



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



İN VİTRO DİYABETİK RETİNOPATİ MODELİNDE ALDOZ REDÜKTAZ ENZİMİ İLE PROTEİN KİNAZ C SİNYAL YOLAĞININ İLİŞKİSİ

Mutlu SARIKAYA

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Net Daş EVCİMEN

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Nuray YAZIHAN

2014-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İN VİTRO DİYABETİK RETİNOPATİ MODELİNDE
ALDOZ REDÜKTAZ ENZİMİ İLE PROTEİN KİNAZ C
SİNYAL YOLAĞININ İLİŞKİSİ**

Mutlu SARIKAYA

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Net Daş Evcimen**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Nuray YAZIHAN**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
tarafından 11B3330002 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2014-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Doktora Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Doktora **Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 27/03/2014



Prof. Dr. Serpil NEBİOĞLU
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Fügen AKTAN
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Doç. Dr. Net Daş EVCİMEN
Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Sevgi Yardım AKAYDIN
Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	x
Çizelgeler	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırması	4
1.1.1. Tip 1 Diyabet	5
1.1.1.1. İmmün Aracılı Diyabet	5
1.1.1.2. İdiyopatik Diyabet	6
1.1.2. Tip 2 Diyabet	6
1.1.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)	7
1.1.4. Diğer Spesifik Tipler	7
1.2. Diyabetik Komplikasyonlar	8
1.2.1. Diyabetik Makrovasküler Komplikasyonlar	8
1.2.1.1. Kardiyovasküler Hastalıklar	8
1.2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar	9
1.2.1.3. Periferik Arter Hastalıkları	9
1.2.2. Diyabetik Mikrovasküler Komplikasyonlar	10
1.2.2.1. Diyabetik Nefropati	10
1.2.2.2. Diyabetik Nöropati	12
1.2.2.3. Diyabetik Retinopati	13
1.3. Diyabetik Retinopati Oluşumunda Rol Oynayan Temel Mekanizmalar	16
1.3.1. İleri Glikasyon Son Ürünlerinin (AGE) Oluşumu	16
1.3.2. Oksidatif Stres	20
1.3.3. Heksozamin Yolağı	25
1.3.4. Protein Kinaz C Sinyal Yolağı	26

1.3.5. Poliol Yolağı	30
1.4. Diyabetik Retinopati ile İlişkili Diğer Sinyal Yolakları	38
1.4.1. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı	38
1.4.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) Sinyal Yolağı	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	42
2.1. Kullanılan Cihazlar	42
2.2. Kullanılan Maddeler, Antikorlar ve Kitler	42
2.3. Kullanılan Hücre Serisi	43
2.4. Deney Planı	43
2.5. Kullanılan Yöntemler	44
2.5.1. Hücre Kültürü Sistemi	44
2.5.2. Hücre Proliferizasyonunun Değerlendirilmesi	44
2.5.3. Hücre Lizatların Toplanması	45
2.5.4. Protein Miktar Tayini	45
2.5.5. Western Blot Tekniğı ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi	47
2.5.6. Nf-kB, Ikb- α , Total c-Jun, Fosfo c-Jun, SAPK/JNK ve Sitokrom c Protein Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi	50
2.5.7. Malondialdehit Tayini	51
2.5.8. Glutatyon Peroksidaz Aktivite Tayini	51
2.5.9. İstatistiksel Analiz	52
3. BULGULAR	53
3.1. Glukoz ve Hidrojen Peroksit'in ARPE-19 Hücre Canlılığına Etkisi	53
3.2. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Aldoz Redüktaz Protein Düzeylerine Etkisi	56
3.3. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Protein Kinaz C Protein Düzeylerine Etkisi	58
3.4. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde NF-kB Protein Düzeylerine Etkisi	60
3.5. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Ikb- α Protein Düzeylerine Etkisi	63
3.6. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde SAPK/JNK Protein Düzeylerine Etkisi	66

3.7. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Total c-Jun Protein Düzeylerine Etkisi	69
3.8. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Fosfo c-Jun Protein Düzeylerine Etkisi	72
3.9. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Sitokrom c Protein Düzeylerine Etkisi	75
3.10. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde MDA Düzeylerine Etkisi	78
3.11. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde GSH-Px Enzim Aktivitesine Etkisi	81
4. TARTIŞMA	84
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
ÖZET	101
SUMMARY	102
KAYNAKLAR	103
ÖZGEÇMİŞ	132

ÖNSÖZ

Tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman inanan ve destek olan çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Net Daş EVCİMEN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında bilimsel bilgi birikimi ile bana yol gösteren ve her türlü kolaylığı sağlayan çok değerli hocam ve ikinci danışmanım Doç. Dr. Nuray YAZIHAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Doktora tez çalışmalarım sırasında tüm bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarına ışık tutan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Serpil NEBİOĞLU başta olmak üzere, Prof. Dr. Zeliha BÜYÜKBİNGÖL'e, Prof. Dr. Fügen AKTAN'a ve Prof. Dr. Bilgehan DOĞRU'ya bana verdikleri emekler için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım süresince bana laboratuvarlarını açan ve çalışmalarına yardımcı olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Berrin İmge ERGÜDER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında ortaya çıkan sorunları aşmamda bana her zaman destek olan Dr. Filiz BAKAR'a, Dr. Arzu Zeynep KARABAY'a ve Dr. Aslı KOÇ'a destekleri ve dostlukları için teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarım sırasında bana her türlü maddi ve manevi desteği veren, dostlukları ile hayatıma anlam katan Özge SEZER, Burcu DAŞTAN, Murat ASLAN, Cengizhan KÜÇÜK, Volkan KÜÇÜK, Elif Demirbaş KÖKLÜ, Aydın YÜCEL ve Fulya YÜCEL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan sevgili annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACE:	Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri
ADA:	Amerikan Diyabet Birliği
AGE:	İleri Glikasyon Son Ürünü
AKR:	Aldo-Keto Redüktaz
ANG II:	Anjiyotensin II Reseptör Antagonisti
AP-1:	Aktivatör Protein-1
APS:	Amonyum Persülfat
AR:	Aldoz Redüktaz
ARPE-19:	İnsan Retinal Pigment Hücre Dizisi
BCA:	Bikinkoninik asit
BSA:	Sığır Serum Albümini
DAG:	Diaçilgliserol
DHAP:	Dihidroksiaseton fosfat
DM:	Diabetes Mellitus
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Besiyeri
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DR:	Diyabetik Retinopati
ECM:	Ekstrasellüler Matriks
EGF:	Epitelyal Büyüme Faktörü
eNOS:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ER:	Endoplazmik Retikulum
ERK:	Ekstrasellüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
ET-1:	Endotelin-1
FBS:	Fetal Sığır Serum
G3P:	Gliseraldehit 3-fosfat
GAD 65:	Glutamat Dekarboksilaz 65
GAPDH:	Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrogenaz
GDM:	Gestasyonel Diyabet
GFAT:	Fruktoz 6-fosfat Amidotransferaz

GR:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Redükte Glutasyon
GSH-Px:	Glutasyon Peroksidaz
H₂O₂:	Hidrojen Peroksit
HMGB1:	Yüksek-Hareketli Grup Protein B1
HNE:	4-hidroksi trans-2-nonenal
HRP:	Horseradish Peroxidase
ICA:	Adacık Hücre Antikorları
ICAM:	İntrasellüler Adezyon Molekülü
IDDM:	İnsüline Bağımlı Diyabet
IκBα:	Kappa B İnhibitörü α
IKK:	IκB kinaz
IL:	İnterlökin
JAK:	Janus Kinaz
JNK:	c-jun N-terminal Kinaz
LDL:	Düşük Dansiteli Lipoprotein
MAPK:	Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz
MCP-1:	Monosit Kemoatraktan Protein-1
MDA:	Malondialdehit
MnSOD:	Manganez Süperoksit Dismutaz
MOD:	Erişkin Başlangıçlı Diyabet
MTT:	3-(4, 5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium Bromid
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NF-κB:	Nükleer Faktör Kappa B
NIDDM:	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet
NO:	Nitrik Oksit
NOS:	Nitrik Oksit Sentaz
NPDR:	Nonproliferatif Diyabetik Retinopati
OGTT:	Oral Glukoz Tolerans Testi
OGT:	O-GlcNAc Transferaz
ONOO⁻:	Peroksinitrit
PAI-1:	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1

PARP:	Poli (ADP-riboz) Polimeraz
PBS:	Fosfat Tampon Salin
PDGF:	Plateletten Türeyen Büyüme Faktörü
PDR:	Proliferatif Diyabetik Retinopati
PI3K:	Fosfoinositid 3-kinaz
PKC:	Protein Kinaz C
PMA:	Forbol 12-meristat 13-asetat
PMSF:	Fenilmetansülfonil florür
PS:	Fosfotilserin
PVDF:	Poliviniliden Floroid
RAGE:	İleri Glikasyon Son Ürünleri Reseptörü
RNS:	Reaktif Nitrojen Türleri
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri
RS:	Reaktif Türler
SDH:	Sorbitol Dehidrogenaz
SDS:	Sodyum Dodesil Sülfat
SHP-1:	Src Homolog-2-Domain İçeren Fosfataz-1
SOD:	Süperoksit Dismutaz
Sp-1:	Spesifik Protein-1
TBA:	Tiyobarbitürik Asit
TCA:	Triklorik Asit
TEMED:	Tetrametilendiamin
TGF-β:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β
TMB:	3, 3', 5, 5-Tetrametilbenzidin
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör-α
VCAM:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-R:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Reseptörü
VSMC:	Vasküler Düz Kas Hücreleri
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Diyabetik nefropati oluşumuna ve ilerlemesine neden olan moleküler mekanizmalar	11
Şekil 1.2. Retina'nın nörovasküler yapısı	15
Şekil 1.3. Maillard Reaksiyonu	17
Şekil 1.4. İleri glikasyon son ürünlerinin diyabetik komplikasyon oluşumuna etkisi	19
Şekil 1.5. Mitokondrial elektron transport zincirinde süperoksitlerin üretimi	22
Şekil 1.6. Diyabetik Retinopatide ROS'un diğer yolaklarla olan ilişkisi	24
Şekil 1.7. Altgruplarına göre PKC izoformlarının yapısı	26
Şekil 1.8. Hiperglisemi ile PKC aktivasyonunun farklı hücrel yolaklara etkileri	27
Şekil 1.9. PKC'nin Retinopatideki rolü	29
Şekil 1.10. Poliol yolağı	31
Şekil 1.11. AR enziminin yapısı	32
Şekil 1.12. AR'ın neden olduğu hücrel zararlar ve diğer yolaklarla olan ilişkisi	34
Şekil 1.13. MAPK sinyal yolağının retinopati oluşumuna etkisi	39
Şekil 2.1. BCA Standart Grafiğı	46
Şekil 3.1. Glukozun ARPE-19 hücrelerinin canlılığına etkisi	54
Şekil 3.2. H ₂ O ₂ 'in ARPE-19 hücrelerinin canlılığına etkisi	55
Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde glukozun AR protein düzeylerine etkisi	56
Şekil 3.4. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ , Sorbinil ve PMA'nın AR protein düzeylerine etkisi	57
Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde glukozun PKC protein düzeylerine etkisi	58
Şekil 3.6. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ , Sorbinil ve PMA'nın PKC protein düzeylerine etkisi	59
Şekil 3.7. ARPE-19 hücrelerinde glukozun NF-kB protein düzeylerine etkisi	60
Şekil 3.8. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in NF-kB protein düzeylerine etkisi	61
Şekil 3.9. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın NF-kB protein düzeylerine etkisi	62
Şekil 3.10. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Ikb- α protein düzeylerine etkisi	63
Şekil 3.11. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in Ikb- α protein düzeylerine etkisi	64

Şekil 3.12. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın I κ B- α protein düzeylerine etkisi	65
Şekil 3.13. ARPE-19 hücrelerinde glukozun SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi	66
Şekil 3.14. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi	67
Şekil 3.15. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi	68
Şekil 3.16. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Total c-jun protein düzeylerine etkisi	69
Şekil 3.17. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in Total c-jun protein düzeylerine etkisi	70
Şekil 3.18. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Total c-jun protein düzeylerine etkisi	71
Şekil 3.19. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi	72
Şekil 3.20. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi	73
Şekil 3.21. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi	74
Şekil 3.22. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Sitokrom c protein düzeylerine etkisi	75
Şekil 3.23. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in Sitokrom c protein düzeylerine etkisi	76
Şekil 3.24. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Sitokrom c protein düzeylerine etkisi	77
Şekil 3.25. ARPE-19 hücrelerinde glukozun MDA düzeylerine etkisi	78
Şekil 3.26. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in MDA düzeylerine etkisi	79
Şekil 3.27. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın MDA düzeylerine etkisi	80
Şekil 3.28. ARPE-19 hücrelerinde glukozun GSH-Px enzim aktivitesine etkisi	81
Şekil 3.29. ARPE-19 hücrelerinde H ₂ O ₂ 'in GSH-Px enzim aktivitesine etkisi	82
Şekil 3.30. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın GSH-Px enzim aktivitesine etkisi	83
Şekil 4.1. Total parametrelerin genel değerlendirmesi	87

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Diyabet Tanı Kriterleri	5
Çizelge 1.2. Gestasyonel Diyabet Tanı Kriterleri	7

1. GİRİŞ

Diabetes mellitus (DM) dünya genelinde 347 milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (WHO, 2011). İnsülin ve antidiyabetik ilaçların diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanması her ne kadar diyabet hastalarının yaşam süresini uzatmış olsa da, diyabetin neden olduğu nefropati, nöropati ve retinopati gibi komplikasyonların görülme sıklığında belirgin bir artışa neden olmuştur. Diyabet ve diyabetle ilişkili olan bu komplikasyonlar tüm dünyada ve Türkiye'de morbitide ve mortalitenin majör nedenini oluşturmaktadır.

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları arasında yer alan diyabetik retinopati (DR), tüm diyabetik bireylerin yaklaşık olarak % 90'ından fazlasında zaman içerisinde gelişmekte ve bireylerde körlüğe kadar giden ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (Kempen ve ark., 2004; Roy ve ark., 2004; Hirai ve ark., 2011).

Retinopati, retinanın prekapiller arteriollerini, kapillerlerini ve venüllerini etkileyen önemli bir mikroanjiyopatidir (Hattat, 1993). Günümüzde diyabette kan şekeri regülasyonun sağlanması dışında retinopatinin oluşumunu engelleyecek koruyucu bir yöntem veya oluşmuş retinopatiyi ortadan kaldıracak bir tedavi bulunmamaktadır. Ancak periyodik izleme, erken tanı, kan glukoz düzeylerinin kontrol altında tutulması ve zamanında uygulanmış semptomatik tedaviler retinopatiye bağlı körlüklerin % 60-95'ini önleyebilmektedir (DCCT, 1993; Matthews ve ark., 2004).

Retinopati tam olarak tedavisi mümkün olmayan bir komplikasyondur ve günümüzde bu amaç doğrultusundaki arayışlar halen devam etmektedir. Tedavi arayışında retinopati ve diğer komplikasyonlara neden olan ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu, oksidatif stres, heksozamin yolağı, protein kinaz C (PKC) sinyal yolağı ve poliol yolağı mekanizmalarının anlaşılması önem kazanmaktadır. Bu mekanizmalar içerisinde yer alan PKC sinyal yolağı ve aldoz redüktaz (AR) enziminin retinopati oluşumundaki önemi, PKC sinyal yolağını ve AR enzimini

tedavi arayışında önemli birer aday haline getirmektedir. Bu nedenle, hem PKC hem de AR enziminin diyabette, oksidatif strese ve normal fizyolojik koşullarda birbirleriyle ve diğer yollarla olan ilişkilerinin ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılması önem taşımaktadır.

AR enzimi farklı dokularda yüksek düzeyde eksprese edilen ve aldehit metabolizmasında görev alan bir enzimdir. Diyabette glukozun AR enzimi aracılığıyla poliol yolundaki redüksiyonu, diyabete bağlı komplikasyonlarda önem kazanmaktadır. Her ne kadar AR inhibitörleri *in vivo* hayvan ve *in vitro* hücre kültürü modellerinde diyabete bağlı komplikasyonları önlemek amacıyla öneriliyor ve deniyor ise de, klinik kullanımı günümüzde henüz mevcut değildir. Özellikle retinal hücrelerde AR enzim ekspresyonunun yüksek olması ve diyabetik retinopatinin oluşum sürecinde önemli roller üstlenmesi nedeniyle diyabete bağlı retinopati modellerinde AR enzim aktivitesi sıklıkla çalışılmaktadır (Srivastava ve ark., 2005; Obrosova ve Kador, 2011).

PKC sinyal yolağı hücre içerisinde ve dışarısında permeabilite, kontraksiyon, ekstrasellüler matriks (ECM), hücre büyümesi, anjiyogenez, apoptoz ve enzim aktivite değişiklikleri gibi pek çok farklı hücresel süreci regüle etmektedir (Nishizuka, 1992; Oikawa ve ark., 1992; Nishizuka, 1995; Xia ve ark., 1996; Koya ve ark., 1997). Retinopatide özellikle nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi hücre içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olarak perisit hücre kaybına ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin ekspresyonlarında artışa neden olarak da neovaskülarizasyonun gelişimine katkı sağlamaktadır (Aiello ve ark., 1997; Geraldine ve ark., 2009).

Genel olarak poliol ve PKC ilişkili yolların sürekli etkileşim halinde olduğu biliniyor ise de, insan retinal hücrelerinde AR inhibisyon ve aktivasyonunun hiperglisemi ve oksidatif koşullarda PKC düzey ve aktivasyonuna etkisi, bu etki sonucu hücresel çoğalma ve mitokondrial ilişkili apoptozun nasıl etkilendiği net olarak bilinmemektedir. Bununla beraber, PKC yolunun aktivasyon ve inhibisyonunun retinal hücrelerdeki etkisi de net olarak henüz ortaya konulmamıştır.

Bu çalışmada; retinal fonksiyonlarda çok önemli olan epitel hücrelerin hiperglisemiye ve oksidatif hasara cevapları ve bu cevap esnasında AR ve PKC etkileşiminin belirlenmesi hedeflenmiştir. Çalışmada öncelikli olarak bu iki yol arasındaki net etkileşim belirlenerek, bu etkilerin hücrede koruyucu veya stresi artırıcı etkileri olup olmadığı hücre proliferasyonu, oksidatif stres düzeyi ve mitokondrial apoptozis ile belirlenecektir. Hiperglisemik süreçte hücre hasarının belirleyicisi gibi gözlenen ve algılanan AR enzim aktivitesinin antioksidan etkileri olduğu da göz önünde tutularak, hiperglisemik şartlarda meydana gelen AR enzim ekspresyonundaki artışın endojen strese bir cevap mı yoksa hücreye doğrudan hasar veren ve stresi artıran bir durum mu olduğu incelenecektir.

Çalışma diyabet ve kanser gibi çok ciddi patolojik durumlarda hücre yaşam döngüsünün kaderinin belirlenmesinde çok önemli rol oynayan PKC sinyal yolağıyla, özellikle hiperglisemik süreçlerde metabolizmanın hücre siklusuyla etkileşimini sağlayan ve hücresel cevapları dengeleyici rolü olduğu düşünülen poliol yolağı arasındaki ilişkinin açığa çıkarılması açısından önem taşımaktadır. Çalışmalarımız sonucu elde edilecek bulgular hiperglisemi ve oksidatif hasarla ilişkili patolojik durumların altında yatan patofizyolojik mekanizmaları açıklamaya yönelik literatüre önemli katkılar sağlayacaktır.

1.1. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırması

Diyabet; pankreasta üretilen insülin hormonunun aktivitesinde, sekresyonunda ya da her ikisinde meydana gelen hasar sonucu oluşan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır (American Diabetes Association, 2013).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (World Health Organization (WHO)) 2008 yılında yaptığı bir araştırmaya göre; dünya üzerinde yaklaşık olarak 347 milyon diyabet hastası bulunmaktadır. Bu sayının 2030 yılına kadar ikiye katlanacağı ve diyabete bağlı ölümlerin dünya genelinde 7. sıraya yükseleceği tahmin edilmektedir (Danaei ve ark., 2011; Whiting ve ark., 2011; WHO, 2011).

Hiperglisemi'nin neden olduğu semptomlar; akut ve kronik semptomlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Akut semptomlar; ketoasidoz ve nonketotik hiperosmolar sendromdur. Kronik semptomlar ise; poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı ve bulanık görmedir. Ayrıca, büyümede gerilik ve bazı belirli infeksiyonlara karşı duyarlılık da hipergliseminin neden olduğu kronik semptomlar arasında yer almaktadır (American Diabetes Association, 2013).

Diyabetteki hiperglisemi insülin bağımsız olan retina, periferik sinir sistemi, böbrek medullası ve endotelial dokular başta olmak üzere birçok dokuda hasara neden olmaktadır. Bu hasarın başlıca nedenleri arasında insülinin dokulardaki aktivitesinin azalmasına bağlı olarak karbohidrat, yağ ve protein metabolizmalarında meydana gelen değişimler yer almaktadır. Bu dokularda oluşan hasar zaman içerisinde ilerleyerek diyabette görülen komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır (Haffner, 2006; Keenan ve ark., 2007).

2003 yılında diyabet tanı kriterleri Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association (ADA)) tarafından yeniden düzenlenmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Diyabet Tanı Kriterleri (American Diabetes Association, 2013).

1. HbA1C $\geq$ % 6,5
2. Açlık Plazma Glukozu $\geq$ 126 mg/dl (7,0 mmol/L)
3. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) 2. saat plazma glukozu $\geq$ 200 mg/dl (11,1 mmol/L)
4. Klasik hiperglisemi semptomları ya da hiperglisemik kriz ile beraber rastgele plazma glukozu $\geq$ 200 mg/dl (11,1 mmol/L)

Çizelge 1.1’de yer alan kriterlerden herhangi birinin bulunması diyabeti işaret etmektedir.

Diyabet etiyolojik olarak 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlar; tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, gestasyonel diyabet (GDM) ve diğer spesifik tiplerdir.

1.1.1. Tip 1 Diyabet

İnsülin sekresyonunun mutlak yokluğu ile meydana gelmektedir. Tip 1 diyabet; immün aracılı diyabet ve idiyopatik diyabet olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır.

1.1.1.1. İmmün Aracılı Diyabet

İmmün aracılı diyabet “İnsüline Bağımlı Diyabet (Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM))” ya da “Gençlik Diyabeti (Juvenil Onset Diabetes Mellitus)” olarak da isimlendirilmektedir. Diyabetik bireylerin yaklaşık olarak % 5-10’u bu grup içerisinde yer almaktadır. Bu tip diyabette pankreasın beta adacık hücrelerinin hücresel aracılı otoimmün yıkımı söz konusudur. Klinik tablo beta adacık hücrelerinin % 80-90’ı harap olduktan sonra ani olarak ortaya çıkmaktadır. Beta

adacık hücrelerinin immün aracılı yıkımı esnasında oluşan adacık hücre antikorları (ICA), insüline karşı otoantikorlar, glutamat dekarboksilaz 65 (GAD 65) otoantikoru ve tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 β otoantikorlarından bir veya daha fazlası açlık hiperglisemisi durumundaki bireylerin % 85-90'ının serumlarında gözlenmekte ve pankreasın harabiyeti ile birlikte bu otoantikorlar ortadan kalkmaktadır (Haller ve ark., 2005; Keenan ve ark., 2010).

1.1.1.2. İdiyopatik Diyabet

İdiyopatik diyabette insülin eksikliği söz konusu olmasına rağmen otoimmün beta adacık hücre harabiyeti gözlenmemekte ve beta adacık hücre yıkımına dair immünolojik kanıt bulunmamaktadır. Bu tip diyabet sıklıkla Afrikalılarda ve Asyalılarda gözlenmektedir (Pilona-Pinero ve Raskin, 2001; American Diabetes Association, 2013).

1.1.2. Tip 2 Diyabet

Tip 2 diyabet, insülin aktivitesine karşı direnç gelişimi ve bunu takiben insülin sekresyonunun azalması sonucu meydana gelmektedir. Tip 2 diyabet “İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM))” ya da “Erişkin Başlangıçlı Diyabet (Maturity Onset Diabetes (MOD))” olarak da isimlendirilmektedir. Diyabetik bireylerin yaklaşık olarak % 90'ı tip 2 diyabetlidir ve tip 2 diyabet dünyada prevalansı en yüksek olan hastalıklardan bir tanesidir (American Diabetes Association, 2013).

Tip 2 diyabette beta adacık hücrelerinin otoimmün yıkımı söz konusu değildir. Hastaların çoğu obezdir ve obezite tek başına insülin direncine neden olabilmektedir. Tip 2 diyabette hiperglisemi dereceli olarak arttığı ve hastalığın erken safhalarında hasta klasik diyabet semptomlarının farkında olmadığı için, çoğunlukla uzun yıllar boyunca teşhis edilememektedir (American Diabetes Association, 2013).

Tip 2 diyabet patogenezinin gelişmesinde birinci dereceden sorumlu olan faktör insülin direncidir. İnsülin direnci; normal konsantrasyondaki insülinin normalden daha az biyolojik yanıt oluşturmaması, başka bir deyişle glukoz kullanımını uyarma etkisinin azalması olarak tanımlanmaktadır. İnsülin direncini oluşturabilen veya artırabilen etkenler arasında; yaş, obezite ve fiziksel aktivite eksikliği başta olmak üzere birçok etken yer almaktadır (Alberti ve ark., 2007; Jain ve Saraf, 2008).

1.1.3. Gestasyonel Diyabet (GDM)

GDM, insülin antagonist hormonlarının en yüksek düzeylere ulaşması sonucu gebelikte gelişmektedir. GDM terimi, hastalık ilk kez gebelik esnasında ortaya çıktığı için kullanılmaktaydı. Fakat bu tanımlamanın getirdiği sınırlamalardan dolayı 2008-2009 yılları arasında süren tartışmalardan sonra GDM için yeni tanı kriterleri belirlenmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Gestasyonel Diyabet Tanı Kriterleri (American Diabetes Association, 2013).

24-28 haftalık gebe bireylere 8 saatlik açlıktan sonra 75 g glukoz OGTT ile uygulanır.

Açlık Plazma Glukozu ≥ 92 mg/dl (5,1 mmol/L)

1.Saat Tokluk: ≥ 180 mg/dl (10,0 mmol/L)

2.Saat Tokluk: ≥ 153 mg/dl (8,5 mmol/L)

1.1.4. Diğer Spesifik Tipler

Bu sınıf, kistik fibrozis gibi çeşitli hastalıkların, glukokortikoidler gibi bazı ilaçların ve belirli genetik bozuklukların neden olduğu diyabet tiplerini içermektedir (Taylor, 1992; Pandit ve ark., 1993; American Diabetes Association, 2013).

1.2. Diyabetik Komplikasyonlar

Diyabetik komplikasyonlar; akut ve kronik komplikasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır ve bireylerdeki morbidite ve mortalitenin majör nedenidir. Akut komplikasyonlar; ketoasidoz, laktik asidoz, nonketotik hiperosmolar koma ve hipoglisemi komasıdır. Kronik komplikasyonlar ise; arterlerin harabiyeti ile oluşan makrovasküler komplikasyonlar ve küçük kan damarlarının harabiyeti ile oluşan mikrovasküler komplikasyonlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Makrovasküler komplikasyonlar arasında; kardiyovasküler hastalıklar, serebrovasküler hastalıklar ve periferik arter hastalıkları yer almaktadır. Diyabetin neden olduğu uzun süreli mikrovasküler komplikasyonlar arasında ise; renal bozukluklara yol açan nefropati, diyabetik ayak ülserine, gastrointestinal, ürogenital, kardiyovasküler ve seksüel bozukluklara neden olan nöropati ve görme kaybına neden olan retinopati yer almaktadır (Fishbein ve Palumbo, 1995, Bölüm 13; Wiernsperger ve Bouskela, 2003; Cheung ve ark., 2007; Juutilainen ve ark., 2007).

1.2.1. Diyabetik Makrovasküler Komplikasyonlar

1.2.1.1. Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar diyabetik hastalarda diyabetik olmayanlara oranla 4 kat daha fazla görülmektedir (Haffner ve ark., 1998; Bonora ve ark., 2002; Buyken ve ark., 2007). Bunun yanı sıra, diyabetli hastalarda diyabetik olmayanlara oranla 5 kat daha fazla miyokard infarktüsü görülmektedir (Haffner ve ark., 1998). Hiperglisemi, insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon ve kronik inflamasyon vasküler endotelde hasara yol açarak kardiyovasküler hastalıkların gelişimine neden olmaktadır (Beckman ve ark., 2002).

Makrovasküler hastalıklardaki merkezi mekanizma; arter daralmasına neden olan aterosklerozdur. Diyabetteki hiperglisemi arter çeperinde mukopolisakkarit

sentezinin artmasına yol açmaktadır. Bu durum, düşük dansiteli lipoproteinlerin (LDL) arter çeperine hapsedilmesi için uygun ortamı hazırlamaktadır. Hipergliseminin neden olduğu oksidatif stres ise; bu LDL partiküllerinin oksitlenmesine neden olmaktadır. Bu sürecin ardından monositler arteriyel duvar içerisine sızarak makrofaj hücrelerine dönüşmekte ve okside LDL'leri fagosite ederek köpük hücrelerini oluşturmaktadırlar. Zamanla bu köpük hücreleri damar içerisinde birikerek aterosklerotik plakların oluşmasına ve arterlerin daralmasına neden olmaktadır (Parthasarathy ve ark., 1989; Farhangkhoe ve ark., 2005; Madamanchi ve ark., 2005a; Madamanchi ve ark., 2005b; Boyle, 2007).

1.2.1.2. Serebrovasküler Hastalıklar

Diyabet, felç kaynaklı ölümler için önemli bir risk faktörüdür (Haheim ve ark., 1995; Tuomilehto ve ark., 1996). Diyabetik bireylerde, diyabetik olmayanlara oranla 2-4 kat daha fazla felç gözlenmektedir (Rohr ve ark., 1996; Folsom ve ark., 1999; Ohira ve ark., 2006). Hiperglisemi; intrakranial ve ekstrakranial ateroskleroz riskini artırarak serebrovasküler sirkülasyonu etkilemektedir (Fabris ve ark., 1994; Friedlander ve Maeder, 2000). Bununla beraber; proteinüri, mikroalbuminüri ve hiperürisemi felç için diğer diyabet ilişkili risk faktörleridir (Sasaki ve ark., 1995; Lehto ve ark., 1998; Guerrero-Romero ve Rodriguez-Moran, 1999).

1.2.1.3. Periferik Arter Hastalıkları

Periferik arter hastalıkları alt ekstremitelerde meydana gelen arter tıkanması ile karakterize bir hastalıktır (Kullo ve ark., 2003). Bu durum diyabetik bireylerin alt ekstremitelerinde fonksiyonel yetersizliğe neden olan acıya yol açmakta ve ilerleyen evrelerde diyabetik ayak ülserine veya alt ekstremitte amputasyonuna neden olabilmektedir (Vogt ve ark., 1994; Schainfeld, 2001; McDermott ve ark., 2004). Diyabetik bireylerde alt ekstremitte amputasyonu, diyabetik olmayan bireylere oranla 15 kat daha fazla görülmektedir (Dickinson ve ark., 2002).

Periferik arter hastalıkları diyabetin şiddeti ve süresiyle yakından ilişkilidir (Jude ve ark., 2001; Al-Delaimy ve ark., 2004). Hiperglisemi, hipertansiyon, obezite, sigara kullanımı ve dislipidemi periferik damar hastalıkları için önemli risk faktörleridir (Selvin ve ark., 2004; Wattanakit ve ark., 2005).

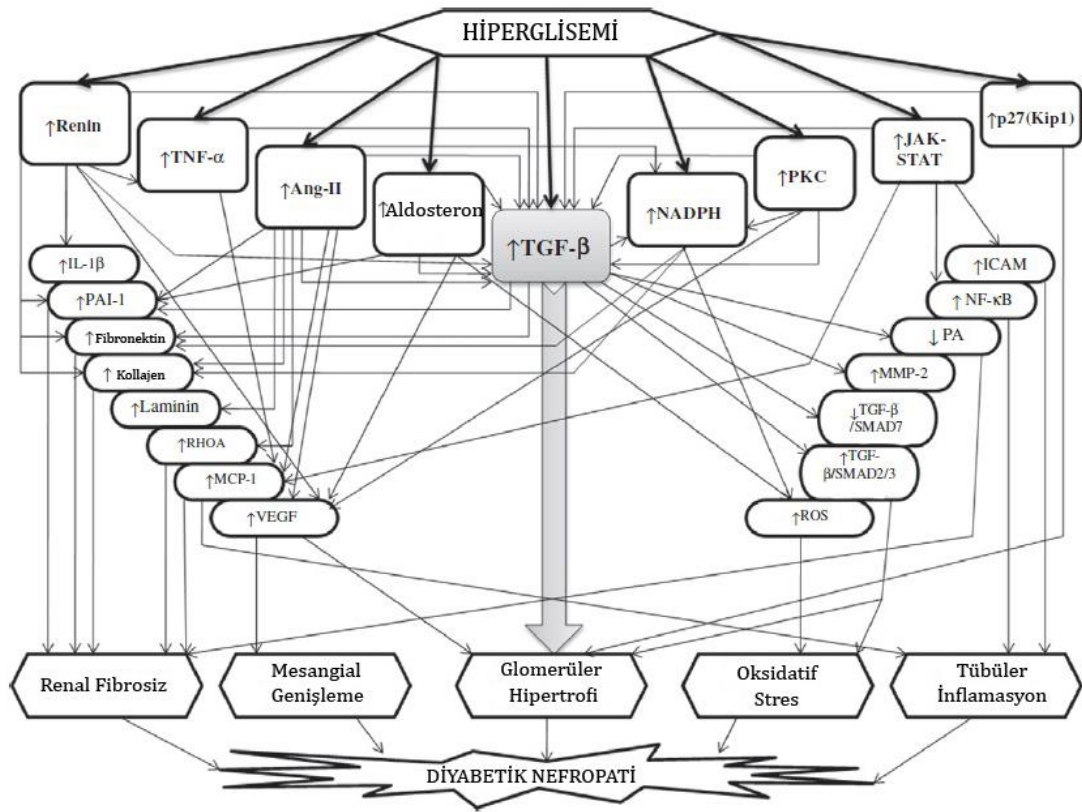
1.2.2. Diyabetik Mikrovasküler Komplikasyonlar

1.2.2.1. Diyabetik Nefropati

Glomerüler filtrasyonun azalmasıyla beraber gelişen proteinüri ile karakterize bir komplikasyondur. Diyabetik nefropati genellikle tip 1 diyabetli hastalarda 5-10 yıl sonra gelişme gösterirken, tip 2 diyabetli hastalarda diyabet tanısı konduğu anda bulunmaktadır. Eğer tedavi edilmez ise, hastalarda üremi nedeni ile ölümlere neden olabilmektedir (Mogensen ve ark., 1983; Gross ve ark., 2005; KDOQI, 2007; American Diabetes Association, 2010). Ayrıca; böbrek hastalıklarının, kalp krizi ve felç gibi makrovasküler komplikasyonların gelişimi açısından da önemli bir risk faktörü olduğu bilinmektedir (Matsushita ve ark., 2010).

Yüksek glukoz konsantrasyonu; böbreklerde glomerüler endotel hücrelerini, düz kas hücrelerini, mesangial hücreleri, podositleri, tübüler epitel hücreleri, inflamasyon hücrelerini ve miyofibroblastları etkilemektedir. Glomeruloskleroz, glomerüler bazal membran kalınlaşması, glomerüler hipertrofi, mesangial hücre genişlemesi, podosit hücre kaybı, renal hücre hipertrofisi ve tubulointerstial fibrozis diyabetik nefropati esnasında meydana gelen majör değişimlerdir. Bu değişimler sonucu; albüminüri, glomerüler filtrasyonda azalma, arteriel kan basıncında ve sıvı tutumunda artma gözlenmektedir (Mauer ve ark., 1984; Ziyadeh, 1993; Dalla-Vestra ve ark., 2000; Mason ve Wahab, 2003; Kolset ve ark., 2012). Diyabetik bireylerde gözlenen bu değişiklikler, zaman içerisinde bireylerde böbrek yetmezliğinin gelişmesine neden olmaktadır (Gilbertson ve ark., 2005).

Diyabetik nefropatinin oluşumu ve ilerlemesi oldukça karmaşıktır. Diyabetik nefropati gelişimine neden olan mekanizmalar arasında; renin-anjiyotensin-aldosteron ve üretilen sistemi, profibrotik, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve tümör nekroz faktör- α (TNF- α) gibi inflamatuvar sitokinler, PKC ve janus kinaz (JAK) gibi sinyal yolları, poliol yolağı, AGE oluşumu ve oksidatif stres yer almaktadır (Şekil 1.1) (Kolset ve ark., 2012; Arora ve Singh, 2013).



Şekil 1.1. Diyabetik nefropati oluşumuna ve ilerlemesine neden olan moleküler mekanizmalar (Arora ve Singh, 2013).

Günümüzde, diyabetik renal hastalıkların tedavisi için hedef alınan noktalar; sistemik kan basıncı ve/veya intraglomerüler hipertansiyondur. Bu amaçla en sık kullanılan ajanlar ise; anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (ACE) (Lewis ve ark., 1993) ve anjiyotensin II reseptör antagonistleridir (ANG II) (Brenner ve ark., 2001). Fakat uygulanan bu strateji ve ajanlar diyabetik nefropatinin tedavisinde yetersiz kalmakta ve nefropatili hastaların sayısı her yıl artmaktadır (Zimmet, 2009).

1.2.2.2. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati periferel sinir sisteminin somatik ve otonom bölümlerini etkileyen önemli bir komplikasyondur. Bununla beraber; omurilik (Roubicek ve ark., 2009) ve merkezi sinir sistemini de etkilemektedir (Wessels ve ark., 2006). Diyabetik bireylerin yaklaşık olarak yarısından fazlasında zamanla nöropati gelişmekte (Abbott ve ark., 2011; Callaghan ve ark., 2012) ve bir veya daha fazla ekstremitenin amputasyonuna neden olabilmektedir (Boulton ve ark., 2005). Klinik ilerleyişi genellikle geleneksel bir tablo sergilemektedir. Diyabetik nöropatinin ileri evrelerinde duyu yitimi, el ve ayaklarda titremeler ve ağrıda artma gözlenmektedir (Boulton, 1997; Boulton ve ark., 2005).

Yapılan bazı çalışmalarda, nöropati gelişiminde nöronal kan damarlarının sekonder öneme sahip olduğu vurgulanmakta ve nöron ve glialarda meydana gelen değişimlerin nöropatinin primer nedeni olduğu ileri sürülmektedir (Malik ve ark., 2003; Pittenger ve ark., 2004; Shun ve ark., 2004).

Diyabetik nöropatinin gelişimine neden olan mekanizmalar arasında; poliol yolağı, AGE'lerin artışı, oksidatif stres ve PKC sinyal yolağı yer almaktadır (Negi ve ark., 2011a).

Diyabetik nöropati gelişimde sinirlerin uzunluğu önem kazanmaktadır. Uzun sinir uçları nöropati aşamasında ilk etkilenen bölgelerdir ve reflekslerde görülen zayıflık ve duyu kaybı bundan kaynaklanmaktadır. Dolayısıyla, diyabetik nöropatide ilk etkilenen bölgeler eller ve ayaklardır. Diyabetik nöropatiye neden olan mekanizmalar günümüzde tam olarak anlaşılamamış ve bu yüzden uygulanabilir bir tedavi yöntemi geliştirilememiştir. Bununla beraber, glisemik kontrolün sağlanması ve nöropatik acıların dindirilmesi belirli ölçülerde hastalara yardımcı olabilmektedir (Hosseini ve Abdollahi, 2013).

1.2.2.3. Diyabetik Retinopati

DR, retinada meydana gelen geniş spektrumlu lezyonlar ile karakterize bir komplikasyondur. Tip 1 diyabetli hastaların tamamında, tip 2 diyabetli hastaların ise büyük bir çoğunluğunda zaman içerisinde gelişmektedir (Fong ve ark., 2003; Kempen ve ark., 2004; Roy ve ark., 2004; Hirai ve ark., 2011). 20-74 yaş arasındaki bireylerde görülmekte ve ileri evrelerinde körlüğe neden olmaktadır (Frank, 2004; Hirai ve ark., 2011). DR’de, vasküler permeabilitede artış, kapiller mikroanevrizma, kapiller dejenerasyon ve yeni kan damarlarının aşırı oluşumu (neovaskülarizasyon) meydana gelmektedir (Wilkinson ve ark., 2003).

Retina, insan vücudundaki en aktif metabolizmaya sahip dokulardan bir tanesidir ve bu yüzden yüksek oksijen ve glukoz konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Fakat glukozun retina hücrelerine girişi insülininden bağımsız olarak gerçekleşmekte ve yüksek glukoz konsantrasyonu retinada ciddi hasarlara neden olmaktadır (Kohner ve ark., 1995; Falcao ve ark., 2010).

DR klinik olarak iki evreye ayrılmaktadır (Neely ve ark., 1998; Fong ve ark., 2003);

1-Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDR),

2-Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR).

NPDR, diyabetik retinopatinin başlangıç evresidir. Bu evrede hiperglisemi; perisit hücre kaybına ve bazal membran kalınlaşmasına neden olarak retina içerisindeki kan damarlarının yapısal bütünlüğünü, kan-retinal bariyeri ve vasküler permeabiliteyi bozmaktadır (Neely ve ark., 1998; Fong ve ark., 2003; Frank, 2004). Genellikle, bu evrede bireylerde herhangi bir görme kaybı sorunu yaşanmamaktadır.

Retinal kapillerdeki dejenerasyonun artmasıyla beraber retinopatinin seyri şiddetlenmekte (Bresnick ve ark., 1976) ve retinopatinin ileri evresi olan PDR’ye

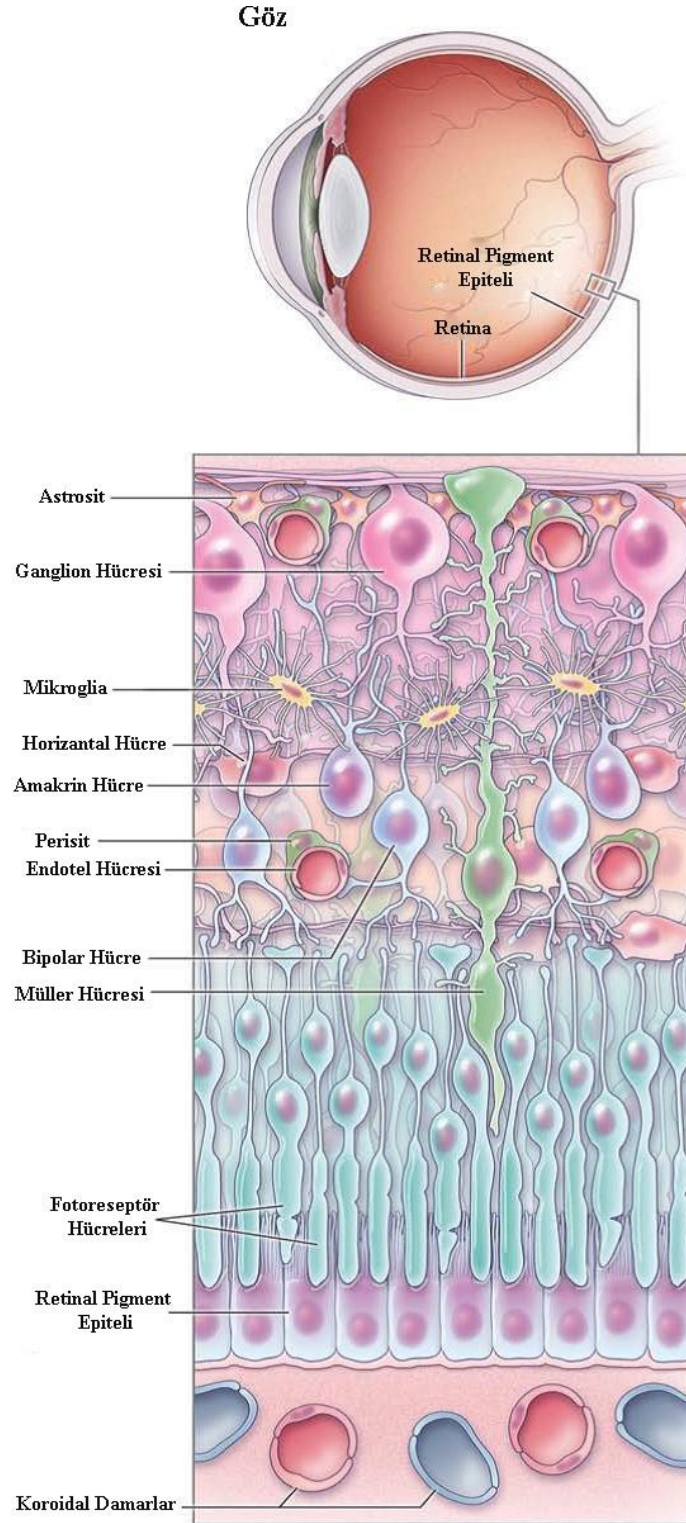
geçilmektedir. Bu evrede, neovaskülarizasyon, retina içerisinde sıvı birikimi, makula ödemi ve görmede yetersizlikler meydana gelmektedir. Daha ağır durumlarda ise; retinada kanama görülmektedir (Frank, 2004; Crawford ve ark., 2009). Neovaskülarizasyonun gelişmesinde ve ilerlemesinde, büyüme faktörleri önemli bir yer tutmaktadır. Özellikle VEGF seviyelerinde meydana gelen artış, DR seyrini şiddetlendiren en önemli etkenlerden bir tanesidir (Ohno-Matsui ve ark., 2002).

