerinde bile ısrarla havuzun kenarlarına kaçmaya teşebbüs ettikleri yapılan çalışmada gözlemlenmiştir. Ancak diğer taraftan kontrol ratları böyle bir davranış sergilememişlerdir. Bu, diyabetik ratların kontrollerden daha düşük düzeyli anlayışa sahip olduğuna işaret eder (311).

3.17. Glutasyon (GSH):

Glutasyon, organizmanın tüm hücrelerinde bulunan, hücrenin protein yapısı dışındaki sülfidril içeriğinin % 90 kadarını oluşturan bir tripeptiddir. Glutamik asit, sistein ve glisin aminoasitlerinden gamma glutamil sistein sentetaz ve glutasyon sentetaz enzimleriyle oluşur (312).

Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH, hücre içi bir sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı korur. Eritrositlerde bulunan indirgenmiş GSH, hemoglobinin sistein gruplarını ve diğer

hücre proteinlerinin tiol gruplarını indirgen şekilde tutar. Böylece hemoglobini oksidasyondan koruyarak hücrenin bütünlüğünü sağlar (312).

GSH, hidrojen peroksidi, lipid peroksidleri, disülfidleri, askorbati ve serbest radikalleri indirgeyebilir. GSH'un peroksidlerle ve disülfidlerle reaksiyonu sonucu glutatyon disülfid oluşur. Glutatyon disülfid düzeyindeki artış oksidan stresin bir göstergesidir. Glutatyon disülfid, tiol içeren proteinlerin konformasyon ve aktivitesi üzerine zararlı etkileri olan bir maddedir (313,314).

3.18. Lipid Peroksidasyonu (LPO):

Lipid peroksidasyonu, membranda bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısında bulunan poliansatüre yağ asitlerinin, serbest oksijen radikalleri tarafından peroksidler, alkoller, aldehitler, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur (315,316).

LPO sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedir. Membranlardaki yağ asitlerinin peroksidasyonu ile oluşan kısa zincirli yağ asitleri ve triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metionin ve sistein gibi aminoasitleri içeren yapısal proteinlerin oksidasyonu, membran permeabilitesinin artmasına ve membrandaki akışkanlığın azalmasına neden olmaktadır (317,318).

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu, malondialdehit (MDA) üretimi ile sonuçlanmaktadır (315). Membran komponentlerinin polimerizasyonu ve çapraz bağlanmalarına neden olan MDA, deformabilite, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzeyindeki determinantların agregasyonu gibi iç membranların bazı özelliklerini değiştirmektedir. Ayrıca difüzyonla geçebildiğinden deoksiribonükleik asitin nitrojen bazlarıyla reaksiyona girmektedir. MDA, bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir (315,317).

3.18.1. Lipid Peroksidasyonu, Prostaglandinlerin Nonenzimatik Etkileşimi:

Membran lipidlerinin peroksidasyonu, enzimlerin inaktivasyonuna ve membran proteinleri ile lipidler arasında bağ oluşumuna neden olarak hücre ölümünü hızlandırır. LPO, DM'un erken dönemlerinde başlar. Endonöral damarlara ve endotel hücrelerine toksik etkilerinden dolayı, sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olurlar.

Lipid peroksidler; vasküler endotele direkt zarar verebileceği gibi, prostoglandin biyosentezini de etkileyerek diyabetik nöropati patogenezinde rol oynar. Lipid hidroperoksidler endotelial prostasiklin sentezini azaltırlar (319).

3.19. Glial Fibriller Asidik Protein:

Astroditler beyinde nöronların yaşamlarını sürdürmesinde önemli bir rol oynarlar ve nöronların fizyolojik olarak fonksiyon görmeleri için gerekli olan iyonik çevrenin düzenlenmesini sağlarlar. Glial hücreler merkezi sinir sistemine karşı olan tahripleri takiben başlangıçtaki hücrel cevapları oluştururlar. Reaktif gliosis fiziksel ve kimyasal tahriplerden kaynaklanan nöronal bozukluğa karşı astroditlerin bir reaksiyonudur. Bu olay astroditler için spesifik belirleyici olan GFAP'in aşırı bir ekspresyonuyla karakterize edilir. GFAP bir intrasellüler intermediate filamenttir. GFAP'nin stabil astrosidik süreçlerde esas olduğu ve hatta nöronal hasarlarda merkezi sinir sisteminin morfojenezi için kritik bir materyal olduğu bilinmektedir. Nöronal hasara cevap olarak astroditler GFAP yapımını hızlandırır (16,268).

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Deney Hayvanları:

Deneyleerde kullanılan Wistar-Albino cinsi sıçanlar, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezin'den temin edildi. Sıçanlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler, özel çelik kaplarda ve su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki sıçan yemleriyle beslendi. Sıçanlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 7.'de belirtilmiştir. Sıçanların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 7. Deney hayvanlarına verilen yemin bileşimi

Yem Yüzdesi (%)	maddeleri
Buğday	10
Mısır	21
Arpa	14
Kepek	8
Soya Küspesi	25
Balık Unu	8
E-Kemik unu	4
Melas	4
Tuz	4
*Vitamin Karması	1
**Mineral Karması	1

*Vitamin karması: Deney hayvanlarına verilen yemlerin vitamin karmasında A, D3, E, K, B1, B2, B6, B12 vitaminleri ile nikotinamid, folik asit, D-biotin ve kolin klorit bulunmaktadır.

**Mineral karması: Mangan, demir, çinko, bakır, iyot, kobalt, selenyum ve kalsiyumdan oluşmuştur.

4.2. Deneysel Uygulamalar:

Deneysel çalışmalara başlamadan önce, çıkabilecek aksaklıkların asgariye indirilmesi amacıyla ön çalışma yapıldı. Deney hayvanlarının buldukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi.

Çalışma için diyabet ve kontrol grubu oluşturulacak 6 adet dişi sıçan seçildi. Anne adayları sıçanlar, on beş gün boyunca vajinal smear ile takip edilerek, ovulasyon siklusları belirlendi. Siklus bozukluğu göstermeyen sıçanların ovulasyon zamanları tespit edilerek çiftleştirildi. Vajinal smearde sperm saptanan sıçanların gebe olacakları varsayılarak diyabet oluşturulacak 3 dişi sıçana 35 mg/kg intraperitoneal STZ enjekte edildi. STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra sıçanların kuyruk veninden kan glukoz seviyeleri tanimsal bir glukoz kiti kullanılarak ölçüldü. Kan glukozu 200 mg/dL ve üzerinde olan sıçanlar diyabetik kabul edildi. Uzun dönemde yavruların davranış ve hareketleri üzerine etkileri olduğu bilinen yüksek glukokortikoid seviyeleriyle ilgili problemler yaratmamak için, gestasyon boyunca, STZ uygulanmış anne sıçanlar üzerinde glukoz takibi yapılmadı. Diyabetik sıçanlara gebeliğin son üç günü, Kinney ve arkadaşlarının (8) kullandığı gibi 5 IU/kg/gün NPH insülin sabah tek doz subkutan uygulandı.

Diyabet ve kontrol grubundan sekizer yavru doğumdan hemen sonra GFAP, LPO ve GSH çalışılmak üzere dekapite edildi. Yavru sıçanlar 1 aylık oluncaya kadar anneleri tarafından aynı kafeste beslendi, bu süre içerisinde anneye diyabet için herhangi bir tedavi verilmedi. Birinci ayın sonunda yavrular annelerinden ayrılarak cinsiyetlerine göre farklı kafeslerde beslendi. Morris Water Maze testi için annesi diyabet olan 5 erişkin erkek sıçan (2 aylık) ve annesi normal (kontrol grubu) 5 erişkin erkek sıçan (2 aylık) alındı. 75 gün sonra tüm gruplara Morris Water Maze öğrenme testi yapıldı.

4.3. Morris Water Maze Testi:

Morris Water Maze Testi sıçan ve farelerde yaygın olarak kullanılan bir öğrenme ve bellek testidir (320). Morris'in su tankı, sirküler bir tank olup, 120 cm çapında galvanizli ve 50 cm yüksekliğindedir. Su tankı 25 cm kadar su ile dolduruldu ve süt tozu ile boyanarak suyun 2 cm altına bırakılan 10x10 cm'lik platformun görünmesi engellendi. Suyun ısısı 24±2 C derecede sabit tutuldu. Tankın yerleştirildiği konum ve platform yeri deney süresince sabit tutuldu. Deneklerin, bulunduğu yerin uzaysal konumunu algılayabilmeleri için görsel bir işaret tank dışına yerleştirildi (visual cues).

Su tankı sanal olarak 4 kısma ayrıldı ve platform bu kadranslardan birinin ortasına yerleştirildi. Sıçan diğer 1/4 oranındaki alanlardan birine bırakıldı ve yüzerek 60 sn içinde platformu bulması beklendi. Platformu bulunca 30 sn orada dinlenmesine izin verildi, sonra alınıp ayrı bir kafeste 30 sn bekletildi. Tekrar su

tankına bırakılarak aynı işlem her hayvan için 4 kez tekrarlanıp platformu bulma süreleri kaydedildi. 60 sn içinde platformu bulamayan sıçan alınıp platforma bırakıldı ve 30 sn dinlenmesine izin verildi. Her hayvan için 5 gün süreyle aynı denemeler yapıp süreler kaydedildi.

Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için, 5 günlük testten 24 saat sonra probe testi yapıldı. Bu testte, platform tanktan alındı ve denekler yüzdürüldü. Deneklerin doğal olarak platformun önceden bulunduğu tankın dörtte birlik kısmında daha çok arama yapması beklenir. Bu süre belleğin pekiştirilmesini ölçer. Deneklerin eski platformun bulunduğu dörtte birlik alanda yüzdükleri süre kaydedildi.

4.4. Hipokampus Örneklerinin Alınması:

Deneyssel uygulamalar sonrasında etik kurulun aldığı kararlara uygun olarak dekapite edilen sıçanların total beyinleri alındı, hacimleri belirlendi ve beyinin hipokampus bölgesi ayrılarak kuru buzda hemen donduruldu. Örnekler darası alınmış olan eppendorf tüplere aktarıldı. Ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlendi ve analizler yapıncaya kadar $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklamaya alındı.

4.5. Hipokampus Örneklerinin SDS-PAGE ile Analizi

Serbest ve serbest olmayan protein örnekleri Laemmli tarafından belirtildiği şekilde hazırlanan SDS-PAGE ile incelendi (321).

Jel oluşturmak için uygun bir pozisyonda tutturulan iki cam arasına yerleştirilmek üzere 10 ml' lik separating jel solusyonu hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla belirli kısımlardan sıkıştırılarak kaset haline getirilen iki cam levha arasına aktarıldı. İki cam levha arasına jel ilave edilirken üst kısımda tarak dişlerinin yüksekliği kadar ($\approx 1\text{cm}$) bir boşluk bırakıldı. Hazırlanan kaset şeklindeki bu iki cam levha arasındaki jel yaklaşık olarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek aralarındaki akrilamid monomerlerinin polimerleşmesi sağlandı. Daha sonra iki cam levhanın üst kısmına örnek sayısına uygun sayıda dişe sahip tarak yerleştirildi.

Tarak dişlerinin aradolgu maddesi olarak ifade edilen stacking jel 10 ml kadar hazırlandı. Hazırlanan bu jel solusyonu iyice karıştırıldı ve uygun bir otomatik pipet yardımıyla, jel kasetine yerleştirilmiş olan tarak dişleri arasındaki boşluklar dolduruldu. Bu dolgu iki camın en üst seviyesine kadar tamamlandı. Stacking jel çok çabuk polimerize olduğundan işlemlerin kısa sürede yapılmasına dikkat edildi. 25-30 dakika oda sıcaklığında bekletilerek polimerleşme sağlandı. Tarak, polimerleşmesi tamamlanan jelden çıkarıldı. Bu işlem sırasında jel de meydana gelen ve örneklerin

birakılacağı yuvaların bozulmamasına dikkat edildi. Cam levhalardan oluşan kaset elektroforez tankına yerleştirildi. Protein çözücü solusyonu; 0,125 M Tris (pH 6.8), %2'lik SDS, %0.002 oranında Bromofenol mavisini, %20'lik gliserol, %10'luk merkaptoethanol şeklinde hazırlandı. Yaklaşık olarak 150 µl olarak alınan her bir protein örneğine eşit oranda çözücü solusyondan ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tarak dişinin genişliğine bağlı olarak, hazırladığımız karışımdan 10-20 µl kadar transfer edildi. Tank içerisine yeterli miktarda tank solusyonu ilave edildi.

Güç kaynağından önce düşük bir voltajla (150 V) akım elektroforeze verildi. 5-10 dakika sonra voltaj değeri yükseltildi (180-200 V). Çıplak gözle izlenilebilen mavi boya bandı jelin alt kısmına gelince elektroforez cihazı kapatıldı.

Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra kaseti oluşturan iki cam birbirinden ayrılarak aradaki jel çıkarıldı. Protein bantlarının görünür hale gelebilmesi için bu jel % 1.25'lik Coomassie blue boya ortamına alındı. Burada en az yarım saat en çok bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletildi.

Boya solusyonundan alınan jel boyayı giderici solusyon (destain solusyon) ortamına alındı. Arasına çalkalanarak protein bantlarının dışındaki boya maddesi uzaklaştırıldı. Boya giderici solusyonda 5'er dakika bekletildi ve solusyon döküldü. Jel tekrar boya giderici ortama alındı ve bu işlem 2-3 kez tekrarlandı. Böylece jel üzerinde bulunan protein bantlarının dışındaki boya giderilmiş oldu. Jel üzerinde görünür hale gelen protein bantlarının fotoğrafları bir kamera yardımıyla çekildi.

4.6. Hipokampus Örneklerinin Western Blot ile Analizi

Hipokampus örneklerinin western blot analizi Baydaş ve arkadaşları tarafından uygulanan metoda göre yapıldı (295).

Jeldeki proteinlerin nitroselüloz membrana aktarımı (blotlama): SDS-PAGE tamamlandıktan sonra poliakrilamid jel blotlanmak üzere alındı. Nitroselüloz membrana transferin gerçekleştirilmesi için poliakrilamid jel ile nitroselüloz membran (Schleicher and Schuell, Inc., USA) yüzeyleri arasında boşluk kalmayacak biçimde karşı karşıya getirildi ve bunlar filtre kağıtlarıyla sarılmış bir şekilde blotlama düzeneğine yerleştirilerek tampon solusyonuyla doyuruldu. Soğutulmuş tampon solusyonuyla doldurulmuş tanka yerleştirilen düzenek için 60 dakika boyunca 150 mA elektrik akımı uygulandı. Bu şekilde proteinlerin transferi sağlanmış oldu.

Spesifik olmayan reaksiyonları engellemek için nitroselüloz membranda protein bağlanmamış bölgelerin ilgisiz proteinlerle kaplanması (bloklama): Blotlama işlemi bittikten sonra petri kutularına alınan nitroselüloz membranlar tampon solusyonla [NaH₂PO₄.2H₂O (0.025 M), Na₂HPO₄.12H₂O (0.075 M), NaCl (1.45 M)] çalkalayıcı üzerinde 3 kez 5 dakika olacak şekilde yıkandı. Spesifik olmayan bağlanmalar, 100 mM NaCl, 20 mM Na₂HPO₄, 20 mM NaH₂PO₄ (pH: 7.2) tamponunda % 1'lik taze sığır serum albumini ile 37 °C'de 90 dakikalık inkübasyonla bloklandı.

Özgül antikorlarla tepkime: Primer antikor olarak poliklonal rabbit anti-rat NCAM ve GFAP antikorları kullanıldı. NCAM ve GFAP primer antikorları % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:2000 oranında hazırlanarak kullanıldı. Nitroselüloz membranlar NCAM ve GFAP antikorları ile +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Daha sonraki safhada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra nitroselüloz membranlar % 0.05 oranında Tween-20 bulanan tamponda 1:1000 oranında hazırlanan, peroksidazla konjuge edilmiş goat-anti-rabbit immünoglobulinle 37 °C'de 90 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. Sonraki aşamada nitroselüloz membranlar 5 kez 5 dakika tampon solusyonuyla yıkandı.

Bantların görüntülenmesi: Bantların görüntülenmesi için 1 M Tris (pH: 7.4) tamponunda % 0.03-0.05 oranında hazırlanmış diaminobenzidin solusyonu kullanıldı. Diaminobenzidinle reaksiyon sonucu nitroselüloz membranlar üzerindeki bantlar kısa bir süre sonra görünür hale geldi. 5-10 dakikalık bir reaksiyon süresi sonunda diaminobenzidinle renklendirilen bantlar net olarak görüldükten sonra nitroselüloz membranlar iyice yıkandı. Nitroselüloz membranlar iyice kurutulduktan sonra, bantların rölatif yoğunlukları analiz edilmek üzere alındı. Bantların rölatif yoğunlukları Lab. Works 4.0 (Ultra Violet Products Ltd. Combridy, CD₄ 1TG UK) software programı kullanılarak analiz edildi.

4.7. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Lipid Peroksidasyonu Ölçüm Yöntemi

Doku LPO; (Malondialdehit 4-Hidroksialkenal (MDA+4-HDA)) seviyeleri, LPO-586 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

4.8. Hipokampus ve Korteks Örneklerinde Glutasyon Ölçüm Yöntemi

Örneklerdeki GSH seviyeleri, GSH-400 (Oxis International, Inc., Portland, USA) ticari kiti kullanılarak tespit edildi.

4.9. İstatistik

Elde edilen veriler SPSS-12 bilgisayar paket programına yüklendi. İstatistiksel analizlerde; NCAM, GFAP, LPO, GSH düzeylerinin gruplar arası anlamlığı Mann-Whitney U, Morris Water Maze öğrenme testinin değerlendirilmesinde tekrarlayan ölçümlerde Varyans analizi kullanıldı. $P < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

Çalışmanın başında 3 kontrol, 3 diyabet oluşturulacak dişi sıçan seçildi. Sıçanların gebelikleri normal seyretti. Diyabetik sıçanların kan glukoz seviyeleri 234 ± 3.2 mg/dL, kontrol grubunun 122 ± 3.1 mg/dL idi. Diyabet grubunda 18, kontrol grubunda 17 yavru elde edildi. Diyabet ve kontrol grubunda doğan sekizer yavru dekapite edilerek GFAP, LPO ve GSH çalışıldı. Kontrol ve diyabet grubunda genel durumu kötü olan birer yavru öldü.

Morris Water Maze Testi için çalışmaya, annesinde deneysel diyabet oluşturulan 5 erkek erişkin sıçan ve annesi normal olan 5 erkek erişkin sıçan alındı.

Diyabet grubunun vücut ağırlığı kontrol grubuna göre daha fazla idi. Deneysel gruplarının vücut ve total beyin ağırlıkları Tablo 8.'de görülmektedir.

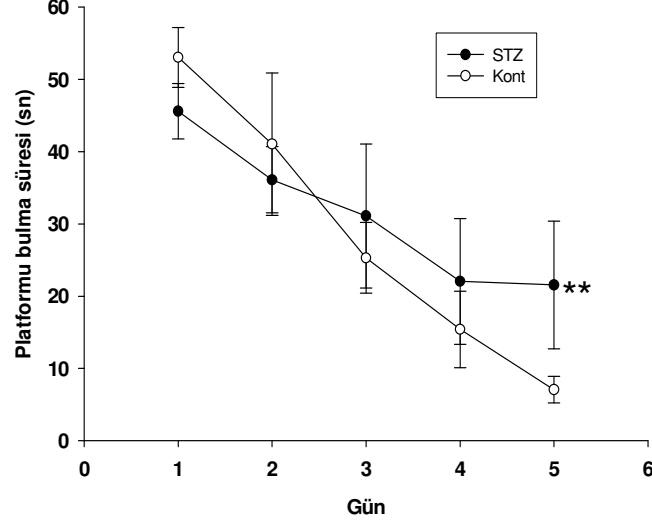
Tablo 8. Deneysel gruplarının ortalama vücut ve total beyin ağırlıkları.

	Kontrol	Diyabet
Vücut Ağırlığı (gr)	171 ± 9.3	211.8 ± 6.3
Total Beyin Ağırlığı (gr)	1.767 ± 0.071	1.923 ± 0.080

5.1. Morris Water Maze Öğrenme Testinin Sonuçları:

Diyabet ve kontrol grubunda öğrenme yeteneğinin 1. günden 5. güne doğru giderek arttığı gözlemlendi (Kontrol gün: $F=22.226$; $P= 0.000$, diyabet gün: $F= 4.735$; $P= 0.002$). Beşinci günde ortalama platform bulma sürelerine bakıldığında, kontrol grubu sürelerinin diyabet grubu sürelerine göre oldukça düşük olduğu gözlemlendi (sürenin kısa olması öğrenmenin daha iyi olduğu anlamına gelmektedir, $p < 0.01$).

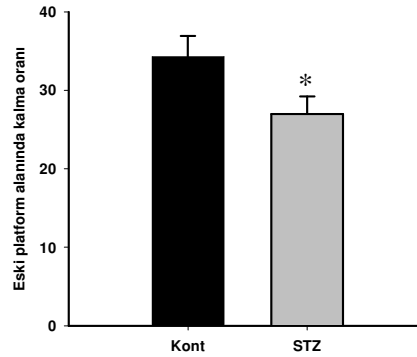
Diyabet grubunda tüm deneysel hayvanları ilk günden itibaren platformu buldular. Kontrol grubunda birinci gün 1 hayvan, ikinci gün 2 hayvan platformu bulamadı. Şekil 4.'te deneysel gruplarının günlük ortalama platform bulma zamanları görülmektedir.



Şekil 4. Water Maze Testi: Her iki grubun günlerdeki ortalama platform bulma süreleri (ortalama saniye olarak Kontrol, Gün: $F=22.226$; $p= 0.000$, diyabet gün: $F= 4.735$; $p= 0.002$). Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu.

** $p<0.01$ Beşinci günde ortalama platform bulma süreleri, kontrol grubunda diyabet grubuna göre daha kısa idi.

Probe test belleğin pekiştirilmesini test eden bir deneydir. Daha önce platformun bulunduğu alanda denegin geçirdiği süre ölçülmektedir. Öğrenmenin pekiştirilmesini ölçen probe testi sonuçları her ne kadar istatistiksel anlamda önemli olmamakla beraber eski platform alanında kontrol grubu sıçanların daha fazla zaman geçirdiği görüldü ($p>0.05$). Kontrol grubu ortalama 20.6 sn (% 34.28), diyabet grubu ortalama 16.2 sn (% 26.99). Şekil 5. Belleğin kontrol grubu sıçanlarında daha önemli oranda pekiştirildiğini göstermektedir.

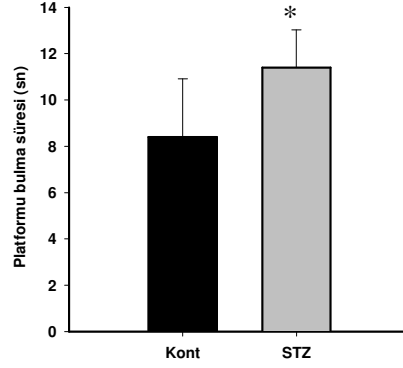


Şekil 5. Deneklerin probe testte eski platform alanında kalma oranları

* $p>0.05$ Kontrol grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında

(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)

Visuel test görsel, fiziksel veya sensorimotor defektlerin olup olmadığını test eden bir deneydir. Platformu görünür hale getirdikten sonra yapılan visuel testte, her iki grubun platformu bulma süreleri arasında önemli bir fark olmadığı görülmektedir (Diyabet grubu ortalama 11.4 sn, kontrol grubu ortalama 8.4 sn, $p>0.05$) (Şekil 6.). Bunun anlamı her iki gruptaki sıçanların görsel, fiziksel veya sensorimotor defektlerinin olmadığıdır.



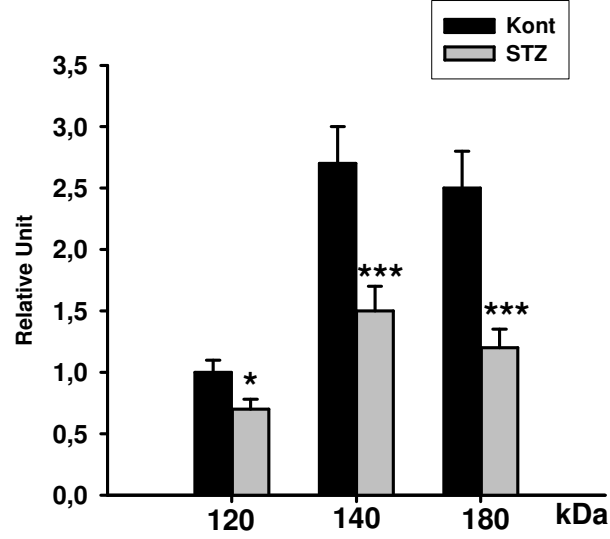
Şekil 6. Deneklerin visuel testte platformu bulma süreleri

* $p>0.05$ Kontrol grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında

(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)

5.2. Hipokampusda NCAM düzeyleri

NCAM 120 düzeyleri daha az olmakla birlikte, NCAM 140 ve NCAM 180 diyabet grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü. (NCAM 180 için $p<0.001$, NCAM 140 için $p<0.001$ ve NCAM 120 için $p<0.05$). (Şekil 7. ve Şekil 8.)

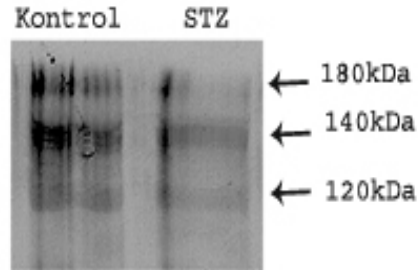


Şekil 7. Hipokampusda NCAM moleküllerinin alt izoformlarının rölatif yoğunlukları.

***p<0.001 Kontrol grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında.

*p<0.05 Kontrol grubu ile diyabet grubu kıyaslandığında.

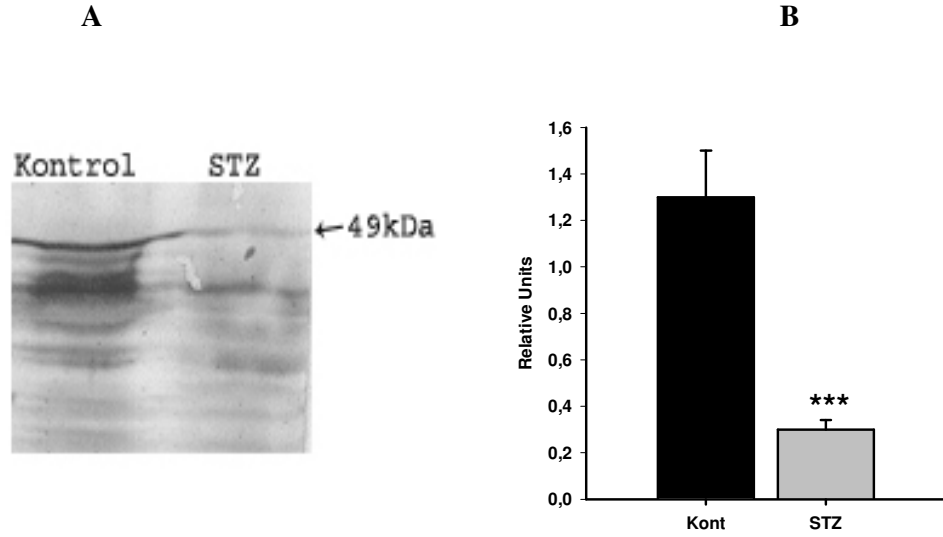
(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)



Şekil 8. Western blot yöntemi ile beyin dokusunda NCAM molekülünün alt izoformlarının ölçümü. (STZ: Diyabet grubu)

5.3. Hipokampusda GFAP düzeyleri

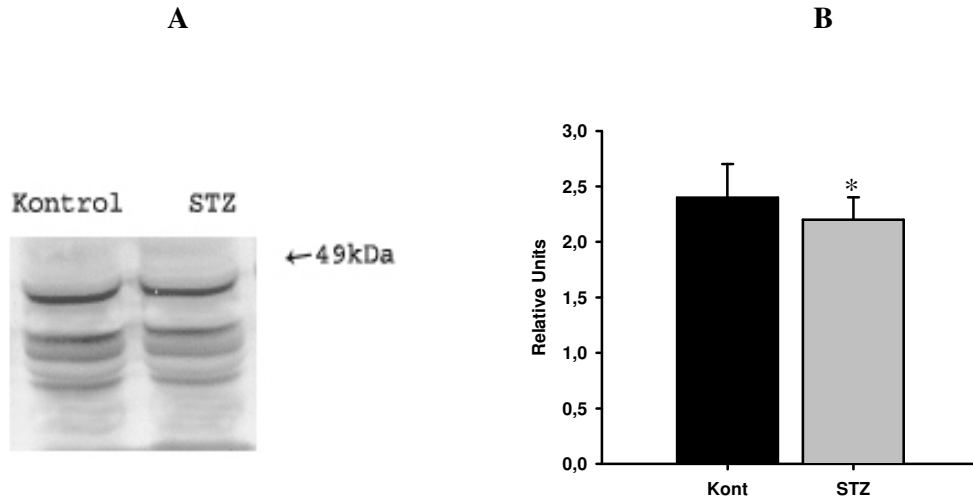
Diyabetik yavru sıçanlardaki GFAP düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (p<0.001) (Şekil 9.). Erişkin diyabetik ve kontrol grubu sıçanlardaki GFAP düzeyleri benzer bir oranda tespit edildi.(p>0.05) (Şekil 10.).