Retinal kapiller, sıkı bağlantılı (tight-junctions) endotel hücrelerinden meydana gelmektedir ve bu nedenle hücreler arası geçirgenliği oldukça düşüktür. Endotel hücrelerin etrafını ise, yüksek miktarda aktin proteini içeren perisit hücreleri sarmaktadır (Şekil 1.2). Perisit hücreleri içerdiği aktin proteinlerinden dolayı kontraktıl özelliğine sahiptir ve retinal kan akışını düzenlemektedir. Bunun yanı sıra; perisit hücreleri, kapiller yapının korunmasını ve endotel proliferasyonun önlenmesi gibi görevlerde de yer almaktadır. Endotel ve perisit hücreleriyle beraber diğer retinal hücreler olan müller hücreleri ve astrositler iç kan-retinal bariyerini oluşturmaktadır (Kaur ve ark., 2008). Bu bariyer retinal homeostasisin sürdürülmesini ve makromoleküllerin retinal dokuya geçişini önlemektedir.

Hiperglisemiye bağlı perisit hücre kaybı, retinopatide görülen birincil değişimdir (Archer, 1999; Lorenzi ve Gerhardinger, 2001; Jousen ve ark., 2003). Hipergliseminin neden olduğu perisit hücre kaybı ile kan akışı düzenlenememekte ve gözde patolojik değişiklikler başlamaktadır. İlerleyen evrelerde, hiperglisemi; epitel hücrelerinin, müller hücrelerinin ve astrositlerin de ölümüne neden olarak retinal damarlar içerisinde yer alan bütün hücresel elemanların kaybına, kan-retinal bariyerin ortadan kalkmasına ve hipoksiye yol açmaktadır. Bu durum, kapiller kapanma olarak bilinmektedir (Khan ve Chakrabarti, 2003a; Khan ve Chakrabarti, 2003b; Khan ve ark., 2006; Kaur ve ark., 2008).

DR’de görülen diğer bir önemli değişim ise bazal membran kalınlaşmasıdır. Bu durumun temel nedeninin AGE’lerin artışı ve bazal membran ürünlerinin aşırı üretimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Perisit hücre kaybı gibi bazal membran kalınlaşması da kapiller kapanmayı hızlandırmakta ve iskemik bölgeyi

genişletmektedir (Roy ve Lorenzi, 1996; Roy ve Sate, 2000; Roy ve ark., 2003; Kaur ve ark., 2008).



Şekil 1.2. Retina'nın nörovasküler yapısı (Antonetti ve ark., 2012).

DR oluşumunun temel mekanizmaları, diğer komplikasyonlarda olduğu gibi çok karmaşıktır. Hücre kayıpları, bazal membran kalınlaşması, hiperglisemiye bağlı AGE'lerin artışı, AR ve PKC gibi bazı enzimlerin aktivitelerinde meydana gelen değişiklikler, artan oksidatif strese bağlı olarak nitrik oksit (NO) ve VEGF seviyelerindeki değişiklikler gibi pek çok faktör DR'nin gelişiminde önemli rol oynamaktadır.

Glisemik kontrolün sağlanması ve kan basıncının düzenlenmesi, belirli derecelerde retinopatik bireylere yardımcı olabilmektedir (DCCT, 1993; UKPDS, 1998; Matthews ve ark., 2004). Bununla beraber; erken teşhis ile belirlenen retinopatinin lazerle tedavisi, retinopatik bireylerin % 90'ından fazlasında görme kaybını önleyebilmektedir (ETDRS, 1991).

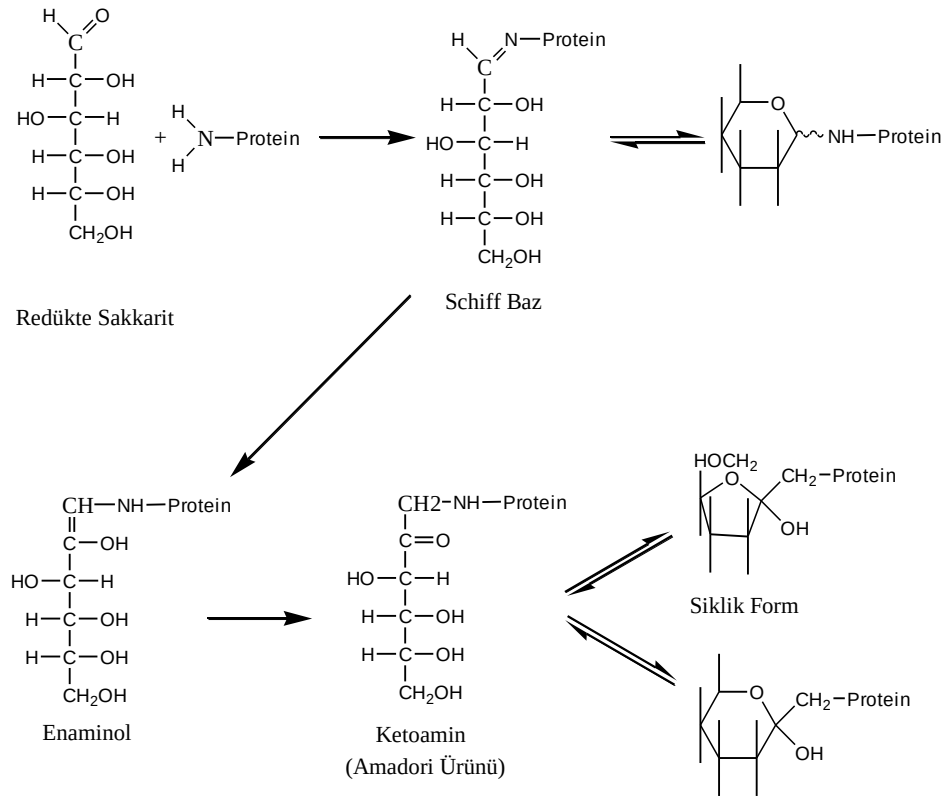
1.3. Diyabetik Retinopati Oluşumunda Rol Oynayan Temel Mekanizmalar

Hiperglisemi, tüm diyabet tiplerinde ortak bir bulgudur ve dokularda istenmeyen zararlı etkilere yol açmaktadır. Hipergliseminin; retinal, nöral, renal ve vasküler düzensizliklere nasıl neden olduğunu açıklayan moleküler mekanizmalar bulunmaktadır. Bunlar; ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, heksozamin yolağı, PKC yolağı ve poliol yolağıdır (Koya ve King., 1998; Brownlee, 2001; Obrosova ve ark., 2003; Wendt ve ark., 2006).

1.3.1. İleri Glikasyon Son Ürünlerinin (AGE) Oluşumu

Diyabette kan glukoz seviyelerinin uzun süreli yüksekliği intrasellüler ve ekstrasellüler proteinlerde non-enzimatik glikasyonu artırmaktadır. Glukoz ve fruktoz gibi şekerler, proteinlerin serbest amino grupları ile reaksiyona girerek Schiff bazlarının oluşmasına neden olmaktadır. Oluşan bu Schiff bazları ise daha sonra yeniden yapılanarak, daha stabil bir yapıda olan Amadori ürünlerini meydana getirmektedir (Jakus ve Rietbrock, 2004). Glukoz ve proteinler arasında meydana

gelen ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumuna neden olan bu reaksiyon 100 yıl önce keşfedilmiştir ve “Maillard Reaksiyonu” olarak bilinmektedir (Maillard, 1912). Reaksiyon; glukoz konsantrasyonu, pH ve zaman gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Şekil 1.3). Reaksiyonun bir sonraki aşamasında ise; Amadori ürünleri, dehidrasyon, oksidasyon, fragmentasyon ve kondensasyon gibi kompleks reaksiyonlar geçirerek AGE’lerin oluşmasına neden olmaktadır.



Şekil 1.3. Maillard Reaksiyonu (Jakus ve Rietbrock, 2004).

Protein glikasyonunun, fizyolojik olarak yaşlanmış proteinlerin tanımlanıp ubiquitinasyon ile parçalanması için evrimsel bir yolak olduğu düşünülmektedir. Fakat, protein glikasyonunun kompleks özellikleri bu görüşün fazla basit olduğunu göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile protein glikasyonunun, insülin sekresyonunu (Coughlan ve ark., 2011) ve sinyal yolağını da (Reddy ve ark., 2006; Cassese ve ark., 2008) düzenlediği gösterilmiştir.

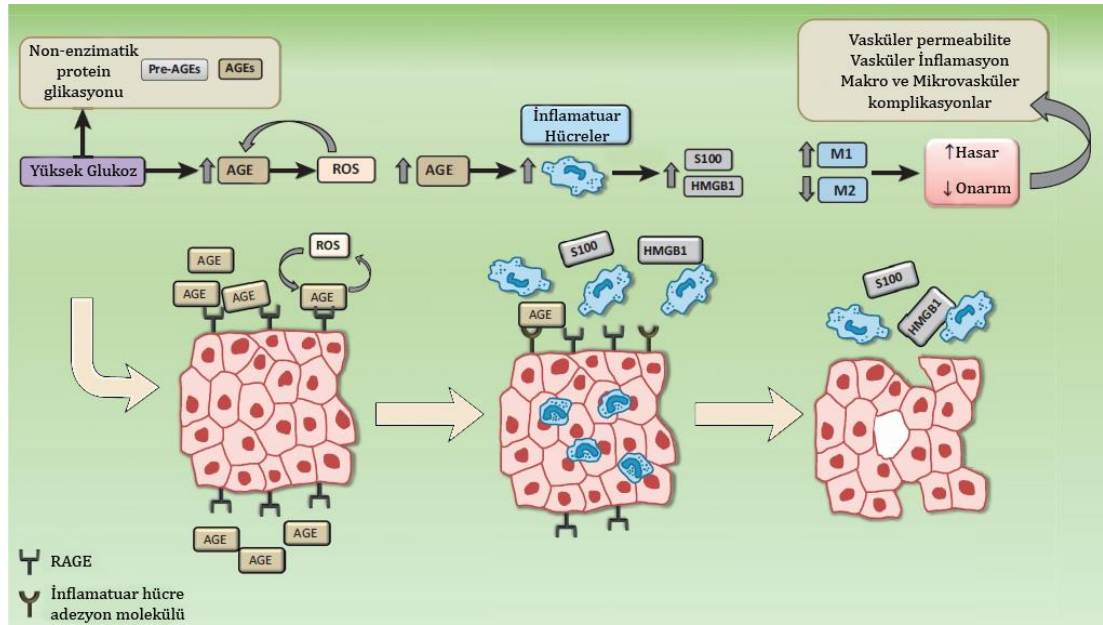
Uzun süreli hiperglisemi ve oksidatif stres AGE'nin oluşumunu hızlandırmaktadır (Fu ve ark., 1994; Vlassara, 1997; Vlassara, 2001). Diyabette, sadece uzun ömürlü proteinler değil, kısa ömürlü proteinler de glikasyon ile daha hızlı bir şekilde değişime uğramakta ve hasara yol açmaktadır. Ayrıca, Krebs döngüsü metabolitleri ve glioksal gibi glikoliz metabolitleri, intrasellüler protein glikasyonunu glukozdan daha etkin bir şekilde artırmaktadır (Thornalley ve ark., 1999).

AGE'nin ekstrasellüler oluşumu; matriks-matriks, hücre-hücre ve matriks-hücre etkileşimini etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda, patolojik şartlar altında matrikste meydana gelen çapraz bağlanmalar ile ECM'de kalınlaşma meydana geldiği tespit edilmiştir (Corman ve ark., 1998; Kass ve ark., 2001; Chang ve ark., 2009). Tip IV kollajen gibi bazı bazal membran glikoproteinlerinde meydana gelen glikasyon ile proteinlerin sekonder yapısı ve katlanması değişmektedir. Bunun bir sonucu olarak da, hücre adezyonunda değişimler meydana gelmektedir (Kalfa ve ark., 1995; Mott ve ark., 1997; Shimizu ve ark., 2011).

İleri glikasyon ile intrasellüler proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonu, hücre içerisindeki proteinlerin fonksiyonlarını ve turnoverını doğrudan etkilemektedir. İnasellüler AGE artışının majör nedeni glukozdur. Glukoz; glikolitik ürünlerin, Krebs döngüsü metabolitlerinin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışına neden olarak AGE'nin artışını sağlamaktadır (Hamada ve ark., 1996).

AGE, patolojik etkilerinin bir kısmını hücresel reseptörler ile etkileşime girerek de gösterebilmektedir. Birçok AGE reseptörü bulunmasına rağmen (Lu ve ark., 2004; Sourris ve Forbes, 2009; Sourris ve ark., 2009; Yan ve ark., 2009), diyabette en fazla incelenen ve çalışılan reseptör, ileri glikasyon son ürünleri reseptörü (RAGE)'dür. RAGE; AGE, yüksek-hareketli grup protein B1 (HMGB1) (Nogueira-Machado ve ark., 2011), S100 kalsiyum bağlama proteini (Heizmann ve ark., 2007) ve β -amiloid gibi pek çok ligand için tanıma bölgesi içermektedir. Reseptörün fizyolojik rolünün, immün ve inflamatuvar yanıt sinyal yollarının amplifikasyonunu sağlamak olduğu düşünülmektedir (Schmidt ve ark., 1995; Bierhaus ve ark., 2001; Yan ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda HMGB1'in RAGE ile ligasyonunun ekstrasellüler sinyal

düzenleyici kinaz 1/2 (ERK) ve NF- κ B aktivasyonunu sağlayarak inflammatuar yanıtı neden olduğu ve retinal vasküler bariyerin yapısını bozduğu gösterilmiştir (Nishino ve ark., 1995; Stitt ve ark., 1997; Mohamed ve ark., 1999; Yan ve ark., 2009). Ayrıca, AGE'nin RAGE ile ligasyonunun nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidaz (Wendt ve ark., 2003) ve mitokondrial kaynaklı ROS'ların (Fu ve ark., 1994; Coughlan ve ark., 2009) üretimine de neden olduğu gösterilmiştir (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. İleri glikasyon son ürünlerinin diyabetik komplikasyon oluşumuna etkisi (Manigrasso ve ark., 2013).

İleri glikasyon, ekstrasellüler matriks proteinlerinin birikimini artırarak fibrozisi hızlandırabilmektedir (Cooper, 1998; Sourris ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda, yüksek glukoz düzeyinin (30 mM), retina ve böbrek mesangial hücrelerinde kollajen ve fibronektin gibi ECM proteinlerinin mRNA'sını artırdığı gösterilmiştir (Cagliero ve ark., 1988; Cagliero ve ark., 1991; Hua ve ark., 2001). Ayrıca, diyabetik hayvanlar ile yapılan çalışmalarda, hayvanların retina bazal membranlarında tip IV kollajen miktarının arttığı tespit edilmiştir (Nishikawa ve ark., 2000b). Bunun yanı sıra, AGE; monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) gibi kemokinlerin (Yamagishi ve ark., 2002; Inagaka ve ark., 2003; Isoda ve ark., 2008), TGF- β 1'in (Tsuchida ve ark., 1999; Li ve ark., 2004; Yamagishi ve ark., 2003) ve VEGF'nin (Lu ve ark.,

1998; Shimizu ve ark., 2011) ekspresyonlarını da artırarak neovaskülarizasyonu hızlandırabilmektedir.

Diyabetik köpekler ile yapılan çalışmalarda spesifik non-enzimatik glikasyon inhibitörü olan aminoguanidinin, retinal mikroanevrizmayı ve perisit hücre kaybını önlediği gösterilmiştir (Kern ve Engerman, 2001). Buna karşılık, diyabetik hayvanlara AGE'nin eksojen verildiği çalışmalarda perisit hücre kaybının arttığı gözlenmiştir (Xu ve ark., 2003).

1.3.2. Oksidatif Stres

ROS ve reaktif nitrojen türleri (RNS), ekstrasellüler ve intrasellüler uyarılara bir cevap olarak üretilmektedir. Ekstrasellüler uyarılar arasında; TNF- α , insülin gibi bazı hormonlar, plateletten türeyen büyüme faktörü (PDGF) ve epitelyal büyüme faktörü (EGF) gibi bazı büyüme faktörleri yer almaktadır. Ekstrasellüler uyarılar, plazma membran reseptörleri aracılığı ile reaktif türlerin (RS) üretimine neden olmaktadır. İntrasellüler uyarılar arasında ise; NADPH oksidaz, nitrik oksit sentaz (NOS) ve ksantin oksidaz gibi enzimatik sistemler, mitokondrial elektron transport zinciri ve sitokrom p450 gibi detoksifikasyon mekanizmaları yer almaktadır (Dröge, 2002; Zangar ve ark., 2004; Bedrad ve Krause, 2007; Pacher ve ark., 2007; Zhang ve Guterman, 2007).

Hücre adezyonu (Chiarugi ve ark., 2003), immün yanıt (Grisham, 2004), hücre büyümesi ve hormon sinyal yolları (Dröge, 2002) gibi hücre fonksiyonların yerine getirilebilmesi için, RS hücre içerisinde belirli miktarlarda sentezlenmekte ve oluşan RS antioksidan sistemler aracılığı ile elimine edilmektedir. Fakat; yaşlanma (Lee ve Wie, 2007), kanser (Storz, 2005), ateroskleroz (Madamanchi ve ark., 2005a; Madamanchi ve ark., 2005b), nörodejeneratif hastalıklar (Knight, 1997), obezite ve diyabet (Bashan ve ark., 2009) gibi hastalıklarda RS'nin aşırı üretimi gerçekleşmektedir. Bu gibi durumlarda RS, antioksidan savunma sistemlerinin kapasitesini aşmakta ve hücre içerisinde ve dışarısında hasara neden olmaktadır. Bu

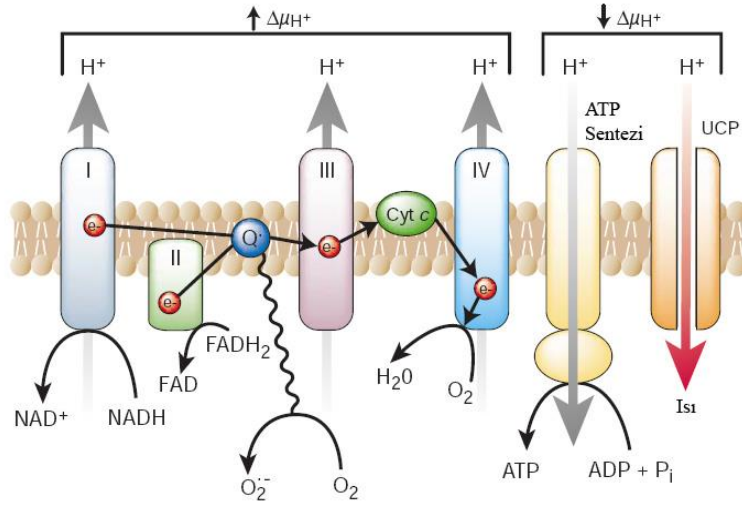
durum, “Oksidatif Stres” olarak bilinmektedir. RS’nin aşırı üretimi; başta DNA olmak üzere, lipitlere, proteinlere ve karbohidratlara zarar vererek hücrel homeostasisi bozmaktadır (Cutler, 2005).

Yapılan çalışmalarda diyabetik bireylerde ROS’un arttığı ve oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (Baynes, 1991). Diyabette oluşan ROS’un ana kaynağı mitokondridir. Fizyolojik şartlar altında, mitokondrial elektron transport zincirine giren oksijenin % 0,1 - 5’i süperoksit radikallerine indirgenmekte ve ROS’u oluşturmaktadır. Fakat bu oranın diyabetle beraber artış gösterdiği ve bu artışın da oksidatif stresin temel kaynağı olduğu ileri sürülmektedir. Bu konu üzerine yapılan çalışmalarda, glukozun ROS’un aşırı üretimini mitokondrial elektron transport zinciri üzerinden sağladığı ileri sürülmüştür. Fakat daha sonra yapılan çalışmalarda, yüksek glukoz miktarının mitokondride yer alan NADPH oksidaz, eşleşmemiş NO sentaz ve ksantin oksidaz gibi enzimatik yolları da aktive ettiği gösterilmiştir (Mullarkey ve ark., 1990; Du ve ark., 1999; Du ve ark., 2000; Nishikawa ve ark., 2000a; Gupta ve ark., 2002).

Hiperglisemi durumunda glukoz oksidasyonu, mitokondri membranları arasındaki voltaj gradientini artırmaktadır. Artan voltaj gradienti elektron transport zincirinde yer alan kompleks III’ün blokasyonuna neden olarak, kompleks III’e elektron taşıyan koenzim Q’nun elektronlarını moleküler oksijene transfer etmesine yol açmakta ve süperoksit oluşumunu artırmaktadır (Young ve ark., 2002) (Şekil 1.5). Bunun bir sonucu olarak da, mitokondrial DNA’da süperoksit kaynaklı mutasyonlar gerçekleşmekte ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelmektedir. Bununla beraber, mitokondrial antioksidan savunmada görev alan ve süperoksit dismutazın (SOD) bir formu olan manganez süperoksit dismutazın (MnSOD) diyabette ve yüksek glukoz içeren retinal hücre kültüründe baskılandığı gösterilmiştir (Kanwar ve ark., 2007; Kowluru ve ark., 2006a; Kowluru ve ark., 2006b).

Hipergliseminin neden olduğu diğer bir önemli değişim ise gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enziminin aktivitesinde meydana gelen inhibisyonudur. ROS,

GAPDH'ın inhibisyonunu sağlayarak diyabetik komplikasyonlara neden olan diğer mekanizmaları aktive etmektedir (Brownlee, 2001; Brownlee, 2005; Kowluru, 2005).



Şekil 1.5. Mitokondrial elektron transport zincirinde süperoksitlerin üretimi (Brownlee, 2001).

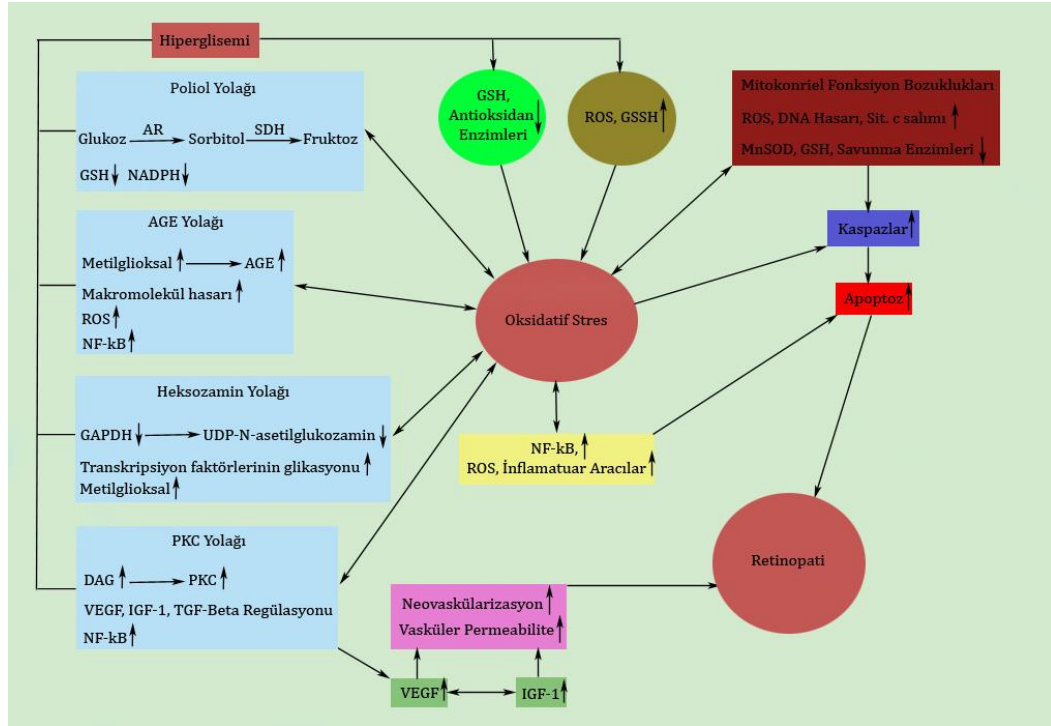
Diyabette artan oksidatif stresin muhtemel diğer kaynakları arasında; glukozun oto-oksidasyonu, proteinlerde meydana gelen glikasyon, redükte glutatyon (GSH) ve E vitamini miktarlarında azalma ve antioksidan savunma enzimlerinin aktivitelerinde meydana gelen düşme yer almaktadır (Wohaieb ve Godin, 1987; Mullarkey ve ark., 1990; Baynes ve Thorpe, 1999; Kowluru ve ark., 2001; Haskins ve ark., 2003). Artan oksidatif stres; nöropati (Feldman, 2003), nefropati (Ha ve Kim, 1999; Hinokio ve ark., 2002) ve retinopatinin (Kowluru ve ark., 2003) patogenezinde önemli roller oynamaktadır.

Retinanın yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içermesi, yüksek oksijen miktarına ihtiyaç duyması ve glukoz oksidasyonunu diğer dokulara oranla daha hızlı gerçekleştirmesi retinayı oksidatif strese duyarlı hale getirmektedir. Diyabetik ratlarda ve retinal hücre kültüründe yapılan çalışmalarda, süperoksit düzeylerinin arttığı tespit edilmiş (Du Y ve ark., 2003; Kowluru ve Abbas, 2003; Cui ve ark., 2006) ve oksidatif stresin diyabetik retinopati gelişiminde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Kowluru, 2003). Diyabetik bireylerin retinalarında yapılan

çalışmalarda ise, lipid peroksidasyonunun ve oksidatif DNA hasarının arttığı gösterilmiştir (Kowluru, 2001; Kowluru ve ark., 2001; Kowluru ve Koppolu, 2002b; Kowluru ve Abbas, 2003). Buna karşılık, antioksidan savunma sisteminin elemanları olan SOD, glutatyon redüktaz (GR), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz gibi enzimlerin ve hücre içi savunma sisteminin en önemli elemanlarından bir tanesi olan GSH'nin seviyelerinde azalma tespit edilmiştir (Meister, 1988; Kern ve ark., 1994; Kowluru ve ark., 2001; Haskins ve ark., 2003). Ayrıca; antioksidan sistemde görev alan vitamin C, vitamin E ve β -karoten gibi non-enzimatik antioksidan seviyelerinde de hipergliseminin neden olduğu oksidatif strese bağlı olarak azalma tespit edilmiştir (Ford ve ark., 2003). Streptozosin uygulanmış diyabetik ratlarda antioksidan uygulaması, retinal VEGF konsantrasyonunu ve lipid peroksidasyonunu önleyebilmektedir (Obrosova ve ark., 2001).

ROS; diyabetik retinopati gelişimine neden olan poliol yolağı (Engerman ve ark., 1994), AGE yolağı (Beisswenger ve ark., 2003), PKC sinyal yolağı (Stauble ve ark., 1994; Koya ve King, 1998) ve heksozamin yolağını (Du ve ark., 2000) doğrudan etkilemekte ve aktivasyonlarına neden olmaktadır (şekil 1.6). Diyabetik retinopatide meydana gelen birincil değişim olan perisit hücre kaybı, oksidatif stresin neden olduğu bir durumdur. Oksidatif stres, kaspaz enzim sistemini ve NF-kB'yi aktive ederek apoptozu tetiklemekte ve perisit hücre kaybına neden olmaktadır (şekil 1.6) (Kowluru ve ark., 2001; Kowluru ve Koppolu, 2002a; Romeo ve ark., 2002; Kowluru ve ark., 2003; Cowell ve Russell, 2004; Kowluru ve ark., 2004). Ayrıca; retinal mitokondride ROS kaynaklı meydana gelen değişimler sonucu, sitokrom c ve proapoptotik faktörler salınmakta ve kaspaz aktivitesine neden olmaktadır (Anuradha ve ark., 2001; Phaneuf ve Leeuwenburgh, 2002).

Diyabetik retinopatide görülen diğer bir önemli değişim olan neovaskülarizasyon, VEGF'nin ekspresyonunda meydana gelen artış ile ilişkilidir. VEGF'nin retinal ekspresyonu ROS ile artmakta ve neovaskülarizasyonu hızlandırmaktadır (Chua ve ark., 1998; Lu ve ark., 1998). Ayrıca; VEGF, diyabetik retinopati ile ilişkili olan poliol ve/veya PKC sinyal yolağı ile de yakından ilişkilidir (Aiello ve ark., 1997; Frank ve ark., 1997).



Şekil 1.6. Diyabetik Retinopatide ROS'un diğer yollarla olan ilişkisi (Kowluru ve Chan, 2007).

Diyabetik komplikasyonlar, endotelial fonksiyon bozuklukları ile yakından ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda, ROS'un diyabetik vaskülopati patogenezinde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Schaffer ve ark., 2012). Diyabette artan ROS ve AGE, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enzim ekspresyonunu azaltmaktadır. Ayrıca; ROS, NO'nin biyoyararlanımını da düşürerek retinal kan damarlarının vazodilatasyonunu önlemekte ve hasara neden olmaktadır (Durante ve ark., 1988; Chua ve ark., 1998; Lum ve Roebuck, 2001; Sheetz ve King, 2002; Kaur ve ark., 2008).

Mitokondri kaynaklı süperoksit radikalleri, NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-) oluşumuna neden olmaktadır. Bu durum özellikle endotel hücrelerinde NO'nin biyoyararlanımını düşürmekle beraber, hücre hasara da yol açmaktadır. ONOO^- güçlü bir oksidandır ve membran fosfolipitlerinde, proteinlerde ve DNA'da hasara yol açmaktadır. Ayrıca, hücre içi GSH miktarlarında da azalmaya neden olarak oksidatif stresi artırmaktadır (Beckman ve Koppenol, 1996; Ceriello ve ark., 2001; Ceriello ve ark., 2008).

1.3.3. Heksozamin Yolağı

Hiperglisemi ve insülin direnci, yağ asidi oksidasyonunun artmasına neden olmaktadır. Bu durum, hücre içerisinde fruktoz 6-fosfat'ın heksozamin yolağına yönlendirilmesine neden olmakta ve diyabetik komplikasyonların gelişimine katkı sağlamaktadır (Sayeski ve Kudlow, 1996; Chen ve ark., 1998; Kolm-Litty ve ark., 1998; Du ve ark., 2000). Fruktoz 6-fosfat, heksozamin yolağında bulunan fruktoz 6-fosfat amidotransferaz (GFAT) enzimi aracılığı ile glukozamin 6-fosfata dönüşmektedir. Oluşan glukozamin 6-fosfat ise, daha sonra UDP-N-asetilglukozamine dönüşmektedir. Spesifik O-GlcNAc transferazlar (OGT) ise, UDP-N-asetilglukozamini kullanarak, sitoplazmik ve nükleer proteinlerin post translasyonel modifikasyonlarına neden olmaktadır.

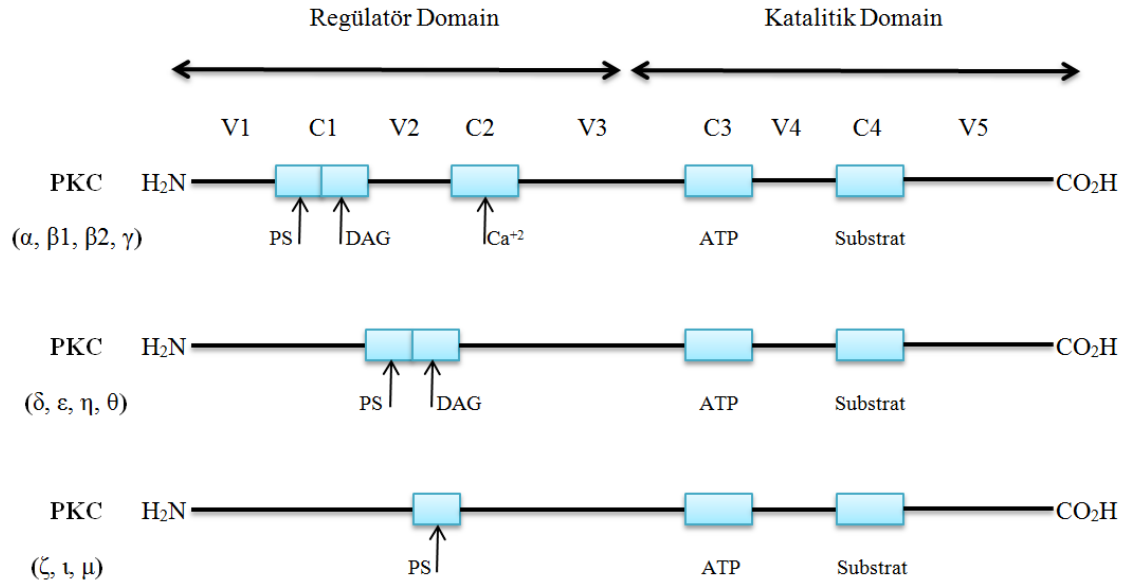
Diyabette heksozamin yolağında meydana gelen artış, hücre içi spesifik protein-1 (Sp1) aktivasyonuna neden olmaktadır. Sp-1 bir transkripsiyon faktörüdür ve TGF- β 1 ve plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) ekspresyonlarında artışa neden olmaktadır (Edwards ve ark., 2008). Bu nedenle; GFAT'ın inhibisyonu, hipergliseminin neden olduğu TGF- α , TGF- β 1 ve PAI-1 artışının inhibisyonuna neden olmaktadır (Du ve ark., 2000).

Arteriel endotel hücrelerde meydana gelen eNOS enzim inhibisyonu, heksozamin yolağı ile yakından ilişkilidir. eNOS enziminde meydana gelen inhibisyon, enzimin Akt aktif bölgesinden O-GlcN asetilasyonu ile gerçekleşmektedir (Hart, 1997; Yamagishi ve ark., 2001; Musicki ve ark., 2005).

ROS ile inhibe olan GAPDH, hücre içerisinde UDP-N-asetilglukozamin artışına neden olmakta ve intrasellüler proteinlerin post-translasyonel modifikasyonlarını hızlandırmaktadır (Du ve ark., 2000; Du X ve ark., 2003).

1.3.4. Protein Kinaz C Sinyal Yolağı

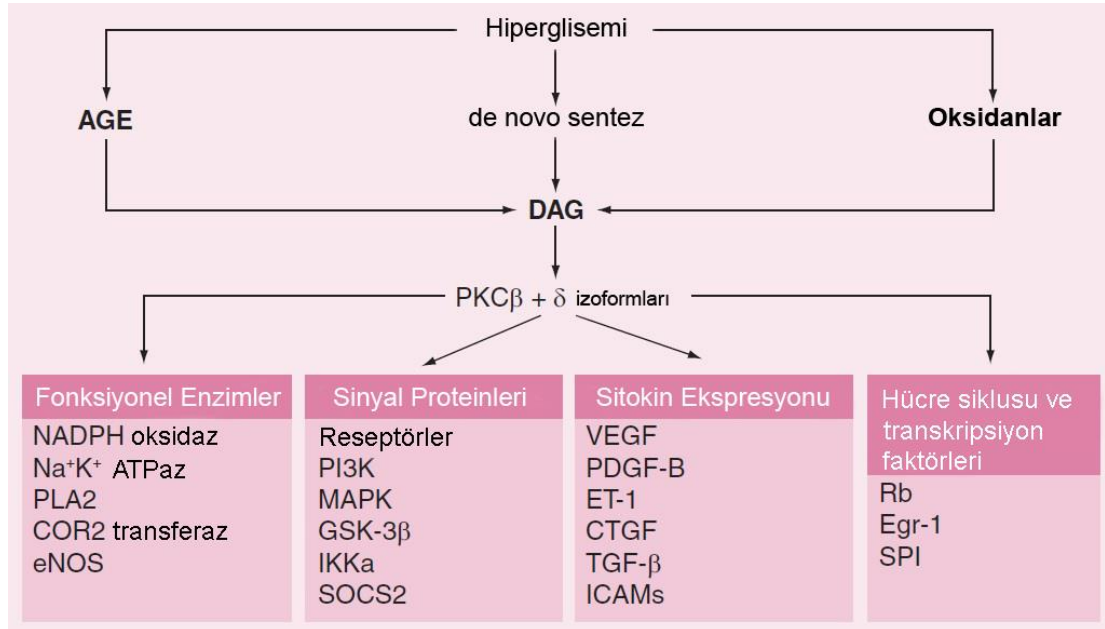
PKC farklı hedefleri fosforilleyen serin/treonin kinaz ailesinin bir üyesidir ve en az 11 izoformu bulunmaktadır (Newton, 2003; Steinberg, 2008). PKC izoformları; Ca^{+2} , diaçilgliserol (DAG), fosfatidilserin (PS) ve forbol 12-meristat 13-asetat (PMA) gibi forbol esterler tarafından aktive edilebilmektedir. PKC izoformları, Ca^{+2} veya DAG bağlama bölgeleri taşıyıp taşıyamamalarına göre sınıflandırılmaktadır. Klasik (Conventional) PKC izoformları (α , $\beta 1$, $\beta 2$ ve γ) hem Ca^{+2} hem de DAG için bağlama bölgeleri taşıırken, orjinal (Novel) PKC izoformları (δ , ϵ , η ve θ) sadece DAG için bağlama bölgesi taşımaktadır. Buna karşılık atipik (Atypical) PKC izoformları (ζ , ι ve μ) ise, ne Ca^{+2} ne de DAG için bağlama bölgesi taşımaktadır. Fakat bu PKC izoformları fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)'ın fosfolipit ürünleri tarafından aktive edilebilmektedir (Newton, 2003; Steinberg, 2008; Corbalan-Garcia ve Gomez-Fernandez, 2006). Ayrıca; diyabette artış gösteren hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksidanlar ve VEGF gibi büyüme faktörleri aracılığı ile de PKC izoformları aktive edilebilmektedir (Konishi ve ark., 1997; Nishikawa ve ark., 2000a; Rolo ve Palmeira, 2006) (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Altgruplarına göre PKC izoformlarının yapısı (Jacobs ve ark., 2003, Bölüm 28).

Yapısal olarak bütün PKC izoformları; N-terminal regülatör ve C-terminal katalitik domain taşımaktadır. Klasik PKC izoformları, regülatör domain C1 ve C2 olarak adlandırılan iki korunmuş bölge taşımaktadır. DAG, C1 bölgesi ile bağlanma gösterirken; Ca^{+2} , C2 bölgesi ile bağlanma göstermektedir. Orjinal PKC izoformları ise, C1 bölgesi ve C2-benzeri domain taşımaktadır. DAG, C1 bölgesi ile bağlanma gösterirken; Ca^{+2} , C2-benzeri domain ile bağlanma gösterememektedir ve PKC'nin bu izoformlarını aktive edememektedir. Atipik PKC izoformları ise, sadece C1-benzeri domain taşımaktadır. Fakat, ne DAG ne de Ca^{+2} bu bölgeye bağlanabilmektedir. PKC izoformlarının katalitik domainde yer alan korunmuş C3 ve C4 bölgeleri ise, bütün izoformlarda ATP ve substrat bağlanmasından sorumlu bölgelerdir (King ve Das-Evcimen, 2010).

PKC sinyal yolağı hücre içerisinde ve dışarısında birçok önemli biyolojik olayı kontrol etmektedir. Permeabilite, kontraksiyon, ECM, hücre büyümesi, anjiyogenez, apoptoz, enzim aktivite değişimleri, sitokin aktivitesi ve lökosit adezyonu gibi pek çok farklı süreç PKC yolağı ile regüle edilmektedir (Şekil 1.8) (Nishizuka, 1992; Oikawa ve ark., 1992; Nishizuka, 1995; Xia ve ark., 1996; Koya ve ark., 1997).

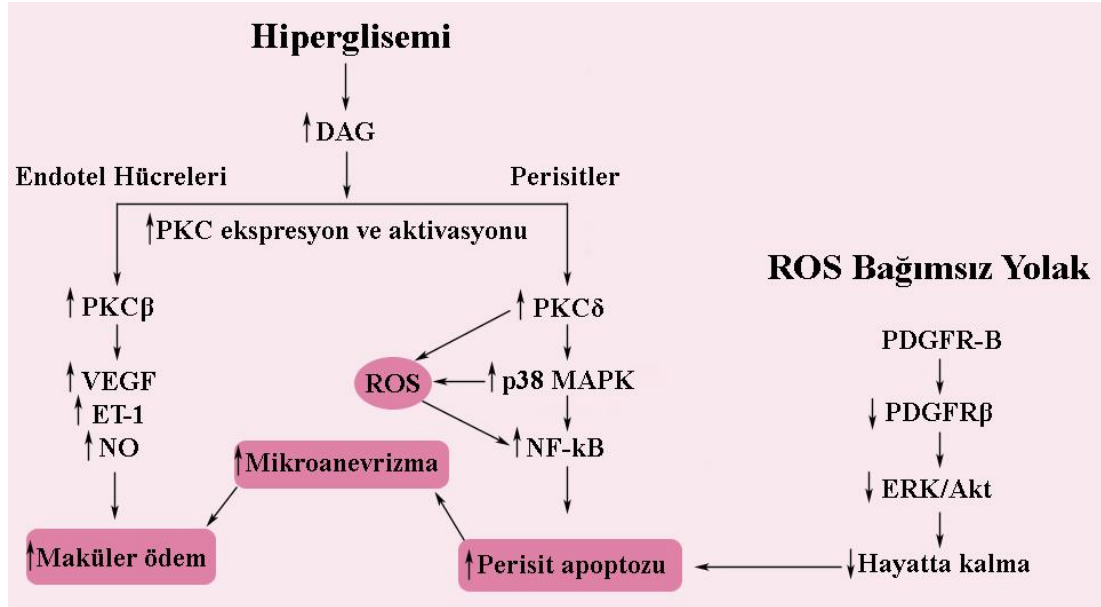


Şekil 1.8. Hiperglisemi ile PKC aktivasyonun farklı hücresel yollara etkileri (King ve Das-Evcimen, 2010).

Diyabette; vasküler doku, retina, aort, kalp ve renal glomerüllerde DAG seviyeleri yükselmektedir (Craven ve ark., 1990; Inoguchi ve ark., 1992; Shiba ve ark., 1993; Derubertis ve Craven, 1994; Ishii ve ark., 1996). Yapılan hücre kültürü çalışmalarında, hiperglisemi durumunda retinal ve aortik endotel hücrelerinde, düz kas hücrelerinde (Inoguchi ve ark., 1992; Shiba ve ark., 1993; Xia ve ark., 1994), renal mesangial hücrelerde (Ayo ve ark., 1991; Studer ve ark., 1993) ve birçok vasküler hücrede DAG seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir. Hiperglisemiye bağlı hücre içi DAG seviyelerindeki bu artışın başlıca iki nedeni bulunmaktadır; hiperglisemi fosfatidilinozitolin hidrolizi ile veya *de novo* olarak DAG seviyelerini artırmaktadır (Shiba ve ark., 1993; Xia ve ark., 1994). Hiperglisemi sonucu, hücre içi konsantrasyonu artan gliserol 3-fosfat, DAG'ün *de novo* sentezini artıran en önemli metabolittir (Xia ve ark., 1994).

Diyabet, değişik dokularda genellikle birden fazla PKC izoformunu aktive etmektedir. Diyabet, retinada PKC α , β 1, β 2 ve ϵ 'ın aktivitesinin artmasına neden olurken (Shiba ve ark., 1993); retinal endotel hücrelerde PKC β 1 ve PKC δ 'nın aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Park ve ark., 2000). Diyabetin neden olduğu endotelial fonksiyon kaybı, perisit hücre kaybı, mikroanevrizma ve anjiyogenez gibi birçok anormal hücresel süreç ve fonksiyon bozuklukları PKC yolağı ile yakından ilişkilidir.

Hiperglisemi durumunda, endotel ve perisit hücrelerinde aktivitesi artan PKC birçok patolojik sürece dâhil olarak DR gelişimine katkı sağlamaktadır (Khan ve Chakrabarti, 2007). Aktivitesi artan PKC; endotel hücrelerinde NO, endotelin-1 (ET-1) ve VEGF düzeylerini değiştirirken, perisit hücrelerinde ROS, PDGF, NF-kB ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) sinyal yollarında değişime neden olarak DR patogenezinde rol oynamaktadır (Şekil 1.9) (Way ve ark., 2001).



Şekil 1.9. PKC'nin Retinopatideki rolü.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile PKCδ'nın perisit hücre kaybıyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Perisit hücrelerinde hipergliseminin neden olduğu PKCδ aktivasyonu, ROS artışına ve NF-kB ve p38 MAPK gibi sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Aktivitesi artan NF-kB ise, PDGF reseptör-β'nin defosforilasyonuna neden olan Src homolog-2-domain içeren fosfataz-1 (SHP-1) ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. Böylelikle, SHP-1 ekspresyonunda meydana gelen artış sonucu PDGF'nin sinyal yolağında azalma meydana gelmekte ve perisit hücrelerinde apoptoz gelişmektedir (Şekil 1.9) (Gerald ve ark., 2009).