Şekil 9. Yavru sıçanların beyin dokusunda GFAP molekülünün Western blot yöntemi ile analizi (A) ve dansitometrik analizi sonucu (B).

***p <0.001 kontrol ve diyabet grubu kıyaslandığında

(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)



Şekil 10. Erişkin sıçanların beyin dokusunda GFAP molekülünün Western blot yöntemi ile analizi (A) ve dansitometrik analizi sonucu (B).

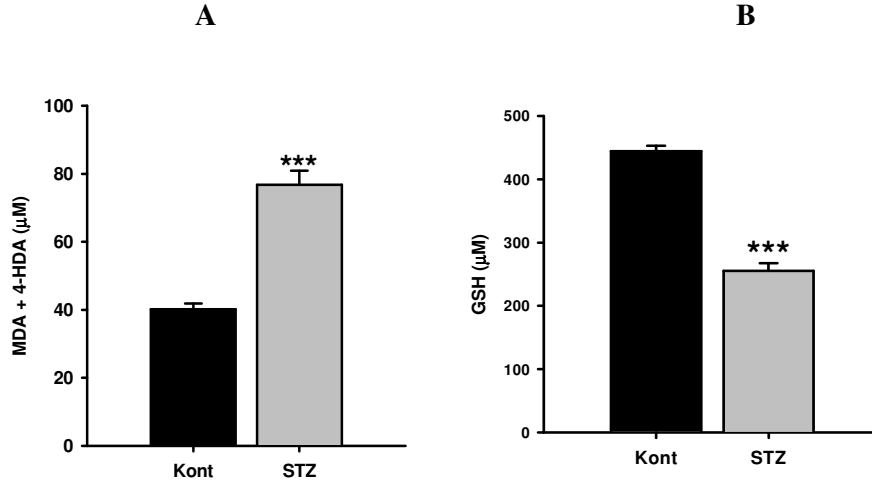
* p>0.05 kontrol ve diyabet grubu kıyaslandığında

(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)

5.4. Hipokampusta Lipid Peroksidasyonu ve Glutasyon Düzeyleri:

Deney gruplarında hipokampusta LPO (MDA+4-HDA) ve GSH seviyeleri ölçüldü. Hipokampusta LPO (MDA+4-HDA) düzeylerinin, diyabetik gruptaki yavru sıçanlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığını (p<0.001), GSH düzeylerinin

diyabetik gruptaki yavru sıçanlarda kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldığını ($p < 0.001$) tespit ettik (Şekil 11.).



Şekil 11. Kontrol ve STZ gruplarındaki yavru sıçanlarda hipokampus bölgelerindeki lipid peroksidasyonu (Malondialdehit+4-hidroksialkenal) (A) ve glutatyon (B) düzeyleri.

*** $p < 0.001$ kontrol ve diyabetik grup kıyaslandığında

(Kont: Kontrol grubu, STZ: Diyabet grubu)

6. TARTIŞMA

Diyabetik anne çocuklarının zeka ve nörolojik fonksiyonlarını değerlendirmek üzere yapılan insan çalışmaları genellikle çelişkili sonuçlar vermektedir. Yapılan çalışmaların büyük bir kısmında; diyabetik anne çocuklarında zeka ve davranış fonksiyonunun maternal glisemi kontrolünün derecesiyle doğru orantılı olarak korelasyon gösterdiği sonucuna varılmış olsa bile (322-330), sınırlı sayıda vakada, diyabetik anne çocukları ve kontrol grubu arasında hafıza ve davranışlarda farklılık olmadığı rapor edilmiştir (331-333). Bazı yayınlar diyabetik anne çocukları ve kontrol grubu arasında zeka açısından bir farklılık olmadığını ve zeka testlerindeki bu performans yavaşlamasına neden olan durumdan, motor bozukluklar, dağınık dikkat ve hiperaktivitenin sorumlu olduğunu göstermektedir (334,335). İncelenen diyabetik anne çocuklarının %3,9-37'nde nörolojik gelişimde gecikme olduğu görülmüştür (336).

Diyabetik hastalarda, ılımlı bir serebral atrofi, beyin sapı lezyonları ve subkortikal lezyonlarda artış bildirilmiştir (2,3). Yetişkinlerde, DM ile birlikte orta düzeyde öğrenme ve hafıza bozukluğu da görülmektedir (4-6). Kronik hiperglisemi boyunca DM, bilişsel bozukluğa neden olur (7). Diyabetik hastalarda, serebral bozukluk gelişmesi tam bir glisemik kontrol ile geciktirilebilir (5). Ancak oluşan değişikliklerin geri dönüşümünün olup olmayacağı açık değildir.

Hipokampusun önemli görevlerinden birisi, primer belleğin (kısa süreli bellek) sekonder belleğe (uzun süreli, sabit bellek) çevrilmesine neden olan yapılanmayı sağlamaktır. Bazı bilgileri kalıcı deponun yer aldığı uzun süreli belleğin depo alanlarına taşır. Mekanizması tam olarak bilinmese de hipokampus olmadan uzun süreli belleğin pekiştirilmesi mümkün olmamaktadır. Ayrıca sağ hipokampus görsel, sol hipokampus ise sözel hafıza ile ilgili fonksiyonlarda daha fazla aktivite göstermekte ve bu bölgelerin lezyonlarında da ilgili hafızalarda kayıp gelişmektedir (292,337).

İntrauterin yaşamda maternal diyabete maruz kalmış çocuklarda yapılan takiplerde bir dizi santral sinir sistemi anomalisi bildirilmiştir. Bunlar; zayıflamış motor fonksiyon, düşük zeka seviyesi, Erb's palsy, felç, serebral palsy, mental retardasyon, konuşma bozukluğu, okuma güçlüğü, davranış bozuklukları, sağırılık ve psikozlardır (338). Buna ilave olarak diyabetik anne çocukları üzerinde yapılan nörofizyolojik çalışmalarda, bunların EEG (339) ve REM uyku paternlerinin, immatür infantlarınkı ile benzer olduğu görülmüş (340). Bu gibi komplikasyonların,

prenatal glukoz seviyelerinin iyi regülasyonu ile azaltılabileceğini bildiren yayınlar olmakla beraber, bu çocuklardaki zeka ve davranış paternleri kontrollerden ciddi farklılıklar göstermemektedir (341,342). Maternal diyabetin zeka ve davranışlarla zayıf bir ilişkisinin olmasına karşın, annenin zeka seviyesi, duygusal stress, ve davranış bozuklukları, çocuklarda zeka geriliği ve davranış bozukluklarının erken habercileridir (343).

Diyabetik sıçan yavruları üzerinde davranış ve bilişsel yetilerin incelenmesi için yapılan az sayıda çalışma sonunda; anormal beyin gelişiminden diyabetik intrauterin çevrenin sorumlu olduğu fikrine varılmıştır.

İnsan yenidoğan otopsilerine benzer şekilde (344), diyabetik sıçan yavruları ve bunların erişkin formlarının azalmış beyin ağırlığına sahip oldukları rapor edilmiştir (345). Genetik olarak diyabeti olan fareler üzerinde yapılan bir çalışmada da, yavrularda düşük beyin ağırlığı ile birlikte, myelin kılıfta ve nöral membranlarda gelişim geriliği bulunmuş (346). Ayrıca diyabetik sıçan yavrularında, cerebellumun purkinje hücrelerine ait dendritik uzantı mesafelerinde ve sinaptik aralıkta bir artış bulunmuş (345).

Çalışma grubumuzda annesi diyabet olan sıçanların öğrenmelerinin kontrol grubu sıçanlarına göre çok daha geri seviyede olduğunu tespit ettik. Önceki çalışmalarda annesi diyabet olan dişi sıçanlarda öğrenme eksikliği tespit edilirken, erkek sıçanlarda ise farklılık tespit edilmemiş (8). Biz çalışmamızı annesi diyabet olan erkek sıçanlarda yaptık ve erkek sıçanlarda da öğrenme eksikliği oluştuğunu tespit ettik. Bu farklılık çalışmalarda farklı türden sıçanların kullanılmasına bağlı olabilir.

Çalışmamızda görünen bir platformda annesi diyabet olan sıçanlarla kontrol grubu sıçanlarının performansını benzer bulduk. Bu bulgular, diyabetin yavru sıçanların bozulan performansına etkisinin sensorimotor defisitlerden çok bilişsel bozukluklara bağlı olduğunu göstermiştir. Aynı türden diyabetik sıçanlarla yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızda olduğu gibi öğrenme bozukluğu tespit edilmiş (9).

İn vitro bir çalışmada; sıçanlarda artmış ekstrasellüler glukoz miktarının, nöral krest hücrelerinin gelişimleri üzerine inhibitör bir etkiye sahip olduğu görülmüş (347). Diyabetik annelerden alınan embriyolara ait nöral krest hücrelerinin incelenmesiyle, tüm glukoz seviyelerinde, hücre migrasyonunun azalmış olduğu, bazal glukoz konsantrasyonlarında oluşturulan kültürlerde de migrasyon yeteneğinde

azalma olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular neticesinde, diyabetin sürekli bir etkinlikle, premigratuar kranial nöral hücrelerin gelişimini etkilediği bildirilmiştir (347).

Ramanathan ve arkadaşlarının (348) diyabetik anne yavrularının davranışlarını inceleyen bir çalışmada, bu hayvanların davranış testlerinde hiperaktivite ve labirente (elevated plus-maze) anksiyöz davranışlar sergiledikleri görülmüştür. Bu çalışmada yavruların performanslarını incelerken, potansiyel cinsiyet farklılıklarının rolü dikkate alınmamıştır.

Kinney ve arkadaşları (8) elevated plus-maze testinde diyabetik sıçanların erkek yavrularında hiperaktivite tablosu tespit etmişken, dişilerde böyle bir tabloya rastlamamışlar. Yine aynı araştırmacılar diyabetik anne yavrularında öğrenme ve hafızanın değerlendirilmesini Sprague-Dawley sıçanlarında yapmışlar. Lashley III Maze testinde diyabetik annelere ait dişi yavrularda öğrenme defisitleri daha belirgin bulunmuş, erkek sıçanlarda ise farklılık tespit edilmemiş. Öğrenme testinden 2 ve 4 hafta sonra hafıza testi yapılmış, 2. hafta sonundaki testte diyabetik annelere ait dişi yavruların anlamlı ölçüde fazla hatalar yaptığı bulunmuş, erkeklerde aynı testin sonucu anlamlı bulunmamış. 4. haftadaki testte erkek ve dişilerin yaptıkları hata sayısında anlamlı bir farklılık bulunmamış (8).

Neonatal hayatta hiperglisemiye maruziyetin kısa dönem / anlık hafıza üzerine etkilerini araştıran çalışmada, kontrol ve diyabetik sıçan yavrularının verilen görevi öğrendiği görülmüş. Dişi yavrular ile kontrol grubu ve erkek yavrular ile kontrol grubu arasında fark görülmemiş (8).

Maternal hipergliseminin öğrenmeyi inhibe edici etkisinin incelenmesi için yapılan çalışmada, diyabetik anne laktasyon süresince 5 İU/kg/gün insülin desteği almış ve yavrularını kendi beslemiş. Diyabet ve kontrol grubundaki sıçanlara ait yavruların median step-through latency'leri karşılaştırıldığında herhangi bir farklılık görülmemiş. Diyabetik annelere ait dişi yavruların hafıza çalışması boyunca median step-through latency'leri kontrol grubundan anlamlı olarak daha kısa bulunmuş. Kontrol ve erkek yavrular arasında anlamlı fark bulunmamış (8).

Kinney ve arkadaşları (8) yaptıkları çalışmalar sonucunda öğrenme bozukluklarını daha ziyade diyabetik annelere ait dişi yavrularda gözlemlemişler. Kısa dönem hafıza ve anlık hafıza çalışmalarında, diyabetik anne yavruları ve kontrol grubu arasında lökomotor etkinlik ve motivasyonda fark bulunmamış, yakın dönem hafıza sonuçları da aynı bulunmuş. Diyabetik dişi sıçan yavrularının zihinsel

gelişimlerdeki değişikliklerden, beyinin tümünü ilgilendiren bir etkiden ziyade, beyindeki belli bölgelerin, özellikle de uzun dönem hafızayla ilintili bir takım merkezlerin etkilendiği düşünülmüştür.

Diyabetik annelere ait yavrularda öğrenmenin cinsiyet ile farklılık göstermesi, diyabette intrauterin çevrenin cinsiyete bağlı olarak çocuklarda farklı zihinsel gelişim odaklarını etkileyebileceğini akla getirmektedir (8).

Battaglia ve Cabrera (349) gebeliğin son trimesteri boyunca prenatal kokaine maruz kalmış bir bebeğin hipotalamusunda serotonin reseptör aracılıklı bir takım değişiklikler olduğunu bulmuştur. Poltyrey ve Weinstock (350) da strese maruz kalan annelere ait yavruları incelediğinde, dişi yavruların tavır ve hareketlerinde anlamlı azalmaya karşı erkeklerde çok daha az seviyede bir gerileme olduğunu görmüşler. İntrauterin yaşamda maruz kalınan endojen ve eksojen bileşenlerin, erkek ve dişi cinsiyetteki yavruları farklı etkilemesinden dolayı zihinsel gelişimlerinin farklı olması mümkündür. Fakat diyabetik annelerin dişi yavrularının öğrenme geriliklerini net bir şekilde açıklayacak kesin bir mekanizma belirtilmemiştir.

İntrauterin yaşamda hiperglisemiye maruz kalan fetus normalin üzerinde fetal insülin üretir. Yapılmış çalışmalarda, insülinin makrozomiden başka fenotipik anomaliye neden olmayacağına karşıt kanıtlar ileri sürülse de (351,352), fetal hiperinsülineminin öğrenme ve hafıza ile ilişkili olduğu bilinen hipokampal gelişimi etkileyip etkilemediği bilinmemektedir.

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanlarda, öğrenme ve hafızada bozukluk (zayıflama) oluşmuştur. Önceki araştırmalarda doğrulandığı üzere, diyabetik sıçanlar ve diyabetik olmayan sıçanlar, Morris Water Maze testi ile karşılaştırıldığında, diyabetik sıçanlarda testin daha bozuk olduğu görülmüştür (9). Ayrıca görünen bir platformda, diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarının performansının benzer olmasından sonra, bu yeni bulgular, diyabetin, sıçanların bozulan performansına etkisinin, sensorimotor defisitlerden çok, bilişsel bozukluklara bağlı olduğunu göstermiştir (9). Diyabetik sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının, hipokampal sinaptik plastisiteye bağlı olduğu görülmüştür (10,11).

Öğrenme ve hafıza şekillenmesi (oluşması) esnasında, sinaptik değişimlerin oluşumuna NCAM'ın yol açtığı ileri sürülmektedir (12). Diyabetin bilişsel fonksiyonları dejenere ettiği, öğrenme ve hafıza fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir (10,11).

Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçanlardaki öğrenme ve hafıza bozukluklarının hipokampal sinaptik plastisite ve nörogenezis ile bağlantısını araştırmak için yavru sıçanların beyin dokusunda GFAP, erişkin sıçanların beyin dokusunda NCAM ve GFAP moleküllerine baktık. Çalışmamız annesi diyabet olan yavruların beyin dokusunda GFAP ve NCAM değişikliklerini ve bunların öğrenme ile ilişkisini araştıran ilk çalışmadır.

Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçanların hipokampusunda kontrol grubuna göre NCAM 120 daha az olmakla birlikte NCAM 140 ve NCAM 180 seviyelerinin belirgin olarak azaldığını bulduk. Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçan yavrularında GFAP seviyelerini, kontrol grubuna göre daha düşük bulduk. Erişkin sıçanlarda gruplar arasında anlamlı fark yoktu.

Diyabetik sıçanlardaki öğrenme bozukluğu için, olası bir açıklama olarak, sinaptik yeniden düzenlenme ve optimal NCAM konsantrasyonuna ihtiyaç duyan plastisite söylenebilir (353). Eğer sinapslarda aşırı NCAM oluşursa, yeni sinapslar oluşmadan inhibe olur. İkinci bir olasılık da diyabetin NCAM'ın polisializasyonunu engellediğidir. NCAM'da bulunan PSA, sinaptik bileşkede dinamik değişikliklere müsaade eder (354).

Böylece DM'da, hiperglisemi nöronlar arasındaki sinaptik yeniden düzenlenmeyi engelleyebilir. Ayrıca diyabette PSA azalır (355). Böylece NCAM 180 seviyesi ve öğrenme arasındaki negatif korelasyon yerine, NCAM seviyesindeki dengesizlik, PSA seviyesindeki değişiklik ve/veya bu ikisi arasındaki iletişim bozukluğu, sinaptik plastisiteyi, hafızanın temelini oluşturan mekanizmayı ve öğrenme fonksiyonunu azaltır.

Çalışmamızda daha önce diyabetik sıçanlarla yapılan çalışmalarda (9) olduğu gibi NCAM 140 değerlerini azalmış bulduk. NCAM 120 ve NCAM 180 seviyeleri bu çalışmalarda (9) yüksek bulunmuş, biz çalışmamızda azalmış olarak bulduk.

Çalışmamızda, NCAM eksikliği tespit edilen diyabetik sıçanlarla yapılan çalışmalarda (9) olduğu gibi öğrenme bozukluğu görüldü. Bu bulgular NCAM 'ın öğrenme ve uzun dönem hafızanın oluşmasında rolü olduğunu gösterebilir. Diyabet, yavruların beyin dokusunda NCAM 'ın polisializasyonunu engelleyerek sinaptik plastisite oluşumunu ve öğrenmeyi engelliyor olabilir. NCAM eksikliği sonucu diyabetik sıçan yavrularında beyin gelişimi ve sinaptik plastisite oluşumu engelleniyor olabilir.

NCAM 140 hem pre hem de postsinaptik membranlarda eksprese edilir ve hücre-hücre adezyonu ve nöron gelişiminde önemli rol oynar (12). NCAM 140 ekspresyonundaki azalma beyin gelişim sürecinde yapısal farklılıklar ile ilişkilendirilebilir (15). Biz de çalışmamızda NCAM 140 seviyesini azalmış olarak bulduk.

NCAM 180 kognitif fonksiyonlarla ilişkilidir. NCAM 180'nin sinaptik plastisite için önemli bir belirleyici olduğu ve sinaptik gücün stabilizasyonunu etkilediği öne sürülmektedir (250). NACM 180 ekspresyonundaki azalma, bilgilerin depolanması ile ilgili sinaptik destabilizasyona neden olur (15). Biz de çalışmamızda NCAM 180 seviyesini azalmış olarak bulduk.

Son yıllarda yapılan çoğu çalışmalar, NCAM'ın, öğrenme ve uzun dönem hafızanın tespit edilmesinde rolünü göstermektedir (228,269). Diyabetik hayvanlarla, diyabetik olmayan hayvanlar, öğrenmeye uyumluluk bakımından karşılaştırıldığında, diyabetiklerde NCAM seviyesinin azalmış olduğu ortaya çıkmıştır. NCAM antikorlarının intrakranial enjeksiyonu ile, antikorların pasif sakınma görevinde inhibisyona yardımcı olduğu görülmüştür (234). Ayrıca Morris Water Maze testine tabi tutulan NCAM eksikliği tespit edilmiş fareler, uzaysal öğrenmede yetersizlik gösterir (267). Böylece yetişkin beyinlerinde, rejenerasyon, öğrenme ile birlikte beyin gelişimi ve sinaptik plastisite esnasında NCAM'ın önemli olduğu ortaya çıkmaktadır.

STZ ile diyabet oluşturulan sıçanların beyinlerinde, hem hipokampusta hem de kortekste NCAM 140 seviyesinin azaldığı, NCAM 180 ve NCAM 120 seviyesinin artması ile NCAM izoformlarında bir dengesizlik olduğu görülmüştür (9).

NCAM, yetişkin beyinlerinde, beyin gelişimi ve sinaptik plastisite esnasında beyin dokusu gelişimini düzenler. NCAM upregülasyonu, retinal ganglion hücrelerinde ve kimyasal beyin hasarında rejenerasyonda görev alır (14,356,357). Diyabetik sıçanlarda, hipokampus ve kortekste NCAM'ın upregülasyonu, dokunun yeniden organize olmasının düzenlenmesinde potansiyel bir rol oynamaktadır. Baydaş ve arkadaşlarının bulguları, dejenere dokulardaki nöronal rejenerasyon oluşumuna yol açanın NCAM olduğu hipotezine uymaktadır (356,357).

Diyabetik sıçanlar ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, diyabetik sıçanların hipokampus ve kortekslerinde, NCAM 180 miktarının aşırı arttığı görülmüştür (9). NCAM 180, NCAM'ın ana formudur ve sinaptik bölgelerde hücre bağlanması stabilizasyonu için gereklidir (358). NCAM 180'in spektrin ve onun stoplazmik

kısmını etkilediği bilinmektedir. Bu etkileşme, NCAM 180'nin sinyal iletiminde önemli olduğunu ileri sürmektedir (4). Böylece NCAM 180'nin, nöronal bileşkenin yapısal olarak yeniden modellenmesinde, sinir sisteminin rejenerasyonunda önemli bir rolünün olduğu görülmektedir. Her ne kadar hiperglisemi, NCAM 180 artışı yapsa da, yapılan çalışmalarda diyabetin öğrenme bozukluğuna yol açtığı bulunmuştur. Ayrıca hipokampustaki NCAM seviyesi, öğrenme bozukluğu ile koreledir. Ancak NCAM izoformlarında anomalilere neden olan diyabetin mekanizması bilinmemektedir.

GFAP matür astrositlerin major intermediate filamentidir. Astrosit farklılaşması süresince anahtar olaylardan biri GFAP ekspresyonunun yapılmasıdır. İmmatür astrositler başlangıçta vimentin, olgunlaştıklarında GFAP eksprese ederler. GFAP astrosit olgunlaşma belirteci olarak tanınır. GFAP fetal yaşamda son derece az miktarda iken, beyinin gelişimi ile yoğunluğu artar (15).

Çalışmamızda annesi diyabet olan sıçan yavrularında GFAP seviyelerini, kontrol grubuna göre daha düşük bulduk. Erişkin sıçanlarda gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Bu bulgu diyabetik sıçan yavrularında beyin gelişiminin tam olmadığını, erişkinlerde beyin gelişiminin tamamlandığını gösterebilir. Bu sonuçlar bize diyabetik annelerde kan şekeri regülasyonu ile yavrularda beyin gelişiminin gecikmesi engellenebilir fikrini vermektedir.

Oksidatif stres diyabetik komplikasyonlar ve diyabetin altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim ve normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korur (306). Oksidatif stres, radikal üretimi ve radikal yok edici sistem arasındaki bir dengesizlikten kaynaklanır. Örneğin; serbest radikal üretiminin yükselmesi veya antioksidan aktivitesinin düşmesi ki her iki durumda da oksidatif stres meydana gelebilir. Diyabetlilerde protein glikasyonu ve glukoz otooksidasyonu sonradan LPO'nu katalizleyen serbest radikaller üretebilir (17,18). Bunların yanı sıra diyabetlilerde antioksidan savunma sisteminin bozuklukları gösterilmiştir; antioksidan enzimlerde değişiklik, bozulmuş GSH mekanizması ve azalmış askorbik asit seviyeleri görülmektedir (19-22). Ancak canlı ortamda yüksek oksidatif stres asla açık olarak gösterilememiştir. Tiyobarbütürik asit analiz maddesi kullanılarak hayvan ve insan modellerinde

yapılan çalışmalarla diyabetik yapıda lipoproteinler ve membranlarda LPO'nun yükselmiş olduğu gösterilmiştir (307).

Oksidatif strese sebep olan serbest radikal gruplarından biri ROS'dir. ROS diyabetlilerde yükselir. Periferel sinirler için ROS direkt olarak nöronları ve Schwann hücrelerini tahrip edebilir ve diyabetle birlikte antioksidan koruma mekanizmalarını tehlikeye atar.

Serbest bir sülfidril grubuna sahip olan indirgenmiş GSH, hücre içi bir sülfidril tamponu olarak etkilidir ve hücreleri oksidatif ve toksik etkilere karşı korur.

LPO sonucu açığa çıkan ürünler, membran permeabilitesini ve mikroviskozitesini önemli ölçüde etkilemektedir.

Kronik hiperglisemi LPO, protein oksidasyonu ve deoksiribonükleik asit oksidasyonu gibi artmış oksidatif stres belirteçlerine eşlik eder (23). Yapılan çalışmalarda, diyabetik sıçanların çeşitli beyin bölgelerinde LPO seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri düşük bulunmuş, vitamin E, melatonin ve gabapentin ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda LPO seviyeleri, tedavi edilmeyen diyabetik gruba göre daha düşük, GSH seviyeleri ise daha yüksek bulunmuş (16,23,268,359). Morris Water Maze testinde yüksek LPO ve düşük GSH seviyeleri olan sıçanların öğrenmeleri kontrol grubuna göre daha bozuk bulunmuş (23). Bu bulgular artmış oksidatif stresin öğrenme ve hafızayı etkileyebileceği fikrini verebilir.

Bizim çalışmamızda da diyabetik grupta LPO seviyeleri yüksek, GSH seviyeleri ise düşük bulundu. Bu durum bize diyabetli annelerin gebelikleri süresince alacakları antioksidan tedavinin, yavruları oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyucu olabileceğini gösterebilir.

Sonuç olarak diyabetik anne yavrularında öğrenme fonksiyonları bozulmaktadır. NCAM izoformlarının azalması beyin gelişimi, sinaptik plastisite oluşumunu engelleyebilir ve NCAM 'ın öğrenme ve uzun dönem hafızanın oluşmasında rolü olduğunu gösterebilir. GFAP yoğunluğunun azalması diyabetik anne yavrularında beyin maturasyonunun tamamlanmasını engelleyebilir. Diyabette, gebelik döneminde kan şekeri regülasyonu ile beyin gelişimi ve sinaptik plastisite oluşumu düzenlenebilir ve öğrenme eksikliği, beyin maturasyonun gecikmesi engellenebilir. Ayrıca diyabetik anne yavrularında LPO düzeyleri yüksek, GSH düzeyleri düşük bulunmuştur. Diyabette gebelikte antioksidan tedavi yavruları oksidatif stresin zararlı etkilerine karşı koruyucu olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston. 2005; 331-338.
2. Araki Y, Nomura M, Tanaka H, Yamamoto H, Yamamoto T, Tsukaguchi I. MRI of the brain in diabetes mellitus. *Neuroradiology* 1994; 36: 101–103.
3. Dejgaard A, Gade A, Larsson H, Bale V, Parving A, Parving HH. Evidence for diabetic encephalopathy. *Diabetic Med* 1991; 8: 162–167.
4. Pollerberg GE, Burridge K, Krebs KE, Goodman SR, Schachner M. The 180-kD component of the neural cell adhesion molecule N-CAM is involved in a cell-cell contacts and cytoskeleton-membrane interactions. *Cell and Tissue Research* 1987; 250: 227–236.
5. Ryan CM. Neurobehavioral complications of type 1 diabetes. Examination of possible risk factors. *Diabetes Care* 1988; 11: 86–93.
6. Tun PA, Nathan DM, Perlmutter LC. Cognitive and affective disorders in elderly diabetics. *Clin Geriatr Med* 1990; 6: 731–746.
7. Stewart R and Liolitsa D. Type 2 diabetes mellitus cognitive impairment and dementia. *Diabetic Medicine* 1999; 16: 93-112.
8. Kinney BA, Rabe MB, Jensen RA, Steger RW. Maternal hyperglycemia leads to gender-dependent deficits in learning and memory in offspring. *Exp Biol Med* 2003; 228: 152–159.
9. Baydas G, Nedzvetskii VS, Nerush PA, Kirichenko SV and Yoldas T. Altered expression of NCAM in hippocampus and cortex may underlie memory and learning deficits in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Life Sciences* 2003; 73: 1907-16.
10. Gispen WH and Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends in Neurosciences* 2000; 23: 542–549.
11. Biessels GJ, Kapella AC, Bravenboer B, Erkelens DW and Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1994; 37: 643–650.
12. Schachner M. Neural recognition molecules and synaptic plasticity. *Current Opinion in Cell Biology* 1997; 9: 627–634.
13. Bastmeyer M, Schlosshauer B, Stuermer CA. The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3. *Development* 1990; 108: 299–311.