DR'de görülen neovaskülarizasyonun gelişiminde önemli rol oynayan VEGF, PKC ile yakından ilişkilidir. VEGF, endotel hücrelerinde VEGF reseptörlerine (VEGF-R1 ve VEGF-R2) bağlanarak DAG seviyelerinin artmasına neden olmaktadır (Xia ve ark., 1996). Artan DAG seviyeleri, spesifik PKC izoformlarının aktivitelerinde artışa neden olmaktadır. Aktivitesi artan PKC ise, endotel hücrelerinde permeabilite değişimine yol açarak neovaskülarizasyonun yayılmasına neden olmaktadır. PKCβ inhibitörü ile yapılan çalışmalarda, VEGF aracılı retinal permeabilite artışının önlenileceği gösterilmiştir. Bununla beraber, PKC de VEGF'nin ekspresyonunda artışa neden olabilmektedir (Aiello ve ark., 1997).

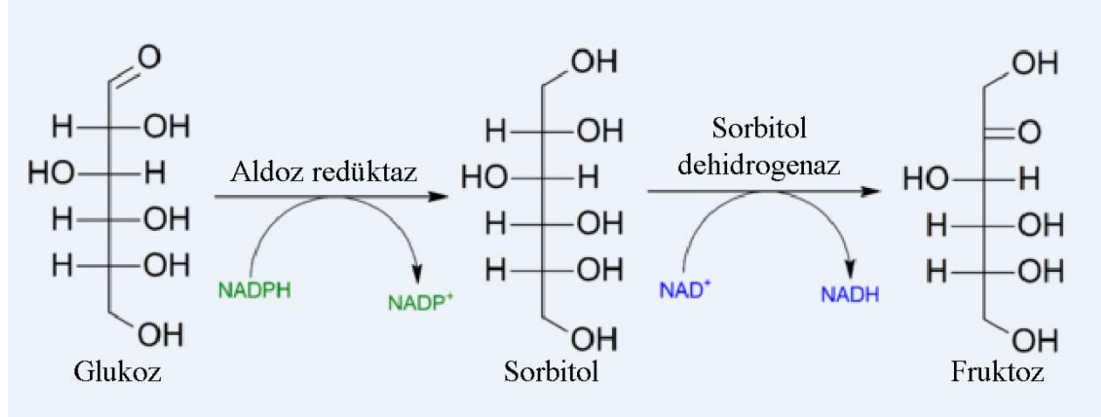
Diyabette yükselen ROS, GAPDH inhibisyonuna neden olarak DAG'ün prekürsörü olan trioz fosfat konsantrasyonunun artmasına neden olmakta ve diyabetik komplikasyonların gelişimine katkı sağlamaktadır (Craven ve ark., 1990; Inoguchi ve ark., 1992; Shiba ve ark., 1993; Scivittaro ve ark., 2000). Bununla beraber, aktivitesi artan PKC; NADPH oksidaz gibi enzimlerin miktarında artışa neden olmakta ve hücre içi oksidatif stresi artırmaktadır (Quagliaro ve ark., 2003). Yapılan çalışmalar ile PKC aktivitesinin, PKC β spesifik inhibitörü (LY53331) ile inhibisyonunun, diyabetin neden olduğu oksidatif stresi önlediği gösterilmiştir (Kowluru, 2001; Wu ve ark., 2006). Dr. King ve çalışma grubunun yaptığı bir başka çalışmada ise, PKC β izoformunun eksik olduğu farelerde, diyabetin neden olduğu oksidatif strese karşı koruma sağladığı bulunmuştur (Ohshiro ve ark., 2006).

Endotel hücrelerinde hiperglisemiye bağlı olarak meydana gelen PKC aktivasyonu, eNOS inhibisyonuna neden olarak endotel bağımlı vazodilatasyonu önlemektedir (Kuboki ve ark., 2000; Hink ve ark., 2001; Cardillo ve ark., 2002). Buna karşılık PKC ET-1 ekspresyonunda artışa neden olmakta ve vazokonstriksiyonu artırmaktadır (Park ve ark., 2000). PKC'nin aktivitesine bağlı olarak meydana gelen bu durum, endotelde permeabilite değişimine neden olmakta ve DR gelişimine katkı sağlamaktadır. Diyabetik ratlarda PKC'nin spesifik inhibitörü olan LY333531 ile yapılan çalışmalarda, LY333531'in ET-1 ekspresyonundaki artışı önleyebildiği gösterilmiştir (Ishii ve ark., 1996; Yokota ve ark., 2003).

1.3.5. Poliol Yolağı

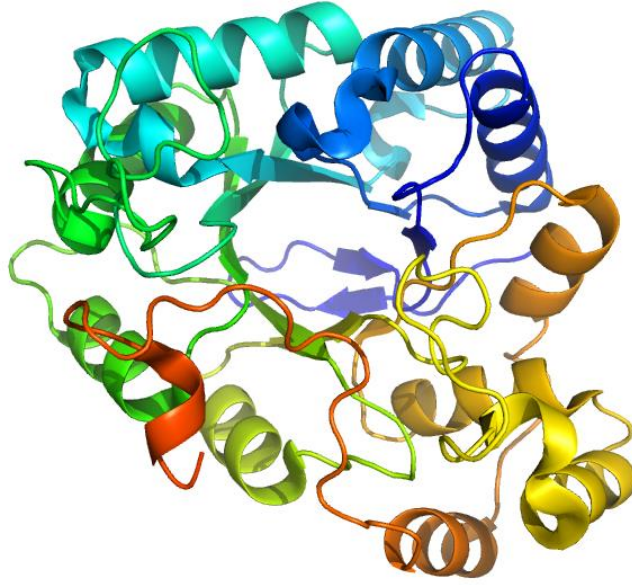
Aldoz redüktaz enzimi (AR, E.C 1.1.1.21, ALR2) biyosentez ve detoksifikasyon gibi farklı hücresel süreçlerde görev alan aldo-keto redüktaz (AKR) süper ailesinin bir üyesidir (Jez ve ark., 1997; Barski ve ark., 2008). İnsülin bağımsız dokular olan; sinir, retina, lens, glomerüller ve vasküler hücreler başta olmak üzere birçok hücre grubu tarafından eksprese edilmektedir. Poliol yolağının ilk enzimi olan AR, NADPH ko-faktörü aracılığı ile glukozun sorbitole dönüşümünü sağlamaktadır. Poliol yolağında yer alan ikinci enzim olan sorbitol dehidrogenaz (SDH, E.C

1.1.1.14) enzimi ise, NAD^+ ko-faktörü ile sorbitolü fruktoza dönüştürmektedir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Polioli yolu (Ramana ve Srivastava, 2010).

İnsan AR enzimi 316 aminoasitten (MW: 36 kDa) oluşan, monomerik bir proteindir. Kromozomun 7q35 bölgesinde yer almakta ve AKR1B1 geni tarafından kodlanmaktadır. AR enzimi, diğer AKR süper ailesinin üyeleri gibi β/α fıçı yapısında bir motifle katlanmaktadır (Şekil 1.11). Enzimin aktif merkezi C-terminal bölgesinde bulunmakta ve NADPH 'ın nikotinamid halkası merkezin ortasında yer almaktadır. Yüksek hidrofobik özellik gösteren bu bölge; aromatik aminoasitler (Trp20, Tyr48, Trp79, Trp11, Phe121, Phe122 ve Trp219), apolar aminoasitler (Val47, Pro218, Leu300 ve Leu301) ve polar aminoasitler (Gln49, Cys298 ve His100) tarafından oluşturulmuştur. Bu aminoasitler arasında yer alan Tyr48, His110 ve Cys298; enzim reaksiyonunda muhtemel proton donörleridir (Kondeau ve ark., 1992; Wilson ve ark., 1992). Yapılan çalışmalar ile Cys298'in enzimin aktif merkezinde yer aldığı ve katalitik aktiviteyi kontrol ettiği bulunmuştur (Petrash ve ark., 1992).



Şekil 1.11. AR enziminin yapısı (Zhang ve ark., 2013).

AR enzimi, substrat olarak glukozdan başka lipid peroksidasyonu esnasında oluşan lipid aldehytleri ve bunların GSH konjugatlarını, fosfolipidleri, aterojenik aldehytleri ve steroidleri de kullanmaktadır (Wermuth ve Monder, 1983; Matsuura ve ark., 1996; Kawamura ve ark., 2002; Srivastava ve ark., 2005).

Yapılan kinetik ve yapısal çalışmalar; AR'ın poliol yolağındaki görevinin majör fizyolojik rolü olmadığı yönünde veriler ortaya koymaktadır (Wilson ve ark., 1992; Srivastava ve ark., 1999; Ramana ve ark., 2000). Bu görüşün ortaya çıkmasında önemli olan verilerden bir tanesi; AR'ın glukozu olan düşük afinitesidir. AR enzimi, glukozu düşük afinite (K_m : 50-100 mM) gösterirken; lipid peroksidasyonundan türeyen aromatik ve alifatik aldehytlere daha yüksek afinite (K_m : 30-800 μ M) göstermektedir (Srivastava ve ark., 1999; Ramana ve ark., 2000). Lipid peroksidasyonu ürünü olan ve yüksek toksik etki gösteren 4-hidroksi trans-2-nonenal (HNE) (K_m : 10-30 μ M), AR için mükemmel bir substrattır (Srivastava ve ark., 1998). Bununla beraber; AR enzimi, GSH ile konjuge olan aldehytleri daha etkin (10-100 kat) bir şekilde metabolize etmektedir. Bu durum AR enziminin aktif bölgesinde GSH için bağlama bölgesi bulunmasından kaynaklanmaktadır (Dixit ve ark., 2000; Ramana ve ark., 2000). Enzimin aktif merkezinde yer alan amino asitlerin hidrofobik

karakterde olması substrat afinitesini doğrudan etkilemektedir. Hidrofobik karakterde olan bu amino asitler sonucu enzim, substrat olarak hidrofobik aldehitleri hidrofilik aldolara tercih etmektedir (Wilson ve ark., 1992; Srivastava ve ark., 1999; Srivastava ve ark., 2005). Bu ve buna benzer veriler AR'ın *in vivo* substratlarının glukozdan daha çok reaktif aldehitler ve bunların konjugatları olduğunu düşündürmektedir.

Diğer bir önemli veri ise; AR'ın gen promotor bölgesinde NF-kB ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgesi içermesidir. Bu transkripsiyon faktörleri redoks-düzenleyici transkripsiyon faktörleri olarak da bilinmektedir ve AR'ın ekspresyonunu oksidatif stres durumunda artırmaktadır (Iwata ve ark., 1999; Srivastava ve ark., 2005).

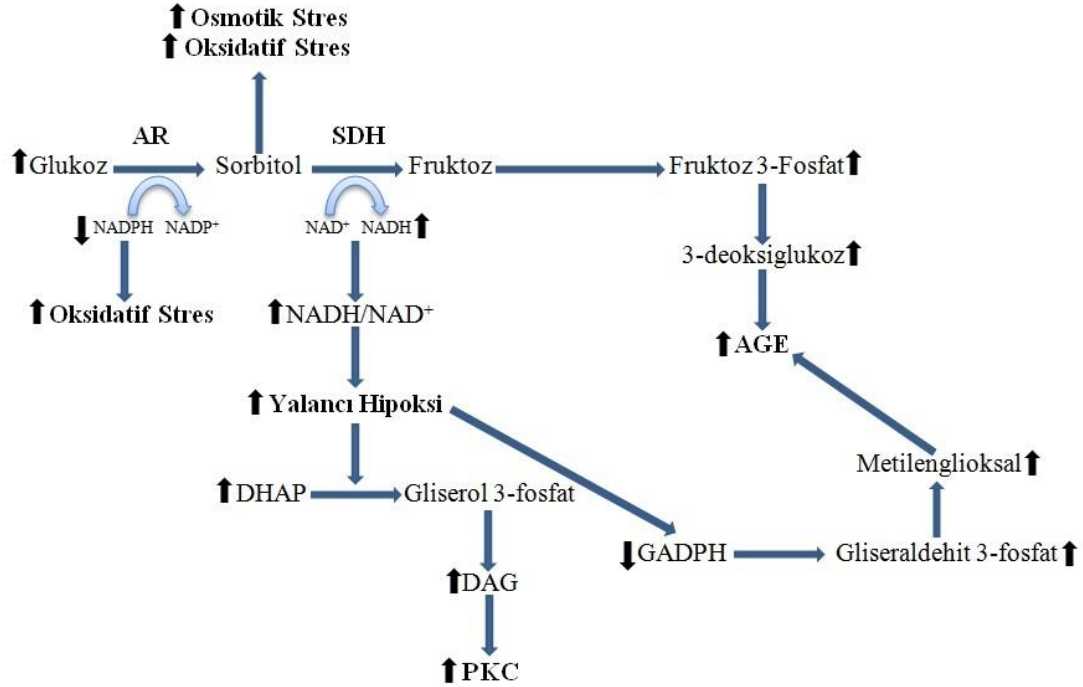
Bu ve buna benzer diğer veriler, AR'ın antioksidan savunma sisteminin önemli bir elemanı olduğunu ve ekstra hepatik dokularda detoksifikasyon görevini üstlendiği görüşünü desteklemektedir.

AR enziminin sahip olduğu bu çoklu fonksiyon özelliği, AR için inhibitör dizayn ederken önem kazanmaktadır. Dizayn edilecek inhibitörler, AR'ın detoksifikasyondaki fonksiyonunu inhibe etmezken; poliol yolağındaki fonksiyonunu inhibe etmelidir (Srivastava ve ark., 2005).

AR, diyabetik komplikasyonlar başta olmak üzere inflamasyonda (Yang ve ark., 1998; Miller ve ark., 2005), renal hastalıklarda (Hasuike ve ark., 2002), değişik kanser türlerinde (Lee ve ark., 2001; Saraswat ve ark., 2006) ve ovaryum anormalliklerinde de (Meyer ve ark., 1992) önemli roller oynamaktadır.

Hiperglisemi durumunda, glukozun % 30'u poliol yolağı ile metabolize olurken, normoglisemik durumlarda bu oran % 3'tür (Gonzalez ve ark., 1984; Yabe-Nishimura, 1998). Diyabette yüksek glukoz konsantrasyonun neden olduğu poliol

yolağındaki artış, hücrel zararlar neden olmaktadır. AR'ın neden olduğu bu hücrel zararların nedenleri çok çeşitlidir (Şekil 1.12). Bunlar;



Şekil 1.12. AR'ın neden olduğu hücrel zararlar ve diğer yollarla olan ilişkisi.

- 1- Osmotik Stres: Diyabette AR aktivitesine bağlı olarak hücre içi miktarı artan sorbitol, osmotik strese ve elektrolit dengesizliğine neden olmaktadır. Bu artış, SDH enziminin AR'a göre daha düşük bir hızda sorbitolu fruktoza dönüştürmesinden ve sorbitolün hücreyi terk etmesini önleyen polaritesinden kaynaklanmaktadır. Poliöl yolağıının aktivitesine bağlı olarak artan sorbitol miktarı, hücrelerin şişmesine neden olmakta ve membrana zarar vermektedir (Demopoulos ve ark., 2005; Srivastava ve ark., 2005). Özellikle endotel hücrelerinde meydana gelen sorbitol artışı, osmotik ve oksidatif strese neden olmaktadır (Yabe-Nishimura, 1998; Sheetz ve King, 2002; Frank, 2004).
- 2- Oksidatif Stres: AR enziminin oksidatif strese olan etkisi, NADPH üzerinden açıklanmaktadır. AR enziminin ko-faktörü olan NADPH aynı zamanda GR ve sitokrom p450 gibi birçok hücre içi savunma enziminin de bir ko-faktörüdür. AR aktivitesinin artışına bağlı olarak düşen NADPH miktarı,

hücre içerisinde oksidatif strese neden olmaktadır (Yabe-Nishimura, 1998; Chung ve ark., 2003; Miwa ve ark., 2003). Bununla beraber, sorbitol birikimi ve relatif osmotik stres de oksidatif stresin artmasına neden olmaktadır (Sheetz ve King, 2002; Chung ve ark., 2003; Vincent ve ark., 2004).

- 3- Yalancı Hipoksi: Poliol yolağının ikinci enzimi olan SDH'nin aktivitesinin artışına bağlı olarak gelişmektedir. Yüksek glukoz konsantrasyonunda, SDH enzimi NADH üreterek hücre içi NADH/NAD^+ oranını değiştirmekte ve yalancı hipoksiye neden olmaktadır (Demopoulos ve ark., 2005; Srivastava ve ark., 2005). Meydana gelen yalancı hipoksi hücre içi çeşitli sinyal yollarını etkileyerek değişikliklere yol açmakta ve komplikasyonların gelişimine katkı sağlamaktadır.
- 4- Glikasyon Stresi: Poliol yolağı ile üretilen fruktoz, 3-fosfokinaz aracılığı ile fruktoz 3-fosfata dönüştürülmekte ve bu da 3-deoksiglukoz oluşmasına neden olmaktadır. 3-deoksiglukoz ise AGE oluşumunda merkezi bir prekürsördür ve hücresel hasara neden olmaktadır (Yan ve ark., 2003). Ayrıca, hücre içi NADH/NAD^+ oranının değişmesine bağlı olarak; GAPDH enziminde inhibisyon gerçekleşmektedir. Bu durum hücre içi gliseraldehit 3-fosfat'ın (G3P) artmasına neden olmaktadır. Hücre içi miktarı artan G3P ise, zaman içerisinde metilenglioksala dönüşmekte ve AGE miktarının artmasına neden olmaktadır (Trueblood ve Ramasamy, 1998; Beisswenger ve ark., 2003; Brownlee, 2005). Bunun yanında, poliol yolağı sonucu üretilen fruktoz glukozdan daha reaktif bir şekerdir ve AGE oluşumunu glukozdan daha etkin bir şekilde gerçekleştirmektedir (Vinson ve Howard, 1996; Khalifah ve ark., 1999).
- 5- PKC Stresi: SDH enzimine bağlı olarak artan NADH/NAD^+ oranı dihidroksi aseton fosfatın (DHAP) gliserol 3-fosfata dönüşümünü stimüle etmektedir. Gliserol 3-fosfat ise, DAG oluşumu için bir prekürsördür ve PKC aktivasyonuna neden olmaktadır (Ishii ve ark., 1996).

AR ve poliol yolağı özellikle diyabette meydana gelen katarakt gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır. AR aktivitesine bağlı olarak hücre içi miktarı artan sorbitolün katarakt gelişimine neden olduğu düşünülmektedir (Lee ve Chung, 1999). Bu amaçla yapılan çalışmalarda, streptozosin uygulanmış diyabetik ratlarda AR inhibitörlerinin katarakt gelişimini önlediği gösterilmiştir (Sun ve ark., 2006; Drel ve ark., 2008). Fakat, yapılan diğer çalışmalarda AR'ın bir diğer substratı olan lipid aldehytlerin lens epitel hücrelerinde apoptoza neden olarak katarakt gelişimine neden olduğu bulunmuştur (Ansari ve ark., 1996; Awasthi ve ark., 1996; Harocopos ve ark., 1998; Lee ve ark., 2002). Bununla ilişkili olan inhibitör çalışmalarında ise, AR inhibitörü kullanımı sonucu lens epitel hücrelerinde HNE metabolizmasının değiştiği gösterilmiştir (Choudhary ve ark., 2003). AR'ın aşırı ekspresyonunun sağlandığı çalışmalarda ise, sitotoksik aldehytlerin azaldığı, stresle aktive olan kinazların (c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve p38 MAPK) inhibe olduğu ve kaspaz-3'ün stimülasyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Pladzyk ve ark., 2006). Yapılan bir başka çalışmada ise insan dokularındaki sorbitol birikiminin osmotik strese ve diyabetik komplikasyonlara neden olabilecek kadar yüksek olmadığı bulunmuştur (Srivastava ve ark., 2005).

Son zamanlarda epitel hücre kültüründe ve diyabetik hayvanların retinalarında yapılan çalışmalarda; poli (ADP-riboz) polimeraz'ın (PARP) DR patogenezinde önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. DNA hasarına bağlı olarak aktive olan PARP, vasküler endotelial hücrelerde NAD^+ ve ATP miktarında azalmaya neden olarak hasara yol açmaktadır (Decker ve Muller, 2002; Obrosova ve ark., 2005; Kaur ve ark., 2006). Aynı zamanda PARP aktivasyonu NF-kB'nin de aktivasyonuna neden olarak apoptozu tetiklemektedir (Zheng ve ark., 2004). Diyabette meydana gelen AR aktivitesindeki artış PARP aktivasyonuna neden olarak retinopatide görülen hücresel hasarlara neden olmaktadır. Ayrıca, PARP aktivasyonu sadece retinopati için değil, diğer komplikasyonların gelişimi içinde önemli bir yolaktır (Obrosova ve ark., 2005).

DR'de meydana gelen neovaskülarizasyonun AR ile olan ilişkisi oksidatif stres üzerinden açıklanmaya çalışılmaktadır. AR aktivitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stres, VEGF'nin ekspresyonunda artışa neden olmakta ve DR gelişimine katkı

sağlamaktadır. Retinada AR inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda; vasküler permeabilitenin ve oksidatif stresin önlenildiği gösterilmiştir (Obrosova ve ark., 2003). Ayrıca, AR aktivasyonundaki artışa bağlı olarak meydana gelen PKC ve NF-kB düzeylerindeki değişimler, vasküler inflamasyonu ve adezyonu artırmaktadır (Ramana ve ark., 2004a). Hipergliseminin, sitokinlerin, büyüme faktörlerinin ve endotoksinlerin neden olduğu NF-kB bağımlı inflamatuvar yollar, AR inhibisyonu ile önlenilmektedir (Ramana ve ark., 2002; Ramana ve ark., 2003; Ramana ve ark., 2006a; Ramana ve ark., 2006b).

Diyabetin neden olduğu AR ve poliol yolağı aktivasyonu, başta oksidatif stres olmak üzere diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olan diğer bütün yolları doğrudan veya dolaylı olarak etkilemektedir. Poliol yolağı ve diğer yollar arasındaki bu ilişki, bazı araştırmacıların poliol yolağını diyabetik komplikasyonlardaki “merkezi yolk” olarak görmesine neden olmaktadır (Obrosova ve ark., 2003). Bu görüşe göre; diyabette aktivasyonu artan poliol yolağı diğer yolları etkileyerek diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır. Bir diğer görüşe göre ise; diyabetik komplikasyonlardaki merkezi mekanizma; mitokondrial süperoksit üretimi ve oksidatif stresdir (Du ve ark., 2000; Nishikawa ve ark., 2000a; Brownlee, 2001; Brownlee, 2005). Bu görüşe göre ise; diyabete bağılı olarak gelişen oksidatif stres diğer yolları etkilemekte ve diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile beraber AR’ın fizyolojik fonksiyonunun anlaşılması poliol merkezli diyabetik komplikasyonların gelişiminin oksidatif stresle yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Diyabette oksidatif strese bağılı olarak artan lipid peroksidasyonu (Schaffer ve ark., 2012) AR’ı doğrudan etkilemekte ve ekspresyonunda artışa neden olmaktadır (Srivastava ve ark., 2005). Bu ve buna benzer veriler AR ve oksidatif stresi birbirine bağlamaktır. Fakat, günümüzde bu konu hala bir tartışma konusudur.

1.4. Diyabetik Retinopati ile İlişkili Diğer Sinyal Yolakları

1.4.1. Mitojenle Aktive Olan Protein Kinaz (MAPK) Sinyal Yolağı

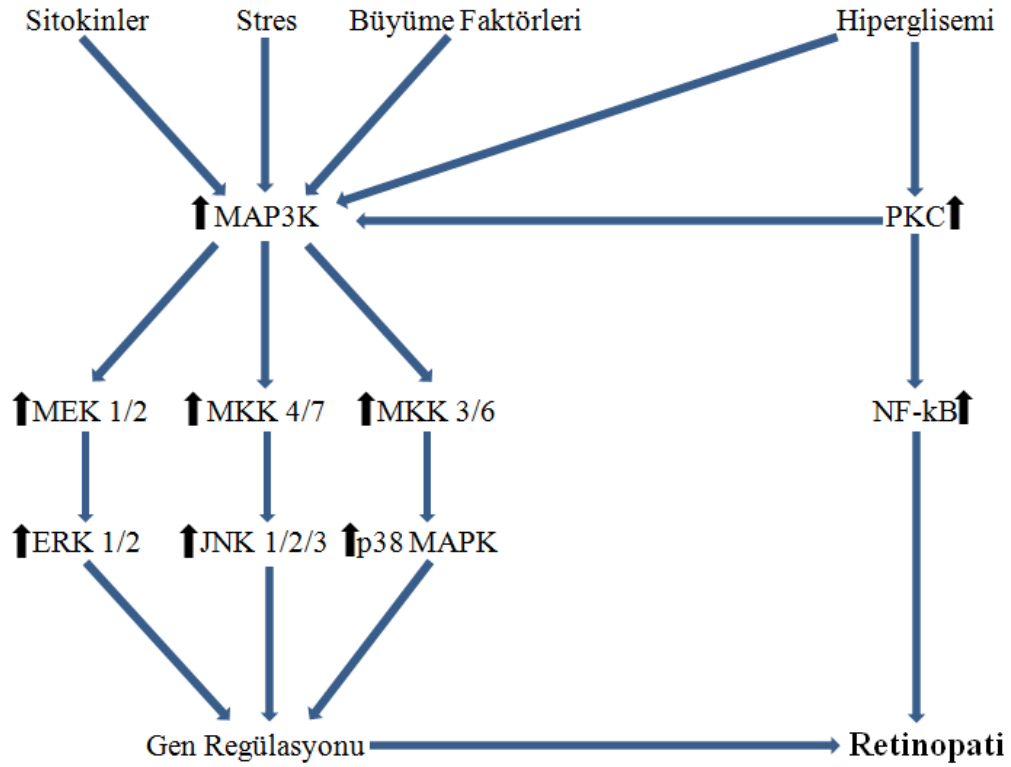
MAPK ailesi; hücre farklılaşması, proliferasyon ve apoptoz gibi farklı hücrel süreçlerin düzenlenmesinde görev alan geniş bir serin/treonin protein kinaz ailesidir (Kang ve ark., 2001). MAPK ailesi; stresle aktive olan JNK ve p38 MAPK ve büyüme faktörleri ile aktive olan ERK'lerden oluşmaktadır (Tomlinson, 1999; Pearson ve ark., 2001).

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile MAPK sinyal yolağının diyabetik komplikasyonlar ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalara göre; MAPK ailesi PKC ile yakından ilişkilidir (Şekil 1.13). Yüksek glukoza maruz bırakılan endotel hücrelerinde PKC inhibisyonunun MAPK aktivasyonunu önlediği bulunmuştur (Awazu ve ark., 1999; Tomlinson, 1999; Xin ve ark., 2004). Bununla beraber, MAPK sinyal yolağı PKC'den bağımsız olarak da aktive olabilmektedir. Diyabette özellikle oksidatif stresin, ERK5 aracılı MAPK aktivasyonuna neden olabileceği gösterilmiştir (Lui ve ark., 2000).

Diyabette MAPK aktivitesine bağlı olarak gelişen diğer bir önemli hasar ise; ECM kalınlaşmasıdır. Endotel hücrelerinde yapılan çalışmalarda; ECM proteinlerinde meydana gelen artışın, MAPK sinyal yolağında meydana gelen aktivasyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Xin ve ark., 2004).

Stresle aktive olan p38 MAPK ve JNK sinyal yolaklarının diyabette aktivitesi artmaktadır. Diyabette artan metilenglioksal gibi reaktif ürünler p38 MAPK aktivitesine neden olmakta ve apoptozu indüklemektedir (Liu ve ark., 2003). Özellikle deneysel diyabetik modellerde; p38 MAPK yolağının inhibisyonunun retinopatide ve sensör sinir fonksiyonlarında düzelmeye neden olduğu bulunmuştur (Du ve ark., 2011). Retinopati modelinde JNK sinyal yolunun inhibisyonu ise; neovaskülarizasyonda azalmaya neden olmaktadır (Guma ve ark., 2009).

Diyabette MAPK yolağında meydana gelen aktivasyon, önemli transkripsiyon faktörleri olan NF-kB ve AP-1'in ekspresyonunda artışa neden olmakta (Xin ve ark., 2004) ve diyabetik komplikasyonların gelişimine katkı sağlamaktadır.



Şekil 1.13. MAPK sinyal solağının retinopati oluşumuna etkisi.

1.4.2. Nükleer Faktör Kappa B (NF-kB) Sinyal Yolağı

NF-kB, p50 ve p65 alt ünitelerinden meydana gelen, dimerik bir transkripsiyon faktörüdür. NF-kB hücre içerisinde kappa B inhibitörü α (I κ B α) ile bağlı durumdadır. I κ B α 'nın I κ B kinaz (IKK) ile fosforilasyonu I κ B α 'nın NF-kB'den ayrılmasına neden olmakta ve NF-kB dimerinin nükleusa transferini sağlamaktadır (Baeuerle, 1998). Nükleusa transfer olan NF-kB ise, hedef genlerin promotor bölgelerine bağlanarak onların transkripsiyonunu gerçekleştirmektedir.

NF-kB'nin diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Hiperglisemi (Pieper ve Riaz-ul-haq, 1997), ROS (Nishikawa ve ark., 2000a), iNOS aktivasyonu (Negi ve ark., 2011b), PKC (Geraldes ve ark., 2009) ve AGE (Yan ve ark., 2009) NF-kB'nin nükleusa transferine ve farklı hedef genlerin transkripsiyonuna neden olmaktadır (Yan ve ark., 1994; Stitt ve ark., 1997; Glomb ve Monnier, 1995).

Diyabetin neden olduğu NF-kB aktivasyonu, retina ve kapillerde proapoptotik olarak ele alınmaktadır (Podesta ve ark., 2000; Kowluru ve ark., 2003). Yüksek glukozun neden olduğu endotel ve perisit hücre kayıplarının merkezi yolağının NF-kB aktivasyonu olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Du ve ark., 1999; Romeo ve ark., 2002). Bu çalışmalara göre; NF-kB aktivasyonu hücrelerin ölümüne ve ilerleyen aşamalarda histopatolojik değişikliklerin başlamasına neden olmaktadır. Zaman içerisinde meydana gelen histopatolojik değişikliklerin artması ise; DR gelişimine neden olmaktadır. Bu veriler, DR'nin başlangıç evrelerinde NF-kB aktivasyonunun gerçekleştiği ve DR patogeneze katkı sağladığı görüşünü ortaya çıkarmıştır (Kowluru ve ark., 2003). Bununla ilişkili yapılan bir başka çalışmada ise; AGE ve ROS'un neden olduğu NF-kB aktivasyonunun vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM) ve intrasellüler adezyon molekülü-1 (ICAM)'in ekspresyonlarında artışa neden olarak retinal bariyerin hasar görmesine neden olduğu bulunmuştur (Schmidt ve ark., 1995; Choudhuri ve ark., 2013). Ayrıca; NF-kB aktivasyonu TNF gibi proinflamatuvar faktörlerin ekspresyonunu artırarak da serbest radikallerin üretimini sağlayabilmektedir (Griscavage ve ark., 1996).

DR, kronik inflamatuvar hastalıklar ile benzerlikler göstermektedir (Joussen ve ark., 2001). Bu benzerlikler, diyabette inflamasyonun önemli bir rolü olabileceği görüşünü ortaya çıkarmıştır. Diyabette artan ROS, farklı yollarla inflamasyonu artırıp endotelial hücre hasarına, mikrovasküler permeabilite artışına ve sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (Quan ve ark., 2003). ROS ile meydana gelen bu artışa NF-kB aktivasyonu aracılık etmektedir (Schreck ve ark., 1992; Yuuki ve ark., 2001). İnterlökin (IL)-1 β , IL-6 ve IL-8 DR'de artış gösteren sitokinlerdir (Carmo ve ark., 1999; Yuuki ve ark., 2001; Kowluru ve Odenbach, 2004a). IL-1 artışı ROS ve NF-

kB artışına neden olmakta ve devam eden bir pozitif feedback oluşturmaktadır (Vassilakopoulos ve ark., 2003; Chang ve LoCicero, 2004). Retinal kapiller hücrelerde meydana gelen apoptoz IL-1 β ile artmaktadır. Bu artışa, NF-kB ve kaspaz-3'ün aracılık ettiği düşünülmektedir (Kowluru ve ark., 2004; Kowluru ve Odenbach, 2004a; Kowluru ve Odenbach, 2004b).

Diyabetin neden olduğu NF-kB aktivasyonu; metformin (Isoda ve ark., 2006), aspirin (Zheng ve ark., 2007), vitamin B türevleri (Hammes ve ark., 2003) ve tiozolidindion (Marx ve ark., 2004) ile önlenebilmektedir. Fakat NF-kB inhibisyonu insanlarda tam anlamıyla uygulanabilir bulunmamaktadır. Bu durum NF-kB'nin apoptoz ve patojen savunma sistemindeki rolünün tam olarak anlaşılamamasından kaynaklanmaktadır (Ju ve ark., 2009; Kretzler ve ark., 2010).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Cihazlar

Laminar Flow (Holten), Etüv (Thermo Scientific), Spektrofotometre (Molecular Devices), Western Blot Sistemi (Bio-Rad), Shaker (Biosan), Jel Görüntüleme Cihazı (Gel Logic 2200 Pro), Mikroplak Yıkayıcı (Biokit), Hassas Terazî (Shimadzu), Vorteks (Heidolph), Derin Dondurucu (- 80 °C) (Sanyo), Santrifüj (Sigma), pH Metre (Inolab), Manyetik Karıştırıcı (Torrey Pines Scientific), Sıcak Su Banyosu (Termal Laboratuvar Aletleri).

2.2. Kullanılan Maddeler, Antikorlar ve Kitler

Fetal sığır serumu (FBS) (Invitrogen), Streptomisin (Sigma), L-Glutamik asit (Sigma), Dulbecco's modified eagle's besiyeri (DMEM) (PAA), Ham's F-12 besiyeri (Sigma), Glukoz (Sigma), H₂O₂ (Sigma), Sorbinil (Sigma), PMA (Sigma), 3-(4, 5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolium bromid (MTT) (Sigma), HCl (Sigma), Tripsin (Sigma), EDTA (Applichem), Aprotinin (Sigma), Leupeptin (Sigma), Pepstatin (Sigma), Fenilmetansülfonil florür (PMSF) (Sigma), Tris (Sigma), NaCl (Sigma), Brij 96 (Sigma), NP-40 (Sigma), Sığır serum albümini (BSA) (Sigma), Akrilamid (Sigma), Bis-akrilamid (Sigma), Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Fisher Scientific), Amonyum persülfat (APS) (Sigma), Tetrametilendiamin (TEMED) (Applichem), Bromfenol mavisi (Merck), Gliserol (Sigma), β -merkaptoetanol (Sigma), NaOH (Sigma), 1-Butanol (Sigma), Metanol (Sigma), Glisin (Sigma), Tween-20 (Sigma), KCl (Sigma), KH₂PO₄ (Sigma), Na₂HPO₄ (Merck), Süt tozu (Sigma), Poliviniliden floroid (PVDF) membran (Santa Cruz), Filtre kâğıdı (Sigma), Kemilüminesans substrat ajanı (Thermo Scientific), AR primer antikoru (Santa Cruz), PKC primer antikoru (Sigma), AR sekonder antikoru (Santa Cruz), PKC sekonder antikoru (Santa Cruz), NF-kB ELISA kit (Cell Signaling), I κ B- α ELISA kit (Cell Signaling), Total c-Jun ELISA kit (Cell Signaling), Fosfo c-Jun

ELISA kit (Cell Signaling), SAPK/JNK ELISA kit (Cell Signaling), Sitokrom c ELISA kit (Invitrogen), Bikinkoninik asit (BCA) Protein Ölçüm Kiti (Thermo Scientific), H_2SO_4 (Sigma), NADPH (Sigma), Triklorik asit (TCA) (Sigma), Fosforik asit (Sigma), Tiyobarbitürik asit (TBA) (Sigma), 3, 3', 5, 5-Tetrametilbenzidin (TMB) (Cell Signaling), Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma), GSH (Sigma), GR (Sigma), Na-azid (Sigma).

2.3. Kullanılan Hücre Serisi

Çalışmalarımızda “insan retinal pigment hücre dizisi” olan ARPE-19 (ATCC) hücre serisi kullanıldı.

2.4. Deney Planı

Tez kapsamında, farklı dozlarda glukozun (5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM), H_2O_2 'in, AR inhibitörü sorbinilin ve PKC aktivatörü PMA'nın retina hücrelerinde proliferasyona, apoptoza, hücre içi sinyal yollarına, AR ve PKC'ye olan etkisi çalışıldı. Hücre proliferasyonunun değerlendirilmesi MTT testi ile, protein miktarı BCA kit prosedürü ile, AR ve PKC protein düzeyleri Western Blot yöntemi ile, oksidatif stres düzeyi malondialdehit (MDA) miktarı ve GSH-Px enzim aktivite tayini ile, NF- κ B, I κ B- α , Total c-Jun, Fosfo c-Jun, SAPK/JNK ve sitokrom c protein düzeyleri ise kit prosedürlerine uygun olarak ELISA yöntemi ile belirlendi. Glukoz ve H_2O_2 için optimum koşullar belirlenerek gruplar oluşturuldu. Gruplar;

- | | |
|---------------------------|--|
| 1- Kontrol | 7- Glukoz (50 mM) + H_2O_2 (200 μ M) |
| 2- 5,5 mM Glukoz | 8- Sorbinil (10 μ M) |
| 3- 25 mM Glukoz | 9- Glukoz (50 mM) + Sorbinil (10 μ M) |
| 4- 50 mM Glukoz | 10- PMA (15 nM) |
| 5- 100 mM Glukoz | 11- Glukoz (50 mM) + PMA (15 nM) |
| 6- H_2O_2 (200 μ M) | |

2.5. Kullanılan Yöntemler

2.5.1. Hücre Kültürü Sistemi

ARPE-19 hücreleri % 20 FBS, 100 mg/ml streptomisin ve 4 mM L-Glutamik asit içeren DMEM/Ham's F-12 besi yeri (1:1) içerisinde kültüre edildi. Kültür steril koşullar altında 37 °C, % 5 CO₂ ihtiva eden etüvlerde gerçekleştirildi.

2.5.2 Hücre Proliferizasyonunun Değerlendirilmesi

Hücre çoğalmasının saptanması için tetrazolium tabanlı kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi kullanıldı.

MTT testi, canlı hücrelerdeki mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. Reaksiyon mitokondrial bir enzim olan süksinat dehidrogenaz aktivitesine bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Enzimin aktivitesine bağlı olarak, MTT'nin tetrazolium halkasının parçalanması sonucu soluk sarı renkli MTT boyası, koyu mavi-mor formazan ürününe dönüşmektedir. Sonuç olarak, canlı ve mitokondri fonksiyonu bozulmamış hücreler mor renkte boyanmakta, ölü ya da mitokondri fonksiyonu bozulmuş hücreler ise boyanmamaktadır (Mosmann, 1983).

Zamana ve doza bağlı olarak H₂O₂ ve glukoz ile 96'lık plakta inkübasyona bırakılan hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri atıldıktan sonra her kuyucuğa 180 µl besiyeri ve hazırlanan MTT (2 mg/ml) boyasından 20µl ilave edilerek 37 °C'de, CO₂ inkübatöründe 1 saat inkübe edildi. İnkübasyonun sonunda hücrelerin üzerinde bulunan besiyeri-MTT karışımı uzaklaştırıldı ve canlı hücrelerde oluşan formazan kristallerinin 200 µl DMSO ile çözünmesi sağlandı. Kristaller DMSO ile çözüldükten 2-3 dakika sonra 550 nm'de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

2.5.3. Hücre Lizatların Toplanması

Hücre kültüründe deney gruplarına göre belirlenen etken maddeler 24 saat uygulandıktan sonra flasklardan hücre lizatları toplandı. Bu işlem için öncelikle flasklarda bulunan besiyeri uzaklaştırıldı ve hücrelerin yüzeyi fosfat tampon salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine proteaz inhibitörü içeren (aprotinin, leupeptin, pepstatin, PMSF - her birisinden 2 mg/ml) brij 96 lizis solüsyonu (1 M Tris, 0,5 M EDTA, 5 M NaCl, % 10 brij 96, % 10 NP-40 suda) eklenerek hücrelerin liziz edilmesi sağlandı.

Ölçümler yapılınca kadar lizatlar -80 °C’de saklandı.

2.5.4. Protein Miktar Tayini

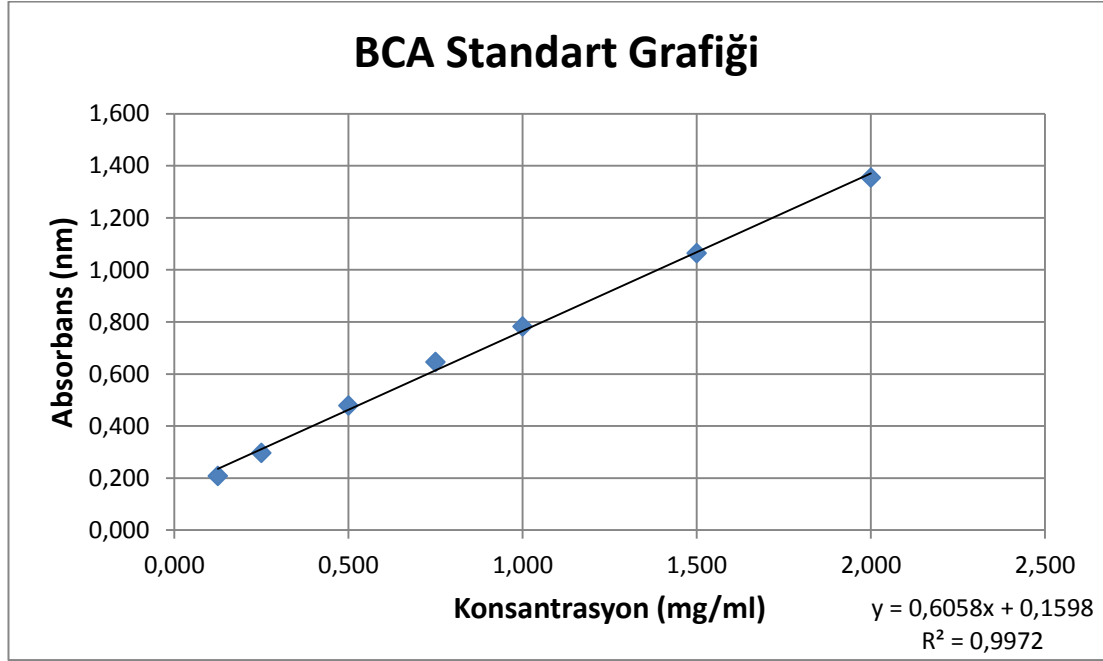
Hücre lizatlarının protein miktarı BCA Protein Ölçüm Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak belirlendi.

Kullanılan Çözeltiler;

- 1- 2 mg/ml BSA (Pierce BCA Protein Assay Kit)
- 2- BCA Reagent A (Pierce BCA Protein Assay Kit)
- 3- BCA Reagent B (Pierce BCA Protein Assay Kit)
- 4- % 0,9 NaCl (Serum Fizyolojik)
- 5- Çalışma reaktanı (WR) (50 Reagent A: 1 Reagent B)

96’lık ELISA plağına 10 µl örnek ve üzerine 190 µl çalışma reaktanı eklendi. Daha sonra plak 5 saniye süre ile çalkalayıcıda çalkalandı ve ardından 30 dakika, 37 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 562 nm’de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

Örneklerde protein miktar tayini yapmak için referans standart olarak 0,125-2 mg/ml arasında değişen konsantrasyonlarda BSA kullanıldı. Şekil 2.1’de görülen standart grafiğe göre örneklerin protein miktarı hesaplandı.



Şekil 2.1. BCA Standart Grafiği.

2.5.5. Western Blot Tekniği ile Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Hücre lizatlarında PKC ve AR protein düzeyleri % 8 (PKC için) ve % 12'lik (AR için) SDS page jel kullanılarak değeriendirildi. Yöntem semi-dry olarak uygulandı ve internal kontrol olarak β -aktin seçildi.

% 8'lik SDS page jel hazırlanması;

Ayrıştırıcı Jel (Separating Gel);

dH ₂ O	7010 μ l
% 30'luk Akrilamid	4000 μ l
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	3750 μ l
% 10'luk SDS	150 μ l
% 10'luk APS	75 μ l
TEMED	15 μ l

Sıkılaştırıcı Jel (Stacking Gel);

dH ₂ O	9000 μ l
% 30'luk Akrilamid	1980 μ l
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	3780 μ l
% 10'luk SDS	150 μ l
% 10'luk APS	75 μ l
TEMED	15 μ l

% 12'lik SDS page jel hazırlanması;

Ayrıştırıcı Jel (Separating Gel);

dH ₂ O	5010 µl
% 30'luk Akrilamid	6000 µl
1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8	3750 µl
% 10'luk SDS	150 µl
% 10'luk APS	75 µl
TEMED	15 µl

Sıkılaştırıcı Jel (Stacking Gel);

dH ₂ O	9000 µl
% 30'luk Akrilamid	1980 µl
0,5 M Tris-HCl, pH: 6,8	3780 µl
% 10'luk SDS	150 µl
% 10'luk APS	75 µl
TEMED	15 µl

Örneklerin Hazırlanması: Protein miktarı belirlenen hücre lizatları örnek denaturasyon karışımı (Örnek Tampon (Sample Buffer) + β merkaptotanol) ile 1:1 (200 µl) oranında karıştırılarak 95 °C'de 4 dakika kaynatıldı. Bu sayede lizatta bulunan proteinlerin denatüre olması ve negatif yükle yüklenmesi sağlandı.