14. Le Gall La Salle G, Rougon G, Valin A. The embryonic form of neural cell surface molecule (E-NCAM) in the rat hippocampus and its reexpression on glial cells following kainic acid-induced status epilepticus. *J Neurosci* 1992; 12: 872–882.
15. Baydas G, Koz ST, Tuzcu M, Nedzvetskii VS, Etem E. Effect of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring. *Int J Devl Neuroscience* 2007; 25: 133-139.
16. Baydas G, Nedzvetskii VS, Tuzcu M, Yasar A, Kirichenko SV. Increase of glial fibrillary acidic protein and S-100B in hippocampus and cortex of diabetic rats: effects of vitamin E. *Eur J Pharmacol* 2003; 462: 67-71.
17. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee L. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 173: 932-939.
18. Baynes JW. Role of oxidative stress in the development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
19. Strain JJ. Disturbances of micronutrient and antioxidant status in diabetes. *Proc Nutr Soc* 1991; 50: 591-604.
20. McLennan SV, Heffernan S, Wright L, Rae C, Fisher E, Yue DK, Turtle JR. Changes in hepatic glutathione metabolism in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 344-348.
21. Jennings PB, Chirico S, Jones AF, Lunee J, Barnett AH. Vitamin C metabolites and microangiopathy in diabetes mellitus. *Diabetes Research* 1987; 6: 151-154.
22. Young IS, Torney JJ, Trimble ER. The effect of ascorbate supplementation on oxidative stress in the streptozotocin diabetic rat. *Free Rad Biol Med* 1992; 13: 41-46.
23. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol*. 2006; 537: 106–110
24. Rewers M, Norris JM, Eisenbarth GS, Erlich HA, Beaty B, Klingensmith G et al. Beta-cell autoantibodies in infants and toddlers without IDDM relatives: Diabetes Autoimmunity Study in the Young (DAISY). *J Autoimmun* 1996; 9: 405-410.
25. Almind K, Doria A, Kahn CR. Putting the genes for type II diabetes on the map. *Nat Med* 2001; 7: 277-279.

26. Gavin JR III, Alberti KGMM, Davidson MB, De Fronzo RA, Drash A, Gabbe SG, et al. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997; 20: 1183-1197.
27. WHO Consultation Group. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications, 2nd ed. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus WHO/NCD/NCS/99. Geneva: World Health Organisation, 1999: 1-59.
28. WHO Study Group. Diabetes mellitus. Technical Report Series 727. Geneva: World Health Organization, 1985.
29. Savage PJ, Bennion LJ, Bennett PH. Normalization of insulin and glucagon secretion in ketosis-resistant diabetes mellitus with prolonged diet therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 49: 830-833.
30. Agner T, Damm P, Binder C. Remission in IDDM: prospective study of basal C-peptide and insulin dose in 268 consecutive patients. *Diabetes Care* 1987; 10: 164-169.
31. O'Sullivan JB. Diabetes mellitus after GDM. *Diabetes* 1991; 40: 131-135.
32. Bingley PJ, Christie MR, Bonifacio E, Bonfanti R, Shattock M, Fonte MT, et al. Combined analysis of autoantibodies improves prediction of IDDM in islet cell antibody-positive relatives. *Diabetes* 1994; 43: 1304-1310.
33. Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH, et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 1108-1112.
34. Shaw JE, Zimmet PZ, de Courten M, Dowse GK, Chitson P, Gareeboo H, et al. Impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. What best predicts future diabetes in Mauritius? *Diabetes Care* 1999; 22: 399-402.
35. de Vegt F, Dekker JM, Jager A, Hienkens E, Kostense PJ, Stehouwer CDA, et al. Relation of impaired fasting and postload glucose with incident type 2 diabetes in a Dutch population: The Hoorn Study. *JAMA* 2001; 285: 2109-2113.
36. Harris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Goldstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose, and impaired glucose tolerance in U.S. adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. *Diabetes Care* 1998; 21: 518-524.

37. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance: a multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991; 14: 173-194.
38. Tanaka S, Kobayashi T, Momotsu T. A novel subtype of type 1 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 2000; 342: 1835-1837.
39. Greenbaum CJ, Cuthbertson D, Eisenbarth GS, Schatz DA, Zeidler A, Krischer JP. Islet cell antibody positive relatives with HLA-DQA1*0102, DQB1*0602: identification by the Diabetes Prevention Trial-1. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 1255-1260.
40. Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay IR, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, et al. Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA): the role of antibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency. *Diabet Med* 1994; 11: 299-303.
41. Groop LC, Bottazzo GF, Doniach D. Islet cell antibodies identify latent type 1 diabetes in patients aged 35-75 years at diagnosis. *Diabetes* 1986; 35: 237-241.
42. Turner RC, Cull CA, Frighi V, Holman RR. Glycemic control with diet, sulfonylurea, metformin, or insulin in patients with type 2 diabetes mellitus: progressive requirement for multiple therapies (UKPDS 49). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. *JAMA* 1999;281:2005-2012.
43. King H, Rewers M. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. *Diabetes Care* 1993; 16: 157-177.
44. Fagot-Campagna A, Pettitt DJ, Engelgau MM, Burrows NR, Geiss LS, Valdez R, et al. Type 2 diabetes among North American children and adolescents: an epidemiologic review and a public health perspective. *J Pediatr* 2000; 136: 664-672.
45. Dabelea D, Pettitt DJ, Jones KL, Arslanian SA. Type 2 diabetes mellitus in minority children and adolescents. An emerging problem. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1999; 28: 709-729.
46. Dabelea D, Hanson RL, Bennett PH, Roumain J, Knowler WC, Pettitt DJ, et al. Increasing prevalence of type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia* 1998; 41: 904-910.
47. Kaufman FR. Type 2 diabetes mellitus in children and youth: a new epidemic. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2002; 15: 737-744.

48. Maassen JA. Mitochondrial diabetes: pathophysiology, clinical presentation, and genetic analysis. *Am J Med Genet* 2002; 115: 66-70.
49. Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, Diamuro S, Schon EA. The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet* 1992; 50: 934-949.
50. Steiner DF, Tager HS, Chan SJ, Nanjo K, Sanke T, Rubinstein AH. Lessons learned from molecular biology of insulin-gene mutations. *Diabetes Care* 1990; 13: 600-609.
51. Taylor SI. Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin-receptor gene. *Diabetes* 1992; 41: 1473-1490.
52. Stoss H, Pesch HJ, Pontz B, Otten A, Spranger J. Wolcott-Rallison syndrome: diabetes mellitus and spondyloepiphyseal dysplasia. *Eur J Pediatr* 1982; 138: 120-129.
53. Ferner RE. Drug-induced diabetes. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1992; 6: 849-866.
54. Jaeckel E, Manns M, Von Herrath M. Viruses and diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 958: 7-25.
55. Comess LJ, Bennett PH, Burch TA, Miller M. Congenital anomalies and diabetes in the Pima Indians of Arizona. *Diabetes* 1969; 18: 471-477.
56. Pettitt DJ, Knowler WC, Baird HR, Bennett PH. Gestational diabetes: infant and maternal complications of pregnancy in relation to third-trimester glucose tolerance in the Pima Indians. *Diabetes Care* 1980; 3: 458-464.
57. Pettitt DJ, Baird HR, Aleck KA, Bennett PH, Knowler WC. Excessive obesity in offspring of Pima Indian women with diabetes during pregnancy. *N Engl J Med* 1983; 308: 242-245.
58. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2004; 27: 88-90.
59. Kjos SL, Peters RK, Xiang A, Henry OA, Montoro MN, Buchanan TA. Predicting future diabetes in Latino women with gestational diabetes. Utility of early postpartum glucose tolerance testing. *Diabetes* 1995; 44: 586-591.

60. Edelstein SL, Knowler WC, Bain RP, Andres R, Barrett-Connor EL, Dowse GK, et al. Predictors of progression from impaired glucose tolerance to NIDDM: an analysis of six prospective studies. *Diabetes* 1997; 46: 701-710.
61. The DECODE study group. Glucose tolerance and mortality: comparison of WHO and American Diabetes Association diagnostic criteria. European Diabetes Epidemiology Group. *Diabetes epidemiology: collaborative analysis of diagnostic criteria in Europe*. *Lancet* 1999; 354: 617-621.
62. Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH, et al. Plasma glucose and prediction of microvascular disease and mortality: evaluation of 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23: 1113-1118.
63. Pan XR, Li GW, Hu YH, Wang JX, Yang WY, An ZX, et al. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance. The Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 537-544.
64. Tuomilehto J, Lindstrom J, Eriksson JG, Vale TT, Hamalainen H, Parikka PI, et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med* 2001; 344: 1343-1350.
65. The Diabetes Prevention Program Research Group: reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med* 2002; 346: 393-403.
66. Chiasson JL, Josse RG, Gomis R, Hanefeld M, Karasik A, Laakso M. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus: the STOP-NIDDM randomised trial. *Lancet* 2002; 359: 2072-2077.
67. Buchanan TA, Xiang AH, Peters RK, Kjos SL, Marroquin A, Goico J, et al. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes* 2002; 51: 2796-2803.
68. Genuth S, Alberti KG, Bennett P, Buse J, De Fronzo R, Kahn R, et al. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-3167.
69. The DECODE study group. Age- and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts. *Diabetes Care* 2003; 26: 61-69.
70. Unwin N, Shaw J, Zimmet P, Alberti KG. Impaired glucose tolerance and impaired fasting glycaemia: the current status on definition and intervention. *Diabet Med* 2002; 19: 708-723.

71. Pettit DJ, Bennett PH, Hanson RL, Narayan KMV, Knowler WC. Comparison of World Health Organization and National Diabetes Data Group procedures to detect abnormalities of glucose tolerance during pregnancy. *Diabetes Care* 1994; 17: 1264-1268.
72. De Sereday MS, Damiano MM, Gonzalez CD, Bennett PH. Diagnostic criteria for gestational diabetes in relation to pregnancy outcome. *J Diabetes Complications* 2003; 17: 115-119.
73. Murata M, Ohta N, Fujisawa S, Tsai JY, Sato S, Akagi Y, et al. Selective pericyte degeneration in the retinal capillaries of galactose-fed dogs results from apoptosis linked to aldose reductase-catalyzed galactitol accumulation. *J Diabetes Complications* 2002; 16: 363-370.
74. Romeo G, Liu WH, Asnaghi V, Kern TS, Lorenzi M. Activation of nuclear factor-kappaB induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes* 2002; 51: 2241-3348.
75. Pomere F, Allione A, Beltramo E, Buttiglieri S, D'Alu F, Ponte E, et al. Effects of protein kinase C inhibition and activation on proliferation and apoptosis of bovine retinal pericytes. *Diabetologia* 2003; 46: 416-419.
76. Yamagishi S, Amano S, Inagaki Y, Okamoto T, Koga K, Sasaki N, et al. Advanced glycation end products induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor in bovine retinal pericytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 290: 973-978.
77. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial cell death in human diabetes. *Circ Res* 2000; 87: 123-1132.
78. Bergstrand A, Bucht H. The glomerular lesions of diabetes mellitus and their electron-microscope appearances. *J Pathol Bacteriol* 1959; 77: 231-242.
79. Shimomura H, Spiro RG. Studies on macromolecular components of human glomerular basement membrane and alterations in diabetes. Decreased levels of heparan sulfate proteoglycan and laminin. *Diabetes* 1987; 36: 374-381.
80. Beisswenger PJ, Spiro RG. Studies on the human glomerular basement membrane. Composition, nature of the carbohydrate units and chemical changes in diabetes mellitus. *Diabetes* 1973; 22: 180-193.
81. Mason RM, Wahab NA. Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 1358-1373.

82. Nagata M, Katz ML, Robison WG Jr. Age-related thickening of retinal capillary basement membranes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986; 27: 437-440.
83. Robison WG Jr, Kador PF, Kinoshita H. Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* 1983; 221: 1177-1179.
84. Abdel Wahab N, Mason RM. Modulation of neutral protease expression in human mesangial cells by hyperglycaemic culture. *Biochem J* 1996; 320: 777-783.
85. Shankland SJ, Ly H, Thai K, Scholey JW. Glomerular expression of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) in normal and diabetic rats. *J Am Soc Nephrol* 1996; 7: 97-104.
86. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321-H326.
87. Williams SB, Goldfine AB, Timimi PK, Ting HH, Roddy MA, Simonson DC, et al. Acute hyperglycemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. *Circulation* 1998; 97: 1695-1701.
88. Nilsson SF. The significance of nitric oxide for parasympathetic vasodilation in the eye and other orbital tissues in the cat. *Exp Eye Res* 2000; 70: 61-72.
89. Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, et al. Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 1996; 272: 728-731.
90. El-Remessy AB, Behzadian MA, Abou-Mohamed G, Franklin T, Caldwell RW, Caldwell RB. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier by a mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. *Am J Pathol* 2003; 162: 1995-2004.
91. Thylefors B, Negrel AD, Pararajasegaram R, Dadzie KY. Global data on blindness. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 115-121.
92. Cai J, Boulton M. The pathogenesis of diabetic retinopathy: old concepts and new questions. *Eye* 2002; 16: 242-260.
93. Ferris FL 3rd, Davis MD, Aiello LM. Treatment of diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 1999; 341: 667-678.
94. Allt G, Lawrenson JG. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* 2001; 169: 1-11.

95. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res* 1996; 32: 687-698.
96. Midena E, Segato T, Radin S, di Giorgio G, Meneghini F, Piermarocchi S, et al. Studies on the retina of the diabetic db/db mouse. I. Endothelial cell-pericyte ratio. *Ophthalmic Res* 1989; 21: 106-111.
97. Agardh CD, Agardh E, Zhang H, Ostenson CG. Altered endothelial / pericyte ratio in Goto-Kakizaki rat retina. *J Diabetes Complications* 1997; 11: 158-162.
98. Morisaki N, Watanabe S, Fukuda K, Saito Y. Angiogenic interaction between retinal endothelial cells and pericytes from normal and diabetic rabbits, and phenotypic changes of diabetic cells. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 1999; 45: 67-77.
99. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 1998; 125: 1591-1598.
100. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest* 1999; 103: 159-165.
101. Osterby R, Gundersen HJ. Glomerular size and structure in diabetes mellitus. Early abnormalities. *Diabetologia* 1975; 11: 225-229.
102. Osterby R, Gundersen HJ. Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 1980; 18: 493-500.
103. Kimmelstiel P, Wilson C. Intercapillary lesions in the glomeruli of the kidney. *Am J Pathol* 1936; 12: 83-98.
104. Wiseman MJ, Saunders AJ, Keen H, Viberti G. Effect of blood glucose control on increased glomerular filtration rate and kidney size in insulin-dependent diabetes. *N Engl J Med* 1985; 312: 617-621.
105. Steffes MW, Brown DM, Basgen JM, Mauer SM. Amelioration of mesangial volume and surface alterations following islet transplantation in diabetic rats. *Diabetes* 1980; 29: 509-515.
106. Cooper ME. Interaction of metabolic and haemodynamic factors in mediating experimental diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2001; 44: 1957-1972.
107. Dyck PJ, Kratz KM, Kames JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM, et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy,

and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993; 43: 817-824.

108. Eichberg J. Protein kinase C changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy? *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 61-82.

109. Sugimoto K, Murakawa Y, Sima AA. Diabetic neuropathy a continuing enigma. *Diabetes Metab Res Rev* 2000; 16: 408-433.

110. Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharma AK, Boulton AJM, et al. Endoneurial localisation of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1993; 36: 454-459.

111. Kannel WB, Hjortland M, Castelli WP. Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham study. *Am J Cardiol* 1974; 34: 29-34.

112. Stone PH, Muller JE, Hartwell T, York BJ, Rutherford JD, Parker CB, et al. The MILIS Study Group. The effect of diabetes mellitus on prognosis and serial left ventricular function after acute myocardial infarction: contribution of both coronary disease and diastolic left ventricular dysfunction to the adverse prognosis. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14: 49-57.

113. Poirier P, Bogaty P, Garneau C, Marois L, Dumesnil JG. Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2001; 24: 5-10.

114. Abaci A, Oğuzhan A, Kahraman S, Eryol NK, Unal S, Arinç H, et al. Effect of diabetes mellitus on formation of coronary collateral vessels. *Circulation* 1999; 99: 2239-2242.

115. Yarom R, Zirkin H, Stammer G, Rose AG. Human coronary microvessels in diabetes and ischaemia. Morphometric study of autopsy material. *J Pathol* 1992; 166: 265-270.

116. Thompson EW. Quantitative analysis of myocardial structure in insulin-dependent diabetes mellitus: effects of immediate and delayed insulin replacement. *Proc Soc Exp Biol Med* 1994; 205: 294-305.

117. Warley A, Powell JM, Skepper JN. Capillary surface area is reduced and tissue thickness from capillaries to myocytes is increased in the left ventricle of streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1995; 38: 413-421.

118. Yamaji T, Fukuhara T, Kinoshita M. Increased capillary permeability to albumin in diabetic rat myocardium. *Circ Res* 1993; 72: 947-957.

119. Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* 2002; 136: 54-71.
120. Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, Levinson GE, Oldewurtel HA, Ahmad MR, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1977; 60: 884-899.
121. Spiro MJ, Crowley TJ. Increased rat myocardial type VI collagen in diabetes mellitus and hypertension. *Diabetologia* 1993; 36: 93-98.
122. Chen S, Evans T, Mukherjee K, Karmazyn M, Chakrabarti S. Diabetes-induced myocardial structural changes: role of endothelin-1 and its receptors. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1621-1629.
123. Perin PC, Maule S, Quadri R. Sympathetic nervous system, diabetes, and hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23: 45-55.
124. Scherrer U, Sartori C. Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* 1997; 96: 4104-4113.
125. Brownlee M. Advanced protein glycosylation in diabetes and aging. *Annu Rev Med* 1995; 46: 223-234.
126. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. BCL-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation endproducts in bovine endothelial cells. *J Clin Invest* 1996; 97: 1422-1428.
127. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
128. Schleicher ED, Wagner E, Nerlich AG. Increased accumulation of the glycoxidation product N(epsilon)-(carboxymethyl)lysine in human tissues in diabetes and aging. *J Clin Invest* 1997; 99: 457-468.
129. Schmidt AM, Yan SD, Wautier JL, Stern D. Activation of receptor for advanced glycation end products: a mechanism for chronic vascular dysfunction in diabetic vasculopathy and atherosclerosis. *Circ Res* 1999; 84: 489-497.
130. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H. Advanced glycation end products (AGEs) colocalize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997; 150: 523-531.
131. Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata S, Sugiyama S, Sakai H, et al. Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implication for

- glycooxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest* 1997; 100: 2995-3004.
132. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-438.
133. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Nonenzymatic glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity. A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94: 110-117.
134. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991; 40: 1328-1334.
135. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 11555-11558.
136. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar GC, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51: 3274-3282.
137. Adamis AP. Is diabetic retinopathy an inflammatory disease? *Br J Ophthalmol* 2002; 86: 363-365.
138. Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, Kirchhof B, Koizumi K, Dohmen S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression. *FASEB J* 2002; 16: 438-440.
139. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329: 977-986.
140. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, Miyata T, Isami S, Motoyoshi S, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. *Diabetes Res Clin Pract* 1995; 28: 103-117.
141. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352: 837-853.

142. Yki-Jarvinen H, Makimattila S. Insulin resistance due to hyperglycaemia: an adaptation protecting insulin-sensitive tissues. *Diabetologia* 1997; 40: 5141-5144.
143. Kaiser N, Sasson S, Feener EP, Boukobza-Vardi N, Higashi S, Moller DE, et al. Differential regulation of glucose transport and transporters by glucose in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Diabetes* 1993; 42: 80-89.
144. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
145. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
146. Jain SK, McVie R. Effect of glycemic control, race (white versus black), and duration of diabetes on reduced glutathione content in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 306-309.
147. Kimura F, Hasegawa G, Obayashi H, Adachi T, Hara H, Ohta M, et al. Serum extracellular superoxide dismutase in patients with type 2 diabetes: relationship to the development of micro and macrovascular complications. *Diabetes Care* 2003; 26: 1246-1250.
148. Augustin AJ, Dick HB, Koch F, Schmidt-Erfurth U. Correlation of blood-glucose control with oxidative metabolites in plasma and vitreous body of diabetic patients. *Eur J Ophthalmol* 2002; 12: 94-101.
149. Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001; 50: 1938-1942.
150. Lal MA, Korner A, Matsuo Y, Zelenin S, Cheng SX, Jaremko G, et al. Combined antioxidant and COMT inhibitor treatment reverses renal abnormalities in diabetic rats. *Diabetes* 2000; 49: 1381-1389.
151. Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK. Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1994; 37: 449-459.
152. Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress, and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18: 1160-1167.

153. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes* 1993; 42: 801-813.
154. Engerman RL, Kern TS, Larson ME. Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia* 1994; 37: 141-144.
155. Greene DA, Arezzo JC, Brown MB. Zenarestat Study Group. Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. *Neurology* 1999; 53: 580-591.
156. Sorbinil Retinopathy Trial Research Group. A randomized trial of sorbinil, an aldose reductase inhibitor, in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1990; 108: 1234-1244.
157. Asahina T, Kashiwagi A, Nishio Y, Ikebuchi M, Harada N, Tanaka Y, et al. Impaired activation of glucose oxidation and NADPH supply in human endothelial cells exposed to H₂O₂ in high-glucose medium. *Diabetes* 1995; 44: 520-526.
158. Zhang Z, Apse K, Pang J, Stanton RC. High glucose inhibits glucose-6-phosphate dehydrogenase via cAMP in aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 40042-40047.
159. Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J* 2001; 15: 1771-1773.
160. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790.
161. Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 2000; 86: 494-501.
162. Gorlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse RA. Agp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res* 2000; 87: 26-32.
163. Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res* 2001; 88: E14-E22.

164. Kim YK, Lee MS, Son SM, Kim IJ, Lee WS, Rhim BY, et al. Vascular NADH oxidase is involved in impaired endothelium-dependent vasodilation in OLETF rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 522-527.
165. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 1993; 91: 2546--2551.
166. Desco MC, Asensi M, Marquez R, Martinez-Valls J, Vento M, Pallardo FV, et al. Xanthine oxidase is involved in free radical production in type 1 diabetes: protection by allopurinol. *Diabetes* 2002; 51: 1118-1124.
167. Hunt JV, Dean RT, Wolff SP. Hydroxyl radical production and autoxidative glycosylation. Glucose autoxidation as the cause of protein damage in the experimental glycation model of diabetes mellitus and ageing. *Biochem J* 1988; 256: 205-212.
168. Jain SK, McVie R, Jackson R, Levine SN, Lim G. Effect of hyperketonemia on plasma lipid peroxidation levels in diabetic patients. *Diabetes Care* 1999; 22: 1171-1175.
169. Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and O-GlcNAc. *Science* 2001; 291: 2376-2378.
170. Lee TS, Saltsman KA, Ohashi H, King GL. Activation of protein kinase C by elevation of glucose concentration: proposal for a mechanism in the development of diabetic vascular complications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 5141-5145.
171. Inoguchi T, Xia P, Kunisaki M, Higasi S, Feener EP, King GL. Insulin's effect on protein kinase C and diacylglycerol induced by diabetes and glucose in vascular tissues. *Am J Physiol* 1994; 267: E369-E379.
172. Yu HY, Inoguchi T, Kakimoto M, Nakashima N, Imamura M, Hashimoto T, et al. Saturated non-esterified fatty acids stimulate de novo diacylglycerol synthesis and protein kinase C activity in cultured aortic smooth muscle cells. *Diabetologia* 2001; 44: 614-620.
173. Tesfamariam B, Brown ML, Cohen RA. Elevated glucose impairs endothelium dependent relaxation by activating protein kinase C. *J Clin Invest* 1991; 87: 1643-1648.
174. Jack A, Cameron NE, Cotter MA. Treatment with the protein kinase C β inhibitor, LY333531, attenuates the development of impaired endothelium dependent vasodilatation in the mesenteric vasculature of diabetic rats. *Diabetes* 1999 (abst 558).

175. Zhang SL, Filep JG, Hohman TC, Tang SS, Ingelfinger JR, Chan JS. Molecular mechanisms of glucose action on angiotensinogen gene expression in rat proximal tubular cells. *Kidney Int* 1999; 55: 454-464.
176. Laakso M, Edelman Sv, Brechtel G, Baron AD. Decreased effect of insulin to stimulate skeletal muscle blood flow in obese man. A novel mechanism for insulin resistance. *J Clin Invest* 1990; 85: 1844-1852.
177. Laakso M, Edelman Sv, Brechtel G, Baron AD. Impaired insulin-mediated skeletal muscle blood flow in patients with NIDDM. *Diabetes* 1992; 41: 1076-1083.
178. Yki-Jarvinen H, Utriainen T. Insulin-induced vasodilatation: physiology or pharmacology. *Diabetologia* 1998; 41: 369-379.
179. Su EN, Yu DY, Alder VA, Cringle SJ, Yu PK. Direct vasodilatory effect of insulin on isolated retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2634-2644.
180. Schmetterer L, Muller M, Fasching P, Diepolder C, Gallenkamp A, Zanaschka G, et al. Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. *Diabetes* 1997; 46: 1868-1874.
181. Chen YL, Messina EJ. Dilation of isolated skeletal muscle arterioles by insulin is endothelium dependent and nitric oxide mediated. *Am J Physiol* 1996; 270: H2120-H2124.
182. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A, Fineberg N, Baron AD. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994; 94: 1172-1179.
183. Duplain H, Burcelin R, Sartori C, Cook S, Egli M, Lepori M, et al. Insulin resistance, hyperlipidemia and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2001; 104: 342-345.
184. Kuboki K, Jiang ZT, Takahara N, Ha SW, Igarashi M, Yamauchi T, et al. Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation* 2000; 101: 676-681.
185. Montagnani M, Chen H, Barr VA, Quon MJ. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt at Ser (1179). *J Biol Chem* 2001; 276: 30392-30398.
186. Natarajan R, Scott S, Bai W, Yerneni KKV, Nadler J. Angiotensin II signaling in vascular smooth muscle cells under high glucose conditions. *Hypertension* 1999; 33: 378-384.

187. Ho FM, Liu SH, Liau CS, Huang PJ, Lin-Shiau SY. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH(2)-terminal kinase and caspase-3. *Circulation* 2000; 101: 2618-2624.
188. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9: 669-676.
189. Alello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
190. Boulton M, Foreman D, Williams G, Mcleod D. VEGF localisation in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* 1998; 82: 561-568.
191. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47: 401-406.
192. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 2229-2239.
193. Bortoloso E, Del Prete D, Gambaro G, Dalla Vestra M, Sailer A, Baggio B, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in diabetic nephropathy: expression studies in biopsies of type 2 diabetic patients. *Ren Fail* 2001; 23: 483-493.
194. Freyberger H, Brocker M, Yakut H, Hammer J, Effert R, Schifferdecker E, et al. Increased levels of platelet-derived growth factor in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2000; 108: 106-109.
195. Koyama N, Watanabe S, Tezuka M, Morisaki N, Saito Y, Yoshida S. Migratory and proliferative effect of platelet-derived growth factor in rabbit retinal endothelial cells: evidence of an autocrine pathway of platelet-derived growth factor. *J Cell Physiol* 1994; 158: 1-6.
196. Yokota T, Ma RC, Park JY, Isshiki K, Sotiropoulos KB, Rauniyar RK, et al. Role of protein kinase C on the expression of platelet-derived growth factor and endothelin-1 in the retina of diabetic rats and cultured retinal capillary pericytes. *Diabetes* 2003; 52: 838-845.
197. Inaba T, Ishibashi S, Gotada T, Kawamura M, Morino N, Nojima Y, et al. Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose.

- Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes* 1996; 45: 507-512.
198. Sharma K, Ziyadeh FN, Alzahabi B, McGowan TA, Kapoor S, Kurnik BR, et al. Increased renal production of transforming growth factor-beta1 in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 854-859.
199. Wahab NA, Yevdokimova N, Weston BS, Roberts T, Li XJ, Brinkman H, et al. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Biochem J* 2001; 359: 77-87.
200. Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 25-38.
201. Murphy M, Godson C, Cannon S, Kato S, Mackenzie HS, Martin F, et al. Suppression subtractive hybridization identifies high glucose levels as a stimulus for expression of connective tissue growth factor and other genes in human mesangial cells. *J Biol Chem* 1999; 274: 5830-5834.
202. Bereket A, Lang CH, Wilson TA. Alterations in the growth hormone insulin-like growth factor axis in insulin dependent diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1999; 31: 172-181.
203. Gilbert RE, Krum H, Wilkinson-Berka J, Kelly DJ. The renin-angiotensin system and the long-term complications of diabetes: pathophysiological and therapeutic considerations. *Diabet Med* 2003; 20: 607-621.
204. Mehler PS, Jeffers BW, Estacio R, Schrier R.W. Associations of hypertension and complications in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Hypertens* 1997; 10: 152-161.
205. Anderson S, Rennke HG, Garcia DL, Brenner BM. Short and long term effects of anti hypertensive therapy in the diabetic rat. *Kidney Int* 1989; 36: 526-536.
206. Singh R, Alavi N, Singh AK, Leehey DJ. Role of angiotensin II in glucose-induced inhibition of mesangial matrix degradation. *Diabetes* 1999; 48: 2066-2073.
207. Price DA, Porter LE, Gordon M, Fisher NDL, De'Oliveria JMF, Laffel LMB, et al. The paradox of the low-renin state in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2382-2391.

208. Schunkert H, Ingelfinger JR, Jacob H, Jackson B, Bouyounes B, Dzau VJ. Reciprocal feedback regulation of kidney angiotensinogen and renin mRNA expressions by angiotensin II. *Am J Physiol* 1992; 263: E863-E869.
209. Ding Y, Vaziri ND, Coulson R, Kamana VS, Roh DD. Effects of simulated hyperglycemia, insulin and glucagon on endothelial nitric oxide synthase expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279: E11-E17.
210. Zou MR, Shi C, Cohen RA. High glucose via peroxynitrite causes tyrosine nitration and inactivation of prostacyclin synthase that is associated with thromboxane/prostaglandin H(2) receptor-mediated apoptosis and adhesion molecule expression in cultured human aortic endothelial cells. *Diabetes* 2002;51:198-203.
211. Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. C-reactive protein decreases prostacyclin release from human aortic endothelial cells. *Circulation* 2003; 108: 1676-1678.
212. Hopfner RL, Gopalakrishnan V. Endothelin: emerging role in diabetic vascular complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1383-1394.
213. Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF, Mayo W, et al. PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *J Devl Neuroscience* 2000; 18: 213-220.
214. Thomsen NK, Soroka V, Jensen PH, Berezin V, Kiselyov VV, Bock E, et al. The three-dimensional structure of the first domain of neural cell adhesion molecule. *Nature Struct Biol* 1996; 3: 581-585.
215. Xiao P, Bahr BA, Staubli U, Vanderklish PW, Lynch G. Evidence that matrix recognition contributes to the stabilization but not the induction of LTP. *Neuroreport* 1991; 2: 461-464.
216. Chen BM, Grinnell AD. Kinetics, Ca²⁺ dependence, and biophysical properties of integrin-mediated mechanical modulation of transmitter release from frog motor nerve terminals. *J Neurosci* 1997; 17: 904-916.
217. Jiang P, Lagenaur CF, Narayanan V. Integrin-associated protein is a ligand for the p84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem* 1999; 274: 559-562.
218. Huang AM, Wang HL, Tang YP, Lee EH. Expression of integrin associated protein gene associated with memory formation in rats. *J Neurosci* 1998; 18: 4305-4313.
219. Yamagata M, Hermann JP, Sanes JR. Laminin-specific expression of adhesion molecules in developing chick optic tectum. *J Neurosci* 1995; 15: 4556-4571.

220. Fannon AM, Colman DR. A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron* 1996; 17: 423-434.
221. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 619-627.
222. Beesley PW, Mummery R, Tibaldi J. N-cadherin is a major glycoprotein of isolated rat brain postsynaptic densities. *J Neurochem* 1995; 64: 2288-2294.
223. Tang L, Hung CP, Schuman EM. A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 1998; 20: 1165-1175.
224. Benson DL, Tanaka H. N-cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *J Neurosci* 1998; 18: 6892-6904.
225. Ronn LCB, Hartz BP, Bock E. The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system. *Exp Gerontol* 1998; 33: 853-864.
226. Cremer H, Chazal G, Goridis C, Represa A. NCAM is essential for axonal growth and fasciculation in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 1997; 8: 323-335.
227. Cremer H, Chazal G, Carleton A, Goridis C, Vincent JD, Lledo PM. Long-term but not short-term plasticity at mossy fiber synapses is impaired in neural cell adhesion molecule-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13242-13247.
228. Murase S, Schuman EM. The role of cell adhesion molecules in synaptic plasticity and memory. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 549-553.
229. Luthi A, Mohajeri H, Schachner M, Laurent JP. Reduction of hippocampal long-term potentiation in transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *J Neurosci Res* 1996; 46: 1-6.
230. Doherty P, Walsh FS. CAM- FGF receptor interactions: a model for axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 1996; 8: 99-111.
231. Holst BD, Vanderklish PW, Krushel LA, Zhov W, Langdon RB, McWhirter JR, et al. Allosteric modulation of AMPA-type glutamate receptors increases activity of the promoter for the neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 2597- 2602.
232. Edelman GM. And Crossin KL. Cell adhesion molecules implications for a molecular histology. *Annu Rev Biochem* 1991; 60: 155- 159.
233. Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM. Hippocampal NCAM180 transiently increases silylation during the acquisition and consolidation of a passive avoidance response in adult rat. *J Neurosci Res* 1992; 31: 513-523.

234. Doyle E, Nolan PM, Bell R, Regan CM. Intraventricular infusions of anti-neural cell adhesion molecules in a discrete postraining period impair consolidation of a passive avoidance response in the rat. *J Neurochem* 1992; 59: 1570-1573.
235. Chuong CM, Edelman GM. Alterations in neural cell adhesion molecules during development of the nervous system. *J Neurosci* 1984; 4: 2354- 2368.
236. Gaardsvoll H, Krog L, Zhernosekov D, Andersson AM, Edvardsen K, Olsen M, et al. Age-related changes in expression of neural cell adhesion molecule (NCAM) in heart: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Eur J Cell Biol* 1993; 61: 100-107.
237. Hoffman S, Grumet H, Edelman GM. Cell adhesion molecules in the histogenesis of nerve and muscle, In: Ferrans VJ, Rosenuist G, Weinstein(eds): *Cardiac Morphogenesis* Elsevier Science Publishers. New York 1985; 36-43.
238. Wharton J, Gordon L, Walsh FS, Flanigon TP, Moore SE, Polak JM. Neural cell adhesion molecule expression during cardiac development in the rat. *Brain Research* 1989; 483: 170- 176.
239. Poltorak M, Frye MA, Wright R, Hemperly JJ, George MS, Pazzaglia PJ, et al. Increased neural cell adhesion molecule in the CSF of patients with mood disorder. *J Neurochem* 1996; 66: 1532- 1538.
240. Cotman CW, Hailer NP, Pfister KK, Soltesz I, Schachner M. Cell adhesion molecules in neural plasticity and pathology: similar mechanism, distinct organizations? *Progress in Neurobiology* 1998; 55: 659-669.
241. Davis GW, Schuster CM, Goodman CS. Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* 1996; 17: 669-679.
242. Doherty P, Walsh FS. Signal transduction events underlying neurite outgrowth stimulated by cell adhesion molecules. *Cur Opin Neurobiol* 1994; 4: 49-55.
243. Frei T, von Bohlen und Halbach F, Wille W, Schachner M. Different extracellular domains of the neural cell adhesion molecule (NCAM) are involved in different functions. *J Cell Biol* 1992; 118: 177-194.
244. Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM. Cell adhesion molecules in early chicken embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 6737-6741.
245. Maier CE, Watanebe M, Singer M, McQuarrie IG, Sunshine J, Rutishauser U. Expression and function of neural cell adhesion molecule during limb regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 8395-8399.

246. Martini R, Schachner M. Immunoelectron microscopic localisation of neural cell adhesion molecules (L1, NCAM, and myelin-associated glycoprotein) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 1988; 106: 1735-1746.
247. Nieke J, Schachner M. Expression of the neural cell adhesion molecules L1 and NCAM and their common carbohydrate epitope L/HNK-1 during development and after transection of mouse sciatic nerve. *Differentiation* 1985; 30: 141-151.
248. Stefano ME, Leone L, Paggi P. Polysialylated neural cell adhesion molecule is involved in the neuroplasticity induced by axonal injury in the avian ciliary ganglion. *Neuroscience* 2001; 103:1093-1104.
249. Tzeng SF, Cheng H, Lee YS, Wu JP, Hoffer BJ, Kuo JS. Expression of neural cell adhesion molecule in spinal cords following a complete transection. *Life Science* 2001; 19: 1005-1012.
250. Dityatev A, Dityateva G, Schachner M. Synaptic strength as a function of post-versus presynaptic expression of the neural cell adhesion molecule NCAM. *Neuron* 2000; 26: 207-217.
251. Andersson AM, Olsen M, Zhernosekov D, Gaardsvoll H, Krog L, Linnemann D, et al. Age-related changes in expression of the neural cell adhesion molecule in skeletal muscle: a comparative study of newborn, adult and aged rats. *Biochem J* 1993; 15: 641-648.
252. Murray BA, Hemperly JJ, Prediger EA, Edelman GM, Cunningham BA. Alternatively spliced mRNAs code for different polypeptide chains of the chicken neural cell adhesion molecule (NCAM). *J Cell Biol* 1986; 102: 189-193.
253. Nybroe O, Albrechtsen M, Dahlin J, Linnemann D, Lyles JM, Moller CJ, et al. Biosynthesis of the neural cell adhesion molecule: Characterization of polypeptide C. *J Cell Biol* 1985; 101: 2310-2315.
254. Rafuse VF, Polo-Parada L, Landmesser LT. Structural and functional alterations of neuromuscular junctions in NCAM-deficient mice. *J Neurosci* 2001; 20: 6529-6539.
255. Kiss JZ. A role of adhesion molecules in neural plasticity. *Molecular and cellular Endocrinology* 1998; 140: 89-94.
256. Kiss JZ, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D. The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Res Rev* 2001; 36: 175-184.
257. Owens GC, Edelman GM, Cunningham BA. Organization of the neural cell adhesion molecule (NCAM) Gene: Alternative exon usage as the basis for different membrane-associated domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 294-298.

258. Sadovl R, Hirn M, Degostini-Bazin H, Rougon G, Goridi C. Adult and embryonic mouse neural adhesion molecules have different binding properties. *Nature* 1983; 304: 347-349.
259. Small SJ, Shull GE, Santoni MJ, Akeson R. Identification of a cDNA clone that contains the complete coding sequence for a 140-kDa rat NCAM polypeptide. *J Cell Biol* 1987; 105: 2334- 2345.
260. Thompson J, Dickson G, Moore SE, Gower HJ, Putt W, Kenimer JG, et al. Alternative splicing of the neural cell adhesion molecule gene generates variant extracellular domain structure in skeletal muscle and brain. *Genes & Development* 1989; 3: 348-357.
261. Barthels P, Santoni MJ, Wille W, Ruppert C, Chaix JC, Hirsh MR, et al. Isolation and nucleotide sequence of mouse NCAM cDNA that codes for a Mr 79000 polypeptide without a membrane-spanning region. *Embo Journal* 1987; 6: 907-914.
262. Jain SK, Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. *Free Rad Biol Med* 1997; 22; 593-596.
263. Mayford M, Barzilai A, Keller F, Schacher S, Kandel ER. Modulation of an NCAM-related adhesion molecule with long-term synaptic plasticity in *Aplysia*. *Science* 1992; 256: 638-644.
264. Hemperly JJ, Murray BA, Edelman GM, Cunningham BA. Sequence of a cDNA clone encoding the polysialic acid-rich and cytoplasmic domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 3037-3041.
265. Linnemann D, Skarsfelt T. Regional changes in expression of NCAM, GFAP, and S100 in aging rat brain. *Neurobiology of Aging* 1994; 5: 651-655.
266. Scholey AB, Rose SPR, Zamani MR, Bock E, Schachner M. A role for the neural cell adhesion molecule in a late, consolidating phase of glycoprotein synthesis 6 h following passive avoidance training of the young chick. *Neuroscience* 1993; 55: 499-509.
267. Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, et al. Inactivation of the NCAM gene in mice result in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning. *Nature* 1994; 367: 455-459.
268. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS, Yasar A, Tuzcu M, Ozveren F, et al. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicology Letter* 2003; 137: 169-174.

269. Fields RD, Itoh K. Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. *Trends Neuroscience* 1996; 19: 473-480.
270. Crossin KL, Krushel LA. Cellular signalling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Developmental Dynamics* 2001; 218: 260-279.
271. Sharma M, Gupta YK. Effect of chronic treatment of melatonin on learning, memory and oxidative deficiencies induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2001; 70: 325-331.
272. Escames G, Guerrero JM, Reiter RJ, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A, Ortiz GG, et al. Melatonin and vitamin E limit nitric oxide-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates. *Neuroscience Letters* 1997; 230: 147-150.
273. Kiss JZ, Rougon G. Cell biology of polysialic acid. *Cur Opin Neurobiol* 1997; 7: 640-646.
274. Fukui K, Onodera K, Shinkai T, Suzuki S, Urano S. Impairment of learning and memory in rats caused by oxidative stress and aging, and changes in antioxidative defense systems. *Ann N York Acad Sci* 2001; 928: 168-175.
275. Carneiro RC, Reiter RJ. Melatonin protects against lipid peroxidation induced by delta-aminolevulinic acid in rat cerebellum, cortex and hippocampus. *Neuroscience* 1998; 82: 293-299.
276. Krog L, Olsen M, Dalseg AM, Roth J, Bock E. Characterization of soluble neural cell adhesion molecule in rat brain, CSF, and plasma. *J Neurochem* 1992; 59: 838-847.
277. Schuster T, Krug M, Hassan H, Schachner M. Increase in proportion of hippocampal spine synapses expressing neural cell adhesion molecule NCAM180 following long-term potentiation. *J Neurobiol* 1998; 37: 359-372.
278. O'Connell AW, Fox GB, Bary T, Murphy KJ, Fichera G, Foley AG, et al. Spatial learning activities neural cell adhesion molecule polysialylation in corticohippocampal pathway within the medial temporal lobe. *J Neurochem* 1997; 68: 2538-2546.
279. Fox GB, O'Connell AW, Murphy KJ, Regan CM. Memory consolidation induces a transient and time-dependent increase in the frequency of neural cell adhesion molecule polysialylated cells in the adult rat hippocampus. *J Neurochem* 1995; 65: 2796-2799.
280. D'hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36: 60-90.