Hazırlanan jeller polimerize olduktan sonra, kuyucuklara kaynatılan lizatlardan yükleme yapıldı. Jel başına 180 V, 56 mA 90 dakika süreyle uygulanarak proteinlerin jel’de ayrıştırılması sağlandı.

Jelden Membrana Antijenlerin Transferi: SDS page jel büyüklüğünde kesilmiş olan PVDF membran metanol ile 5 dakika fikse edildi. Elektroforez işleminin tamamlanmasının ardından jelin üzerinde yer alan sıkılaştırıcı jel kesilerek uzaklaştırıldı ve transfer tamponunda ıslatılmış 2 filtre kâğıdı, membran, jel ve tekrar 2 filtre kâğıdı olacak şekilde western blot sandviçi hazırlandı. 7 V, 110 mA 60 dakika süreyle western blot sandviğine uygulandı ve jelden PVDF membrana proteinlerin transferi sağlandı.

Western Blotting: Proteinlerin PVDF membrana transferinin ardından nonspesifik bağlanmaları önlemek için membran, bloklama solusyonu (% 5’lik Süt tozu) ile 90 dakika oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama sonrası membran PBS-Tween ile 3x10 dakika yıkandı. Yıkama sonunda membran +4 °C’de gece boyunca çalkayıcıda primer antikor ile inkübe edildi (Aldoz redüktaz primer antikor (Santa Cruz Biotechnology, INC: sc-17736) 1/200 ve Protein kinaz C primer antikor (Sigma: P5704) 1/500 oranında PBS ile dilüe edildi). Bu işlemden sonra membran PBS-Tween ile 3x10 dakika yıkandı. Yıkama sonunda membran horseradish peroxidase (HRP) bağlı sekonder antikor (Aldoz redüktaz sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, INC: keçi anti-fare IgG-HRP: sc-2005) 1/5000 ve Protein kinaz C sekonder antikor (Santa Cruz Biotechnology, INC: tavşan anti-fare IgG-HRP: sc-358923) 1/5000 oranında % 5’lik süt tozu ile dilüe edildi) ile 90 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran PBS-Tween ile 3x10 dakika yıkandı. En son aşamada HRP substratı olan peroksidaz reaktifi ve ışımayı sağlayan luminol reaktifi (Thermo Scientific, USA) 1:1 oranında karıştırılarak membranın üzerine uygulandı ve membran görüntülemeye alındı. Görüntüleme Gel Logic 2200 Pro cihazı aracılığıyla gerçekleştirildi.

2.5.6. NF-kB, IκB-α, Total c-Jun, Fosfo c-Jun, SAPK/JNK ve Sitokrom c Protein Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Belirlenmesi

Lizatlarda, NF-kB (Cell Signaling Technology, Sandwich ELISA Antibody Pair #7836), IκB-α (Cell Signaling Technology, Sandwich ELISA Antibody Pair #7343), Total c-Jun (Cell Signaling Technology, Sandwich ELISA Antibody Pair #7314), Fosfo c-Jun (Cell Signaling Technology, Sandwich ELISA Antibody Pair #7141), SAPK/JNK (Cell Signaling Technology, Sandwich ELISA Antibody Pair #7219) ve Sitokrom c (Invitrogen) protein düzeyleri kit prosedürüne uygun olarak ELISA yöntemi ile belirlendi.

Yakalayıcı antikor (capture antikor) 1:100 oranında PBS ile dilüe edildi ve 96'lık ELISA plaklarındaki her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde uygulanarak +4 °C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda kuyucuklar PBS-Tween ile 2 defa yıkandı. Daha sonra her bir kuyucuğa 150 µl bloklama solüsyonu (% 1'lik BSA; PBS içinde) konularak yarım saat 37 °C'de ve yarım saatte oda sıcaklığında bloklandı. Bloklama sonunda kuyucuklar PBS-Tween ile 2 defa yıkandı. Yıkamayı takiben örneklerden 30 µl alınarak kuyucuklara eklendi ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonunda kuyucuklar PBS-Tween ile 2 defa yıkandı. Yıkama sonunda kuyucuklara 1:100 oranında PBS ile dilüe edilmiş belirleyici antikordan 100 µl eklenerek 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 1 saat sonunda plaklar PBS-Tween ile 2 defa yıkandı. Yıkama sonunda kuyucuklara 1/1000 oranında % 1'lik BSA ile dilüe edilmiş HRP bağlı sekonder antikordan 100 µl eklenerek yarım saat inkübasyona bırakıldı. Yarım saat sonunda plak PBS-Tween ile 5 defa yıkandı ve ardından her bir kuyucuğa 100 µl 1X TMB substrat solüsyonundan eklenerek 15 dakika karanlıkta bekletildi. Daha sonra her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu (H₂SO₄) ilave edildi ve 2-3 dakika içerisinde 450 nm'de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

2.5.7. Malondialdehit Tayini

Lizatlardaki MDA miktarı Mihara ve Uchiyama'nın önerdiği yöntemle göre ölçüldü (Mihara ve Uchiyama, 1978). Bu yöntemin prensibi, aktive serbest radikallere moleküler oksijenin atak yapması sonucu lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'nın asidik ortamda TBA reaktifiyle oluşturduğu rengin spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Hazırlanan hücre lizatları 5000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda elde edilen süzüntüden 100 µl alınarak deney tüpüne aktarıldı ve üzerine 600 µl % 1'lik fosforik asit ve 200 µl % 0,6'lık TBA reaktifi ilave edildi. TBA'nın eklenmesinin ardından tüpler 100 °C'deki su banyosunda 45 dakika bekletildi. 45 dakika sonunda soğutulan örnekler 800 µl 1-bütanol eklenerek vortex yardımıyla karıştırıldı. Vortexleme işleminin sonunda bütanol fazı santrifüjle ayrılarak 532 nm'de spektrofotometrede absorbansı ölçüldü.

2.5.8. Glutasyon Peroksidaz Aktivite Tayini

Lizatlardaki GSH-Px aktivite tayini kit prosedürüne uygun olarak yapıldı. Bu yöntemin prensibi, GSH ile H₂O₂'in GSH-Px aracılığıyla H₂O ve GSSG'ye çevrilmesine ve bunun ardından GR enziminin GSSG miktarına bağlı olarak NADPH'ı okside etmesine dayanmaktadır.

Hazırlanan hücre lizatlarından 50 µl alınarak 96'lık plak içerisine konuldu. Üzerine 33 µl reaksiyon tamponu, 3 µl 40 mM NADPH solüsyonu ve 2 µl GSH eklendi. Plaklara 10 µl H₂O₂ eklenerek reaksiyon başlatıldı ve bunun hemen ardından spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda köre karşı 25 °C'de 5 dakika absorbansı ölçüldü.

2.5.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değeriendirilmesi SPSS paket programı dahilinde, normal dağılım gösteren veriler için Tek Yönlü ANOVA Varyans Analizi Testi ile ve normal dağılım göstermeyen veriler için ise non parametrik testler olan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testi uygulanarak yapıldı. Uygulanan analiz yöntemine bağılı olarak birbirinden bağımsız en az üç veya altı denemeden elde edilen üç tekrarlı sonuçlar kullanıldı. $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

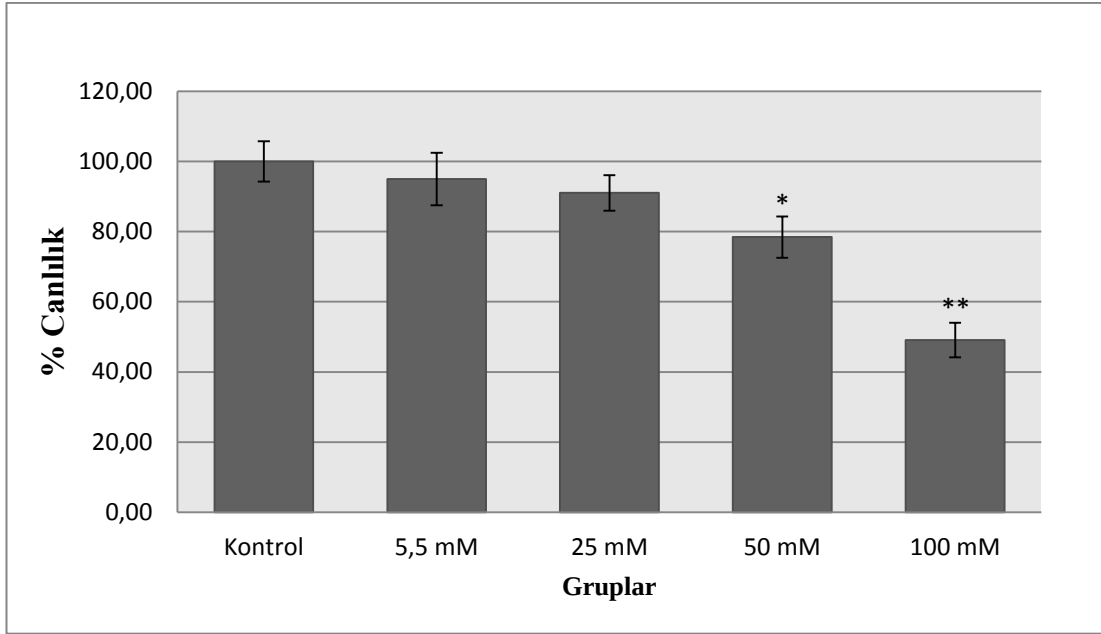
3. BULGULAR

3.1. Glukoz ve Hidrojen Peroksit'in ARPE-19 Hücre Canlılığına Etkisi

Çalışmamızda; hiperglisemi ve oksidatif stresin ARPE-19 hücrelerindeki canlılık üzerine olan etkilerinin belirlenmesi için glukoz ve H_2O_2 kullanıldı. Bu amaç için, 96 kuyucuklu plaklara 9.000 hücre/kuyucuk konsantrasyonlarında ekilen ARPE-19 hücre serisinin üzerine 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM konsantrasyonlarında glukoz ve 5 μ M, 25 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 200 μ M, 300 μ M, 400 μ M ve 500 μ M konsantrasyonlarında H_2O_2 eklendi. Glukoz ve H_2O_2 eklenmesinin ardından plaklar bir gece (24 saat) inkübasyona bırakıldı ve inkübasyon sonunda kolorimetrik bir yöntem olan MTT testi ile hücre canlılık analizi yapıldı. Bu değerlendirmelerden elde edilen sonuçlar ile hiperglisemi ve oksidatif stres grupları için kullanılacak olan uygun glukoz ve H_2O_2 konsantrasyonu belirlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar, ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM ve 25 mM glukozun anlamlı hücre ölümüne neden olmadığını, 50 mM glukozun % 21,57 (sub-toksik) ($p < 0,05$) ve 100 mM glukozun ise % 50,91 (toksik) ($p < 0,001$) oranında hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir (Şekil 3.1).

Retinal hücrelerde % 50 ölümle sonuçlanan 100 mM glukoz konsantrasyonu uygulaması LD50 dozu olarak kabul edilerek, çalışmaya subletal (subtoksik) doz olan 50 mM ile devam edilmiştir. 50 mM glukoz dozunda ARPE-19 hücrelerinde anlamlı apoptoz ve hücre ölümü gözlenmiştir. Daha düşük doz uygulamaları ise hücre canlılığında anlamlı azalmaya neden olmamıştır.



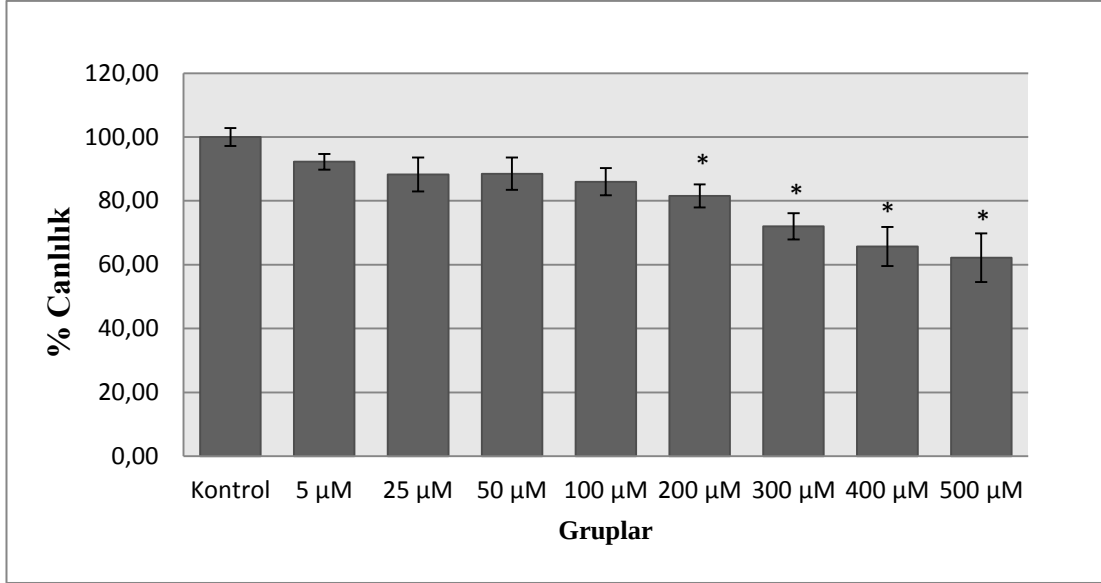
Şekil 3.1. Glukozun ARPE-19 hücrelerinin canlılığına etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir).

(*) $p < 0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=6$).

(**) $p < 0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=6$).

Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerinde 5 μM , 25 μM , 50 μM ve 100 μM H_2O_2 'in anlamlı hücre ölümüne neden olmadığı, 200 μM H_2O_2 'in % 18,41 ($p < 0,001$), 300 μM H_2O_2 'in 27,95 ($p < 0,001$), 400 μM H_2O_2 'in % 34,30 ($p < 0,001$) ve 500 μM H_2O_2 'in ise % 37,78 ($p < 0,001$) oranında hücre ölümüne neden olduğu belirlendi (Şekil 3.2).

200 μM H_2O_2 konsantrasyonunun hücre canlılığını anlamlı olarak azaltması, bu konsantrasyonun altındaki konsantrasyonlarda canlılığın anlamlı olarak değişmemesi ve 200 μM H_2O_2 üzerindeki konsantrasyonların ise aşırı toksik etkileri nedeni ile bundan sonraki çalışmalarda 200 μM H_2O_2 'in yüksek H_2O_2 konsantrasyonu olarak kullanılmasına karar verildi.



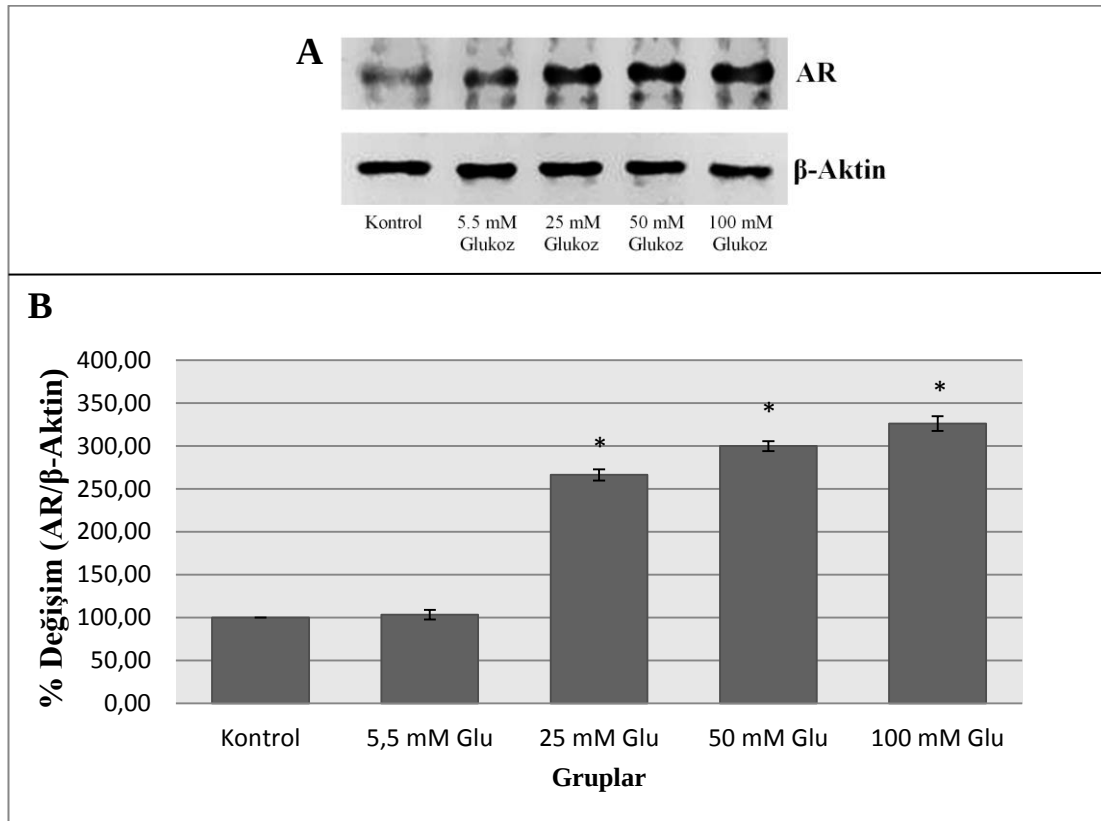
Şekil 3.2. H_2O_2 'in ARPE-19 hücrelerinin canlılığına etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir).
(*) $p < 0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=6$).

Glukoz ve H_2O_2 konsantrasyonunun belirlenmesinin ardından deneysel gruplarda kullanılacak olan sorbinil ve PMA konsantrasyonlarının tespiti için literatür taraması yapıldı. Bu tarama sonucu AR inhibitörü olan sorbinil için 10 μM (Pladzyk ve ark., 2006) ve PKC aktivatörü olan PMA için standart sinyalin oluşmasını sağlayan 15 nM (Ramana ve ark., 2005) konsantrasyonları seçildi. Konsantrasyonların belirlenmesinin ardından oluşturulan gruplar için ARPE-19 hücre serisinin kültürü yapıldı ve uygulamalar 24 saat gerçekleştirildi.

3.2. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Aldoz Redüktaz Protein Düzeylerine Etkisi

Glukoz, H₂O₂, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 hücrelerinde AR protein düzeylerine olan etkisi hücre lizatlarında western blot yapılarak değerlendirildi.

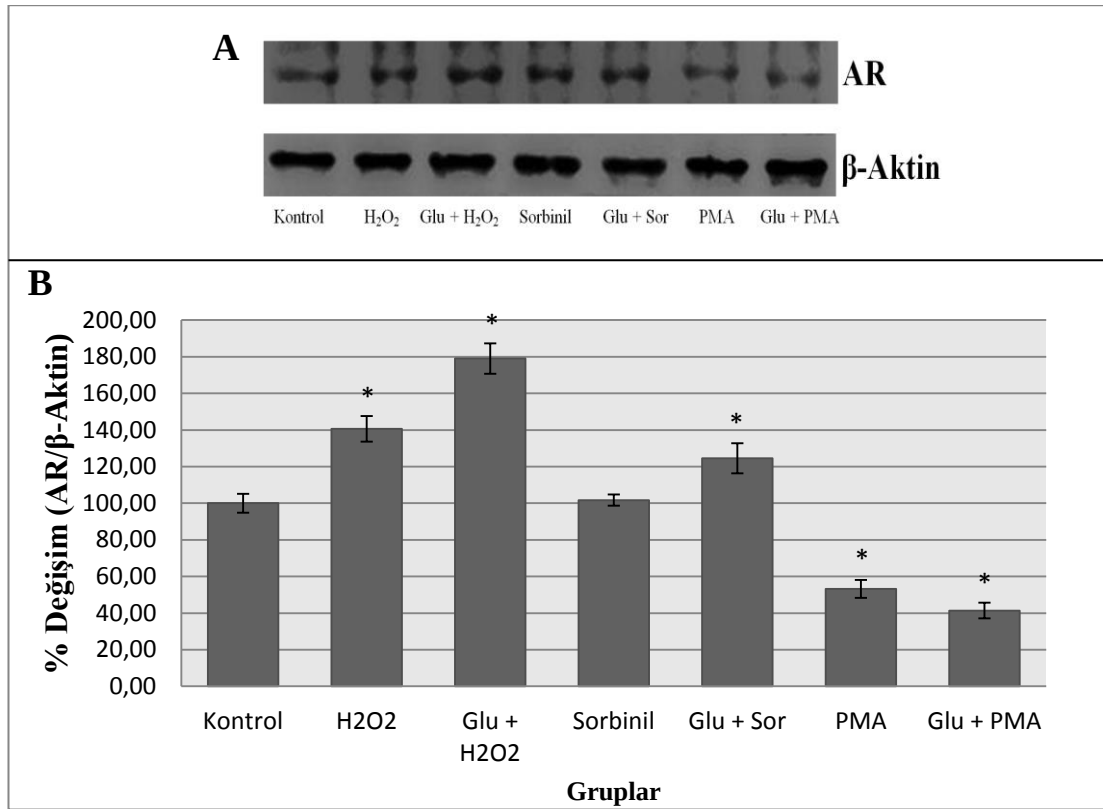
ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun AR protein düzeylerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık 25 mM ($p<0,001$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) glukoz konsantrasyonlarının AR protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. ARPE-19 hücrelerinde glukozun AR protein düzeylerine etkisi. (A) Western blot band sonuçları. (B) AR'ın gruplara göre yüzde değişimi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$).

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulanan gruplarda AR protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p<0,001$). Sorbinil uygulanan grupta AR protein düzeylerinde herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık glukoz + sorbinil uygulanan grupta ise AR protein düzeylerinin arttığı saptandı ($p<0,001$). Bununla beraber, PMA ve glukoz + PMA uygulanan gruplarda AR protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 3.4).

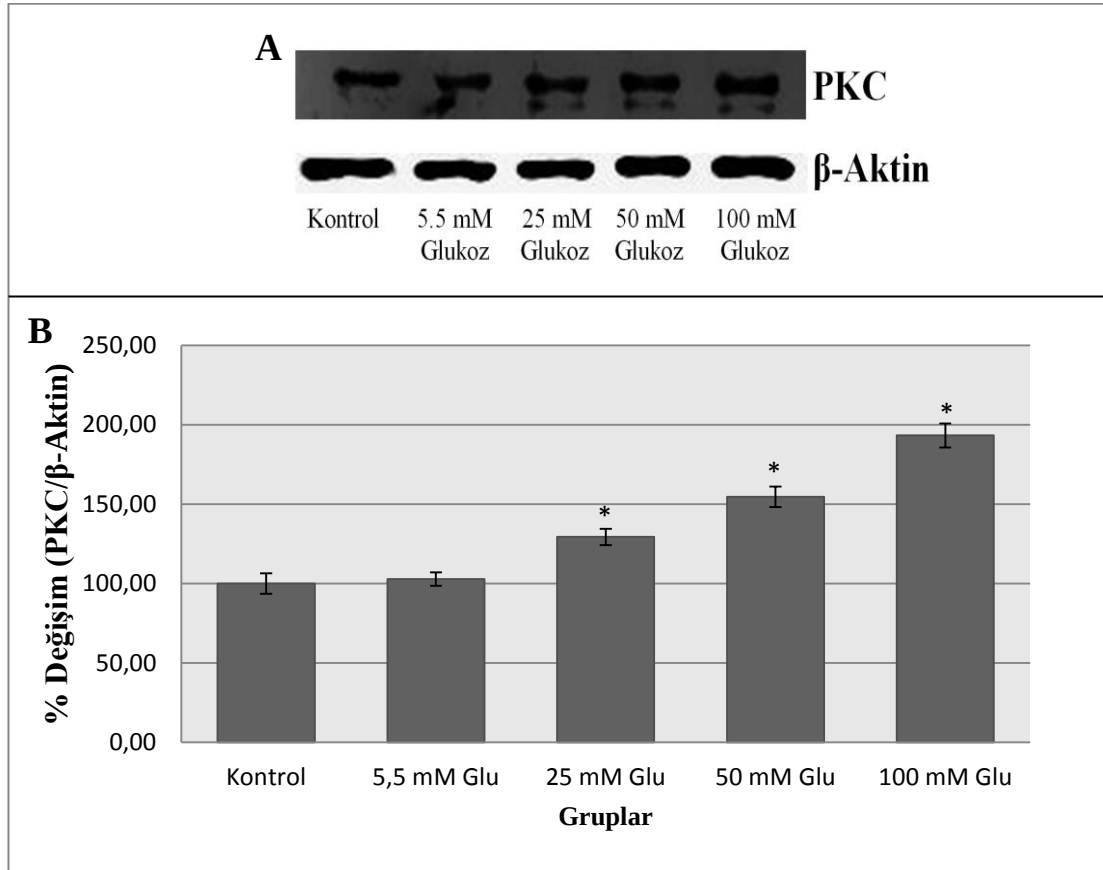


Şekil 3.4. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 , Sorbinil ve PMA'nın AR protein düzeylerine etkisi. **(A)** Western blot bant sonuçları. **(B)** AR'ın gruplara göre yüzde değişimi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir). (*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$).

3.3. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Protein Kinaz C Protein Düzeylerine Etkisi

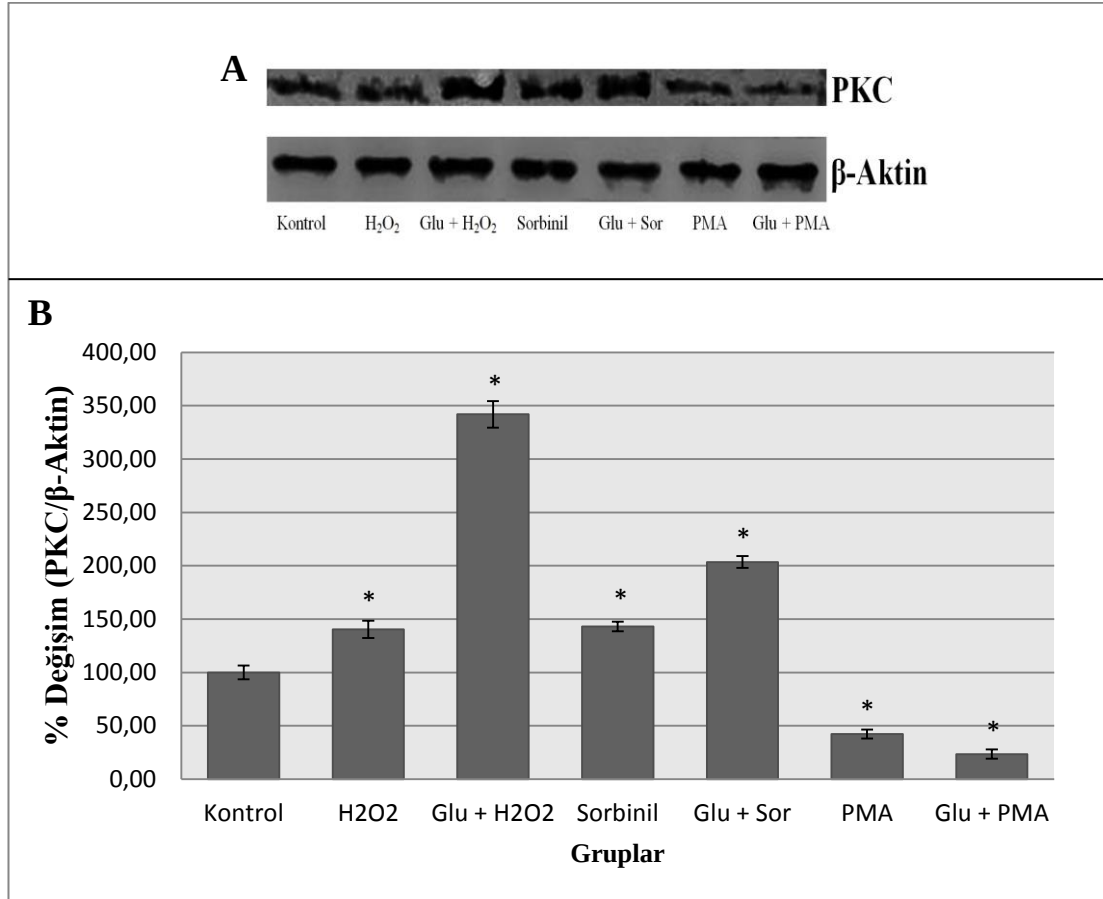
Glukoz, H₂O₂, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 hücrelerinde PKC protein düzeylerine etkisi hücre lizatlarında western blot yapılarak değerlendirildi.

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun PKC protein düzeylerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM (p<0,001), 50 mM (p<0,001) ve 100 mM (p<0,001) konsantrasyonlarının PKC protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. ARPE-19 hücrelerinde glukozun PKC protein düzeylerine etkisi. **(A)** Western blot bant sonuçları. **(B)** PKC'nin gruplara göre yüzde değişimi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir). (*)p<0,001 (Kontrol grubuna göre anlamlı, n=3).

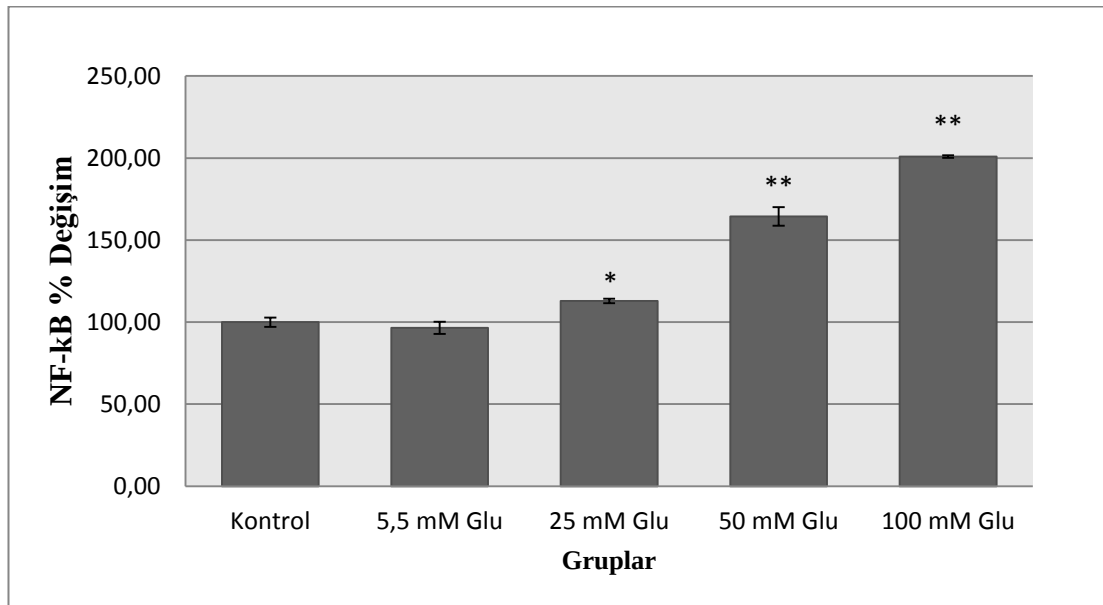
ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 , sorbinil ve glukozun H_2O_2 ve sorbinil ile kombine uygulamasının PKC protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p<0,001$). Buna karşılık PMA ve glukoz + PMA uygulanan gruplarda ise PKC protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı saptandı ($p<0,001$) (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 , Sorbinil ve PMA'nın PKC protein düzeylerine etkisi. **(A)** Western blot bant sonuçları. **(B)** PKC'nin gruplara göre yüzde değişimi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir). (*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$).

3.4. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde NF-kB Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun NF-kB protein düzeyleri üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM ($p<0,05$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) konsantrasyonlarının NF-kB protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.7).

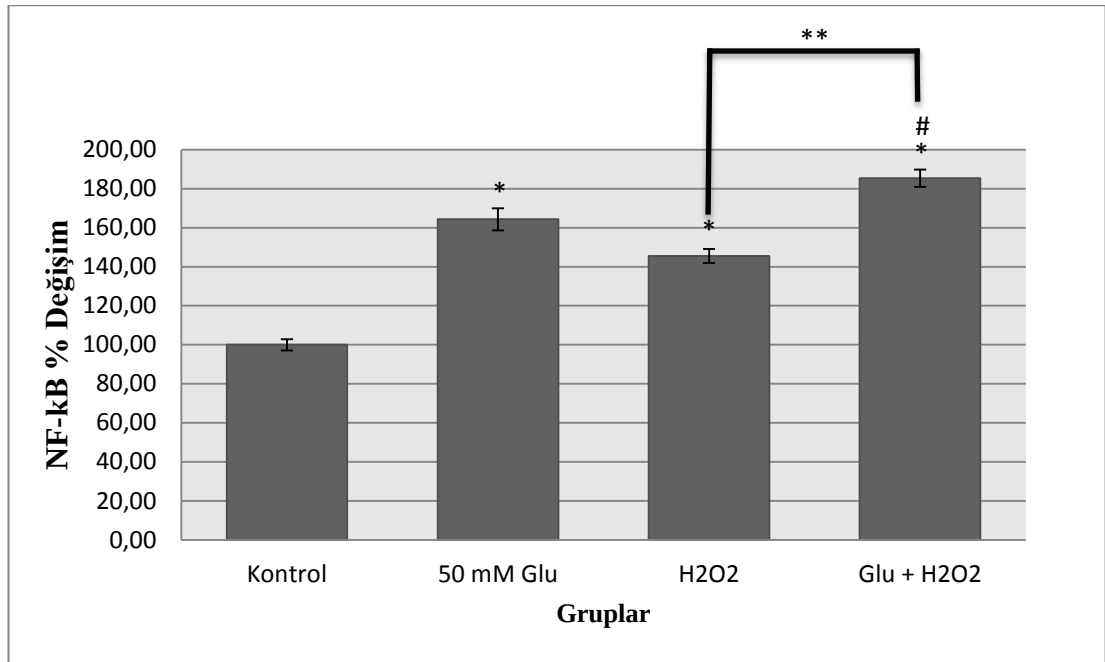


Şekil 3.7. ARPE-19 hücrelerinde glukozun NF-kB protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının NF-kB protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki NF-kB protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,05$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.8).



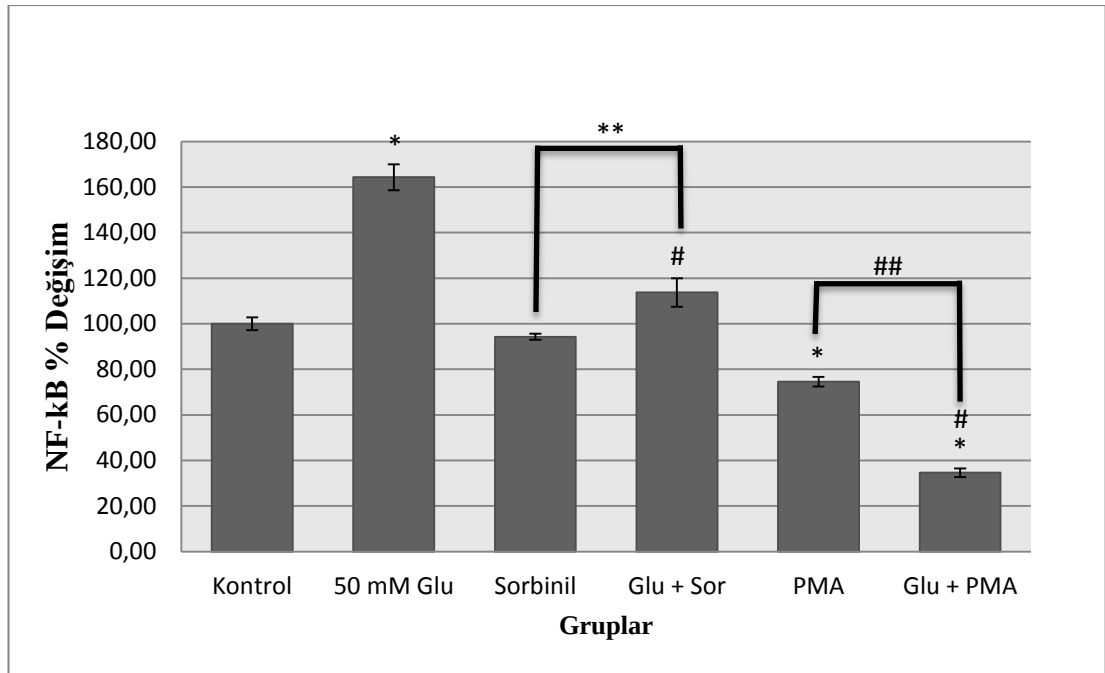
Şekil 3.8. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in NF-kB protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,05$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde sorbinil ve glukoz + sorbinil uygulanan gruplarda NF-kB protein düzeylerinde anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık PMA ve glukoz + PMA uygulanan gruplarda ise NF-kB protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda NF-kB protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Glukoz + Sorbinil grubunda glukozun etkisi ile NF-kB protein düzeylerinin arttığı ($p<0,05$) buna karşılık Glukoz + PMA grubunda ise glukozun etkisi ile NF-kB protein düzeylerinin azaldığı ($p<0,001$) belirlendi (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın NF-kB protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

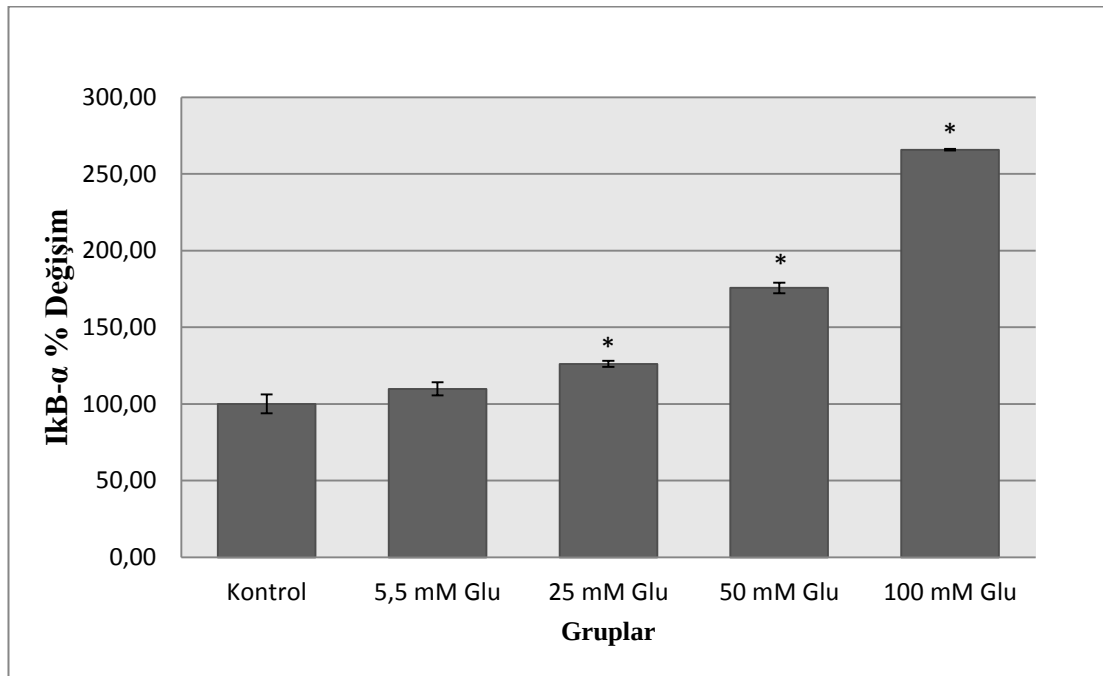
(**) $p<0,05$ (Sorbinil grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(##) $p<0,001$ (PMA grubuna göre anlamlı, $n=3$)

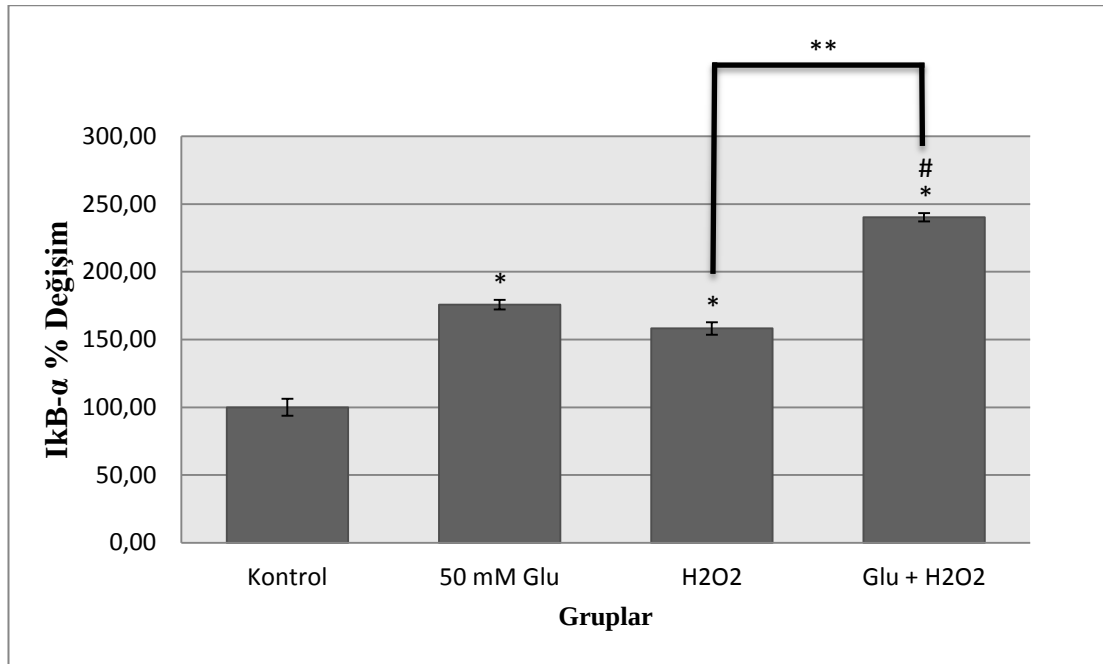
3.5. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde I κ B- α Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun I κ B- α protein düzeyleri üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM ($p<0,001$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) konsantrasyonlarının I κ B- α protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. ARPE-19 hücrelerinde glukozun I κ B- α protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır). (*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının I κ B- α protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki I κ B- α protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.11).



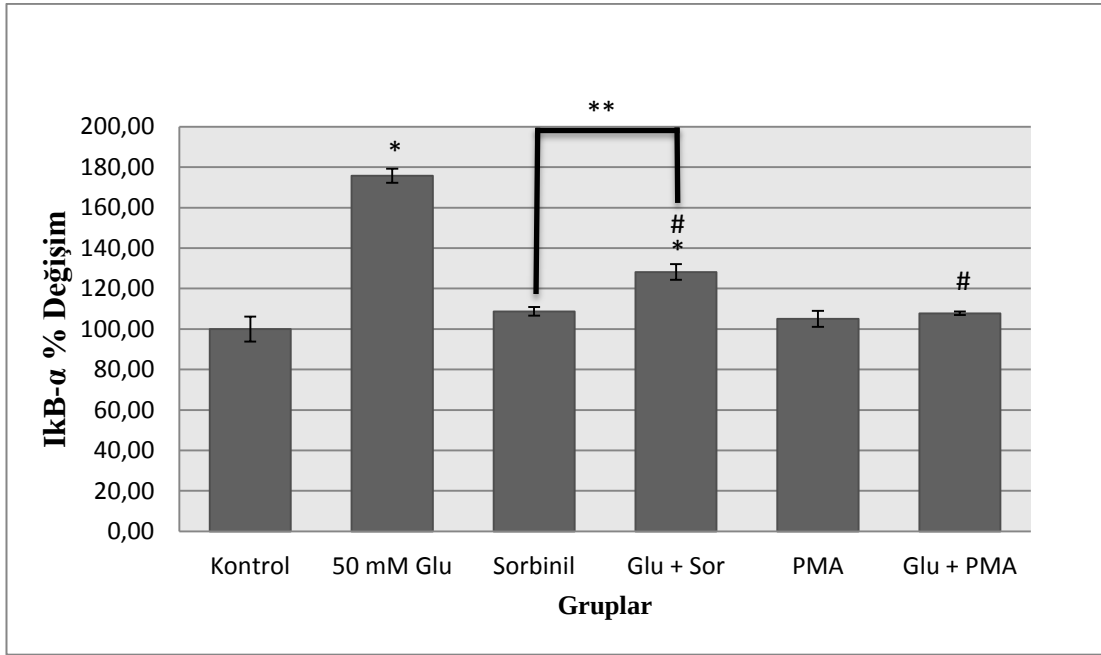
Şekil 3.11. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in I κ B- α protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde sorbinil, PMA ve glukoz + PMA uygulamasının I κ B- α protein düzeylerinde anlamlı herhangi bir değişime neden olmadığı belirlendi. Buna karşılık, glukozun sorbinil ile kombine uygulandığı grupta ise I κ B- α protein düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p<0,001$). Fakat Glukoz + Sorbinil ve Glukoz + PMA gruplarındaki I κ B- α protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + Sorbinil grubunda glukozun etkisi ile I κ B- α protein düzeylerinin arttığı ($p<0,001$) saptandı (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın I κ B- α protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

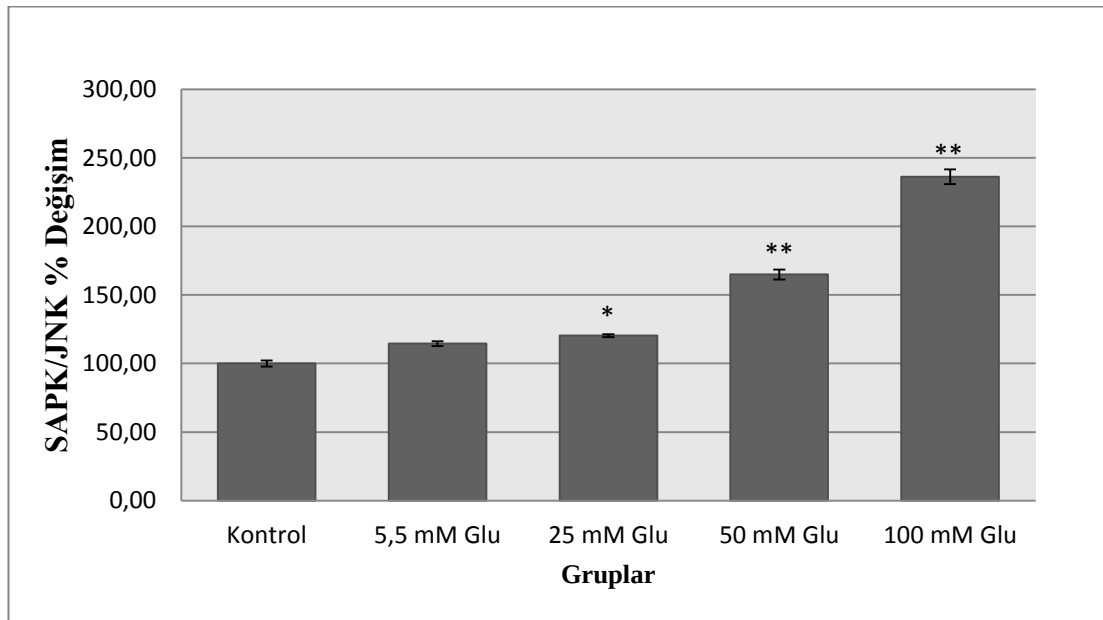
(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Sorbinil grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

3.6. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde SAPK/JNK Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun SAPK/JNK protein düzeyleri üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık 25 mM ($p<0,05$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) glukoz konsantrasyonlarının SAPK/JNK protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.13).

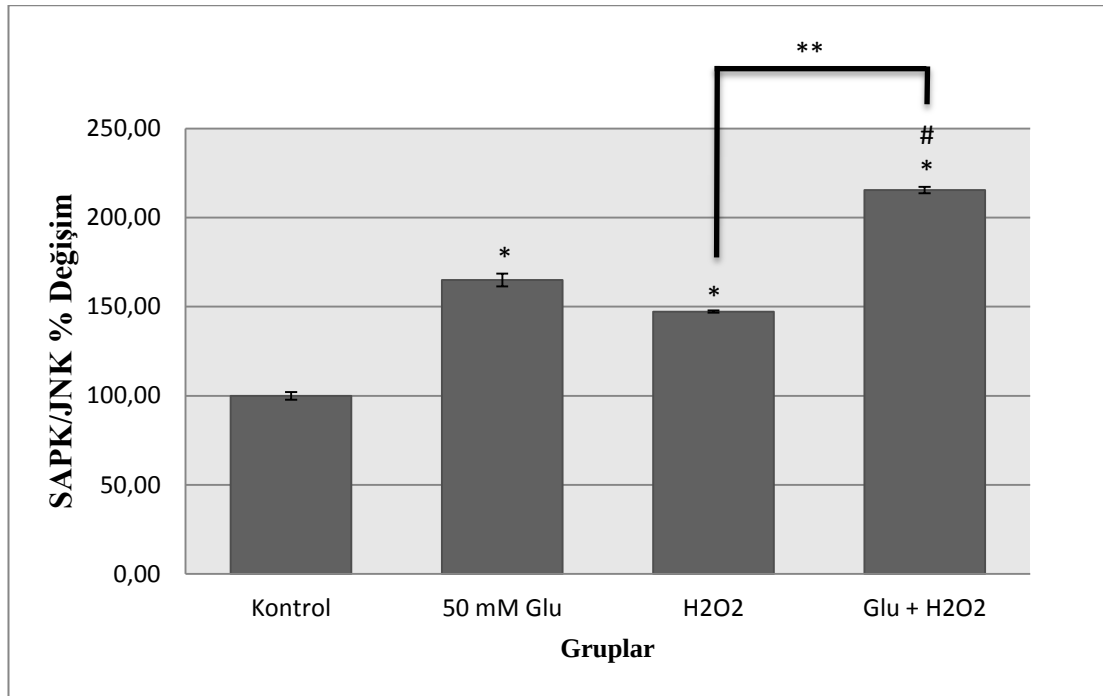


Şekil 3.13. ARPE-19 hücrelerinde glukozun SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının SAPK/JNK protein düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki SAPK/JNK protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.14).



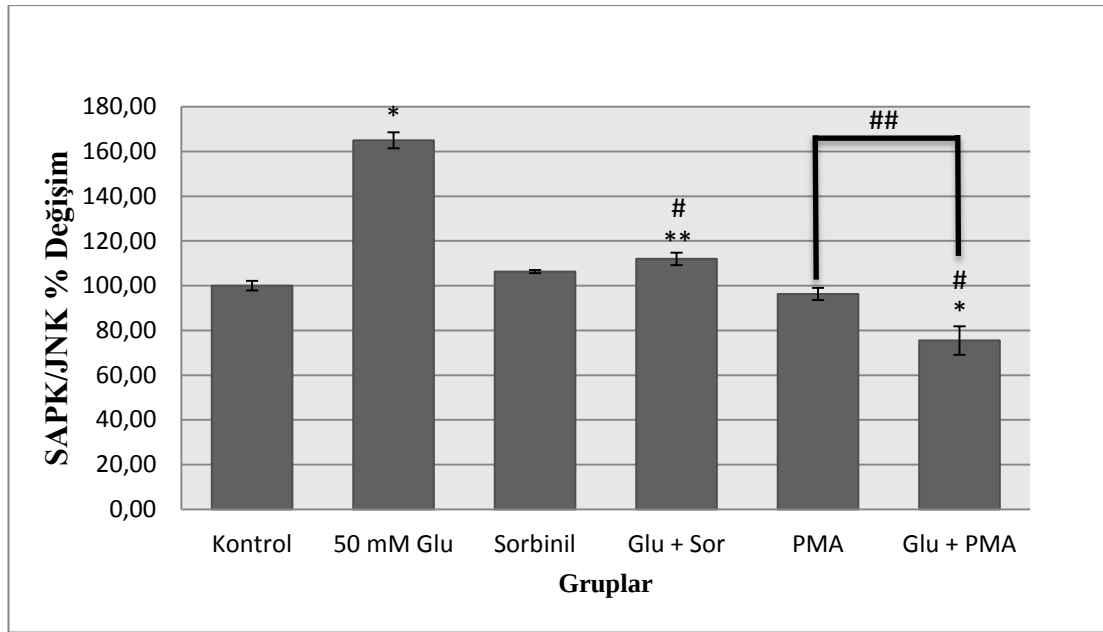
Şekil 3.14. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde sorbinil ve PMA uygulanan gruplarda SAPK/JNK protein düzeylerinde anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı belirlendi. Buna karşılık, glukozun sorbinilin ile kombine uygulandığı grupta SAPK/JNK protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ($p<0,05$), glukozun PMA ile kombine uygulandığı grupta ise SAPK/JNK protein düzeylerinin anlamlı olarak ($p<0,001$) azaldığı saptandı. Bununla beraber, SAPK/JNK protein düzeylerinin hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + PMA grubunda da glukozun etkisi ile SAPK/JNK protein düzeylerinin azaldığı ($p<0,05$) tespit edildi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın SAPK/JNK protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

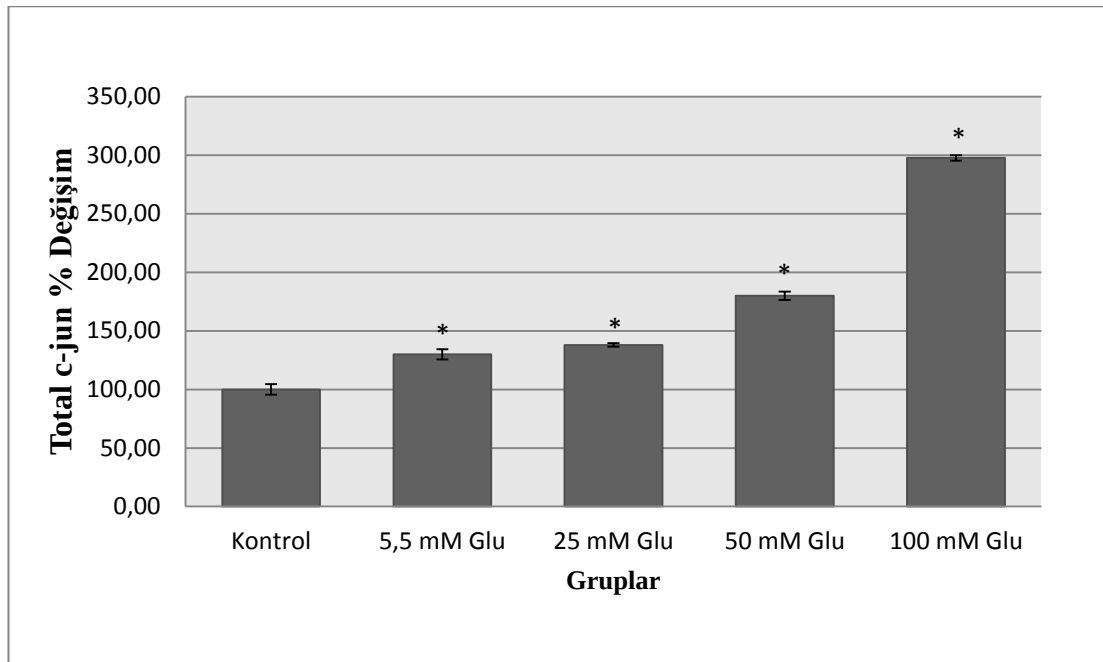
(**) $p<0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(##) $p<0,05$ (PMA grubuna göre anlamlı, $n=3$)

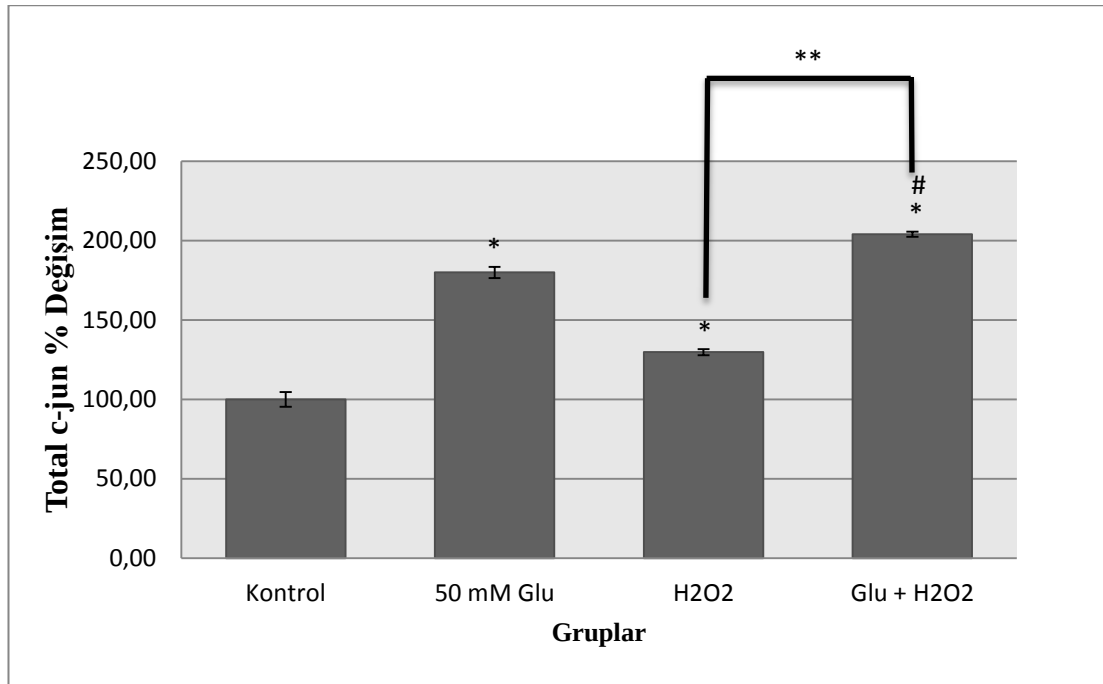
3.7. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Total c-Jun Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM ($p<0,001$), 25 mM ($p<0,001$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) glukoz konsantrasyonlarının Total c-jun protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Total c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır). (*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının Total c-jun protein düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki Total c-jun protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.17).



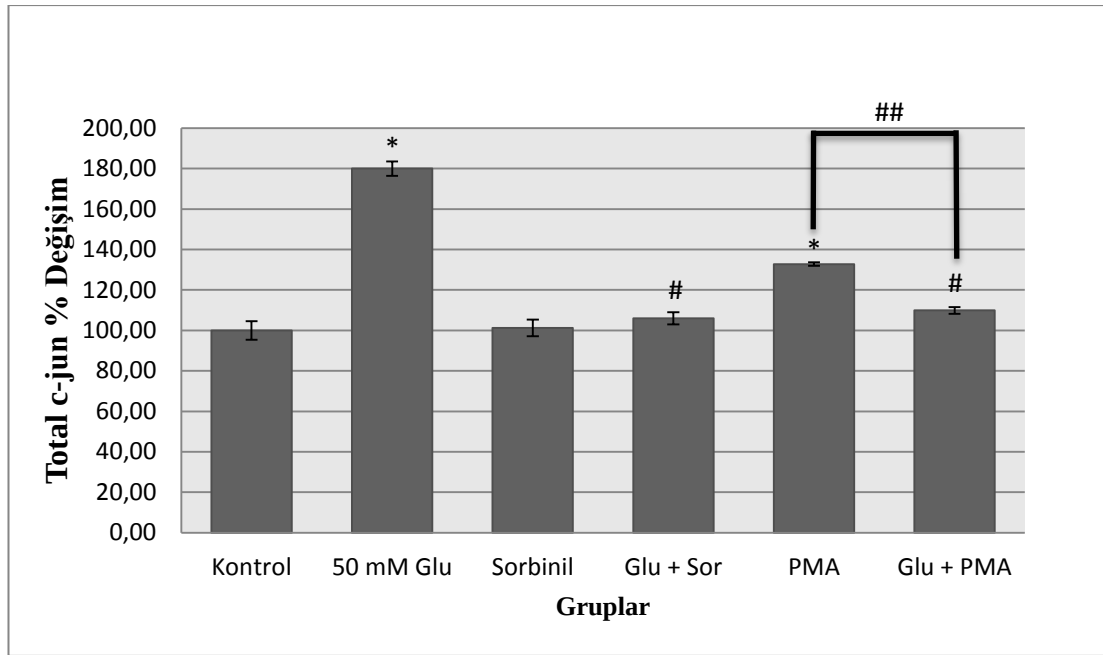
Şekil 3.17. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in Total c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil, Glukoz + Sorbinil ve Glukoz + PMA gruplarında Total c-jun protein düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık sadece PMA'nın uygulandığı grupta ise Total c-jun protein düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, Total c-jun protein düzeylerinin hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + PMA grubunda da glukozun etkisi ile Total c-jun protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) belirlendi (Şekil 3.18).



Şekil 3.18. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Total c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

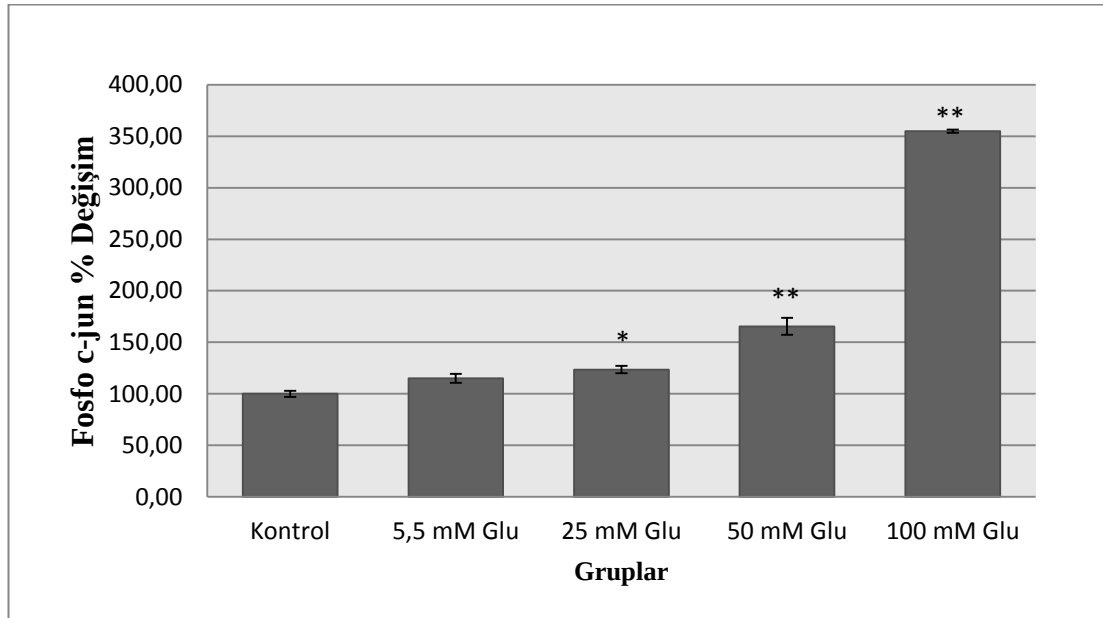
(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(##) $p<0,001$ (PMA grubuna göre anlamlı, $n=3$)

3.8. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Fosfo c-Jun Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun Fosfo c-jun protein düzeyleri üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM ($p<0,05$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) konsantrasyonlarının Fosfo c-jun protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.19).

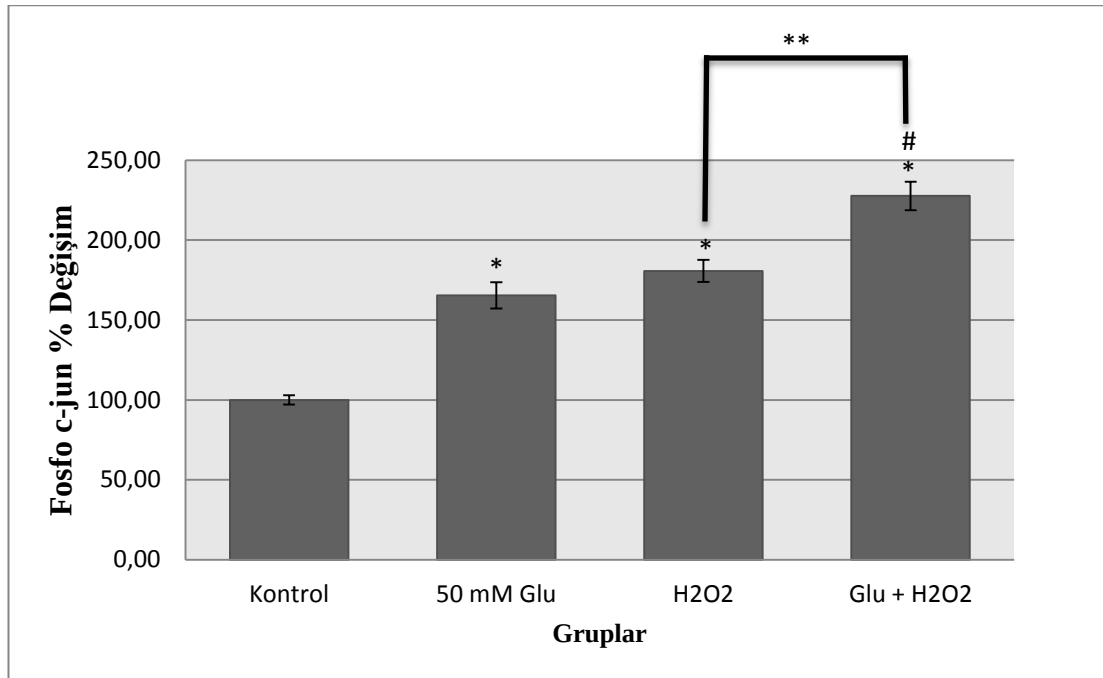


Şekil 3.19. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının Fosfo c-jun protein düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki Total c-jun protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak ($p<0,001$) yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.20).



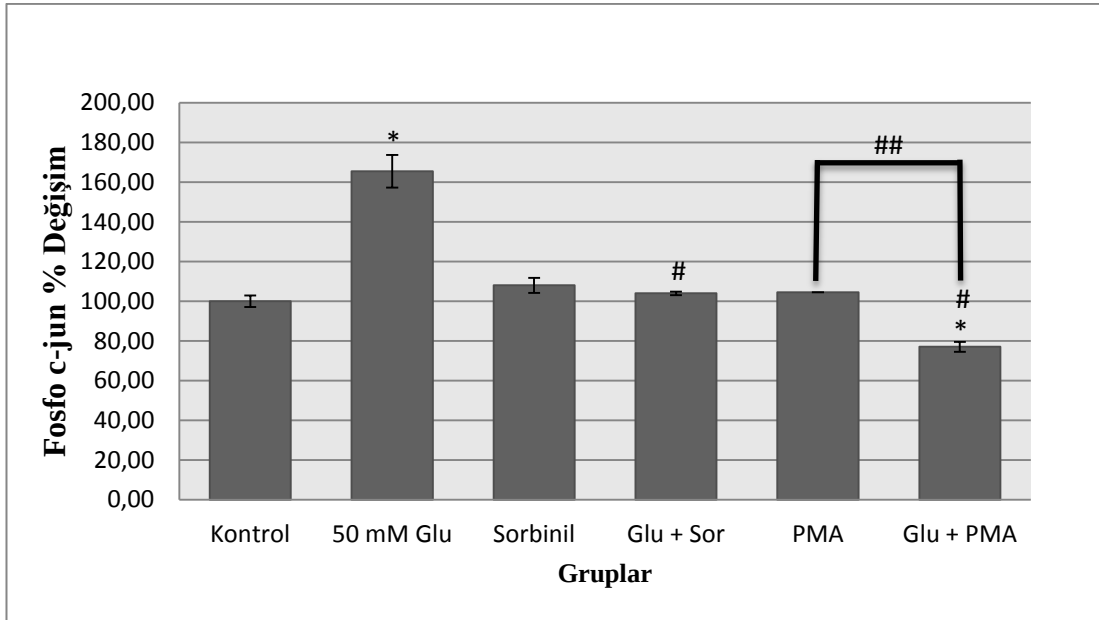
Şekil 3.20. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil, Glukoz + Sorbinil ve PMA gruplarında Fosfo c-jun protein düzeylerinde anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık Glukoz + PMA grubunda ise Fosfo c-jun protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, Fosfo c-jun protein düzeylerinin hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + PMA grubunda glukozun etkisi ile Total c-jun protein düzeylerinin azaldığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 3.21).



Şekil 3.21. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Fosfo c-jun protein düzeylerine etkisi (Kontrol grubu % 100 olarak verilmiştir ve protein düzeltmeleri yapılmıştır).

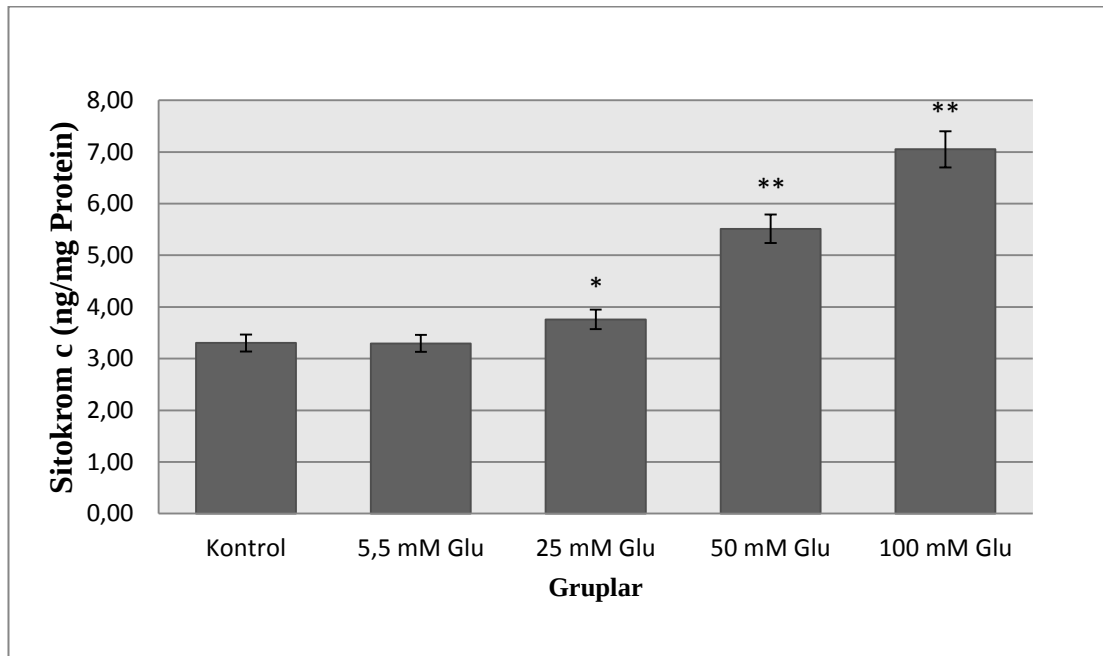
(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(##) $p<0,001$ (PMA grubuna göre anlamlı, $n=3$)

3.9. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde Sitokrom c Protein Düzeylerine Etkisi

ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun Sitokrom c protein düzeyleri üzerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık 25 mM ($p<0,05$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) glukoz konsantrasyonlarının Sitokrom c protein düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.22).

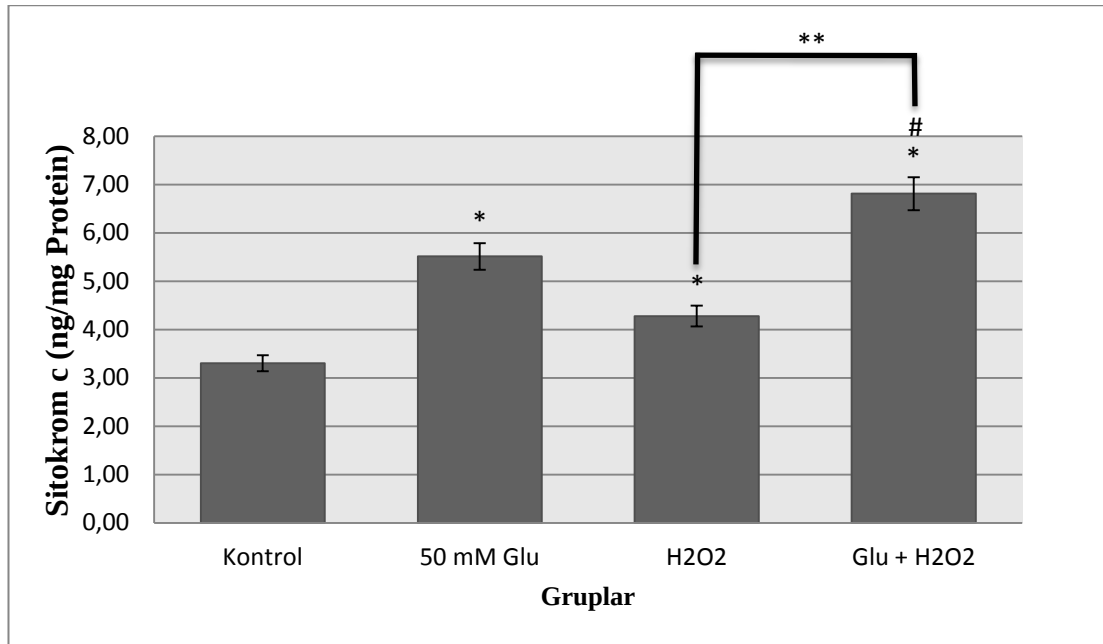


Şekil 3.22. ARPE-19 hücrelerinde glukozun Sitokrom c protein düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,05$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının Sitokrom c protein düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki Sitokrom c protein düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.23).



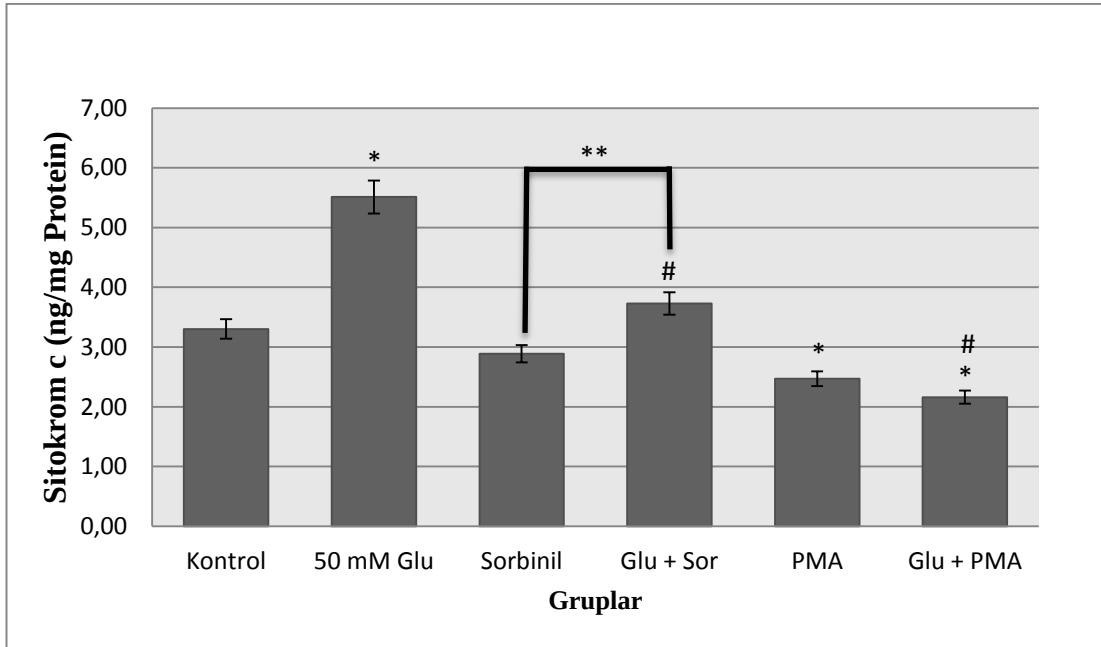
Şekil 3.23. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in Sitokrom c protein düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve Glukoz + Sorbinil uygulanan gruplarda Sitokrom c protein düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık PMA ve Glukoz + PMA gruplarında ise Sitokrom c protein düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda Sitokrom c protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + Sorbinil grubunda glukozun etkisi ile sitokrom c protein düzeylerinin arttığı ($p<0,001$) belirlendi (Şekil 3.24).



Şekil 3.24. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın Sitokrom c protein düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

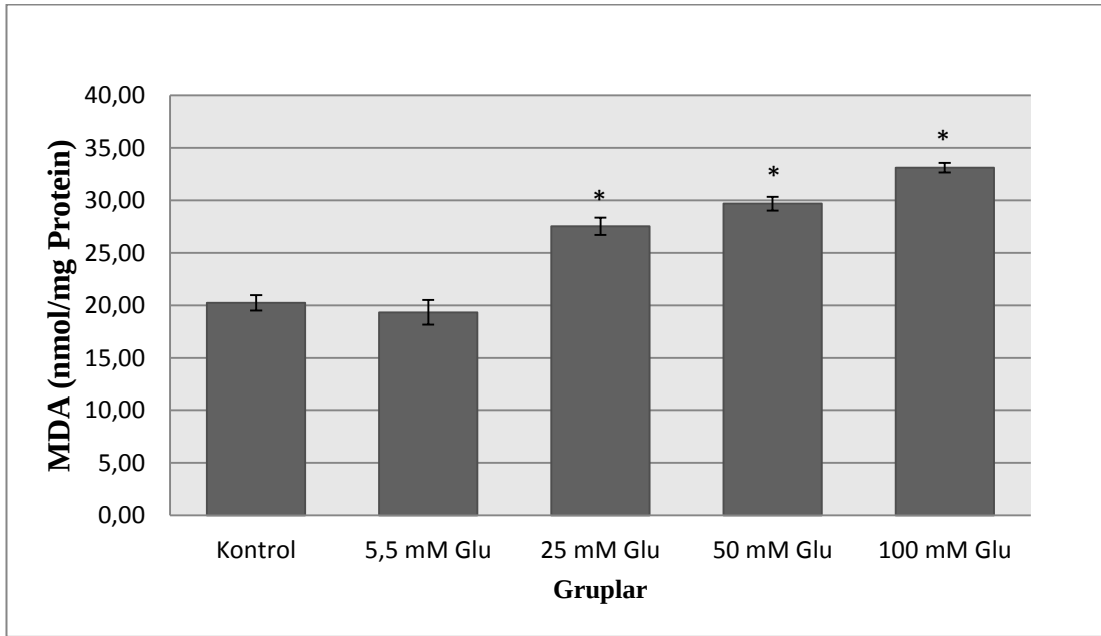
(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Sorbinil grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

3.10. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde MDA Düzeylerine Etkisi

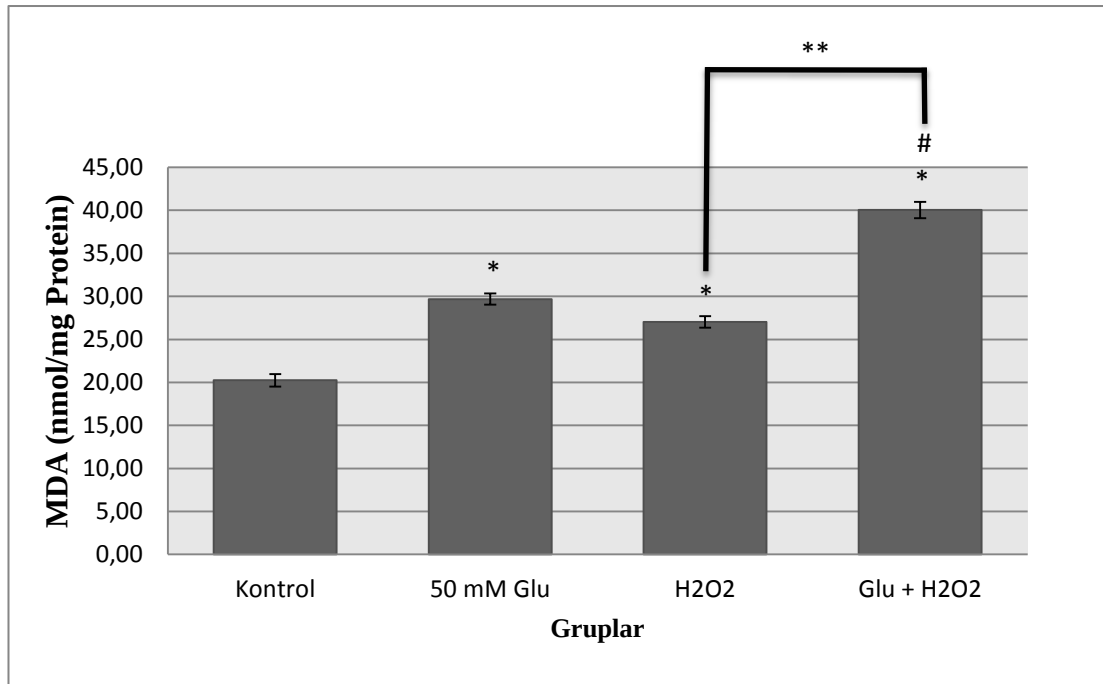
ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun MDA düzeylerinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM ($p<0,001$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) konsantrasyonlarının MDA düzeylerinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.25).



Şekil 3.25. ARPE-19 hücrelerinde glukozun MDA düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının MDA düzeylerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki MDA düzeylerinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.26).



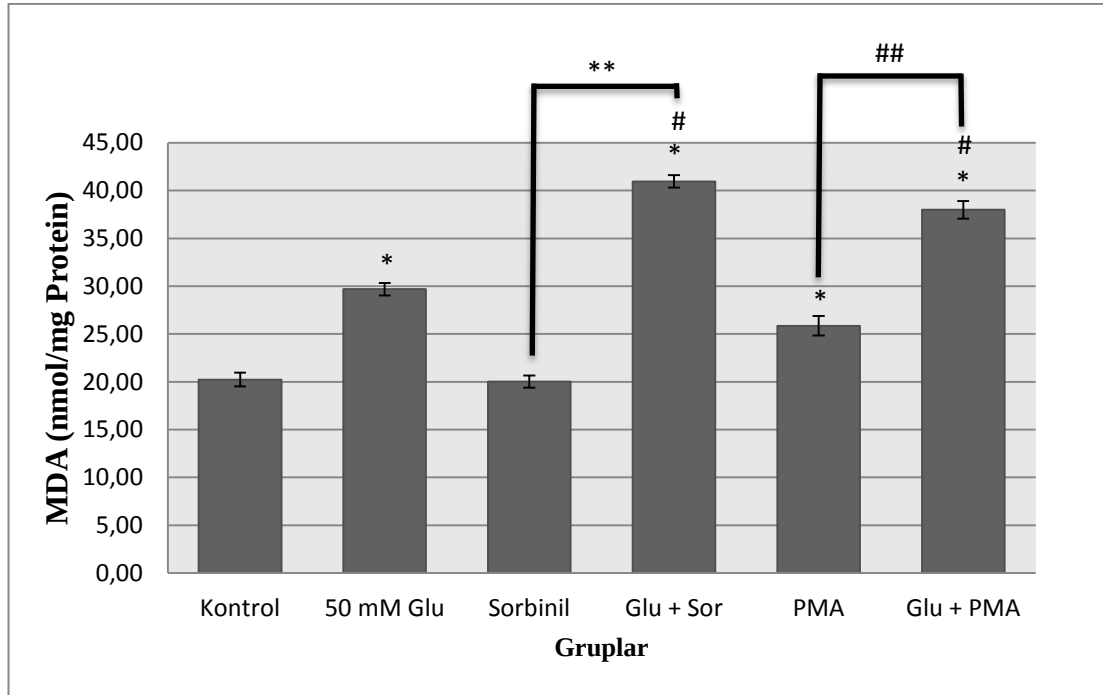
Şekil 3.26. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in MDA düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde sadece sorbinilin uygulandığı grupta kontrol grubuna göre MDA düzeylerinde anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık Glukoz + Sorbinil, PMA ve Glukoz + PMA gruplarında ise MDA düzeylerinin anlamlı olarak arttığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda MDA düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + Sorbinil ($p<0,001$) ve Glukoz + PMA ($p<0,001$) gruplarında da glukozun etkisi ile MDA düzeylerinin arttığı belirlendi (Şekil 3.27).



Şekil 3.27. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın MDA düzeylerine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

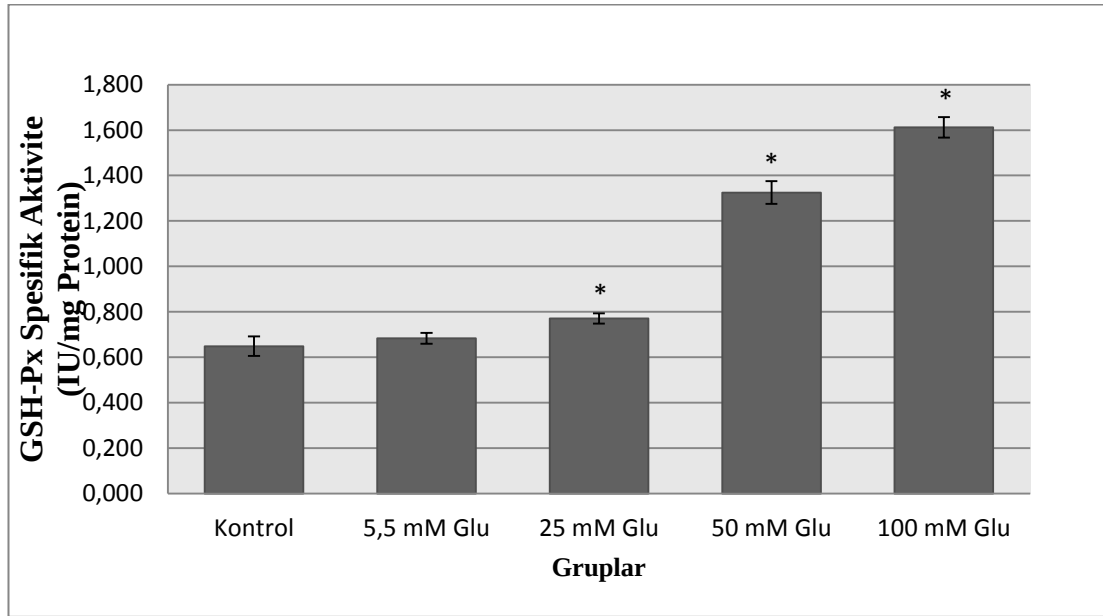
(**) $p<0,001$ (Sorbinil grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(##) $p<0,001$ (PMA grubuna göre anlamlı, $n=3$)

3.11. Glukoz, Hidrojen Peroksit, Sorbinil ve PMA'nın ARPE-19 Hücrelerinde GSH-Px Enzim Aktivitesine Etkisi

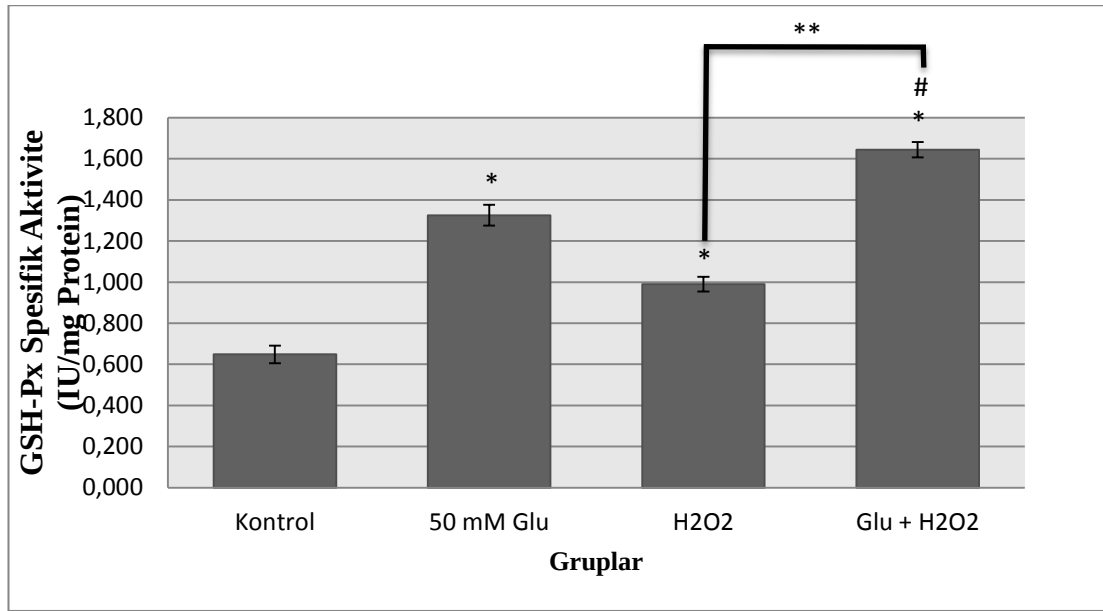
ARPE-19 hücrelerinde 5,5 mM glukoz konsantrasyonunun GSH-Px enzim aktivitesinde anlamlı değişime neden olmadığı, buna karşılık glukozun 25 mM ($p<0,001$), 50 mM ($p<0,001$) ve 100 mM ($p<0,001$) konsantrasyonlarının GSH-Px enzim aktivitesinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. ARPE-19 hücrelerinde glukozun GSH-Px enzim aktivitesine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 ve glukoz + H_2O_2 uygulamasının GSH-Px enzim aktivitesinde anlamlı artışa neden olduğu belirlendi ($p<0,001$). Bununla beraber, Glukoz + H_2O_2 grubundaki GSH-Px enzim aktivitesinin hem H_2O_2 'li gruba göre ($p<0,001$) hem de 50 mM Glukoz grubuna göre ($p<0,001$) daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 3.29).