281. Nothias F, Vernier P, Von Boxberg Y, Mirman S, Vincent JD. Modulation of NCAM polysialylation is associated with morphofunctional modifications in the hypothalamo-neurohypophysial system during lactation. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 1553-1565.
282. McEwen BS, De Kloet ER, Rostene W. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol Rev* 1986; 66: 1121-1188.
283. Lupien SJ, McEwen BS. The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies. *Brain Res Rev* 1997; 24: 1-27.
284. Gould E, McEwen BS, Tanapat P, Galea LAM, Fuchs E. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult tree shrew is regulated by psychosocial stress and NMDA receptor activation. *J Neurosci* 1997; 17: 2492-2498.
285. Ronn LCB, Berezin V, Bock E. The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci* 2000; 18: 193-199.
286. Kadmon G, Kowitz A, Altevogt P, Schachner M. The neural cell adhesion molecule N-CAM enhances L1-dependent cell-cell interactions. *J Cell Biol* 1990; 110: 193-208.
287. Regan CM, Fox GB. Polysialylation as a regulator of neural plasticity in rodent learning and aging. *Neurochem Res* 1995; 20: 593-598.
288. Muller D, Wang C, Skibo G, Toni N, Cremer H, Calaora V, et al. PSA-NCAM is required for activity-induced synaptic plasticity. *Neuron* 1996; 17: 413-422.
289. Rafuse VF, Landmesser L. Contractile activity regulates isoform expression and polysialylation of NCAM in cultured myotubes: Involvement of Ca^{+2} and protein kinase-C. *J Cell Biol* 1996; 132: 969-983.
290. Wieraszko A, Ball GF. Long-term potentiation in the avian hippocampus does not require activation of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor. *Synapse* 1993; 13: 173-178.
291. Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji*. 9. baskı. Editör: Çavuşoğlu H. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul. 1996; 57: 733-734.
292. Taner D. *Fonksiyonel Anatomi, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş.-Metu Press-Yayımları*, Ankara. 1998; 231-232.
293. Muller D, Djebbara-Hannas Z, Jourdain P, Vutskits L, Durbec P, Rougon G, et al. Brain-derived neurotrophic factor restores long-term potentiation in polysialic acid-neural cell adhesion molecule-deficient hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4315-4320.

294. Ganong WF. *Tıbbi Fizyoloji, Nobel Tıp Kitabevleri*, 20. baskı. İstanbul 2002; Bölüm: 16, 259-263.
295. Baydas G, Nedzvetsky VS, Nerush PA, Kirichenko SV, Demchenko, HM Reiter RJ. A novel role for melatonin: regulation of the expression of cell adhesion molecules in the rat hippocampus and cortex. *Neuroscience Letters* 2002; 326: 109-112.
296. Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-695.
297. Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuna-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging, Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 854: 410-424.
298. Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. *Br Med Bull* 1993; 49: 642-652.
299. Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988; 84: 223-231.
300. Marklund SL, Hagglof B. Plasma EC-superoxide dismutase activity in insulin-dependent diabetic children. *Clinica Chimica Acta* 1984; 142: 299-305.
301. Hagglof B, Marklund SL, Holmgren G. CuZn superoxide dismutase, Mn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in lymphocytes and erythrocytes in insulin-dependent diabetic children. *Acta Endocrinology* 1983; 102: 235-239.
302. Scribner KA, Walker CD, Cascio CS, Dallman MF. Chronic streptozotocin diabetes in rats facilitates the acute stress response without altering pituitary or adrenal responsiveness to secretagogues. *Endocrinology* 1991; 129: 99-108.
303. Scribner KA, Akana SF, Walker CD, Dallman MF. Streptozotocin-diabetic rats exhibit facilitated adrenocorticotropin responses to acute stress, but normal sensitivity to feedback by corticosteroids. *Endocrinology* 1993; 133: 2667-2674.
304. Birrell AM, Heffernan SJ, Anselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, et al. Functional and structural abnormalities in the nerves of type 1 diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.
305. Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia* 1999; 42: 773-788.

306. Packer L. The role of anti-oxidative treatment in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 1212-1213.
307. Velazques B, Winocour PH, Kesteven P, Alberti KGMM, Lakeer MF. Relation of lipid peroxides to macrovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetic Medicine* 1991; 8: 752-758.
308. MacRury SM, Gordon D, Wilson R, Bradley H, Gemmell CG, Paterson JR, et al. A comparison of different methods of assessing free radical diabetes and peripheral vascular disease. *Diabetic Medicine* 1993; 10: 331-335.
309. Ganong WF. *Tıbbi Fizyoloji*. 16. baskı. Editör : Doğan. A. Barış Kitabevi, İstanbul. 1995; Bölüm 19: 365-386.
310. Kamal A, Biessels GJ, Duis SE, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: Interaction of diabetes and ageing. *Diabetologia* 2000; 43: 5000-5006.
311. Biessels GJ, Kamal A, Ramakers GM, Urban IJ, Spruijt BM, Erkelens DW, et al. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 1996; 45: 1259-1266.
312. Meister A. On the antioxidant effects of ascorbic acid and glutathione. *Biochem Pharmacol* 1992; 44: 1905-1915.
313. McCoy RN, Hill KE, Ayon MA, Stein JH, Burk RF. Oxidant stress following renal ischemia: changes in the glutathione redox ratio. *Kidney Int* 1988; 33: 812-817.
314. Ripalda MJ, Rudolph N, Wong SL. Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res* 1989; 26: 366-369.
315. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 1982; 47: 412-426.
316. Gutteridge JM, Halliwell B: The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. *Trends Biochem Sci* 1990; 15: 129-135.
317. Frank L, Massaro D. Oxygen toxicity. *Am J Med* 1980; 69: 117-126.
318. Ledwozyw A, Michalak J, Stepien A, Kadziolka A. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 1986; 155: 275-283.
319. Dyck PJ (editor). *Periferik Nöropati*. Harati Y (Çeviren). Bilimsel ve Teknik Yayınları Çeviri Vakfı, İstanbul. 1992; 231-264.
320. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 29: 681-683.

321. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680–685.
322. Hod M, Levy-Shiff R, Lerman M, Schindel B, Ben-Rafael Z, Bar J. Developmental outcome of offspring of pregestational diabetic mothers. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12: 867–872.
323. Rizzo T, Freinkel N, Metzger BE, Hatcher R, Burns WJ, Barglow P. Correlations between antepartum maternal metabolism and newborn behavior. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: 1458–1464.
324. Rizzo T, Metzger BE, Burns WJ, Burns K. Correlations between antepartum maternal metabolism and intelligence of offspring. *N Engl J Med* 1991; 325: 911–916.
325. Rizzo T, Metzger BE, Dooley SL, Cho NH. Early malnutrition and child neurobehavioral development: insights from the study of children of diabetic mothers. *Child Dev* 1997; 68: 26–38.
326. Sells CJ, Robinson NM, Brown Z, Knopp RH. Long-term developmental follow-up of infants of diabetic mothers. *J Pediatr* 1994; 125: 9–17.
327. Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. Long-term effects of the intrauterine environment. *Diabetes Care* 1998; 21: B142–B149.
328. Silverman BL, Rizzo T, Green OC, Cho NH, Winter RJ, Ogata ES, et al. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. *Diabetes* 1991; 40: 121–125.
329. Stenninger E, Flink R, Eriksson B, Sahlen C. Long-term neurological dysfunction and neonatal hypoglycemia after diabetic pregnancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Edu* 1998; 79: F174–F179.
330. Yamashita Y, Kawano Y, Kuriya N, Murakami Y, Yoshimatsu K, Kato H. Intellectual development of offspring of diabetic mothers. *Acta Paediatr* 1996; 85: 1192–1196.
331. Weintrob N, Karp M, Hod M. Short- and long-range complications in offspring of diabetic mothers. *J Diabetes Complications* 1996; 10: 294–301.
332. Stehbens JA, Baker GL, Kitchell M. Outcome at ages 1, 3, and 5 years of children born to diabetic women. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 408–413.
333. Hadden DR, Byrne E, Trotter I, Harley JMG, McClure G, McAuley RR. Physical and psychological health of children of Type 1 (insulin dependent) diabetic mothers. *Diabetologia* 1984; 26: 250–254.

334. Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Peretz E, Soriano D, Dulitzky M. Neurobehaviour of school age children born to diabetic mothers. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Edu* 1998; 79: 94–99.
335. Yogman MW, Cole P, Als H, Lester BM. Behavior of newborns of diabetic mothers. *Infant Behavior Dev* 1982; 5: 331–340.
336. Vohr BR. Long-term follow-up of the infant of the diabetic mother. *Infant of the Diabetic Mother: Report of the 93rd Ross Conference on Pediatric Research*. Columbus, OH: Ross Laboratories, 1987; 159–167.
337. Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M. Hipokampus Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 2001; 21: 427–431
338. Pettitt DJ, Bennett PH. Long-term outcome of infants of diabetic mothers. In: Reece EA, Coustan DR, Eds. *Diabetes Mellitus in Pregnancy* (2nd ed). New York: Churchill Livingstone, 1995; 379–388.
339. Schulte FJ, Michaelis R, Nolte R, Albert G, Parl U, Lasson U. Brain and behavioural maturation in newborn infants of diabetic mothers. Part I: nerve conduction and EEG patterns. *Neuropediatric* 1969; 1: 24–35.
340. Schulte FJ, Lasson U, Parl U, Nolte R, Jurgens U. Brain and behavioural maturation in newborn infants of diabetic mothers. Part II: sleep cycles. *Neuropediatric* 1969; 1: 36–55.
341. Cummins M, Norrish M. Follow-up of children of diabetic mothers. *Arch Dis Childhood* 1980; 55: 259–264.
342. Metzger BE, Coustan DR. Summary and recommendations of the fourth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1989; 21: 161–167.
343. Persson B, Gentz J. Follow-up of children of insulin-dependent and gestational diabetic mothers. *Acta Paediat Scand* 1984; 73: 349–358.
344. Naeye RL. Infants of diabetic mothers: a quantitative, morphologic study. *Pediatrics* 1965; 35: 980–988.
345. Yamano T, Shimada M, Yoshiki F, Kawasaki H, Onaga A. Quantitative synaptic changes on purkinje cell dendritic spines of rats born from streptozotocin-induced diabetic mothers. *Brain Dev* 1986; 8: 269–273.
346. Sena A, Ferret-Sena V. Insulin and brain development. *Trends Neurosci* 1995; 18: 485.

347. Suzuki N, Svensson K, Eriksson UJ. High glucose concentration inhibits migration of rat cranial neural crest cells in vitro. *Diabetologia* 1996; 39: 401–411.
348. Ramanathan M, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Hyperglycaemia in pregnancy: effects on the offspring behaviour with special reference to anxiety paradigms. *Indian J Exp Biol* 2000; 38: 231–236.
349. Battaglia G, Cabrera TM. Potentiation of 5-HT_{1A} receptor-mediated neuroendocrine responses in male but not female rat progeny after prenatal cocaine, Evidence for gender differences. *J Pharmacol Exp Therapeutics* 1994; 271: 1453–1461.
350. Poltyrey T, Weinstock M. Effect of prenatal stress on opioid component of exploration in different experimental situations. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58: 387–393.
351. Mills JL, Baker L, Goldman AS. Malformations in infants of diabetic mothers occur before the seventh gestational week. *Diabetes* 1979; 28: 292–293.
352. Contreras-Soto J, Forsbach G, Vazquez-Rosales J, Alvarez-Garcia C, Garcia G. Noninsulin-dependent diabetes mellitus and pregnancy in Mexico. *J Gynecol Obstet* 1991; 34: 205–210.
353. Bailey CH. Structural changes and the storage of long-term memory in *Aplysia*. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 738–747.
354. Tang J, Rutishauser U, Landmesser L. Polysialic acid regulates growth cone behavior during sorting of motor axon in the plexus region. *Neuron* 1994; 13: 405–414.
355. Merry AC, Yamamoto K, Sima AAF. Imbalances in N-CAM, SAM and polysialic acid may underlie the paranodal ion channel barrier defect in diabetic neuropathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 40: 153–160.
356. Bastmeyer M, Schlosshauer B, Stuermer CA. The spatiotemporal distribution of N-CAM in the retinotectal pathway of adult goldfish detected by the monoclonal antibody D3. *Development* 1990; 108: 299–311.
357. Bernhardt RR, Tongiorgi E, Anzini P, Schachner M. Increased expression of specific recognition molecules by retinal ganglion cells and by optic pathway glia accompanies the successful regeneration of retinal axons in adult zebrafish. *J Comp Neurol* 1996; 376: 253–264.
358. Wheal HV, Chen Y, Mitchell J, Schachner M, Maerz W, Wieland H, et al. Molecular Mechanisms that underlie structural and functional changes at the

postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 1998; 55: 611–640.

359. Baydas G, Sonkaya E, Tuzcu M, Yasar A, Dönder E. Novel role for gabapentin in neuroprotection of central nervous system in streptozotocine-induced diabetic rats.

Acta Pharmacologica Sinica 2005; 26: 417–422.

8. ÖZGEÇMİŞ

1970 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Elazığ'da tamamladım. 1993 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. Elazığ Sağlık Müdürlüğü'ne bağlı olarak çeşitli birimlerde çalıştım, askerlik hizmetimi Edirne'de yaptım. 2002 yılında Fırat Üniversitesi İç Hastalıkları Anabilim Dalında ihtisasa başladım. Evli, bir erkek ve bir kız olmak üzere iki çocuk babasıyım.