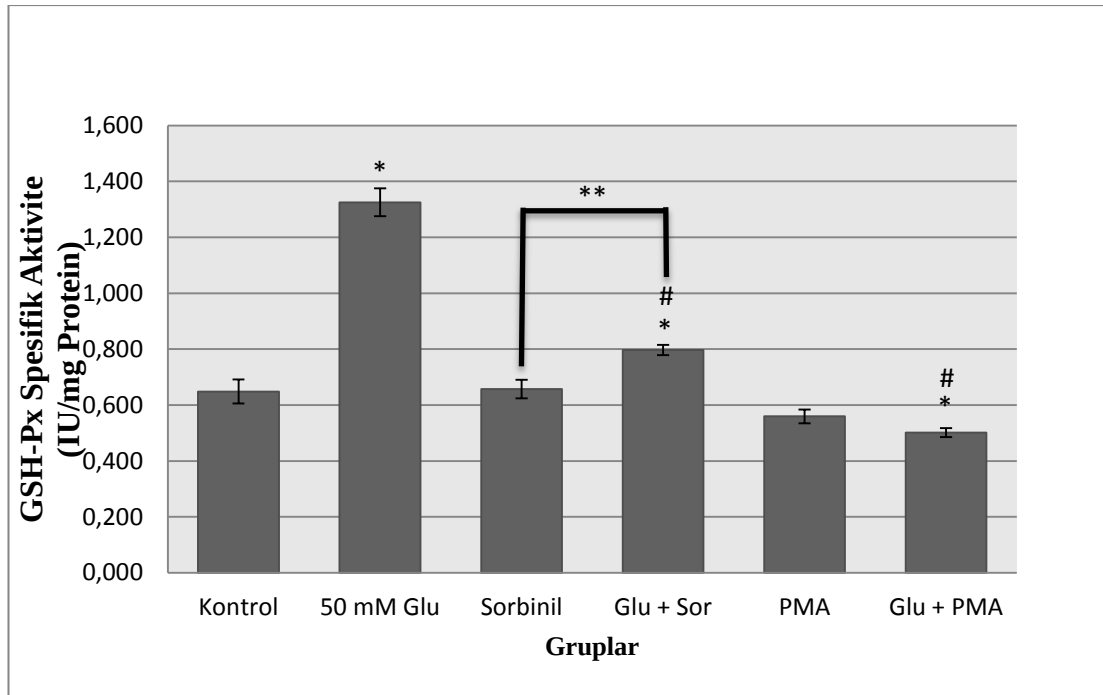
Şekil 3.29. ARPE-19 hücrelerinde H_2O_2 'in GSH-Px enzim aktivitesine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (H_2O_2 grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

ARPE-19 hücrelerinde sorbinil ve PMA uygulanan gruplarda GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı herhangi bir değişimin olmadığı, buna karşılık Glukoz + Sorbinil uygulanan grupta GSH-Px enzim aktivitesinin anlamlı olarak arttığı ve Glukoz + PMA uygulanan grupta ise GSH-Px enzim aktivitesinin anlamlı olarak azaldığı ($p<0,001$) belirlendi. Bununla beraber, hem sorbinilin hem de PMA'nın glukoz ile kombine uygulandığı gruplarda GSH-Px enzim aktivitesinin 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğu saptandı ($p<0,001$). Ayrıca, Glukoz + Sorbinil grubunda da glukozun etkisi ile GSH-Px enzim aktivitesinin arttığı belirlendi ($p<0,001$) (Şekil 3.30).



Şekil 3.30. ARPE-19 hücrelerinde Sorbinil ve PMA'nın GSH-Px enzim aktivitesine etkisi (Protein düzeltmeleri yapılmıştır).

(*) $p<0,001$ (Kontrol grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(**) $p<0,001$ (Sorbinil grubuna göre anlamlı, $n=3$)

(#) $p<0,001$ (50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı, $n=3$)

4. TARTIŞMA

DR, diyabetin en sık görülen kronik komplikasyonlarından bir tanesidir ve tüm diyabetik bireylerin % 90'ından fazlasında yaşamlarının her hangi bir döneminde gelişmektedir (Kempen ve ark., 2004; Roy ve ark., 2004; Hirai ve ark., 2011). Dünyadaki diyabetik bireylerin sayısı düşünüldüğünde retinopatik bireylerin iş ve sağlık sistemi üzerine oluşturduğu yük, bu konun önemine dikkat çekmektedir. Ayrıca, retinopati tedavisinde uygulanabilir yöntemlerin azlığı ve retinopatinin patofizyolojisinin tam olarak aydınlatılamamış olması da bu yükü her geçen gün artırmaktadır.

Diyabette retinada meydana gelen perisit hücre kaybı, bazal membran kalınlaşması, kan-retinal bariyerin ortadan kalkması, vasküler permeabilite artışı, neovaskülarizasyon, retina içerisinde sıvı birikimi, makula ödemi ve görmede yetersizlik sonucu ortaya çıkan retinopatinin oluşumu başlıca 5 temel mekanizma ile açıklanmaktadır (Neely ve ark., 1998; Ohno-Matsui ve ark., 2002; Fong ve ark., 2003; Frank, 2004; Crawford ve ark., 2009). Bu temel mekanizmalar arasında yer alan poliol yolağı ve PKC sinyal yolağı sadece retinopati ile değil diğer kronik komplikasyonlar ile de yakından ilişkilidir (Negi ve ark., 2011a; Kolset ve ark., 2012; Arora ve Singh, 2013).

AR ve PKC'nin inflamasyonla ve dolayısıyla oksidatif stresle olan yakın ilişkisi (Yang ve ark., 1998; Ramana ve ark., 2004a; Ramana ve ark., 2004b; Miller ve ark., 2005) ve diyabetin inflamatuvar hastalıklarla yakından benzerlik göstermesi (Joussen ve ark., 2001; Quan ve ark., 2003) hem PKC hem de AR enziminin diyabette, oksidatif stresde ve normal fizyolojik koşullarda birbirleriyle ve diğer yolaklarla olan ilişkilerinin ve fonksiyonlarının ortaya çıkarılması açısından önem taşımaktadır. Diyabetik süreçte hipergliseminin endotel hücrelerine ve vasküler komponentlere etkisi ve olası mekanizmaları yoğun olarak çalışılmış olmasına rağmen, hipergliseminin retinal hücrelere etkisine dair çalışmalar çok kısıtlıdır. Çalışmamız kapsamında "insan retinal pigment hücre dizisi" olan ARPE-19 hücrelerine farklı

dozlarda glukoz (5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM) ve H₂O₂ uygulanmıştır. Hiperglisemik ve oksidatif koşullarda AR ve PKC ilişkili mekanizmalarının belirlenmesi amacıyla AR inhibitörü sorbinilin ve PKC aktivatörü PMA'nın retina hücrelerinde proliferasyona, apoptozise, hücre içi sinyal yollarına, AR ve PKC'ye olan etkisi değerlendirilmiştir.

Retinal pigment epitel hücreleri nörosensör retina ve koroid tabakası arasında sıralanmış bir hücre topluluğudur. Özellikle fotoreseptörlere besinlerin ulaştırılması ve metabolik destekte görev almaktadır. Hipoksi ve hiperglisemi durumlarında konneksin ekspresyonuna, kemokin üretimine, büyüme faktörlerinin sentezlenmesine ve salınmasına neden olarak DR'nin başlamasına ve ilerlemesine önemli katkılar sağlamaktadır (Nakamura ve ark., 1992; Bian ve ark., 1996; Sone ve ark., 1996; Mousa ve ark., 1999; Seko ve ark., 1999; Malfait ve ark., 2001).

Poliol yolağı ve AR enzimi kronik komplikasyonların etiyolojisinde önemli bir yer tutmaktadır. Hiperglisemik şartlar altında polioliol yolağının aktivitesinin artması ve glukozun % 30'unun (Gonzalez ve ark., 1984; Yabe-Nishimura, 1998) bu yolak ile metabolize olması diyabette istenmeyen zararlı etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, AR enziminin fizyolojik fonksiyonu üzerine olan tartışmalar ise günümüzde halen devam etmektedir. Bu tartışmalar, AR enzimin farklı dokularda çeşitli fonksiyonel özellikler göstermesinden kaynaklanmaktadır. Örneğin; AR enzimi testislerde spermlerin majör enerji kaynağı olan fruktozun üretilmesinden sorumlu iken (Kobayashi ve ark., 2002; Frenette ve ark., 2004), böbreklerde bir ozmolit olan sorbitolün üretilmesinden ve osmoregülasyonun korunmasından sorumludur (Garcia-Perez ve Burg, 1991). Bununla beraber, AR enziminin lipid aldehitleri ve bunların GSH konjugatlarını glukozdan daha etkin bir şekilde metabolize etmesi (Srivastava ve ark., 1999; Ramana ve ark., 2000; Vander Jagt ve ark., 2001; Srivastava ve ark., 2005) ve gen promotor bölgesinde NF-kB ve AP-1 (Iwata ve ark., 1999; Srivastava ve ark., 2005) gibi redoks transkripsiyon faktörleri için bağlama bölgeleri bulunması, enzimin antioksidan savunmada önemli rolleri olduğu yönünde görüşlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Çalışmamızda farklı dozlarda glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinin canlılıklarının 50 mM Glukoz ($p<0,05$) (subtoksik) ve 100 mM Glukoz ($p<0,001$) (toksik) konsantrasyonlarında değiştiğini belirledik (Şekil 3.1). Bu konsantrasyon değerleri klasik diyabet tanısı için belirlenen konsantrasyonların üzerinde değerlerdir. Bu durum ARPE-19 hücrelerinin hiperglisemiye karşı dayanaklı olduklarını ve hiperglisemin neden olduğu etkilerin gözlenmesi için yüksek glukoz konsantrasyonlarına çıkılması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde AR protein düzeylerinin artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak arttığını belirledik (Şekil 3.3). Glukoza bağlı olarak AR enziminde meydana gelen bu artış, daha önce yapılmış olan benzer çalışmalar ile uyumlu sonuçlar ortaya koymaktadır (Chung ve Chung, 2005; Srivastava ve ark., 2005). Fakat AR enziminde meydana gelen bu artışın, glukozun neden olduğu oksidatif stresle yakından ilişkili olabileceği birçok araştırmacı tarafından vurgulanmaktadır (Chung ve Chung, 2005; Srivastava ve ark., 2005; Lorenzi, 2007; Obrosova ve ark., 2010). Hiperglisemi ve oksidatif stres arasındaki bu ilişkinin ortaya çıkarılması için 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde MDA miktar ve GSH-Px enzim aktivite tayini gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, ARPE-19 hücrelerinde glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak oksidatif stresin de arttığını göstermektedir (Şekil 3.25 ve Şekil 3.28). Glukoza bağlı olarak oksidatif streste meydana gelen bu artış, birçok araştırmacı tarafından diyabetik komplikasyonların merkezi mekanizması olarak görülmektedir.

5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen AR protein düzeylerindeki artışın, oksidatif stresle olan ilişkisini belirlemek için glukozdan bağımsız olarak oluşturduğumuz ve sadece H_2O_2 içeren besiyeri içerisinde kültüre ettiğimiz ARPE-19 hücrelerinde, H_2O_2 'in etkisiyle hücre içi oksidatif stresin arttığını belirledik (Şekil 3.26 ve Şekil 3.29). Bu grupta yapmış olduğumuz western blot değerlendirmelerinde ise, ARPE-19 hücrelerinde AR protein düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını saptadık (Şekil 3.4). Ayrıca, oluşturduğumuz Glukoz + H_2O_2 grubunda, glukoz ve H_2O_2 'in etkisiyle hücre

Hiperglisemi (Pieper ve Riaz-ul-haq, 1997) ve ROS (Nishikawa ve ark., 2000a) NF-kB ve AP-1'in nükleusa transferine ve farklı hedef genlerin transkripsiyonuna neden olarak diyabetik komplikasyonların gelişimine katkı sağlamaktadır. AR gen promotor bölgesinde bu iki transkripsiyon faktörü için bağlama bölgeleri bulunması, oksidatif stres ve hiperglisemi şartlarında meydana gelen ARPE-19 AR protein düzeylerindeki artışın NF-kB ve AP-1 ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu durumu belirlemek için 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde ilk önce NF-kB ve I κ B- α protein düzeylerini ELISA yöntemi ile belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlar, artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak ARPE-19 hücrelerinde NF-kB ve NF-kB'nin inhibitörü olan I κ B- α 'nın protein düzeylerinin arttığını göstermektedir (Şekil 3.7 ve Şekil 3.10). Artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak NF-kB'de meydana gelen bu artışın ARPE-19 AR protein düzeylerini doğrudan etkilediğini düşünmekteyiz. Ayrıca, oksidatif stres durumunun ARPE-19 hücrelerindeki etkilerini belirlemek için oluşturduğumuz H₂O₂'li ve Glukoz + H₂O₂'li gruplarımızda da hiperglisemiye benzer şekilde NF-kB ve I κ B- α protein düzeylerinin arttığını saptadık (Şekil 3.8 ve Şekil 3.11). Birbirini destekler nitelikteki bu sonuçlar, hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında ARPE-19 AR protein düzeylerinde meydana gelen artışın NF-kB ile yakından ilişkili olabileceğini göstermektedir (Şekil 4.1).

Diğer bir önemli transkripsiyon faktörü olan AP-1'in 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerindeki değişimlerini belirlemek için Total c-jun ve Fosfo c-jun protein düzeylerini ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Bilindiği gibi AP-1; fos ve jun altbirimlerinde meydana gelen dimerik bir proteindir ve jun alt biriminin fosforillenmesi AP-1'in aktivasyonuna neden olarak hedef genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır (Karin ve ark., 1997). Elde ettiğimiz sonuçlar, artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak ARPE-19 hücrelerinde Total c-jun ve Fosfo c-jun protein düzeylerinin arttığını göstermektedir (Şekil 3.16 ve Şekil 3.19). Hiperglisemik şartlarda ARPE-19 hücrelerinde Total c-jun ve Fosfo c-jun protein düzeylerinde meydana gelen bu artışın hücre içi AR protein düzeylerinin artışına neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, oksidatif stres durumunun ARPE-19 hücrelerindeki etkilerini belirlemek için oluşturduğumuz H₂O₂'li ve Glukoz +

H₂O₂'li gruplarımızda da hiperglisemiye benzer şekilde Total c-jun ve Fosfo c-jun protein düzeylerinin arttığını saptadık (Şekil 3.17 ve Şekil 3.20). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında ARPE-19 AR protein düzeylerinde meydana gelen artışın AP-1 ile de ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.1).

Hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında NF-kB ve AP-1 protein düzeylerinde meydana gelen bu artışın hücre içi çok önemli iki sinyal yolağı ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu yollar; NF-kB ile ilişkili olan PKC sinyal yolağı ve AP-1 ile ilişkili olan JNK sinyal yolağıdır. PKC sinyal yolağı hücre içerisinde ve dışarısında birçok önemli biyolojik olayı kontrol eden bir yoldur. Diyabette artan DAG seviyelerine bağlı olarak PKC aktivitesinde ve protein düzeylerinde meydana gelen artış, hücre içi NF-kB ve MAPK gibi önemli sinyal yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Özellikle retinada endotel ve perisit hücrelerinde meydana gelen PKC aktivasyonu DR patogenezinde önemli roller oynamaktadır (Way ve ark., 2001; Khan ve Chakrabarti, 2007). Hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında NF-kB ve AP-1 protein düzeylerinde meydana gelen artışın PKC ile olan ilişkisini belirlemek için ilk önce 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde PKC protein düzeylerini western blot yöntemi ile değerlendirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, ARPE-19 hücrelerinde artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak PKC protein düzeylerinin de arttığını göstermektedir (Şekil 3.5). PKC'de meydana gelen bu artışın oksidatif stres ile yakından ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Oksidatif stres durumunda özellikle PKC'nin δ izoformunun ekspresyonu artmakta ve aktif hale geçerek NF-kB aktivasyonuna neden olmaktadır (Storz ve ark., 2004; Young ve ark., 2005). Bununla beraber, diyabette yükselen ROS GAPDH inhibisyonuna neden olarak DAG'ün prekürsörü olan trioz fosfat konsantrasyonunun artmasına ve PKC aktivasyonuna neden olmaktadır (Craven ve ark., 1990; Inoguchi ve ark., 1992; Shiba ve ark., 1993; Scivittaro ve ark., 2000). Ayrıca, AR enzim aktivitesine bağlı olarak artan DAG seviyelerinin de PKC aktivasyonuna neden olduğu yapılan çalışmalar ile daha önce gösterilmiştir (Brownlee, 2001; Ramana ve ark., 2006b; Rolo ve Palmeira, 2006). H₂O₂'li ve Glukoz + H₂O₂'li gruplardan elde ettiğimiz sonuçlar ise, PKC protein düzeylerinin

bu gruplarda da hiperglisemiye benzer şekilde arttığını göstermektedir (Şekil 3.6). Elde ettiğimiz tüm bu sonuçlar hem hiperglisemi hem de oksidatif stres durumlarında ARPE-19 PKC protein düzeylerinin arttığını göstermekte ve bu konu üzerine daha önce yapılmış olan diğer çalışmalar ile benzer sonuçlar ortaya koymaktadır (Koya ve King, 1998; Konishi ve ark., 1997; Rolo ve Palmeria, 2006) (Şekil 4.1).

Daha önceki yapılan çalışmalarda ARPE-19 hücrelerinde PKC'nin α , $\beta 1$, $\beta 2$, δ , ϵ ve ζ izoformlarının eksprese olduğu bildirilmiştir (Wood ve Osborne, 1997; Wood ve Osborne, 1998; Moriarty ve ark., 2000). Yapılan bir diğer çalışmada ise bu izoformlar arasında yer alan PKC δ 'nın baskın izoform olduğu ve retinopati gelişiminde önemli roller oynadığı gösterilmiştir (Young ve ark., 2005). Çalışmalarımızda ARPE-19 PKC izoformlarının tamamını yansıtan western blot sonuçlarımız izoform spesifik değildir. ARPE-19 hücrelerinde yaratılan hiperglisemik ve oksidatif stres koşullarının PKC izoformlarının ekspresyonları ve aktiviteleri üzerine olan etkisi ve bu izoformların AR ile olan etkileşimi daha sonra araştırılacak konular arasında yer almaktadır.

Hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında ARPE-19 PKC protein düzeylerinde meydana gelen artışın NF-kB'nin dışında MAPK sinyal yolağı ile de ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Daha önceki yapılan çalışmalarda yüksek glukoz maruz bırakılan endotel hücrelerinde PKC inhibisyonunun MAPK aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Awazu ve ark., 1999; Tomlinson, 1999; Xin ve ark., 2004). MAPK sinyal yolağının JNK ailesi stres ve apoptotik sinyallerle yakından ilişkili bir ailedir (Lewis ve ark., 1998). Bu ailenin, ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen AP-1 protein düzeylerindeki artışın majör sorumlusu olduğunu düşünmekteyiz. Bu durumu belirlemek için 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde SAPK/JNK protein düzeylerini ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak SAPK/JNK protein düzeylerinin de arttığını göstermektedir (Şekil 3.13). Ayrıca, H₂O₂'li ve Glukoz + H₂O₂'li gruplarımızda da SAPK/JNK protein düzeylerinin hiperglisemik şartlara benzer şekilde arttığını saptadık (Şekil 3.14). ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen bu artışın c-jun'un fosforillenmesine neden olarak AP-1'in

aktivasyonuna yol açtığını ve böylelikle AR protein düzeylerinde artışa neden olduğunu düşünmekteyiz.

ARPE-19 hücrelerinde hipergliseminin ve oksidatif stresin apoptoz üzerine olan etkilerini belirlemek için 5,5 mM, 25 mM, 50 mM ve 100 mM glukoz uyguladığımız ARPE-19 hücrelerinde sitokrom c protein düzeylerini ELISA yöntemi ile değerlendirdik. Bilindiği gibi sitokrom c'nin mitokondri yapısının bozulması sonucu sitozole salınması apoptozda geri dönülmez bir aşamaya gelindiğinin işaretidir. Elde ettiğimiz sonuçlar, artan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak ARPE-19 hücrelerinde sitokrom c protein düzeylerinin de arttığını göstermektedir (Şekil 3.22). Ayrıca, H_2O_2 'li ve Glukoz + H_2O_2 'li gruplarımızda da sitokrom c protein düzeylerinin hiperglisemik şartlara benzer bir şekilde arttığını ve bu sonuçların da daha önce Choudhary ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışma ile de benzerlikler gösterdiğini belirledik (Choudhary ve ark., 2005) (Şekil 3.23). Hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen apoptozun merkezi yolağında NF-kB ve/veya PKC olduğunu düşünmekteyiz. Çünkü, diyabetin neden olduğu NF-kB aktivasyonu retina ve kapillerde proapoptotik olarak ele alınmakta (Podesta ve ark., 2000; Kowluru ve ark., 2003) ve PKC NF-kB aktivasyonuna neden olarak apoptozu tetiklemektedir. Bununla beraber, sitokrom c düzeylerinde ve dolayısıyla apoptozda meydana gelen bu artışın PKC ile ilişkili farklı bir mekanizma ile de bağlantılı olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır. PKC izoformlarının mitokondri içerisinde yer aldığı uzun zamandır bilinmekle beraber, bu izoformların mitokondri içerisindeki fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (Noland ve Dimino, 1986; Wang ve ark., 2006). Yapılan çalışmalarda oksidatif stres durumunda mitokondride PKC δ akümüülasyonunun sitokrom c'nin salınmasına neden olan mitokondrial membran potansiyelinin kaybedilmesine yol açtığı ve farklı hücre tiplerinde apoptoza neden olduğu bulunmuştur (Li ve ark., 1998; Li ve ark., 1999; Majumder ve ark., 2000; Majumder ve ark., 2001). Bu bağlamda, ARPE-19 hücrelerinde hiperglisemik ve oksidatif stres durumlarında meydana gelen sitokrom c artışının bu yolak ile de ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 4.1).

Ayrıca, diyabetin yarattığı endoplazmik retikulum (ER) stresi PKC δ 'nın ER yüzeyinde yer alan Abl I ile kompleks yapmasına neden olmaktadır. PKC δ -Abl I kompleksi ise JNK bağımlı yolları aktive etmekte ve mitokondriden sitokrom c salınımına neden olmaktadır (Vannuvel ve ark., 2013). Bu yolak diyabette mitokondriyel stres ve ER stresi arasındaki ilişkinin hücrenin kaderinde önemli bir yer tutması bakımından önemlidir. PKC'nin ve dolayısıyla AR'ın bu yolda önemli görevler üstlenmesi ise bu iki yolağının önemine dikkat çekmektedir.

2006 yılında Ramana ve arkadaşları tarafından VSCM ve makrofaj hücrelerinde yapılan bir çalışmada, oksidatif stresin neden olduğu NF-kB aktivasyonunda AR'ın çok önemli bir yer tuttuğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre; AR enziminin bir substrat'ı olan GS-HNE'nin, enzimin aktivitesi ile GS-DHN'ye dönüşmesi ve GS-DHN'nin de PKC aktivasyonuna neden olarak NF-kB yolunu aktive ettiği bulunmuştur (Ramana ve ark., 2006a). 2008 yılında Nambu ve arkadaşları tarafından rat lens epitel hücrelerinde yapılan bir başka çalışmada ise, AR inhibisyonunun NF-kB bağımlı apoptozu önlediği gösterilmiştir (Nambu ve ark., 2008). Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerinde AR enzimin sorbinil ile inhibisyonunun, PKC ve hücre içi yollara olan etkilerini belirlemek için oluşturduğumuz Sorbinil ve Glukoz + Sorbinil gruplarında AR ve PKC protein düzeylerini western blot yöntemi ile değerlendirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, sorbinil uyguladığımız grupta AR protein düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak değişmediğini, Glukoz + Sorbinil uyguladığımız grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığını göstermektedir (Şekil 3.4). Sorbinil uyguladığımız grupta AR protein düzeylerinde kontrol grubuna göre değişim olmaması, muhtemelen hücre içi oksidatif stres düzeylerinin kontrol grubuna göre değişmemesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 3.27 ve Şekil 3.30). Glukoz + Sorbinil uyguladığımız grupta ise AR protein düzeylerinde meydana gelen artışın sebebinin yüksek glukoz konsantrasyonu olduğunu düşünmekteyiz.

Sorbinil ve Glukoz + Sorbinil gruplarımızdan elde ettiğimiz önemli sonuçlardan iki tanesini, MDA miktar ve GSH-Px enzim aktivite sonuçları oluşturmaktadır. ARPE-19 hücrelerinde sadece sorbinil uyguladığımız grupta MDA miktarında ve GSH-Px

enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı herhangi bir değişim belirlenmezken, glukoz + sorbinil uyguladığımız grupta MDA miktarında ve GSH-Px enzim aktivitesinde anlamlı artış belirlenmiştir (Şekil 3.27 ve Şekil 3.30). Bununla beraber, glukoz + sorbinil uyguladığımız grupta meydana gelen MDA artışının, 50 mM Glukoz grubundan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Glukoz + Sorbinil grubunda 50 mM Glukoz grubuna göre daha fazla MDA oluşmasının nedeninin, AR enziminin sorbinil ile inhibisyonunun bir sonucu olduğunu düşünmekteyiz. AR enzimi, lipid peroksidasyonu son ürünlerini substrat olarak kullanmakta ve Glukoz + Sorbinil grubunda AR enzimi sorbinil ile inhibe olduğu için MDA miktarı 50 mM glukoz uyguladığımız gruba göre daha yüksek çıkmaktadır. Bununla beraber, glukoz + sorbinil uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre GSH-Px enzim aktivitesinde meydana gelen artış, 50 mM glukoz uyguladığımız grup ele alındığında anlamlı bir azalış olarak tespit edilmiştir (Şekil 3.30). 50 mM glukoz uyguladığımız grupta oksidatif stres sonucu kontrol grubuna göre anlamlı bir GSH-Px enzim aktivite artışı meydana gelirken, glukoz + sorbinil uyguladığımız grupta 50 mM Glukoz grubuna göre sorbinilin etkisiyle anlamlı bir GSH-Px enzim aktivite azalışı belirlenmiştir. Bu durum muhtemelen hücre içi sinyal yollarıyla, özellikle AR'ın etkilediği PKC ve NF-kB ile yakından ilişkili olabilir.

Çalışmamızda, sorbinilin APRE-19 hücrelerinde PKC protein düzeylerine olan etkilerini belirlemek için oluşturduğumuz Sorbinil ve Glukoz + Sorbinil gruplarında western blot yöntemi ile protein düzeylerini değerlendirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar, Sorbinil ve Glukoz + Sorbinil gruplarında PKC protein düzeylerinin arttığını göstermektedir (Şekil 3.6). Her ne kadar PKC protein düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış saptamış olsak da, PKC'nin aktivitesini sorbinilin etkisiyle gösteremediğini düşünmekteyiz. Bu düşüncemizin başlıca nedenini; Glukoz + Sorbinil grubunda NF-kB ve I κ B- α protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük çıkması oluşturmaktadır (Şekil 3.9 ve Şekil 3.12). AR inhibitörü olan sorbinilin etkisiyle ARPE-19 hücrelerinde her ne kadar PKC protein düzeyleri artış gösterse de, bu artışın enzim aktivitesine yansımadığını ve hücre içi NF-kB protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük seyretmesinin nedeninin bu aktivite azalışı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca, Glukoz + Sorbinil

grubunda 50 mM Glukoz grubuna göre meydana gelen GSH-Px enzim aktivite düşüşünün, NF-kB protein düzeylerinde meydana gelen azalmadan kaynaklandığını düşünmekteyiz (Şekil 3.30).

ARPE-19 hücrelerinde SAPK/JNK protein düzeylerinde sorbinil uygulanmış grupta kontrole göre her hangi bir değişim belirlenmezken, Glukoz + Sorbinil grubunda 50 mM Glukoz grubuna göre azalma belirlenmiştir (Şekil 3.15). SAPK/JNK protein düzeylerinde meydana gelen bu azalmanın, PKC aktivitesi ile yakından ilişkili olduğunu ve dolayısıyla JNK sinyal yolağının AR enzim aktivitesine bağımlı olduğunu düşünmekteyiz. Bununla beraber, JNK sinyal yolağıyla ilişkili olan Total c-jun ve Fosfo c-jun protein düzeylerinde sorbinil uygulanmış grupta kontrol grubuna göre anlamlı her hangi bir değişim belirlenmezken, glukoz + sorbinil uygulanmış grupta 50 mM glukoz grubuna göre anlamlı azalma belirlenmiştir (Şekil 3.18 ve Şekil 3.21). ARPE-19 hücrelerinde sorbinilin etkisiyle ortaya çıkan bu durum, hücre içi AP-1'in PKC ve dolayısıyla AR enzimi ile de ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Özellikle oluşturulan retinopati modellerinde JNK sinyal yolunun inhibisyonunun neovaskülerizasyonu önleyerek retinopati gelişimini durdurduğu (Guma ve ark., 2009) göz önüne alınırsa, AR inhibitörlerinin retinopati tedavisinde kullanılabileceği varsayılabilir (Şekil 4.1).

AR enziminin PKC ve NF-kB ile olan yakın ilişkisi ARPE-19 hücrelerinde apoptozu etkilemektedir. Çalışmamızda sadece sorbinil uygulanan grupta kontrol grubuna göre ve glukoz + sorbinil uygulanan grupta da ise 50 mM Glukoz grubuna göre sitokrom c protein düzeylerinin azaldığını belirledik (Şekil 3.24). Elde ettiğimiz bu sonuçlar; ARPE-19 hücrelerinde apoptozun NF-kB ve/veya PKC ile ilişki içerisinde olduğunu ve bu ilişkinin AR enzim aktivitesine bağımlı olduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.1).

PKC aktivatörü olan PMA DAG bağımlı PKC izoformları üzerine etki etmekte ve onların aktivasyonlarına neden olmaktadır (Cosentino-Gomes ve ark., 2012). Bununla beraber, PMA'nın hücre kültürü ortamındaki uzun süreli uygulaması (24 saat veya daha fazla) PKC izoformlarının hücre içi protein düzeylerinin düşmesine

yol açmaktadır (Adams ve Gullick, 1989; Kiningham ve ark., 2004). Çalışmamızda PMA'nın ARPE-19 hücrelerinde AR ve PKC üzerine olan etkilerini belirlemek için oluşturduğumuz PMA ve Glukoz + PMA gruplarında western blot değerlendirmeleri gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar; PMA ve Glukoz + PMA gruplarında PKC protein düzeylerinin azaldığını göstermektedir (Şekil 3.6). PKC protein düzeylerinde meydana gelen bu azalma, 24 saat PMA uygulamasının bir sonucudur. Glukoz + PMA grubunda meydana gelen PKC protein düzeylerindeki azalışın, sadece PMA'nın uygulandığı gruba göre daha fazla olması glukozun PMA'nın etkisini artırdığını göstermektedir. Yapılan bir çalışmada RPE hücrelerinde 24 saat PMA uygulanmasının PKC- δ protein düzeylerini azalttığı, buna karşılık diğer izoformlarda bu azalmanın 48 saat sonra gerçekleştiği saptanmıştır (Young ve ark., 2005). Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerinde 24 saat PMA uygulamasına bağlı olarak PKC protein düzeylerinde meydana gelen azalışın sadece PKC δ izoformunda gerçekleştiğini yapılan bu ve diğer çalışmaları referans alarak düşünmekteyiz (Young ve ark., 2005).

Çalışmamızda PMA'nın ARPE-19 hücrelerinde NF-kB ve I κ B- α üzerine olan etkilerini belirlemek için yaptığımız ELISA değerlendirmelerinde; PMA grubunda NF-kB protein düzeylerinin kontrole göre anlamlı olarak azaldığını belirledik (Şekil 3.9). Benzer şekilde oluşturduğumuz Glukoz + PMA grubunda ise NF-kB protein düzeylerinin hem kontrol grubuna göre hem de 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı olarak daha düşük olduğunu saptadık (Şekil 3.9). Bununla beraber, PMA grubunda I κ B- α protein düzeylerinde kontrol grubuna göre herhangi bir anlamlı değişim gözlenmezken, Glukoz + PMA grubunda 50 mM Glukoz grubuna göre anlamlı bir düşme gözlenmiştir (Şekil 3.12). Elde ettiğimiz bu sonuçlar, PMA'nın etkisiyle PKC protein düzeylerinde meydana gelen azalmanın enzimin aktivitesine de yansıdığını göstermektedir. PKC aktivitesinde meydana gelen bu azalmanın ise ARPE-19 hücrelerinde NF-kB protein azalışının temel nedeni olduğunu düşünmekteyiz.

PMA'nın APRE-19 hücrelerinde AP-1 üzerine olan etkilerini belirlemek için yaptığımız total c-jun ve fosfo c-jun ELISA değerlendirmelerinde; PMA grubunda total c-jun protein düzeylerinin kontrol grubuna göre artış gösterdiğini, fosfo c-jun

protein düzeylerinin ise kontrol grubuna göre anlamlı bir değişim göstermediğini belirledik (Şekil 3.18 ve Şekil 3.21). Buna karşılık, oluşturulan Glukoz + PMA grubunda ise hem total c-jun hem de fosfo c-jun protein düzeylerinin 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük olduğunu saptadık (Şekil 3.18 ve Şekil 3.21). Glukoz + PMA grubunda fosfo c-jun protein düzeylerinde meydana gelen bu düşüş, muhtemelen PKC'nin etkilediği JNK sinyal yolağı ile yakından ilişkidir. Yaptığımız değerlendirmelerde PMA uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir SAPK/JNK protein düzeyi artış veya azalışı gözlenmezken, Glukoz + PMA uygulanan grupta ise hem kontrol grubuna göre hem de 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük SAPK/JNK protein düzeyleri gözlenmiştir (Şekil 3.15). Bu sonuçlar, ARPE-19 hücrelerinde PMA'nın etkisiyle meydana gelen PKC protein miktar azalışının JNK sinyal yolağını ve dolayısıyla AP-1'i etkilediğini göstermektedir.

Çalışmamızda PMA'nın ARPE-19 AR enzimi üzerine olan etkisini belirlemek için yaptığımız western blot değerlendirmelerinde, hem PMA grubunda hem de Glukoz + PMA grubunda AR protein düzeylerinin azaldığını belirledik (Şekil 3.4). Bu durumun PMA'nın neden olduğu PKC protein azalışının hücre içi NF-kB ve AP-1 gibi transkripsiyon faktörlerinde meydana getirdiği düşme ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

PMA'nın oksidatif strese olan etkilerini belirlemek için ARPE-19 hücrelerinde oluşturduğumuz PMA ve Glukoz + PMA gruplarında MDA miktar ve GSH-Px enzim aktivite tayini gerçekleştirdik. Elde ettiğimiz sonuçlar; PMA'nın kontrol grubuna göre anlamlı MDA artışına neden olduğunu, buna karşılık GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre anlamlı herhangi bir değişime neden olmadığını göstermektedir (Şekil 3.27 ve Şekil 3.30). Ayrıca, oluşturduğumuz Glukoz + PMA grubunda yaptığımız MDA miktar ve GSH-Px aktivite tayininde, MDA miktarının hem kontrol grubuna göre hem de 50 mM Glukoz grubuna göre daha yüksek olduğunu, buna karşılık GSH-Px enzim aktivitesinin hem kontrol grubuna göre hem de 50 mM Glukoz grubuna göre daha düşük olduğunu saptadık (Şekil 3.27 ve Şekil 3.30). Bu durum PMA'nın etkisiyle meydana gelen PKC protein düzey azalışının ARPE-19 hücrelerinde neden olduğu NF-kB azalışı ile ilişkili olabilir. Glukoz +

PMA grubunda NF-kB protein düzeylerinde meydana gelen azalışın, GSH-Px ve AR gibi antioksidan savunmada görev alan enzimleri etkilediğini ve ekspresyonlarında düşmeye neden olduğunu düşünmekteyiz. Bununla beraber, antioksidan enzimlerde meydana gelen bu düşmenin hücre içi oksidatif stresi artırdığını ve MDA'da meydana gelen artışın ise bu durumla yakından ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda PMA'nın ARPE-19 hücrelerinde apoptoza olan etkilerini belirlemek için yaptığımız ELISA değerlendirmelerinde, hem PMA'lı grupta hem de Glukoz + PMA'lı grupta sitokrom c protein düzeylerinin düştüğünü belirledik (Şekil 3.24). Bu durum muhtemelen ARPE-19 hücrelerinde PKC ve/veya PKC'nin etkilediği NF-kB protein düzeylerin azalması ile ilişkilidir. Proapoptotik olarak algılanan NF-kB'nin protein düzeylerinde ve/veya mitokondriden sitokrom c salınımına neden olan PKC δ protein düzeylerinde meydana gelen azalmanın bir sonucu olarak, PMA ve Glukoz + PMA gruplarında apoptozun azalma göstermiş olabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 4.1).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda ARPE-19 hücrelerinde hiperglisemi ve oksidatif stres durumları yaratılarak AR, PKC, apoptozis ve hücre içi sinyal yollarının olaya katılımı değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda glukoz uygulamasının ancak çok yüksek dozlara çıkıldığında (50 mM Glukoz) toksik etki yarattığı tespit edilmiştir. Buna karşılık diyabet tanısı için belirlenen glukoz konsantrasyonlarının (7.0 mM) ARPE-19 hücrelerinde tek başına herhangi bir toksik etki yaratmadığı belirlenmiştir. Bu durum ARPE-19 hücrelerin hiperglisemiye dayanıklı olduklarını düşündürmektedir. Bununla beraber, ARPE-19 hücrelerinde yüksek glukoz konsantrasyonlarıyla oluşan hasarın, oksidatif stres ile beraber belirginleştiği saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmalarda hem hiperglisemi hem de oksidatif stres koşullarında AR ve PKC protein düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. AR ve PKC protein düzeylerinde meydana gelen bu artış, uygulanan glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak artmaktadır. Hiperglisemi durumunda AR ve PKC protein düzeylerinde meydana gelen bu artışın majör nedeninin oksidatif stres olduğunu düşünmekteyiz. AR enziminin hücre içi protein düzeylerinin NF-kB ve AP-1 gibi redoks düzenleyici faktörler tarafından değişmesi ve AR inhibitörü olan sorbinilin varlığında hücre içi oksidatif stresin artması, AR enziminin antioksidan savunmadaki rolünün önemini vurgulamaktadır. Bu görüş yapılan başka çalışmalarla da desteklenmiştir. Fakat AR enziminin fizyolojik fonksiyonun çeşitliliği enzimi tek bir yolak üzerinden açıklamaya yetmemektedir. Bu bağlamda, ARPE-19 hücrelerinde AR enzimin önemli bir antioksidan savunma elemanı olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında PKC protein düzeylerinde meydana gelen artışın NF-kB ve AP-1'i doğrudan etkileyerek AR protein düzeylerinde artışa neden olduğunu düşünmekteyiz. Bununla beraber, PMA'nın neden olduğu PKC protein düzeylerinin düşmesinin ise AR protein düzeylerinde düşmeye neden olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar, AR protein düzeylerinin PKC ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğunu ve PKC'de meydana gelen

değişimlerin doğrudan NF-kB ve AP-1'i etkileyerek AR protein düzeylerinde değişime neden olabileceğini göstermektedir.

AR inhibitörü sorbinilin PKC aktivitesinde azalmaya neden olarak NF-kB ve AP-1 gibi redoks transkripsiyon faktörlerinin protein düzeylerinde düşmeye neden olduğunu düşünmekteyiz. Bu durum, PKC'nin AR enzimi ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğunu düşündürmektedir. PKC sinyal yolağının hücre içi ilişkili olduğu diğer yollar düşünülüğünde, AR ve PKC arasındaki bu ilişkinin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Bununla beraber, ileride yapılacak olan AR ve PKC aktivite ölçümleri sonuçlara önemli katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında ARPE-19 hücrelerinde apoptozun arttığı belirlenmiştir. ARPE-19 hücrelerinde meydana gelen apoptozun nedeninin pivotal etki gösteren NF-kB ve/veya PKC olabileceğini düşünmekteyiz. AR inhibitörü olan sorbinil ile yaptığımız değerlendirmelerden elde ettiğimiz sonuçlar, sorbinilin apoptozu önlediğini göstermektedir. Bu durumun AR inhibitörü olan sorbinilin etkisi ile NF-kB protein düzeylerinde meydana gelen düşme ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Diyabetik retinopatinin ilerleyişi göz önüne alındığında, retinada meydana gelen birincil değişim olan perisit hücre kaybı ve endotelin yapısının bozulması apoptozun önemine dikkat çekmektedir. Bununla beraber, AR inhibitörü sorbinilin SAPK/JNK protein düzeylerinde azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Retinopati gelişiminde bu yolağın inhibisyonunun neovaskülarizasyonu önlediği daha önceki yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Ayrıca, yapılan bir başka çalışmada ise neovaskülarizasyonda önemli bir faktör olan VEGF'in PKC ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğu ve PKC aktivitesinin artmasının VEGF artışına neden olduğu gösterilmiştir. Bu bağlamda AR inhibitörü olan sorbinilin hem retinopatinin başlangıç evresinde apoptozu önlemek için hem de ileri evresinde neovaskülarizasyonu önlemek için tedavi amaçlı kullanılabileceği varsayılabilir.

Oksidatif stres, PKC ve AR enzimi arasındaki bu ilişki retinopati başta olmak üzere diğer diyabetik komplikasyonların da gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır.

Yaptığımız çalışma bu üç temel mekanizmanın sıkı bir şekilde birbirine bağlı olduğunu göstermektedir. AR enziminin antioksidan savunma ve PKC sinyal yolağındaki fonksiyonları düşünüldüğünde, enzimin sorbinil veya diğer inhibitör maddeler ile inhibisyonunun doğru bir yaklaşım olmadığını düşünmekteyiz. Fakat farklı fonksiyonel özellikler gösteren bu enzimin doku bağımlı olarak düşünülmesi ve enzimin inhibisyonunun hücre için yarar/zarar ilişkisinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini önermekteyiz. İn vitro-in vivo sistem analizleri ve farklı hücre serileri ile yapılacak olan ko-kültür çalışmalarının sonuçlara katkıda bulunabileceğini düşünmekteyiz.

ÖZET

***In Vitro* Diyabetik Retinopati Modelinde Aldoz Redüktaz Enzimi İle Protein Kinaz C Sinyal Yolağının İlişkisi**

Diyabetik retinopati; retinanın prekapiller arteriollerini, kapillerini ve venüllerini etkileyen önemli bir mikroanjiyopatidir. Tüm diyabetik bireylerin yaklaşık olarak % 90'ından fazlasında zaman içerisinde gelişmekte ve bireylerde ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Diyabetin retinal, nöral, renal ve vasküler düzensizliklerinin nedenlerini açıklayan birkaç moleküler mekanizma bulunmaktadır. Bunlar; ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, oksidatif stres, heksozamin yolağı, PKC sinyal yolağı ve poliol yolağıdır. Bu mekanizmalar arasında yer alan PKC sinyal yolağı ve AR enzimi ile ilişkili olan poliol yolağının sürekli etkileşim halinde olduğu biliniyor ise de, insan retinal hücrelerinde AR inhibisyon ve aktivasyonunun hiperglisemi ve oksidatif koşullarda PKC düzey ve aktivasyonuna etkisi, bu etki sonucu hücresel çoğalma ve apoptozun nasıl etkilendiği net olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada ARPE-19 hücrelerinde hiperglisemi ve oksidatif stres koşullarında AR ve PKC arasındaki etkileşim araştırılmıştır. Bu amaçla, AR ve PKC protein düzeyleri western blot yöntemi ile, oksidatif stres düzeyi MDA miktar ve GSH-Px enzim aktivite tayini ile, NF-kB, IκB-α, Total c-Jun, Fosfo c-Jun, SAPK/JNK ve sitokrom c protein düzeyleri ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. ARPE-19 hücrelerinde hiperglisemi ve oksidatif stres koşullarında AR ve PKC protein düzeylerinin arttığı tespit edilmiştir. Hiperglisemi durumunda AR ve PKC'de meydana gelen bu artışın majör nedeninin oksidatif stres olduğunu düşünmekteyiz. Hiperglisemi durumunda PKC'nin etkilendiği NF-kB ve AP-1'in AR protein düzeylerinde artışa neden olduğu düşünülmektedir. AR inhibitörü olan sorbinilin PKC aktivitesinde azalmaya neden olarak hücre içi NF-kB ve AP-1 protein düzeylerinde düşmeye neden olduğu ve apoptozu önlediği belirlenmiştir. PKC aktivatörü olan PMA'nın uzun süreli uygulamasının ise AR protein düzeylerinde ve apoptozda azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Oksidatif stres, PKC ve AR enzimi arasındaki bu ilişki retinopati başta olmak üzere diğer diyabetik komplikasyonların da gelişiminde önemli bir yer tutmaktadır. Yaptığımız çalışmalar bu üç temel mekanizmanın birbiri ile sıkı bir ilişki içerisinde olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda, farklı fonksiyonel özellikler gösteren AR enziminin doku bağımlı olarak düşünülmesi ve enzimin inhibisyonunun hücre için yarar/zarar ilişkisinin doğru bir şekilde değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Sonuç olarak, in vitro diyabetik retinopati modelinde AR ve PKC sinyal yolağı birbiri ile yakından ilişkilidir. Hiperglisemi ve oksidatif stres durumlarında AR ve PKC sinyal yolağı arasındaki bu ilişki hücresel birçok yolağın kontrolünde önemli roller oynamaktadır.

Anahtar Sözcükler: Aldoz Redüktaz, Hiperglisemi, Oksidatif Stres, Protein Kinaz C, Retinopati.

SUMMARY

Relation Between Aldose Reductase Enzyme and the Signal Pathway Of Protein Kinase C in the *In Vitro* Diabetic Retinopathy Model

Diabetic retinopathy is an important microangiopathy which effects the pre-capillary arterioles, capillaries and venules of retina. More than 90 % of all diabetic patients have retinopathy within which causes serious health problems. Several molecular mechanisms have been described to explain the retinal, neural and vascular disorders caused by diabetes. Formation of advanced glycation products, oxidative stress, hexosamine pathway, PKC pathway and polyol pathways are among of these mechanisms. Although it has been known that the PKC signaling pathway and the aldose reductase related polyol pathway are interacting with each other, it is not clearly known whether inhibition or activation of aldose reductase in human retinal cells effects the PKC level and activity, cell proliferation and apoptosis under hyperglycemia and oxidative conditions. In this study, the interaction between AR and PKC in ARPE-19 cells have been investigated. For this purpose, AR and PKC protein levels have been detected with western blot, oxidative stress level has been measured by MDA and GSH-Px enzyme activity assays, NF-kB, I κ B- α , Total c-Jun, Fosfo c-Jun, SAPK/JNK and cytochrome c protein levels have been determined with ELISA. It has been shown that AR and PKC protein levels increased in ARPE-19 cells under hyperglycemia and oxidative stress conditions. We thought that the major reason of the increasing in AR and PKC protein levels is oxidative stress. In hyperglycemia condition, NF-kB and AP-1 protein levels which are effected by PKC are increased. Decrease in PKC activity in the presence of AR inhibitor sorbinil causes decrease in intracellular NF-kB and AP-1 protein levels and inhibits apoptosis. Long term incubation with PKC activator PMA leads decreased apoptosis and AR protein levels. The relationship between oxidative stress, PKC and AR is very important for the development of diabetic complications such as retinopathy. Our studies have shown that these three mechanisms are closely related to each other. In this context, the AR enzyme can be considered as tissue dependent and its inhibition for the benefit/harm of the cell must be evaluated carefully. In conclusion, AR and PKC pathways are closely related to each other in in-vitro diabetic retinopathy model. The relation between AR and PKC signaling pathways under hyperglycemia and oxidative stress conditions plays an important role in the control of various cellular pathways.

Key Words: Aldose Reductase, Hyperglycemia, Oxidative Stress, Protein Kinase C, Retinopathy.

KAYNAKLAR

- ABBOTT, C. A., MALIK, R. A., VAN ROSS, E. R., KULKARNI, J., BOULTON, A. J. (2011). Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the UK. *Diabetes Care*, **34**: 2220-2224.
- ADAMS, J. C., GULLICK, W. J. (1989). Differences in phorbol-ester-induced down-regulation of protein kinase c between cell lines. *Biochem. J.*, **257**: 905-911.
- AIELLO, L. P., BURSELL, S. E., CLERMONT, A., DUH, E., ISHII, H., TAKAGI, C., MORI, F., CIULLA, T. A., WAYS, K., JIROUSEK, M., SMITH, L. E., KING, G. L. (1997). Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes*, **46**: 1473-1480.
- ALBERTI, K. G., ZIMMET, P., SHAW, J. (2007). International Diabetes Federation: a consensus on type 2 diabetes prevention. *Diabet Med.*, **24**: 451-463.
- AL-DELAIFY, W. K., MERCHANT, A. T., RIMM, E. B., WILLETT, W. C., STAMPFER, M. J., HU, F. B. (2004). Effect of type 2 diabetes and its duration on the risk of peripheral arterial disease among men. *Am. J. Med.*, **116**: 236-240.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2010). Standards of medical care in diabetes-2010. *Diabetes Care*, **33**: 11-61.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2013). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, **36**: 67-74.
- ANSARI, N. H., WANG, L., SRIVASTAVA, S. K. (1996). Role of lipid aldehydes in cataractogenesis: 4-hydroxynonenal-induced cataract. *Biochem. Mol. Med.*, **58**: 25-30.
- ANTONETTI, D. A., KLEIN, R., GARDNER, T. W. (2012). Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.*, **366**: 1227-1239.
- ANURADHA, C. D., KANNO, S., HIRANO, S. (2001). Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **31**: 367-373.
- ARCHER, D. B. (1999). Diabetic retinopathy: some cellular, molecular and therapeutic considerations. *Eye*, **13**: 497-523.
- ARORA, M. K., SINGH, U. K. (2013). Molecular mechanisms in the pathogenesis of diabetic nephropathy: an update. *Vascul. Pharmacol.*, **58**: 259-271.
- AWASTHI, S., SRIVASTAVA, S. K., PIPER, J. T., SINGHAL, S. S., CHAUBEY, M., AWASTHI, Y. C. (1996). Curcumin protects against 4-hydroxy-2-nonenal-induced cataract formation in rat lenses. *Am. J. Clin. Nutr.*, **64**: 761-766.
- AWAZU, M., ISHIKURA, K., HIDA, M., HOSHIYA, M. (1999). Mechanisms of mitogen-activated protein kinase activation in experimental diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*, **10**: 738-745.

- AYO, S. H., RADNIK, R., GARONI, J. A., TROYER, D. A., KREISBERG, J. I. (1991). High glucose increases diacylglycerol mass and activates protein kinase C in mesangial cell cultures. *Am. J. Physiol.*, **261**: 571-577.
- BAEUEERLE, P. A. (1998). Pro-inflammatory signaling: last pieces in the NF-kappaB puzzle? *Curr. Biol.*, **8**: 19-22.
- BARSKI, O. A., TIPPARAJU, S. M., BHATNAGAR, A. (2008). The aldo-keto reductase superfamily and its role in drug metabolism and detoxification. *Drug Metab. Rev.*, **40**: 553-624.
- BASHAN, N., KOVSAN, J., KACHKO, I., OVADIA, H., RUDICH, A. (2009). Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. *Physiol. Rev.*, **89**: 27-71.
- BAYNES, J. W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*, **40**: 405-412.
- BAYNES, J. W., THORPE, S. R. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes*, **48**: 1-9.
- BECKMAN, J. A., CREAGER, M. A., LIBBY, P. (2002). Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *JAMA*, **287**: 2570-2581.
- BECKMAN, J. S., KOPPENOL, W. H. (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *American Journal of Physiology*, **271**: 1424-1437.
- BEDRAD, K., KRAUSE, K. H. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.*, **87**: 245-313.
- BEISSWENGER, P. J., HOWELL, S. K., SMITH, K., SZWERGOLD, B. S. (2003). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity as an independent modifier of methylglyoxal levels in diabetes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1637**: 98-106.
- BIAN, Z. M., ELNER, S. G., STRIETER, R. M., GLASS, M. B., LUKACS, N. W., KUNKEL, S. L., ELNER, V. M. (1996). Glycated serum albumin induces chemokine gene expression in human retinal pigment epithelial cells. *J. Leukoc. Biol.*, **60**: 405-414.
- BIERHAUS, A., SCHIEKOFER, S., SCHWANINGER, M., ANDRASSY, M., HUMPERT, P. M., CHEN, J., HONG, M., LUTHER, T., HENLE, T., KLOTING, I., MORCOS, M., HOFMANN, M., TRITSCHLER, H., WEIGLE, B., KASPER, M., SMITH, M., PERRY, G., SCHMIDT, A. M., STERN, D. M., HARING, H. U., SCHLEICHER, E., NAWROTH, P. P. (2001). Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor-kappaB. *Diabetes*, **50**: 2792-2808.
- BONORA, E., FORMENTINI, G., CALCATERRA, F., LOMBARDI, S., MARINI, F., ZENARI, L., SAGGIANI, F., POLI, M., PERBELLINI, S., RAFFAELLI, A., CACCIATORI, V., SANTI, L., TARGHER, G., BONADONNA, R., MUGGEO, M. (2002). HOMA-estimated insulin resistance is an independent predictor of cardiovascular disease in type 2 diabetic subjects: prospective data from the Verona Diabetes Complications Study. *Diabetes Care*, **25**: 1135-1141.

- BOULTON, A. J. (1997). Foot problems in patients with diabetes mellitus. In: Textbook of Diabetes. Edited by; Pickup J., Williams G. London, Blackwell Science.
- BOULTON, A. J., VINIK, A. L., AREZZO, J. C., BRIL, V., FELDMAN, E. L., FREEMAN, R., MALIK, R. A., MASER, R. E., SOSENKO, J. M., ZIEGLER, D. (2005). Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, **28**: 956-962.
- BOYLE, P. J. (2007). Diabetes mellitus and macrovascular disease: mechanisms and mediators. *Am. J. Med.*, **120**: 12-17.
- BRENNER, B. M., COOPER, M. E., DE ZEEUW, D., KEANE, W. F., MITCH, W. E., PARVING, H. H., REMUZZI, G., SNAPINN, S. M., ZHANG, Z., SHAHINFAR, S. (2001). Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N. Engl. J. Med.*, **345**: 861- 869.
- BRESNICK, G. H., ENGERMAN, R., DAVIS, M. D., DE VENECIA, G., MYERS, F. L. (1976). Patterns of ischemia in diabetic retinopathy. *Trans. Sect. Ophthalmol. Am. Acad. Ophthalmol. Otolaryngol.*, **81**: 694-709.
- BROWN, K. E., BROADHURST, K. A., MATHAHS, M. M., KLADNEY, R. D., FIMMEL, C. J., SRIVASTAVA, S. K., BRUNT, E. M. (2005). Immunodetection of aldose reductase in normal and diseased human liver. *Histol. Histopathol.*, **20**: 429-436.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, **414**: 813-820.
- BROWNLEE, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes*, **54**: 1615-1625.
- BUYKEN, A. E., VON ECKARDSTEIN, A., SCHULTE, H., CULLEN, P., ASSMANN, G. (2007). Type 2 diabetes mellitus and risk of coronary heart disease: results of the 10- year follow-up of the PROCAM Study. *Eur. J. Cardiovasc. Prev. Rehabil.*, **14**: 230-236.
- CAGLIERO, E., MAIELLO, M., BOERI, D., ROY, S., LORENZI, M. (1988). Increased expression of basement membrane components in human endothelial cells cultured in high glucose. *J. Clin Invest.*, **82**: 735-738.
- CAGLIERO, E., ROTH, T., ROY, S., LORENZI, M. (1991). Characteristics and mechanisms of high-glucose-induced overexpression of basement membrane components in cultured human endothelial cells. *Diabetes*, **40**: 102-110.
- CALLAGHAN, B. C., CHENG, H. T., STABLES, C. L., SMITH, A. L., FELDMAN, E. L. (2012). Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. *Lancet Neurology*, **11**: 521-534.
- CARDILLO, C., CAMPIA, U., BRYANT, M. B., PANZA, J. A. (2002). Increased activity of endogenous endothelin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, **106**: 1783-1787.
- CARMO, A., CUNHA-VAZ, J. G., CARVALHO, A. P., LOPES, M. C. (1999). L-arginine transport in retinas from streptozotocin diabetic rats: correlation with the level of IL-1 beta and NO synthase activity. *Vision Research*, **39**: 3817-3823.

- CASSESE, A., ESPOSITO, I., FIORY, F., BARBAGALLO, A. P., PATURZO, F., MIRRA, P., ULIANICH, L., GIACCO, F., IADICICCO, C., LOMBARDI, A., ORIENTE, F., VAN OBBERGHEN, E., BEGUINOT, F., FORMISANO, P., MIELE, C. (2008). In skeletal muscle advanced glycation end products (AGEs) inhibit insulin action and induce the formation of multimolecular complexes including the receptor for AGEs. *J. Biol. Chem.*, **283**: 36088-36099.
- CERIELLO, A., MERCURI, F., QUAGLIARO, L., ASSALONI, R., MOTZ, E., TONUTTI, L., TABOGA, C. (2001). Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: Evidence of oxidative stress. *Diabetologia*, **44**: 834-838.
- CERIELLO, A., ESPOSITO, K., PICONI, L., IHNAT, M. A., THORPE, J. E., TESTA, R., BOEMI, M.I GIUGLIANO, D. (2008). Oscillating glucose is more deleterious to endothelial function and oxidative stress than mean glucose in normal and type 2 diabetic patients. *Diabetes*, **57**: 1349-1354.
- CHANG, C. K., LOCICERO III, J. (2004). Overexpressed nuclear factor κ B correlates with enhanced expression of interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase in aged murine lungs to endotoxic stress. *The Annals of Thoracic Surgery*, **77**: 1222-1227.
- CHANG, K. C., LIANG, J. T., TSAI, P. S., WU, M. S., HSU, K. L. (2009). Prevention of arterial stiffening by pyridoxamine in diabetes is associated with inhibition of the pathogenic glycation on aortic collagen. *Br. J. Pharmacol.*, **157**: 1419-1426.
- CHEN, Y. Q., SU, M., WALIA, R. R., HAO, Q., COVINGTON, J. W., VAUGHAN, D. E. (1998). Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **273**: 8225-8231.
- CHEUNG, N., WANG, J. J., KLEIN, R., COUPER, D. J., SHARRETT, A. R., WONG, T. Y. (2007). Diabetic retinopathy and the risk of coronary heart disease: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Diabetes Care*, **30**: 1742-1746.
- CHIARUGI, P., PANI, G., GIANNONI, E., TADDEI, L., COLAVITTI, R., RAUGEI, G., SYMONS, M., BORRELLO, S., GALEOTTI, T., RAMPONI, G. (2003). Reactive oxygen species as essential mediators of cell adhesion: The oxidative inhibition of a FAK tyrosine phosphatase is required for cell adhesion. *J. Cell Biol.*, **161**: 933-944.
- CHOUDHARY, S., SRIVASTAVA, S., XIAO, T., ANDLEY, U. P., SRIVASTAVA, S. K., ANSARI, N. H. (2003). Metabolism of lipid derived aldehyde, 4-hydroxynonenal in human lens epithelial cells and rat lens. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**: 2675-2682.
- CHOUDHARY, S., XIAO, T., SRIVASTAVA, S., ZHANG, W., CHAN, L. L., VERGARA, L. A., VAN KUIJK, F. J., ANSARI, N. H. (2005). Toxicity and detoxification of lipid-derived aldehydes in cultured retinal pigmented epithelial cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **204**: 122-134.
- CHOUDHURI, S., DUTTA, D., SEN, A., CHOWDHURY, I. H., MITRA, B., MONDAL, L. K., SAHA, A., BHADHURI, G., BHATTACHARYA, B. (2013). Role of N- ϵ -carboxy methyl lysine, advanced glycation end products and reactive oxygen species for the development of nonproliferative and proliferative retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Mol. Vis.*, **19**: 100-113.

- CHUA, C. C., HAMDY, R. C., CHUA, B. H. (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free. Radic. Biol. Med.*, **25**: 891-897.
- CHUNG, S. S., HO, E. C., LAM, K. S., CHUNG, S. K. (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**: 233-236.
- CHUNG, S. S., CHUNG, S. K. (2005). Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Curr. Drug Targets*, **6**: 475-486.
- COOPER, M. E. (1998). Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, **352**: 213-219.
- CORBALAN-GARCIA, S., GOMEZ-FERNANDEZ, J. C. (2006). Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1761**: 633-654.
- CORMAN, B., DURIEZ, M., POITEVIN, P., HEUDES, D., BRUNEVAL, P., TEDGUI, A., LEVY, B. L. (1998). Aminoguanidine prevents age-related arterial stiffening and cardiac hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 1301-1306.
- COSENTINO-GOMES, D., ROCCO-MACHADO, N., MEYER-FERNANDES, J. R. (2012). Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. *Int. J. Mol. Sci.*, **13**: 10697-10721.
- COUGHLAN, M. T., THORBURN, D. R., PENFOLD, S. A., LASKOWSKI, A., HARCOURT, B. E., SOURRIS, K. C., TAN, A. L., FUKAMI, K., THALLAS-BONKE, V., NAWROTH, P. P., BROWNLEE, M., BIERHAUS, A., COOPER, M. E., FORBES, J. M. (2009). RAGE-induced cytosolic ROS promote mitochondrial superoxide generation in diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **20**: 742-752.
- COUGHLAN, M. T., YAP, F. Y., TONG, D. C., ANDRIKOPOULOS, S., GASSER, A., THALLAS-BONKE, V., WEBSTER, D. E., MIYAZAKI, J., KAY, T. W., SLATTERY, R. M., KAYE, D. M., DREW, B. G., KINGWELL, B. A., FOURLANOS, S., GROOP, P. H., HARRISON, L. C., KNIP, M., FORBES, J. M. (2011). Advanced glycation end products are direct modulators of β -cell function. *Diabetes*, **60**: 2523-2532.
- COWELL, R. M., RUSSELL, J. W. (2004). Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. *Journal of Investigative Medicine*, **52**: 33-44.
- CRAVEN, P. A., DAVIDSON, C. M., DERUBERTIS, F. R. (1990). Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from de novo synthesis of glycerolipids. *Diabetes*, **39**: 667-674.
- CRAWFORD, T. N., ALFARO, D. V., KERRISON, J. B., JABLON, E. P. (2009). Diabetic retinopathy and angiogenesis. *Curr. Diabetes. Rev.*, **5**: 8-13.
- CUI, Y., XU, X., BI, H., ZHU, Q., WU, J., XIA, X., QIUSHI, R., HO, P. C. (2006). Expression modification of uncoupling proteins and MnSOD in retinal endothelial cells and pericytes induced by high glucose: the role of reactive oxygen species in diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research*, **83**: 807-816.
- CUTLER, R. G. (2005). Oxidative stress profiling: part I. Its potential importance in the optimization of human health. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1055**: 93-135.

- DALLA-VESTRA, M., SALLER, A., BORTOLOSO, E., MAUER, M., FIORETTO, P. (2000). Structural involvement in type 1 and type 2 diabetic nephropathy. *Diabetes Metab.*, **26**: 8-14.
- DANAEI, G., FINUCANE, M. M., LU, Y., SINGH, G. M., COWAN, M. J., PACIOREK, C. J., LIN, J. K., FARZADFAR, F., KHANG, Y. H., STEVENS, G. A., RAO, M., ALI, M. K., RILEY, L. M., ROBINSON, C. A., EZZATI, M. (2011). National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, **378**: 31–40.
- DECKER, P., MULLER, S. (2002). Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **3**: 275-283.
- DEMOPOULOS, V. J., ZAHER, N., ZIKA, C. H., ANAGNOSTOU, K., MAMADOU, E., ALEXIOU, P., NÍCOLAOU, I. (2005). Compounds that combine aldose reductase inhibitory activity and ability to prevent the glycation (glucation and/or fructation) of proteins as putative pharmacotherapeutic agents. *Drug Design Rev.*, **2**: 293-304.
- DERUBERTIS, F. R., CRAVEN, P. A. (1994). Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes. Mechanisms and potential links to the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Diabetes*, **43**: 1-8.
- DICKINSON, P. J., CARRINGTON, A. L., FROST, G. S., BOULTON, A. J. (2002). Neurovascular disease, antioxidants and glycation in diabetes. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **18**: 260-272.
- DIXIT, B. L., BALENDIRAN, G. K., WATOWICH, S. J., SRIVASTAVA, S., RAMANA, K. V., PETRASH, J. M., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. (2000). Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of aldose reductase. *J. Biol. Chem.*, **275**: 21587-21595.
- DREL, V. R., PACHER, P., ALI, T. K., SHIN, J., JULIUS, U., EL-REMESSY, A. B., OBROSOVA, I. G. (2008). Aldose reductase inhibitor fidarestat counteracts diabetes-associated cataract formation, retinal oxidative-nitrosative stress, glial activation, and apoptosis. *Int. J. Mol. Med.*, **21**: 667-676.
- DRÖGE, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, **82**: 47-95.
- DU, X. L., EDELSTEIN, D., ROSSETTI, L., FANTUS, I. G., GOLDBERG, H., ZIYADEH, F., WU, J., BROWNLEE, M. (2000). Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**: 12222-12226.
- DU, X., STOCKLAUSER-FARBER, K., RÖSEN, P. (1999). Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF- κ B and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: Role of nitric oxide synthase? *Free Radic. Biol. Med.*, **27**: 752-763.
- DU, X., MATSUMURA, T., EDELSTEIN, D., ROSSETTI, L., ZSENGELLER, Z., SZABO, C., BROWNLEE, M. (2003). Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase

- activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *Journal of Clinical Investigation*, **112**: 1049-1057.
- DU, Y., MILLER, C. M., KERN, T. S. (2003). Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radical Biology and Medicine*, **35**: 1491-1499.
- DU, Y., TANG, J., LI, G., BERTI-MATTERA, L., LEE, C. A., BARTKOWSKI, D., GALE, D., MONAHAN, J., NIESMAN, M. R., ALTON, G., KERN, T. S. (2011). Effects of p38 MAPK inhibition on early stages of diabetic retinopathy and sensory nerve function. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **51**: 2158-2164.
- DURANTE, W., SEN, A. K., SUNAHARA, F. A. (1988). Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. *Br. J. Pharmacol.*, **94**: 463-468.
- EARLY TREATMENT DIABETIC RETINOPATHY STUDY RESEARCH GROUP (ETDRS). (1991). Early photocoagulation for diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, **98**: 766-785.
- EDWARDS, J. L., VINCENT, A. M., CHENG, H. T., FELDMAN, E. L. (2008). Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacology & Therapeutics*, **120**: 1-34.
- ENGERMAN, R. L., KERN, T. S., LARSON, M. E. (1994). Nerve conduction and aldose reductase inhibition during 5 years of diabetes or galactosaemia in dogs. *Diabetologia*, **37**: 141-144.
- FABRIS, F., ZANOCCHI, M., BO, M., FONTE, G., POLI, L., BERGOGLIO, I., FERRARIO, E., PERNIGOTTI, L. (1994). Carotid plaque, aging, and risk factors. A study of 457 subjects. *Stroke*, **25**: 1133-1140.
- FALCAO, M., FALCAO-REIS, F., ROCHA-SOUSA, A. (2010). Diabetic Retinopathy: Understanding Pathologic Angiogenesis and Exploring its Treatment Options. *Open Circ. Vasc. J.*, **3**: 30-42.
- FARHANGKHOEE, H., KHAN, Z. A., BARBIN, Y., CHAKRABARTI, S. (2005). Glucose-induced up-regulation of CD36 mediates oxidative stress and microvascular endothelial cell dysfunction. *Diabetologia*, **48**: 1401-1410.
- FELDMAN, E. L. (2003). Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *Journal of Clinical Investigation*, **111**: 431-433.
- FISHBEIN, H., PALUMBO, P. J. (1995). Acute metabolic complications in diabetes. In: Diabetes in America. America, DIANE Publishing, p: 283-291, Chapter 13.
- FOLSOM, A. R., RASMUSSEN, M. L., CHAMBLESS, L. E., HOWARD, G., COOPER, L. S., SCHMIDT, M. I., HEISS, G. (1999). Prospective associations of fasting insulin, body fat distribution, and diabetes with risk of ischemic stroke. The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators. *Diabetes Care*, **22**: 1077-1083.
- FONG, D. S., AIELLO, L., GARDNER, T. W., KING, G. L., BLANKENSHIP, G., CAVALLERANO, J. D., FERRIS, F. L., KLEIN, R., AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2003). Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, **26**: 99-102.

- FORD, E. S., MOKDAD, A. H., GILES, W. H., BROWN, D. W. (2003). The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*, **52**: 2346-2352.
- FRANK, R. N., AMIN, R., KENNEDY, A., HOHMAN, T. C. (1997). An aldose reductase inhibitor and aminoguanidine prevent vascular endothelial growth factor expression in rats with long-term galactosemia. *Archives of Ophthalmology*, **115**: 1036-1047.
- FRANK, R. N. (2004). Diabetic retinopathy. *N. Engl. J. Med.*, **350**: 48-58.
- FRENETTE, G., LESSARD, C., SULLIVAN, R. (2004). Polyol pathway along the bovine epididymis. *Mol. Reprod. Dev.*, **69**: 448-456.
- FRIEDLANDER, A. H., MAEDER, L. A. (2000). The prevalence of calcified carotid artery atheromas on the panoramic radiographs of patients with type 2 diabetes mellitus. *Oral Surg., Oral Med., Oral Pathol., Oral Radiol. Endod.*, **89**: 420-424.
- FU, M. X., WELLS-KNECHT, K. J., BLACKLEDGE, J. A., LYONS, T. J., THORPE, S. R., BAYNES, J. W. (1994). Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. *Diabetes*, **43**: 676-683.
- GARCIA-PEREZ, A., BURG, M. B. (1991). Renal medullary organic osmolytes. *Physiol. Rev.*, **71**: 1081-1115.
- GERALDES, P., HIRAOKA-YAMAMOTO, J., MATSUMOTO, M., CLERMONT, A., LEITGES, M., MARETTE, A., AIELLO, L. P., KERN, T. S., KING, G. L. (2009). Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat. Med.*, **15**: 1298-1306.
- GILBERTSON, D. T., LIU, J., XUE, J. L., LOUIS, T. A., SOLID, C. A., EBBEN, J. P., COLLINS, A. J. (2005). Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**: 3736-3741.
- GIOGI, C., AGNOLETTI, C., BALDINI, C., BONONI, A., BONORA, M., MARCHI, S., MISSIROLI, S., PATERGNANI, S., POLETTI, F., RIMESSI, A., ZAVAN, B., PINTON, P. (2010). Redox control of Protein Kinase C: Cell and disease-specific aspects. *Antioxid. Redox Signal.*, **13**: 1051-1085.
- GLOMB, M. A., MONNIER, V. M. (1995). Mechanism of protein modification by glyoxal and glycolaldehyde, reactive intermediates of the maillard reaction. *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 10017-10026.
- GONZALEZ, R. G., BARNETT, P., AGUAYO, J., CHENG, H. M., CHYLACK, L. T. (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, **33**: 196-199.
- GOPALAKRISHNA, R., JAKEN, S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free. Radic. Biol. Med.*, **9**: 1349-1361.
- GRISCAVAGE, J. M., WILK, S., IGNARRO, L. J. (1996). Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**: 3308-3312.

- GRISHAM, M. B. (2004). Reactive oxygen species in immune responses. *Free Radic. Biol. Med.*, **36**: 1479-1480.
- GROSS, J. L., DE AZEVEDO, M. J., SILVEIRO, S. P., CANANI, L. H., CARAMORI, M. L., ZELMANOVITZ, T. (2005). Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. *Diabetes Care*, **28**: 164-176.
- GUERRERO-ROMERO, F., RODRIGUEZ-MORAN, M. (1999). Proteinuria is an independent risk factor for ischemic stroke in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke*, **30**: 1787-1791.
- GUMA, M., RIUS, J., DUONG-POLK, K. X., HADDAD, G. G., LINDSEY, J. D., KARIN, M. (2009). Genetic and pharmacological inhibition of JNK ameliorates hypoxia-induced retinopathy through interference with VEGF expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 8760-8765.
- GUPTA, S., CHOUGH, E., DALEY, J., OATES, P., TORNHEIM, K., RUDERMAN, N. B., KEANEY, J. F. JR. (2002). Hyperglycemia increases endothelial superoxide that impairs smooth muscle cell Na⁺-K⁺-ATPase activity. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**: 560-566.
- HA, H., KIM, K. H. (1999). Pathogenesis of diabetic nephropathy: the role of oxidative stress and protein kinase C. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **45**: 147-151.
- HAFFNER, S. M., LEHTO, S., RONNEMAA, T., PYORALA, K., LAAKSO, M. (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.*, **339**: 229-234.
- HAFFNER, S. M. (2006). Abdominal obesity, insulin resistance, and cardiovascular risk in pre-diabetes and type 2 diabetes. *Eur. Heart J. Suppl.*, **8**: 20-25.
- HAHEIM, L. L., HOLME, I., HJERMANN, I., LEREN, P. (1995). Nonfasting serum glucose and the risk of fatal stroke in diabetic and nondiabetic subjects. 18-year follow-up of the Oslo Study. *Stroke*, **26**: 774-777.
- HALLER, M.J., ATKINSON, M.A., SCHATZ, D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr Clin. North Am.*, **52**: 1553-1578.
- HAMADA, Y., ARAKI, N., KOH, N., NAKAMURA, J., HORIUCHI, S., HOTTA, N. (1996). Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **228**: 539-543.
- HAMMES, H. P., DU, X., EDELSTEIN, D., TAGUCHI, T., MATSUMURA, T., JU, Q., LIN, J., BIERHAUS, A., NAWROTH, P., HANNAK, D., NEUMAIER, M., BERGFELD, R., GIARDINO, I., BROWNLEE, M. (2003). Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat. Med.*, **9**: 294-299.
- HAROCOPOS, G. J., ALVARES, K. M., KOLKER, A. E., BEEBE, D. C. (1998). Human age-related cataract and lens epithelial cell death. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**: 2696-2706.
- HART, G. W. (1997). Dynamic O-linked glycosylation of nuclear and cytoskeletal proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **66**: 315-335.

- HASKINS, K., BRADLEY, B., POWERS, K., FADOK, V., FLORES, S., LING, X., PUGAZHENTHI, S., REUSCH, J., KENCH, J. (2003). Oxidative stress in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1005**: 43-54.
- HASUIKE, Y., NAKANISHI, T., OTAKI, Y., NANAMI, M., TANIMOTO, T., TANIGUCHI, N., TAKAMITSU, Y. (2002). Plasma 3-deoxyglucosone elevation in chronic renal failure is associated with increased aldose reductase in erythrocytes. *Am. J. Kidney Dis.*, **40**: 464-471.
- HATTAT, N. (1993). Diabet retinopatisinin etyopatogenezi. *Türkiye Klinikleri J. Ophthalmol.*, **2**: 13-15.
- HEIZMANN, C. W., ACKERMANN, G. E., GALICHET, A. (2007). Pathologies involving the S100 proteins and RAGE. *Subcell. Biochem.*, **45**: 93-138.
- HINK, U., LI, H., MOLLNAU, H., OELZE, M., MATHEIS, E., HARTMANN, M., SKATCHKOV, M., THAISS, F., STAHL, R. A., WARNHOLTZ, A., MEINERTZ, T., GRIENDLING, K., HARRISON, D. G., FORSTERMANN, U., MUNZEL, T. (2001). Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ. Res.*, **88**: 14-22.
- HINOKIO, Y., SUZUKI, S., HIRAI, M., SUZUKI, C., SUZUKI, M., TOYOTA, T. (2002). Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy. *Diabetologia*, **45**: 877-882.
- HIRAI, F. E., TIELSCH, J. M., KLEIN, B. E., KLEIN, R. (2011). Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology*, **118**: 353-358.
- HOSSEINI, A., ABDOLLAHI, M. (2013). Diabetic neuropathy and oxidative stress: therapeutic perspectives. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **168039**: 1-15.
- HUA, H., GOLDBERG, H. J., FANTUS, I. G., WHITESIDE, C. I. (2001). High glucose-enhanced mesangial cell extracellular signal-regulated protein kinase activation and $\alpha 1(IV)$ collagen expression in response to endothelin-1: role of specific protein kinase C isozymes. *Diabetes*, **50**: 2376-2383.
- INAGAKI, Y., YAMAGISHI, S., OKAMOTO, T., TAKEUCHI, M., AMANO, S. (2003). Pigment epithelium- derived factor prevents advanced glycation end products-induced monocyte chemoattractant protein-1 production in microvascular endothelial cells by suppressing intracellular reactive oxygen species generation. *Diabetologia*, **46**: 284-287.
- INOUCHI, T., BATTAN, R., HANDLER, E., SPORTSMAN, J. R., HEATH, W., KING, G. L. (1992). Preferential elevation of protein kinase C isoform β II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 11059-11063.
- ISHII, H., JIROUSEK, M. R., KOYA, D., TAKAGI, C., XIA, P., CLERMONT, A., BURSELL, S. E., KERN, T. S., BALLAS, L. M., HEATH, W. F., STRAMM, L. E., FEENER, E. P., KING, G. L. (1996). Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC β inhibitor. *Science*, **272**: 728-731.
- ISODA, K., YOUNG, J. L., ZIRLIK, A., MACFARLANE, L. A., TSUBOI, N., GERDES, N., SCHONBECK, U., LIBBY, P. (2006). Metformin inhibits proinflammatory responses and

nuclear factor-kappaB in human vascular wall cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **26**: 611-617.

- ISODA, K., FOLCO, E., MARWALI, M. R., OHSUZU, F., LIBBY, P. (2008). Glycated LDL increases monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1- mediated chemotaxis. *Atherosclerosis*, **198**: 307-312.
- IWATA, T., SATO, S., JIMENEZ, J., MCGOWAN, M., MORONI, M., DEY, A., IBARAKI, N., REDDY, V. N., CARPER, D. (1999). Osmotic response element is required for the induction of aldose reductase by tumor necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.*, **274**: 7993-8001.
- JACOBS, R. C. J., NET-DAS, E., KING, G. L. (2003). New treatments for prevention of insulin resistance and diabetic complications; PKC involvement. In: Diabetes from research to diagnosis and treatment. Edited by; Itamar Raz, Jay Skyler, Eleazar Shafrir, U.K, Chapter 28.
- JAIN, S., SARAF, S. (2008). Type 2 diabetes mellitus-its global prevalence and therapeutic strategies. *Diabetes and metabolic syndrome: clinical research and reviews*, **01**: 1-14.
- JAKUS, V., RIETBROCK, N. (2004). Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol. Res.*, **53**: 131-142.
- JEDZINIAK, J. A., CHYLACK, L. T. JR., CHENG, H. M., GILLIS, M. K., KALUSTIAN, A. A., TUNG, W. H. (1981). The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **20**: 314-326.
- JEZ, J. M., BENNETT, M. J., SCHLEGEL, B. P., LEWIS, M., PENNING, T. M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.*, **326**: 625-636.
- JOUSSEN, A. M., MURATA, T., TSUJIKAWA, A., KIRCHHOF, B., BURSELL, S. E., ADAMIS, A. P. (2001). Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *American Journal of Pathology*, **158**: 147-152.
- JOUSSEN, A. M., FAUSER, S., KROHNE, T. U., LEMMEN, K. D., LANG, G. E., KIRCHHOF, B. (2003). Diabetic retinopathy. Pathophysiology and therapy of hypoxia-induced inflammation. *Ophthalmology*, **100**: 363-370.
- JU, W., EICHINGER, F., BITZER, M., OH, J., MCWEENEY, S., BERTHIER, C. C., SHEDDEN, K., COHEN, C. D., HENGER, A., KRICK, S., KOPP, J. B., STOECKERT, C. J. JR., DIKMAN, S., SCHROPPEL, B., THOMAS, D. B., SCHLONDORFF, D., KRETZLER, M., BOTTINGER, E. P. (2009). Renal gene and protein expression signatures for prediction of kidney disease progression. *Am. J. Pathol.*, **174**: 2073-2085.
- JUDE, E. B., OYIBO, S. O., CHALMERS, N., BOULTON, A. J. (2001). Peripheral arterial disease in diabetic and nondiabetic patients: a comparison of severity and outcome. *Diabetes Care*, **24**: 1433-1437.
- JUUTILAINEN, A., LEHTO, S., RONNEMAA, T., PYORALA, K., LAAKSO, M. (2007). Retinopathy predicts cardiovascular mortality in type 2 diabetic men and women. *Diabetes Care*, **30**: 292-299.

- KALFA, T. A., GERRITSEN, M. E., CARLSON, E. C., BINSTOCK, A. J., TSILIBARY, E. C. (1995). Altered proliferation of retinal microvascular cells on glycated matrix. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **36**: 2358-2367.
- KANG, S. W., ADLER, S. G., LAPAGE, J., NATARAJAN, R. (2001). p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli. *Kidney Int.*, **60**: 543-552.
- KANWAR, M., CHAN, P. S., KERN, T. S., KOWLURU, R. A. (2007). Oxidative damage in the retinal mitochondria of diabetic mice: possible protection by superoxide dismutase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **48**: 3805-3811.
- KARIN, M., LIU, Z. G., ZANDI, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**: 240-246.
- KASS, D. A., SHAPIRO, E. P., KAWAGUCHI, M., CAPRIOTTI, A. R., SCUTERI, A., DEGROOF, R. C., LAKATTA, E. G. (2001). Improved arterial compliance by a novel advanced glycation end-product crosslink breaker. *Circulation*, **104**: 1464-1470.
- KAUR, C., FOULDS, W. S., LING, E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: basic concepts, clinical features and management. *Prog. Retin. Eye. Res.*, **27**: 622-647.
- KAUR, H., CHEN, S., XIN, X., CHIU, J., KHAN, Z. A., CHAKRABARTI, S. (2006). Diabetes-induced extracellular matrix protein expression is mediated by transcription coactivator p300. *Diabetes*, **55**: 3104-3111.
- KAWAMURA, M., EISENHOFER, G., KOPIN, I. J., KADOR, P. F., LEE, Y. S., FUJISAWA, S., SATO, S. (2002). Aldose reductase: an aldehyde scavenging enzyme in the intraneuronal metabolism of norepinephrine in human sympathetic ganglia. *Auton. Neurosci.*, **96**: 131-139.
- KEENAN, H. A., COSTACOU, T., SUN, J. K., DORIA, A., CAVELLERANO, J., CONEY, J., ORCHARD, T. J., AIELLO, L. P., KING, G. L. (2007). Clinical factors associated with resistance to microvascular complications in diabetic patients of extreme disease duration: the 50-year medalist study. *Diabetes Care*, **30**: 1995-1997.
- KEENAN, H. A., SUN, J. K., LEVINE, J., DORIA, A., AIELLO, L. P., EISENBARTH, G., BONNER-WEIR, S., KING, G. L. (2010). Residual insulin production and pancreatic β -cell turnover after 50 years of diabetes: Joslin Medalist Study. *Diabetes*, **59**: 2846-2853.
- KEMPEN, J. H., O'COLMAIN, B. J., LESKE, M. C., HAFFNER, S. M., KLEIN, R., MOSS, S. E., TAYLOR, H. R., HAMMAN, R. F. (2004). The prevalence of diabetic retinopathy among adults in the United States. *Arch. Ophthalmol.*, **122**: 552-563.
- KERN, T. S., KOWLURU, R. A., ENGERMAN, R. L. (1994). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **35**: 2962-2967.
- KERN, T. S., ENGERMAN, R. L. (2001). Pharmacological inhibition of diabetic retinopathy: aminoguanidine and aspirin. *Diabetes*, **50**: 1636-1642.
- KHALIFAH, R. G., BAYNES, J. W., HUDSON, E. G. (1999). Amadorins: novel post-Amadori inhibitors of advanced glycation reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**: 251-258.

- KHAN, Z. A., CHAKRABARTI, S. (2003a). Endothelins in chronic diabetic complications. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **81**: 622-634.
- KHAN, Z. A., CHAKRABARTI, S. (2003b). Growth factors in proliferative diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, **4**: 287-301.
- KHAN, Z. A., FARHANGKHOEE, H., CHAKRABARTI, S. (2006). Towards newer molecular targets for chronic diabetic complications. *Current Vascular Pharmacology*, **4**: 45-57.
- KHAN, Z. A., CHAKRABARTI, S. (2007). Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes. Res.*, **2007**: 31867-31879.
- KIDNEY DISEASE OUTCOMES QUALITY INITIATIVE (KDOQI). (2007). KDOQI clinical practice guidelines and clinical practice recommendations for diabetes and chronic kidney disease. *Am. J. Kidney Dis.*, **49**: 12-154.
- KING, G. L., DAS-EVCIMEN, N. (2010). Role of protein kinase C in diabetic complications. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.*, **5**: 77-88.
- KININGHAM, K. K., DAOSUKHO, C., CLAIR, D. K. ST. (2004). I κ B α (inhibitory kappaB α) identified as labile repressor of MnSOD (manganese superoxide dismutase) expression. *Biochem. J.*, **384**: 543-549.
- KNIGHT, J. A. (1997). Reactive oxygen species and the neurodegenerative disorders. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **27**: 11-25.
- KOBAYASHI, T., KANEKO, T., IUCHI, Y., MATSUKI, S., TAKAHASHI, M., SASAGAWA, I., NAKADA, T., FUJII, J. (2002). Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats. *J. Androl.*, **23**: 674-683.
- KOHNER, E. M., PATEL, V., RASSAM, S. M. (1995). Role of blood flow and impaired autoregulation in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Diabetes*, **44**: 603-607.
- KOLM-LITTY, V., SAUER, U., NERLICH, A., LEHMANN, R., SCHLEICHER, E. D. (1998). High glucose-induced transforming growth factor beta1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J. Clin. Invest.*, **101**: 160-169.
- KOLSET, S. O., REINHOLT, F. P., JENSSEN, T. (2012). Diabetic nephropathy and extracellular matrix. *J. Histochem. Cytochem.*, **60**: 976-986.
- KONDEAU, J. M., TETE-FAVIER, F., PODJARNY, A., REYMANN, J. M., BARTH, P., BIELLMANN, J. F., MORAS, D. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature*, **355**: 469-472.
- KONISHI, H., TANAKA, M., TAKEMURA, Y., MATSUZAKI, H., ONO, Y., KIKKAWA, U., NISHIZUKA, Y. (1997). Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H₂O₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 11233-11237.
- KOWLURU, R. A. (2001). Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta. Diabetologica*, **38**: 179-185.

- KOWLURU, R. A., TANG, J., KERN, T. S. (2001). Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes*, **50**: 1938-1942.
- KOWLURU, R. A., KOPPOLU, P. (2002a). Diabetes-induced activation of caspase-3 in retina: effect of antioxidant therapy. *Free Radical Research*, **36**: 993-999.
- KOWLURU, R. A., KOPPOLU, P. (2002b). Termination of experimental galactosemia in rats, and progression of retinal metabolic abnormalities. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **43**: 3287-3291.
- KOWLURU, R. A. (2003). Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*, **52**: 818-823.
- KOWLURU, R. A., ABBAS, S. N. (2003). Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **44**: 5327-5334.
- KOWLURU, R. A., KOPPOLU, P., CHAKRABARTI, S., CHEN, S. (2003). Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radical Research*, **37**: 1169-1180.
- KOWLURU, R. A., ODENBACH, S. (2004a). Role of interleukin-1 β in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *British Journal of Ophthalmology*, **88**: 1343-1347.
- KOWLURU, R. A., ODENBACH, S. (2004b). Role of interleukin-1 β in the development of retinopathy in rats: effect of antioxidants. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **45**: 4161-4166.
- KOWLURU, R. A., CHAKRABARTI, S., CHEN, S. (2004). Re-institution of good metabolic control in diabetic rats and activation of caspase-3 and nuclear transcriptional factor (NF- κ B) in the retina. *Acta Diabetol.*, **41**: 194-199.
- KOWLURU, R. A. (2005). Diabetic retinopathy: mitochondrial dysfunction and retinal capillary cell death. *Antioxidants & Redox Signaling*, **7**: 1581-1587.
- KOWLURU, R. A., ATASI, L., HO, Y. S. (2006a). Role of mitochondrial superoxide dismutase in the development of diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **47**: 1594-1599.
- KOWLURU, R. A., KOWLURU, W., XIONG, Y., HO, Y. S. (2006b). Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, **41**: 1191-1196.
- KOWLURU, R. A., CHAN, P. S. (2007). Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.*, **43603**: 1-12.
- KOYA, D., JIROUSEK, M. R., LIN, Y. W., ISHII, H., KUBOKI, K., KING, G. L. (1997). Characterization of protein kinase C β isoform activation on the gene expression of transforming growth factor- β , extracellular matrix components, and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, **100**: 115-126.
- KOYA, D., KING, G. L. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*, **47**: 859-866.

- KRETZLER, M., COHEN, C. D. (2010). Integrative biology of renal disease: toward a holistic understanding of the kidney's function and failure. *Semin. Nephrol.*, **30**: 439-442.
- KUBOKI, K., JIANG, Z. Y., TAKAHARA, N., HA, S. W., IGARASHI, M., YAMAUCHI, T., FEENER, E. P., HERBERT, T. P., RHODES, C. J., KING, G. L. (2000). Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase gene expression in endothelial cells and in vivo: a specific vascular action of insulin. *Circulation*, **101**: 676-681.
- KULLO, I. J., BAILEY, K. R., KARDIA, S. L., MOSLEY, T. H., BOERWINKLE, E., TURNER, S. T. (2003). Ethnic differences in peripheral arterial disease in the NHLBI Genetic Epidemiology Network of Arteriopathy (GENOA) Study. *Vasc. Med.*, **8**: 237-242.
- LEE, A. Y., CHUNG, S. S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.*, **13**: 23-30.
- LEE, E. H., WAN, X. H., SONG, J., KANG, J. J., CHO, J. W., SEO, K. Y., LEE, J. H. (2002). Lens epithelial cell death and reduction of anti-apoptotic protein Bcl-2 in human anterior polar cataracts. *Mol. Vis.*, **8**: 235-240.
- LEE, H. C., WIE, Y. H. (2007). Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp. Biol. Med.*, **232**: 592-606.
- LEE, K. W., KO, B. C., JIANG, Z., CAO, D., CHUNG, S. S. (2001). Overexpression of aldose reductase in liver cancers may contribute to drug resistance. *Anticancer Drugs*, **12**: 129-132.
- LEHTO, S., NISKANEN, L., RONNEMAA, T., LAAKSO, M. (1998). Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Stroke*, **29**: 635-639.
- LEWIS, E. J., HUNSICKER, L. G., BAIN, R. P., ROHDE, R. D. (1993). The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N. Engl. J. Med.*, **329**: 1456-1462.
- LEWIS, T. S., SHAPIRO, P. S., AHN, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.*, **74**: 49-139.
- LI, B., MURPHY, K., LAUCIRICA, R., KITTRELL, F., MEDINA, D., ROSEN, J. (1998). A transgenic mouse model for mammary carcinogenesis. *Oncogene*, **16**: 997-1007.
- LI, J. H., HUANG, X. R., ZHU, H. J., OLDFIELD, M., COOPER, M., TRUONG, L. D., JOHNSON, R. J., LAN, H. Y. (2004). Advanced glycation end products activate Smad signaling via TGF-beta-dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease. *FASEB J.*, **18**: 176-178.
- LI, L., LORENZO, P. S., BOGI, K., BLUMBERG, P. M., YUSPA, S. H. (1999). Protein kinase C delta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol. Cell. Biol.*, **12**: 8547-8558.
- LIN, Y. L., SHIVJI, M. K., CHEN, C., KOLODNER, R., WOOD, R. D., DUTTA, A. (1998). The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.*, **3**: 1453-1461.

- LIU, B. F., MIYATA, S., HIROTA, Y., HIGO, S., MIYAZAKI, H., FUKUNAGA, M., HAMADA, Y., UEYAMA, S., MURAMOTO, O., URIUHARA, A., KASUGA, M. (2003). Methylglyoxal induces apoptosis through activation of p38 mitogen-activated protein kinase in rat mesangial cells. *Kidney Int.*, **63**: 947-957.
- LORENZI, M., GERHARDINGER, C. (2001). Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*, **44**: 791-804.
- LORENZI, M. (2007). The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: attractive, elusive, and resilient. *Exp. Diabetes Res.*, **2007**: 61038-61048.
- LU, C., HE, J. C., CAI, W., LIU, H., ZHU, L., VLASSARA, H. (2004). Advanced glycation endproduct (AGE) receptor 1 is a negative regulator of the inflammatory response to AGE in mesangial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 11767-11772.
- LU, M., KUROKI, M., AMANO, S., TOLENTINO, M., KEOUGH, K., KIM, I., BUCALA, R., ADAMIS, A. P. (1998). Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression. *J. Clin. Invest.*, **101**: 1219-1224.
- LUI, W., SCHOENKERMAN, A., LOWE, W. L. JR. (2000). Activation of members of the mitogen-activated protein kinase family by glucose in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**: 782-790.
- LUM, H., ROEBUCK, K. A. (2001). Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **280**: 719-741.
- MADAMANCHI, N. R., HAKIM, Z. S., RUNGE, M. S. (2005a). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J. Thromb. Haemost.*, **3**: 254-267.
- MADAMANCHI, N. R., VENDROV, A., RUNGE, M. S. (2005b). Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **25**: 29-38.
- MAILLARD, L. (1912). Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, **154**: 66-68.
- MAJUMDER, P. K., PANDEY, P., SUN, X., CHENG, K., DATTA, R., SAXENA, S., KHARBANDA, S., KUFE, D. (2000). Mitochondrial translocation of protein kinase C delta in phorbol ester-induced cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.*, **275**: 21793-21796.
- MAJUMDER, P. K., MISHRA, N. C., SUN, X., BHARTI, A., KHARBANDA, S., SAXENA, S., KUFE, D. (2001). Targeting of protein kinase C delta to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ.*, **12**: 465-470.
- MALFAIT, M., GOMEZ, P., VAN VEEN, T. A., PARYS, J. B., DE SMEDT, H., VEREECKE, J., HIMPENS, B. (2001). Effects of hyperglycemia and protein kinase C on connexin 43 expression in cultured rat retinal pigment epithelial cells. *J. Membr. Biol.*, **181**: 31-40.
- MALIK, R. A., KALLINIKOS, P., ABBOTT, C. A., VAN SCHIE, C. H., MORGAN, P., EFRON, N., BOULTON, A. J. (2003). Corneal confocal microscopy: a non-invasive surrogate of nerve fiber damage and repair in diabetic patients. *Diabetologia*, **46**: 683-688.

- MANIGRASSO, M. B., JURANEK, J., RAMASAMY, R., SCHMIDT, A. M. (2013). Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol. Metab.*, **25**: 15-22.
- MARX, N., WALCHER, D., IVANOVA, N., RAUTZENBERG, K., JUNG, A., FRIEDL, R., HOMBACH, V., DE CATERINA, R., BASTA, G., WAUTIER, M. P., WAUTIERS, J. L. (2004). Thiazolidinediones reduce endothelial expression of receptors for advanced glycation end products. *Diabetes*, **53**: 2662-2668.
- MASON, R. M., WAHAB, N. A. (2003). Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **14**: 1358-1373.
- MATSUSHITA, K., VAN DER VELDE, M., ASTOR, B. C., WOODWARD, M., LEVEY, A. S., DE JONG, P. E., CORESH, J., GANSEVORRT, R. T. (2010). Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*, **375**: 2073-2081.
- MATSUURA, K., DEYASHIKI, Y., BUNAI, Y., OHYA, I., HARA, A. (1996). Aldose reductase is a major reductase for isocaproaldehyde, a product of side-chain cleavage of cholesterol, in human and animal adrenal glands. *Arch. Biochem. Biophys.*, **328**: 265-271.
- MATTHEWS, D. R., STRATTON, I. M., ALDINGTON, S. J., HOLMAN, R. R., KOHNER, E. M. (2004). Risks of progression of retinopathy and vision loss related to tight blood pressure control in type 2 diabetes mellitus: UKPDS 69. *Arch. Ophthalmol.*, **122**: 1631-1640.
- MAUER, S. M., STEFFES, M. W., ELLIS, E. N., SUTHERLAND, D. E., BROWN, D. M., GOETZ, F. C. (1984). Structural-functional relationships in diabetic nephropathy. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1143-1155.
- MCDERMOTT, M. M., LIU, K., GREENLAND, P., GURALNIK, J. M., CRIQUI, M. H., CHAN, C., PEARCE, W. H., SCHNEIDER, J. R., FERRUCCI, L., CELIC, L., TAYLOR, L. M., VONESH, E., MARTIN, G. J., CLARK, E. (2004). Functional decline in peripheral arterial disease: associations with the ankle brachial index and leg symptoms. *JAMA*, **292**: 453-461.
- MEISTER, A. (1988). Glutathione metabolism and its selective modification. *Journal of Biological Chemistry*, **263**: 17205-17208.
- MEYER, W. R., DOYLE, M. B., GRIFO, J. A., LIPETZ, K. J., OATES, P. J., DECHERNEY, A. H., DIAMOND, M. P. (1992). Aldose reductase inhibition prevents galactose-induced ovarian dysfunction in the Sprague-Dawley rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **167**: 1837-1843.
- MIHARA, M., UCHIYAMA, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**: 271-278.
- MILLER, S. I., ERNST, R. K., BADER, M. W. (2005). LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**: 36-46.
- MIWA, K., NAKAMURA, J., HAMADA, Y., NARUSE, K., NAKASHIMA, E., KATO, K., KASUYA, Y., YASUDA, Y., KAMIYA, H., HOTTA, N. (2003). The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, **60**: 1-9.

- MOGENSEN, C. E., CHRISTENSEN, C. K., VITTINGHUS, E. (1983). The stages in diabetic renal disease. With emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes*, **32**: 64-78.
- MOHAMED, A. K., BIERHAUS, A., SCHIEKOFFER, S., TRITSCHLER, H., ZIEGLER, R., NAWROTH, P. P. (1999). The role of oxidative stress and NF-kappaB activation in late diabetic complications. *BioFactors*, **10**: 157-167.
- MORIARTY, P., DICKSON, A. J., ERICHSEN, J. T., BOULTON, M. (2000). Protein kinase C isoenzyme expression in retinal cells. *Ophthalmic Res.*, **32**: 57-60.
- MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- MOTT, J. D., KHALIFAH, R. G., NAGASE, H., SHIELD, C. F., 3RD HUDSON, J. K., HUDSON, B. G. (1997). Nonenzymatic glycation of type IV collagen and matrix metalloproteinase susceptibility. *Kidney Int.*, **52**: 1302-1312.
- MOUSA, S. A., LORELLI, W., CAMPOCHIARO, P. A. (1999). Role of hypoxia and extracellular matrix-integrin binding in the modulation of angiogenic growth factors secretion by retinal pigmented epithelial cells. *J. Cell. Biochem.*, **74**: 135-143.
- MULLARKEY, C. J., EDELSTEIN, D., BROWNEE, M. (1990). Free radical generation by early glycation products: A mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**: 932-939.
- MUSICKI, B., KRAMER, M. F., BECKER, R. E., BURNETT, A. L. (2005). Inactivation of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (Ser-1177) by O-GlcNAc in diabetes-associated erectile dysfunction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**: 11870-11875.
- NAKAMURA, J., DEL MONTE, M. A., SHEWACH, D., LATTIMER, S. A., GREENE, D. A. (1992). Inhibition of phosphatidylinositol synthase by glucose in human retinal pigment epithelial cells. *Am. J. Physiol.*, **262**: 417-426.
- NAMBU, H., KUBO, E., TAKAMURA, Y., TSUZUKI, S., TAMURA, M., AKAGI, Y. (2008). Attenuation of aldose reductase gene suppresses high-glucose-induced apoptosis and oxidative stress in rat lens epithelial cells. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **82**: 18-24.
- NEELY, K. A., QUILLEN, D. A., SCHACHAT, A. P., GARDNER, T. W., BLANKENSHIP, G. W. (1998). Diabetic retinopathy. *The Medical Clinics of North America*, **82**: 847-876.
- NEGI, G., KUMAR, A., JOSHI, R. P., RUBY, P. K., SHARMA, S. S. (2011a). Oxidative stress and diabetic neuropathy: current status of antioxidants. *IIOABJ*, **2**: 71-78.
- NEGI, G., KUMAR, A., SHARMA, S. S. (2011b). Nrf2 and NF-kappaB modulation by sulforaphane counteracts multiple manifestations of diabetic neuropathy in rats and high glucose-induced changes. *Curr. Neurovasc. Res.*, **8**: 294-304.
- NEWTON, A. C. (2003). Regulation of the abc kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.*, **370**: 361-371.
- NISHIKAWA, T., EDELSTEIN, D., DU, X. L., YAMAGISHI, S., MATSUMURA, T., KANEDA, Y., YOREK, M. A., BEEBE, D., OATES, P. J., HAMMES, H. P., GIARDINO, I.,

- BROWNLEE, M. (2000a). Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, **404**: 787-790.
- NISHIKAWA, T., GIARDINO, I., EDELSTEIN, D., BROWNLEE, M. (2000b). Changes in diabetic retinal matrix protein mRNA levels in a common transgenic mouse strain. *Current Eye Research*, **21**: 581-587.
- NISHINO, T., HORII, Y., SHIIKI, H., YAMAMOTO, H., MAKITA, Z., BUCALA, R., DOHI, K. (1995). Immunohistochemical detection of advanced glycosylation end products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum. Pathol.*, **26**: 308-313.
- NISHIZUKA, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, **258**: 607-614.
- NISHIZUKA, Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.*, **9**: 484-496.
- NOGUEIRA-MACHADO, J. A., VOLPE, C. M., VELOSO, C. A., CHAVES, M. M. (2011). HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation. *Expert Opin. Ther. Targets*, **15**: 1023-1035.
- NOLAND, T. A. JR., DIMINO, M. J. (1986). Characterization and distribution of protein kinase C in ovarian tissue. *Biol. Reprod.*, **35**: 863-872.
- OBROSOVA, I. G., MINCHENKO, A. G., MARINESCU, V., FATHALLAH, L., KENNEDY, A., STOCKERT, C. M., FRANK, R. N., STEVENS, M. J. (2001). Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, **44**: 1102-1110.
- OBROSOVA, I. G., MINCHENKO, A. G., VASUPURAM, R., WHITE, L., ABATAN, O. I., KUMAGAI, A. K., FRANK, R. N., STEVENS, M. J. (2003). Aldose reductase inhibitor fidarestat prevents retinal oxidative stress and vascular endothelial growth factor overexpression in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetes*, **52**: 864-871.
- OBROSOVA, I. G., PACHER, P., SZABO, C., ZSENGELLER, Z., HIROOKA, H., STEVENS, M. J., YOREK, M. A. (2005). Aldose reductase inhibition counteracts oxidative-nitrosative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in tissue sites for diabetes complications. *Diabetes*, **54**: 234-242.
- OBROSOVA, I. G., CHUNG, S. S., KADOR, P. F. (2010). Diabetic cataracts: mechanisms and management. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **26**: 172-180.
- OBROSOVA, I. G., KADOR, P. F. (2011). Aldose reductase / polyol inhibitors for diabetic retinopathy. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **12**: 373-385.
- OHIRA, T., SHAHAR, E., CHAMBLESS, L. E., ROSAMOND, W. D., MOSLEY, T. H., FOLSOM, A. R. (2006). Risk factors for ischemic stroke subtypes: the Atherosclerosis Risk in Communities Study. *Stroke*, **37**: 2493-2498.
- OHNO-MATSUI, K., HIROSE, A., YAMAMOTO, S., SAIKIA, J., OKAMOTO, N., GEHLBACH, P., DUH, E. J., HACKETT, S., CHANG, M., BOK, D., ZACK, D. J., CAMPOCHIARO, P. A. (2002). Inducible expression of vascular endothelial growth factor

in adult mice causes severe proliferative retinopathy and retinal detachment. *Am. J. Pathol.*, **160**: 711-719.

- OHSHIRO, Y., MA, R. C., YASUDA, Y., HIRAOKA-YAMAMOTO, J., CLERMONT, A. C., ISSHIKI, K., YAGI, K., ARIKAWA, E., KERN, T. S., KING, G. L. (2006). Reduction of diabetes-induced oxidative stress, fibrotic cytokine expression, and renal dysfunction in protein kinase C β -null mice. *Diabetes*, **55**: 3112-3120.
- OIKAWA, T., SHIMAMURA, M., ASHINO, H., NAKAMURA, O., KANAYASU, T., MORITA, I., MUROTA, S. (1992). Inhibition of angiogenesis by staurosporine, a potent protein kinase inhibitor. *Journal of Antibiotics*, **45**: 1155-1160.
- PACHER, P., BECKMAN, J. S., LIAUDET, L. (2007). Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol. Rev.*, **87**: 315-424.
- PANDIT, M. K., BURKE, J., GUSTAFSON, A. B., MINOCHA, A., PEIRIS, A. N. (1993). Drug-induced disorder of glucose tolerance. *Ann. Int. Med.*, **118**: 529-539.
- PARK, J. Y., TAKAHARA, N., GABRIELE, A., CHOU, E., NARUSE, K., SUZUMA, K., YAMAUCHI, T., HA, S. W., MEIER, M., RHODES, C. J., KING, G. L. (2000). Induction of endothelin-1 expression by glucose: an effect of protein kinase C activation. *Diabetes*, **49**: 1239-1248.
- PARTHASARATHY, S., WIELAND, E., STEINBERG, D. (1989). A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of lowdensity lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1046-1050.
- PEARSON, G., ROBINSON, F., GIBSON, T. B., XU, B. E., KARANDIKAR, M., BERMAN, K., COBB, M. H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological. *Endocrine Reviews*, **22**: 153-183.
- PETRASH, J. M., HARTER, T. M., DEVINE, C. S., OLINS, P. O., BHATNAGAR, A., LIU, S., SRIVASTAVA, S. K. (1992). Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Cys-80, -298, and -303. *J. Biol. Chem.*, **267**: 24833-24840.
- PHANEUF, S., LEEUWENBURGH, C. (2002). Cytochrome c release from mitochondria in the aging heart: a possible mechanism for apoptosis with age. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **282**: 423-430.
- PIEPER, G. M., RIAZ-UL-HAQ. (1997). Activation of nuclear factor-kappaB in cultured endothelial cells by increased glucose concentration: prevention by calphostin C. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **30**: 528-532.
- PILONA-PINERO, A., RASKIN, P. (2001). Idiopathic Type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and Its complications*, **15**: 328-335.
- PITTENGER, G. L., RAY, M., BURCUS, N. L., MCNULTY, P., BASTA, B., VINIK, A. L. (2004). Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care*, **27**: 1974-1979.

- PLADZYK, A., RAMANA, K. V., ANSARI, N. H., SRIVASTAVA, S. K. (2006). Aldose reductase prevents aldehyde toxicity in cultured human lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.*, **83**: 408-416.
- PODESTA, F., ROMEO, G., LIU, W. H., KRAJEWSKI, S., REED, J. C., GERHARDINGER, C., LORENZI, M. (2000). Bax is increased in the retina of diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *American Journal of Pathology*, **156**: 1025-1032.
- QUAGLIARO, L., PICONI, L., ASSALONI, R., MARTINELLI, L., MOTZ, E., CERIELLO, A. (2003). Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells: the role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes*, **52**: 2795-2804.
- QUAN, N., HE, L., LAI, W. (2003). Endothelial activation is an intermediate step for peripheral lipopolysaccharide induced activation of paraventricular nucleus. *Brain Research Bulletin*, **59**: 447-452.
- RAMANA, K. V., DIXIT, B. L., SRIVASTAVA, S., BALENDIRAN, G. K., SRIVASTAVA, S. K., BHATNAGAR, A. (2000). Selective recognition of glutathiolated aldehydes by aldose reductase. *Biochemistry*, **39**: 12172-12180.
- RAMANA, K. V., CHANDRA, D., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A., AGGARWAL, B. B., SRIVASTAVA, S. K. (2002). Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **277**: 32063-32070.
- RAMANA, K. V., FRIEDRICH, B., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. (2003). Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J.*, **17**: 315-317.
- RAMANA, K. V., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. (2004a). Inhibition of aldose reductase attenuates TNF-alpha-induced expression of adhesion molecules in endothelial cells. *FASEB J.*, **18**: 1209-1218.
- RAMANA, K. V., FRIEDRICH, B., SRIVASTAVA, S., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. (2004b). Activation of nuclear factor-kappaB by hyperglycemia in vascular smooth muscle cells is regulated by aldose reductase. *Diabetes*, **53**: 2910-2920.
- RAMANA, K. V., FRIEDRICH, B., TAMMALI, R., WEST, M. B., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K. (2005). Requirements of aldose reductase for the hyperglycaemic activation of protein kinase C and formation of diacylglycerol in vascular smooth muscle cells. *Diabetes*, **54**: 818-829.
- RAMANA, K. V., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S., YADAV, U. C., AWASTHI S., AWASTHI, Y. C., SRIVASTAVA, S. K. (2006a). Mitogenic responses of vascular smooth muscle cells to lipid peroxidation-derived aldehyde 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE): role of aldose reductase-catalyzed reduction of the HNE-glutathione conjugates in regulating cell growth. *J. Biol. Chem.*, **281**: 17652-17660.
- RAMANA, K. V., FADL, A. A., TAMMALI, R., REDDY, A. B., CHOPRA, A. K., SRIVASTAVA, S. K. (2006b). Aldose reductase mediates the lipopolysaccharide-induced release of inflammatory mediators in RAW264.7 murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, **281**: 33019-33029.

- RAMANA, K. V., SRIVASTAVA, S. K. (2010). Aldose reductase: a novel therapeutic target for inflammatory pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**: 17-20.
- REDDY, M. A., LI, S. L., SAHAR, S., KIM, Y. S., XU, Z. G., LANTING, L., NATARAJAN, R. (2006). Key role of Src kinase in S100B-induced activation of the receptor for advanced glycation end products in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **281**: 13685-13693.
- RITTNER, H. L., HAFNER, V., KLIMIUK, P. A., SZWEDA, L. I., GORONZY, J. J., WEYAND, C. M. (1999). Aldose reductase functions as a detoxification system for lipid peroxidation products in vasculitis. *J. Clin. Invest.*, **103**: 1007-1013.
- ROHR, J., KITTNER, S., FEESER, B., HEBEL, J. R., WHYTE, M. G., WEINSTEIN, A., KANARAK, N., BUCHHOLZ, D., EARLEY, C., JOHNSON, C., MACKO, R., PRICE, T., SLOAN, M., STERN, B., WITYK, R., WOZNIAK, M., SHERWIN, R. (1996). Traditional risk factors and ischemic stroke in young adults: the Baltimore-Washington Cooperative Young Stroke Study. *Arch. Neurol.*, **53**: 603-607.
- ROLO, A. P., PALMEIRA, C. M. (2006). Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **212**: 167-178.
- ROMEO, G., LIU, W. H., ASNAGHI, V., KERN, T. S., LORENZI, M. (2002). Activation of nuclear factor- κ B induced by diabetes and high glucose regulates a proapoptotic program in retinal pericytes. *Diabetes*, **51**: 2241-2248.
- ROUBICEK, T., BARTLOVA, M., KRAJICKOVA, J., HALUZIKOVA, D., MRAZ, M., LACINOVA, Z., KUDLA, M., TEPLAN, V., HALUZIK, M. (2009). Increased production of proinflammatory cytokines in adipose tissue of patients with end-stage renal disease. *Nutrition*, **25**: 762-768.
- ROY, M. S., KLEIN, R., O'COLMAIN, B. J., KLEIN, B. E., MOSS, S. E., KEMPEN, J. H. (2004). The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic persons in the United States. *Arch. Ophthalmol.*, **122**: 546-551.
- ROY, S., LORENZI, M. (1996). Early biosynthetic changes in the diabetic-like retinopathy of galactose-fed rats. *Diabetologia*, **39**: 735-738.
- ROY, S., SATE, T. (2000). Role of vascular basement membrane components in diabetic microangiopathy. *Drug News Perspect.*, **13**: 91-98.
- ROY, S., SATO, T., PARYANI, G., KAO, R. (2003). Downregulation of fibronectin overexpression reduces basement membrane thickening and vascular lesions in retinas of galactose-fed rats. *Diabetes*, **52**: 1229-1234.
- SARASWAT, M., MRUDULA, T., KUMAR, P. U., SUNEETHA, A., RAO RAO, T. S., SRINIVASULU, M., REDDY, B. (2006). Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Med. Sci. Monit.*, **12**: 525-529.
- SASAKI, A., HORIUCHI, N., HASEGAWA, K., UEHARA, M. (1995). Mortality from coronary heart disease and cerebrovascular disease and associated risk factors in diabetic patients in Osaka District, Japan. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **27**: 77-83.

- SAYESKI, P. P., KUDLOW, J. E. (1996). Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor- α gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **271**: 15237-15243.
- SCHAFFER, S. W., JONG, C. J., MOZAFFARI, M. (2012). Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascul. Pharmacol.*, **57**: 139-149.
- SCHAINFELD, R. M. (2001). Management of peripheral arterial disease and intermittent claudication. *J. Am. Board Fam. Pract.*, **14**: 443-450.
- SCHMIDT, A. M., HORI, O., CHEN, J. X., LI, J. F., CRANDALL, J., ZHANG, J., CAO, R., YAN, S. D., BRETT, J., STERN, D. (1995). Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J. Clin. Invest.*, **96**: 1395-1403.
- SCHRECK, R., ALBERMANN, K., BAEUERLE, P. A. (1992). Nuclear factor kappa β : an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radical Research Communications*, **17**: 221-237.
- SCIVITTARO, V., GANZ, M. B., WEISS, M. F. (2000). AGEs induce oxidative stress and activate protein kinase C- β (II) in neonatal mesangial cells. *Am. J. Physiol.*, **278**: 676-683.
- SEKO, Y., SEKO, Y., FUJIKURA, H., PANG, J., TOKORO, T., SHIMOKAWA, H. (1999). Induction of vascular endothelial growth factor after application of mechanical stress to retinal pigment epithelium of the rat in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**: 3287-3291.
- SELVIN, E., MARINOPOULOS, S., BERKENBLIT, G., RAMI, T., BRANCATI, F. L., POWE, N. R., GOLDEN, S. H. (2004). Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann. Intern. Med.*, **141**: 421-431.
- SHEETZ, M. J., KING, G. L. (2002). Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA*, **288**: 2579-2588.
- SHIBA, T., INOUCHI, T., SPORTSMAN, J. R., HEATH, W. F., BURSELL, S., KING, G. L. (1993). Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am. J. Physiol.*, **265**: 783-793.
- SHIMIZU, F., SANO, Y., HARUKI, H., KANDA, T. (2011). Advanced glycation end-products induce basement membrane hypertrophy in endoneurial microvessels and disrupt the blood-nerve barrier by stimulating the release of TGF- β and vascular endothelial growth factor (VEGF) by pericytes. *Diabetologia*, **54**: 1517-1526.
- SHUN, C. T., CHANG, Y. C., WU, H. P., HSIEH, S. C., LIN, W. M., LIN, Y. H., TAI, T. Y., HSIEH, S. T. (2004). Skin denervation in type 2 diabetes: correlations with diabetic duration and functional impairments. *Brain*, **127**: 1593-1605.
- SONE, H., KAWAKAMI, Y., OKUDA, Y., KONDO, S., HANATANI, M., SUZUKI, H., YAMASHITA, K. (1996). Vascular endothelial growth factor is induced by long-term high glucose concentration and up-regulated by acute glucose deprivation in cultured bovine retinal pigmented epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **221**: 193-198.

- SOURRIS, K. C., FORBES, J. M. (2009). Interactions between advanced glycation end-products (AGE) and their receptors in the development and progression of diabetic nephropathy: are these receptors valid therapeutic targets. *Curr. Drug Targets*, **10**: 42-50.
- SOURRIS, K. C., HARCOURT, B. E., FORBES, J. M. (2009). A new perspective on therapeutic inhibition of advanced glycation in diabetic microvascular complications: common downstream endpoints achieved through disparate therapeutic approaches? *Am. J. Nephrol.*, **30**: 323-335.
- SRIVASTAVA, S., CHANDRA, A., WANG, L. F., SEIFERT, W. E. JR., DAGUE, B. B., ANSARI, N. H., SRIVASTAVA, S. K., BHATNAGAR, A. (1998). Metabolism of the lipid peroxidation product, 4-hydroxy-trans-2-nonenal, in isolated perfused rat heart. *J. Biol. Chem.*, **273**: 10893-10900.
- SRIVASTAVA, S., WATOWICH, S. J., PETRASH, J. M., SRIVASTAVA, S. K., BHATNAGAR, A. (1999). Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase. *Biochemistry*, **38**: 42-54.
- SRIVASTAVA, S. K., RAMANA, K. V., BHATNAGAR, A. (2005). Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev.*, **26**: 380-392.
- STAUBLE, B., BOSCOBOINIK, D., TASINATO, A., AZZI, A. (1994). Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D- α -tocopherol in vascular smooth muscle cells. *European Journal of Biochemistry*, **226**: 393-402.
- STEINBERG, S. F. (2008). Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol. Rev.*, **88**: 1341-1378.
- STITT, A. W., LI, Y. M., GARDINER, T. A., BUCALA, R., ARCHER, D. B., VLASSAR, H. (1997). Advanced glycation end products (AGEs) co-localize with AGE receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am. J. Pathol.*, **150**: 523-531.
- STORZ, P., DÖPPLER, H., TOKER, A. (2004). Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor kappaB. *Mol. Pharmacol.*, **66**: 870-879.
- STORZ, P. (2005). Reactive oxygen species in tumor progression. *Front. Biosci.*, **10**: 1881-1896.
- STUDER, R. K., CRAVEN, P. A., DERUBERTIS, F. R. (1993). Role for protein kinase C in the mediation of increased fibronectin accumulation by mesangial cells grown in high-glucose medium. *Diabetes*, **42**: 118-126.
- SUN, W., OATES, P. J., COUTCHER, J. B., GERHARDINGER, C., AND LORENZI, M. (2006). A selective aldose reductase inhibitor of a new structural class prevents or reverses early retinal abnormalities in experimental diabetic retinopathy. *Diabetes*, **55**: 2757-2762.
- TAYLOR, S. I. (1992). Lilly Lecture: molecular mechanisms of insulin resistance. Lessons from patients with mutations in the insulin receptor gene. *Diabetes*, **41**: 1473-1490.
- THE DIABETES CONTROL AND COMPLICATION TRIAL RESEARCH GROUP (DCCT). (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of

- long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*, **329**: 977-986.
- THORNALLEY, P. J., LANGBORG, A., MINHAS, H. S. (1999). Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.*, **344**: 109-116.
- TOMLINSON, D. R. (1999). Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia*, **42**: 1271-1281.
- TRUEBLOOD, N., RAMASAMY, R. (1998). Aldose reductase inhibition improves altered glucose metabolism of isolated diabetic rat hearts. *American Journal of Physiology*, **275**: 75-83.
- TSUCHIDA, K., MAKITA, Z., YAMAGISHI, S., ATSUMI, T., MIYOSHI, H., OBARA, S., ISHIDA, M., ISHIKAWA, S., YASUMURA, K., KOIKE, T. (1999). Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*, **42**: 579-588.
- TUOMILEHTO, J., RASTENYTE, D., JOUSILAHTI, P., SARTI, C., VARTIAINEN, E. (1996). Diabetes mellitus as a risk factor for death from stroke: prospective study of the middle-aged Finnish population. *Stroke*, **27**: 210-215.
- UK PROSPECTIVE DIABETES STUDY (UKPDS) GROUP. (1998). Tight blood pressure control, and risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 38. *BMJ*, **317**: 703-713.
- VANDER JAGT, D. L., HASSEBROOK, R. K., HUNSAKER, L. A., BROWN, W. M., ROYER, R. E. (2001). Metabolism of the 2-oxoaldehyde methylglyoxal by aldose reductase and by glyoxalase-I: roles for glutathione in both enzymes and implications for diabetic complications. *Chem. Biol. Interact.*, **130-132**: 549-562.
- VANNUVEL, K., RENARD, P., RAES, M. (2013). Functional and Morphological Impact of ER Stress on Mitochondria. *J. Cell. Physiol.*, **228**: 1802-1818.
- VASSILAKOPOULOS, T., KARATZA, M. H., KATSAOUNOU, P., KOLLINTZA, A., ZAKYNTINOS, S., ROUSSOS, C. (2003). Antioxidants attenuate the plasma cytokine response to exercise in humans. *Journal of Applied Physiology*, **94**: 1025-1032.
- VINCENT, A. M., RUSSELL, J. W., LOW, P., FELDMAN, E. L. (2004). Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr. Rev.*, **25**: 612-628.
- VINSON, J. A., HOWARD III, T. B. (1996). Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. *J. Nutr. Biochem.*, **7**: 659-663.
- VLASSARA, H. (1997). Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes*, **46**: 19-25.
- VLASSARA, H. (2001). The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab. Res. Rev.*, **17**: 436-443.

- VOGT, M. T., CAULEY, J. A., KULLER, L. H., NEVITT, M. C. (1994). Functional status and mobility among elderly women with lower extremity arterial disease: the Study of Osteoporotic Fractures. *J. Am. Geriatr. Soc.*, **42**: 923-929.
- WANG, Y., BISWAS, G., PRABU, S. K., AVADHANI, N. G. (2006). Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase Calpha in C2C12 myocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **72**: 881-892.
- WATTANAKIT, K., FOLSOM, A. R., SELVIN, E., WEATHERLEY, B. D., PANKOW, J. S., BRANCATI, F. L., HIRSCH, A. T. (2005). Risk factors for peripheral arterial disease incidence in persons with diabetes: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis*, **180**: 389-397.
- WAY, K. J., KATAI, N., KING, G. L. (2001). Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet. Med.*, **18**: 945-959.
- WENDT, T. M., TANJI, N., GUO, J., KISLINGER, T. R., QU, W., LU, Y., BUCCIARELLI, L. G., RONG, L. L., MOSER, B., MARKOWITZ, G. S., STEIN, G., BIERHAUS, A., LILIENSIEK, B., ARNOLD, B., NAWROTH, P. P., STERN, D. M., D'AGATI, V. D., SCHMIDT, A. M. (2003). RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Am. J. Pathol.*, **162**: 1123-1137.
- WENDT, T., HARJA, E., BUCCIARELLI, L., QU, W., LU, Y., RONG, L. L., JENKINS, D. G., STEIN, G., SCHMIDT, A. M., YAN, S. F. (2006). RAGE modulates vascular inflammation and atherosclerosis in a murine model of type 2 diabetes. *Atherosclerosis*, **185**: 70-77.
- WERMUTH, B., MONDER, C. (1983). Aldose and aldehyde reductase exhibit isocorticosteroid reductase activity. *Eur. J. Biochem.*, **131**: 423-426.
- WESSELS, A. M., ROMBOUTS, S. A., SIMSEK, S., KUIJER, J. P., KOSTENSE, P. J., BARKHOF, F., SCHELTENS, P., SNOEK, F. J., HEINE, R. J. (2006). Microvascular disease in type 1 diabetes alters brain activation: a functional magnetic resonance imaging study. *Diabetes*, **55**: 334-340.
- WHITING, D.R., GUARIGUATA, L., WEIL, C., SHAW, J. (2011). IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **94**: 311-321.
- WIERNSPERGER, N. F., BOUSKELA, E. (2003). Microcirculation in insulin resistance and diabetes: more than just a complication. *Diabetes Metab.*, **29**: 77-87.
- WILKINSON, C. P., FERRIS, F. L., KLEIN, R. E., LEE, P. P., AGARDH, C. D., DAVIS, M., DILLS, D., KAMPIK, A., PARARAJASEGARAM, R., VERDAGUER, J. T. (2003). Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology*, **110**: 1677-1682.
- WILSON, D. K., BOHREN, K. M., GABBAY, K. H., QUIOCHO, F. A. (1992). An unlikely sugar substrate site in the 1.65 Å structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications. *Science*, **257**: 81-84.

- WOHAIEB, S. A., GODIN, D. V. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*, **36**: 1014-1018.
- WOOD, J. P., OSBORNE, N. N. (1997). Induction of apoptosis in cultured human retinal pigmented epithelial cells: the effect of protein kinase C activation and inhibition. *Neurochem. Int.*, **31**: 261-273.
- WOOD, J. P., OSBORNE, N. N. (1998). Expression of protein kinase C isoenzymes in cultured hooded rat retinal pigmented epithelial cells: comparison with dystrophic Royal College of Surgeons rat. *Curr. Eye. Res.*, **17**: 757-760.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). (2011). Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva, World Health Organization, 2011.
- WU, Y., WU, G., QI, X., LIN, H., QIAN, H., SHEN, J., LIN, S. (2006). Protein kinase C beta inhibitor LY333531 attenuates intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemotactic protein-1 expression in the kidney in diabetic rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, **101**: 335-343.
- XIA, P., INOBUCHI, T., KERN, T. S., ENGERMAN, R. L., OATES, P. J., KING, G. L. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerol-protein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*, **43**: 1122-1129.
- XIA, P., AIELLO, L. P., ISHII, H., JIANG, Z. Y., PARK, D. J., ROBINSON, G. S., TAKAGI, H., NEWSOME, W. P., JIROUSEK, M. R., KING, G. L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *Journal of Clinical Investigation*, **98**: 2018-2026.
- XIN, X., KHAN, Z. A., CHEN, S., CHAKRABARTI, S. (2004). Extracellular signal-regulated kinase (ERK) in glucose-induced and endothelin-mediated fibronectin synthesis. *Laboratory Investigation*, **84**: 1451-1459.
- XU, X., LI, Z., LUO, D., HUANG, Y., ZHU, J., WANG, X., HU, H., PATRICK, C. P. (2003). Exogenous advanced glycosylation end products induce diabetes-like vascular dysfunction in normal rats: a factor in diabetic retinopathy. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **241**: 56-62.
- YABE-NISHIMURA, C. (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol. Rev.*, **50**: 21-33.
- YAMAGISHI, S. I., EDELSTEIN, D., DU, X. L., BROWNLEE, M. (2001). Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*, **50**: 1491-1494.
- YAMAGISHI, S., INAGAKI, Y., OKAMOTO, T., AMANO, S., KOGA, K., TAKEUCHI, M., MAKITA, Z. (2002). Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, **277**: 20309-20315.
- YAMAGISHI, S., INAGAKI, Y., OKAMOTO, T., AMANO, S., KOGA, K., TAKEUCHI, M. (2003). Advanced glycation end products inhibit de novo protein synthesis and induce TGF-beta overexpression in proximal tubular cells. *Kidney Int.*, **63**: 464-473.

- YAN, S. D., SCHMIDT, A. M., ANDERSON, G. M., ZHANG, J., BRETT, J., ZOU, Y. S., PINSKY, D., STERN, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J. Biol. Chem.*, **269**: 9889-9897.
- YAN, S. F., RAMASAMY, R., NAKA, Y., SCHMIDT, A. M. (2003). Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ. Res.*, **93**: 1159-1169.
- YAN, S. F., YAN, S. D., RAMASAMY, R., SCHMIDT, A. M. (2009). Tempering the wrath of RAGE: an emerging therapeutic strategy against diabetic complications, neurodegeneration, and inflammation. *Ann. Med.*, **41**: 408-422.
- YAN, S. F., RAMASAMY, R., SCHMIDT, A. M. (2010). The RAGE axis: a fundamental axis signaling danger to the vulnerable vasculature. *Circ. Res.*, **106**: 842-853.
- YANG, R. B., MARK, M. R., GRAY, A., HUANG, A., XIE, M. H., ZHANG, M., GODDARD, A., WOOD, W. I., GURNEY, A. L., GODOWSKI, P. J. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, **395**: 284-288.
- YOKOTA, T., MA, R. C., PARK, J. Y., ISSHIKI, K., SOTIROPOULOS, K. B., RAUNIYAR, R. K., BORNFELDT, K. E., KING, G. L. (2003). 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*, **52**: 838-845.
- YOUNG, T. A., CUNNINGHAM, C. C., BAILEY, S. M. (2002). Reactive oxygen species production by the mitochondrial respiratory chain in isolated rat hepatocytes and liver mitochondria: studies using myxothiazol. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **405**: 65-72.
- YOUNG, T. A., WANG, H., MUNK, S., HAMMOUDI, D. S., YOUNG, D. S., MANDELCORN, M. S., WHITESIDE, C. I. (2005). Vascular endothelial growth factor expression and secretion by retinal pigment epithelial cells in high glucose and hypoxia is protein kinase C-dependent. *Exp. Eye Res.*, **80**: 651-662.
- YUUKI, T., KANDA, T., KIMURA, Y., KOTAJIMA, N., TAMURA, J., KOBAYASHI, I., KISHI, S. (2001). Inflammatory cytokines in vitreous fluid and serum of patients with diabetic vitreoretinopathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, **15**: 257-259.
- ZANGAR, R. C., DAVYDOV, D. R., VERMA, S. (2004). Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **199**: 316-331.
- ZHANG, D. X., GUTTERMAN, D. D. (2007). Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**: 2023-2031.
- ZHANG, L., ZHANG, H., ZHAO, Y., LI, Z., CHEN, S., ZHAI, J., CHEN, Y., XIE, W., WANG, Z., LI, Q., ZHENG, X., HU, X. (2013). Inhibitor selectivity between aldo-keto reductase superfamily members AKR1B10 and AKR1B1: role of Trp112 (Trp111). *FEBS Lett.*, **15**: 3681-3686.
- ZHENG, L., SZABO, C., KERN, T. S. (2004). Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappaB. *Diabetes*, **53**: 2960-2967.

- ZHENG, L., HOWELL, S. J., HATALA, D. A., HUANG, K., KERN, T. S. (2007). Salicylate-based anti-inflammatory drugs inhibit the early lesion of diabetic retinopathy. *Diabetes*, **56**: 337-345.
- ZIMMET, P. (2009). Preventing diabetic complications: a primary care perspective. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **84**: 107-116.
- ZIYADEH, F. N. (1993). The extracellular matrix in diabetic nephropathy. *Am. J. Kidney Dis.*, **22**: 736-744.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı ve Soyadı: Mutlu SARIKAYA

Doğum yeri ve tarihi: ANKARA-03.01.1982

İletişim adresi: Örnek Mah. İlkev Sok. No: 19/7 Telsizler/ANKARA

Telefon: 0536 365 81 37

E-mail: mutu.sarikaya@gmail.com

II-Eğitim

2008-2014: Doktora. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

2004-2007: Yüksek Lisans. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

2000-2004: Lisans. Akdeniz Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü.

1996-1999: Lise. Ankara Lisesi.

Yabancı dil: İngilizce

III-Ünvanları

2007: Bilim Uzmanı

2004: Biyolog

IV-Bilimsel Çalışmalar

SCI, SCI-Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergilerdeki yayınlar;

Murat Şüküroğlu, Burcu Çalışkan-Ergün, Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Erden Banoğlu, Sibel Süzen. (2007). Screening and evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of some pyridazine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 15: 443-451.

Sibel Süzen, Net Daş-Evcimen, Pınar Varol, Mutlu Sarıkaya. (2007). Preliminary evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of 2-phenylindole derivatives: affiliation to antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*. 16: 112-118.

Oya Bozdağ-Dündar, Net Daş-Evcimen, Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Rahmiye Ertan, Mutlu Sarıkaya. (2007). Some new thiazolyl thiazolidinedione derivatives as aldose reductase. *Medicinal Chemistry Research*. 16: 39-47.

Net Daş-Evcimen, Oya Bozdağ-Dündar, Mutlu Sarıkaya, Rahmiye Ertan. (2008). In vitro aldose reductase inhibitory activity of some flavonyl-2,4-thiazolidinediones. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 23(3): 297-301.

Oya Bozdağ-Dündar, Eugen J. Verspohl, Net Daş-Evcimen, Rebecca M. Kaup, Katrin Bauer, Mutlu Sarıkaya, Begüm Evranos, Rahmiye Ertan. (2008). Synthesis and biological activity of some new flavonyl-2-4-thiazolidinediones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16: 6747-6751.

Oya Bozdağ-Dündar, Begüm Evranos, Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Rahmiye Ertan. (2008). Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of some new chromonyl-2-4-thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43: 2414-2417.

Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Gökçe Gürkök, Sibel Süzen. (2011). Evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of some *N*-acetyl dehydroalanine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*. 20: 453-460.

Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Oya Bozdağ-Dündar, Rahmiye Ertan. (2009). The inhibitory effects of thiazolyl-2,4-thiazolidinedione compounds on the rat kidney aldose reductase enzyme. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 38 (3): 181-190. (Received: 15.03.2012, Accepted: 28.03.2012).

Net-Daş Evcimen, Mutlu Sarıkaya, A. Selen Gurkan-Alp, Oya Bozdağ-Dundar. (2013) Aldose reductase inhibitory potential of several thiazolyl-thiazolidine-2,4-dions. *Letters in Drug Design & Discovery*. 10: 415-419.

Kongrelerde sunulan ve SCI, SCI-Expanded, SSCI ve AHCI kapsamındaki dergi özel sayılarında veya aynı kapsamdaki kongre kitaplarında özeti yayınlanan bildiriler;

Mutlu Sarıkaya, Murat Şüküroğlu, Burcu Çalışkan-Ergün, Erden Banoğlu, Net Daş-Evcimen, Sibel Süzen. Screening and evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of some pyridazine-3-one derivatives. *8th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS)*. P10, pp.126. Ankara, Turkey, 13-16 June, 2006.

Oya Bozdağ-Dündar, Net Daş-Evcimen, Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Rahmiye Ertan, Mutlu Sarıkaya. Synthesis and aldose reductase enzyme inhibition activity of some new 2-substituted-thiazolyl-5-methylenyl-thiazolidinedione derivatives. *XXII European Colloquium On Heterocyclic Chemistry*. PO10, p.96. Bari, Italy, 2-6 September, 2006.

Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Oya Bozdağ-Dündar, Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Rahmiye Ertan. The inhibitory effect of thiazolyl-2-4-thiazolidinedione compounds on the

rat kidney aldose reductase enzyme. *Gordon Research Conference, Drug Metabolism*. Plymouth, NH, USA, 9-14 July, 2006.

Net Daş-Evcimen, Oya Bozdağ-Dündar, Mutlu Sarıkaya, Rahmiye Ertan. Aldose reductase inhibitory activity of some flavonyl-2,4-thiazolidinedione derivatives. *The 21st Annual Symposium Of The Protein Society*. 281, pp.161-162. Boston, MA, USA, 21-25 July, 2007.

Asiye Gül-İşbilen, Mutlu Sarıkaya, Oya Bozdağ-Dündar, Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Net Daş-Evcimen. Aldose reductase inhibitory activities of some 2,4-thiazolidinedione derivatives. *9th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS)*. P-226, pp.349. Ankara, Turkey, 23-26 June, 2009.

Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Oya Bozdağ-Dündar, Selen Gürkan. Determination of aldose reductase enzyme activities in rat kidney.: Effect of novel thiazolyl-2,4-thiazolidindiones. *Gordon Research Conference, Drug Metabolism*. Holderness, USA, 11-16 July, 2010.

Meltem Ceylan-Ünlüsoy, Net Daş-Evcimen, Asiye Gül-İşbilen, Mutlu Sarıkaya, Oya Bozdağ-Dündar, Rahmiye Ertan. Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of some new triazolo-thiazolyl-thiazolidine-2,4-diones. *10th International Symposium On Pharmaceutical Sciences (ISOPS)*. P-61, pp.136. Ankara, Turkey, 26-29 June, 2012.

Net Daş-Evcimen, Mutlu Sarıkaya, Hanif Shirinzadeh, Çiğdem Karaaslan, Ayşe Didem-Yılmaz, Sibel Süzen. Aldose reductase inhibitory capacity of several indol derivatives. *Gordon Research Conference, Drug Metabolism*. Holderness, USA, 8-13 July, 2012.

Net Daş-Evcimen, Nuray Yazıhan, Mutlu Sarıkaya, Hande Özge Altunkaynak, A. Tanju Özçelikay, Ethem Akcil. Determination of aldose reductase enzyme activity in different tissues. *The 27th Annual Symposium Of The Protein Society*. P124, pp.84-85. Boston, MA, USA, 20-23 July, 2013.

Verdiği Seminerler;

P53'ün Yapı ve Fonksiyonları (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)

Aldo-Keto Redüktaz Süper Ailesinin Yapı ve Fonksiyonları (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı)