

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI YENİ TİYAZOLİDİNDİON TÜREVLERİNİN ALDOZ
REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİLERİ

Asiye Gül İŞBİLEN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç Dr. Net DAŞ EVCİMEN

2009- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

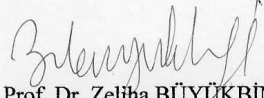
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 03 / 07 / 2009



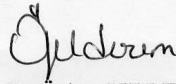
Prof.Dr.Serpil NEBİOĞLU
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi
Jüri Başkanı



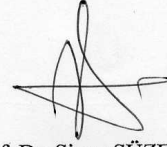
Prof. Dr. Zeliha BÜYÜKBİNGÖL
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Prof. Dr. Fügen AKTAN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi



Doç. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Sinan SÜZEN
Ankara Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, 2,4-Tiyazolidindion türevlerinin yeni bir serisi olan maddelerin, sıgır lensi aldoz redüktazını inhibe etme yeteneği, in vitro spektrofotometrik çalışma ile test edilmiştir.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilimsel bakış açısı ve disiplini ile bana yol gösteren, sabır ve hoşgörüsünü esirgemeyen tez danışmanım, Doç. Dr. Net DAŞ EVCİMEN' e çok teşekkür ederim.

Ayrıca Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya A.B.D Başkanı Prof. Dr. Serpil NEBİOĞLU' na teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca ve deney aşamasında bilgi ve becerisiyle daima bana destek olan sevgili arkadaşım Uzm. Bio. Mutlu SARIKAYA' ya ve desteklerini daima hissettiğim sevgili arkadaşlarım Beste GÜLGÜN' e, Uzm.Ecz. Filiz BAKAR'a, Uzm.Ecz. Arzu KARABAY' a, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Oya BOZDAĞ'a ve Uzm.Ecz. Meltem ÜNLÜSOY' a, çalışmalarım süresince iyi dilekleri ile beni cesaretlendiren aileme, özellikle babama çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	ix

1. GİRİŞ

1.1 Aldo-Keto Oksidoredüktaz Süper Aile Üyesi : Aldoz Redüktaz Enziminin Yapısı ve Sınıflandırması	1
1.2. Poliöl Yolağı	8
1.3. Hiperglisemi ve Aldoz Redüktaz Aktivasyonu	12
1.3.1. Diabetes Mellitus	12
1.3.1.1 Tip 1 Diyabet	14
1.3.1.2. Tip 2 Diyabet	15
1.3.2. Diyabetik Komplikasyonlar	17
1.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar	20
1.3.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar	21
1.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati ve Katarakt Gelişimi	21
1.3.2.2.2. Diyabetik Nöropati	23
1.3.2.2.3. Diyabetik Nefropati	24
1.4. Aldoz Redüktaz Enziminin Diyabetik Komplikasyon Oluşumuna Etkileri	25
1.4.1. Ozmotik Stres	27
1.4.2. Oksidatif Stres	27
1.4.3. İleri Glikasyon Ürünlerinin Oluşumu	30
1.4.4. Na ⁺ /K ⁺ ATPaz ve Aldoz Redüktaz etkisi	32
1.4.5. Nitrikoksit ve Aldoz Redüktaz Etkisi	34

1.4.6. Protein Kinaz C ve Aldoz Redüktaz İlişkisi	34
1.5. Aldoz Redüktaz Enziminin Diğer Patolojik Proseslerle İlişkisi	36
1.5.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Aldoz Redüktaz	36
1.5.2. İnflamasyon ve Aldoz Redüktaz	37
1.5.3. Depresyon ve Aldoz Redüktaz	37
1.5.4. Renal Yetmezlik ve Aldoz Redüktaz	38
1.5.5. Over Anomalileri ve Aldoz Redüktaz	38
1.5.6. Kanser ve Aldoz Redüktaz	38
1.6. Aldoz Redüktaz İnhibitörleri (ARI)	39
2. GEREÇ VE YÖNTEM	
2.1. Kullanılan Gereçler	45
2.1.1. Kullanılan Cihazlar	45
2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	45
2.1.3. Denekler	46
2.2. Kullanılan Yöntemler	47
2.2.1. Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyonu	47
2.2.2. Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesinin Tayini	47
2.2.2. Protein Miktar Tayini	49
3. BULGULAR	50
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	63
6. ÖZET	64
7. SUMMARY	65
9. KAYNAKLAR	66
8. ÖZGEÇMİŞ	92

SİMGELER VE KISALTMALAR

3-DG:	3-deoksiglukoz
ADA:	Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association)
AGE:	İleri Glikasyon Son Ürünü (Advanced Glycation Endproduct)
ALR1 :	Aldehit redüktaz
AR:	Aldoz Redüktaz
ARI:	AR inhibitörü
BKE:	Beden Kitle Endeksi
cPLA₂:	Sitozolik Fosfolipaz A ₂ (Cytosolic phospholipase A ₂)
DAG:	Diaçilgliserol
DCCT:	Diabetes Control and Complications Trial
DHAP:	Dihidroksiaseton fosfat
DMF :	Dimetil formamid
ECM:	Ekstrasellüler Matriks
eNOS:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ET-1:	Endotelin-1 (Endothelin-1)
F-3-P:	Fruktoz-3-fosfat
G-3-P:	Gliserol-3-fosfat
GA-3-P:	Gliseraldehit-3-P
GAPDH:	Gliseraldehit-3-P-dehidrogenaz
GR:	Glutasyon Redüktaz
GSH:	Redükte Glutasyon
GSSG:	Okside Glutasyon
HLA:	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
HNE:	Hekzanitroetan
ICA:	Adacık Hücre Antikorları (Islet Cell Antibodies)
IDDM:	İnsüline Bağımlı Diyabet (Insulin Dependent Diabetes Mellitus)
IFG:	Bozulmuş Açlık Glukozu (Impaired Fasting Glucose)
IGF-1:	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (Insulin-Like Growth Factor-1)
IGT:	Bozulmuş Glukoz Toleransı (Impaired Glucose Tolerance)

IL1:	İnterlökin1 (Interleukin 1)
MAP:	Mitojen Aktive Edici Protein
MGO:	Metilenglioksal
NADH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid (Redükte)
NAD+:	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP+:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (Redükte)
NFk-B:	Nükleer Faktör Kapa B (Nuclear Factor Kappa B)
NIDDM:	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet (Non-insulin Dependent Diabetes Mellitus)
NO:	Nitrik Oksit
Nox:	NADPH-Oksidaz
PAI-1:	Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1)
PKC:	Protein Kinaz C
ROS:	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SD:	Sorbitol Dehidrogenaz
TGF:	Dönüştürücü Büyüme Faktörü (Transforming Growth Factor)
TNF-α:	Tümör Nekroz Faktör- α (Tumor necrosis factor- α)
TGF-β1:	Dönüştürücü büyüme faktörü- β 1 (Transforming Growth Factor β 1)
TZD:	Tiazolidindion
VEGF:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
WHO:	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER

Şekil 1: Aldoz redüktaz enziminin temel yapısı.	2
Şekil 2 : Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesi.	2
Şekil 3: Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesindeki proton donörleri	3
Şekil 4: ALR1 (siyah şeritler) ile AR' ın (beyaz şeritler) gösterimi	7
Şekil 5: Poliöl yolağı	8
Şekil 6: Glikoliz ve poliöl yolağına giren glukozun akibeti	9
Şekil 7. Poliöl yolağında substrat olarak galaktoz	10
Şekil 8: Tip 2 diyabette pankreasın adacık hücrelerinde azalış	16
Şekil 9 : Hipergliseminin etkilediğı yolaklar	18
Şekil 10: Hiperglisemi ve endotelyal fonksiyon bozukluğu	19
Şekil 11. Poliöl yolağının diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi	25
Şekil 12: Poliöl yolağının diğler yolaklarla ilişkisi	26
Şekil 13: Aldoz redüktaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin NADPH kullanım yarışı	28
Şekil 14: Aldoz redüktazın detoksifikasyon reaksiyonlarındaki önemi	29
Şekil 15: Aldoz Redüktaz enziminin miyoinositol ve $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPaz}$ enzime etkisi	33
Şekil 16: Nitrik Oksit Sentezi	34
Şekil 17: AR inhibitörlerinin kimyasal yapıları	40
Şekil 18: 2 inhibitör maddenin aldoz redüktaz enzime bağlanması	42
Şekil 19: Protein Miktar Tayini Standart Grafiğı	50
Şekil 20: Aldoz redüktaz enzimi kontrol aktivite grafiğı	51
Şekil 21: Aldoz redüktaz enzimi bazal aktivite grafiğı	52
Şekil 22: İnhibitör maddeler ile aldoz redüktaz enziminin % aktivite değlerleri.	55
Şekil 23: 13. numaralı TZD türevi bileşiğinin, $3,3 \times 10^{-6} \text{ M}$, $0,33 \times 10^{-6} \text{ M}$ ve $0,033 \times 10^{-6} \text{ M}$ final konsantrasyonları ile aldoz redüktaz enzim aktivitesi.	58
Şekil 24: 13 numaralı TZD türevinin % inhibisyon grafiğı	58

ÇİZELGELER

Tablo 1: İnsan dokularında bulunan aldoz redüktaz miktarları	5
Tablo 2: Çeşitli substratlar için sıçan lensi AR ve ALR1 Km değerleri	10
Tablo 3: Tiyazolidindion türevi inhibitör maddelerin formülleri.	53
Tablo 3 Devam: Tiyazolidindion türevi inhibitör maddelerin formülleri.	54
Tablo 4: TZD türevleri ile aldoz redüktaz enzim aktiviteleri ve oluşturdıkları % inhibisyon oranları.	56

1. GİRİŞ

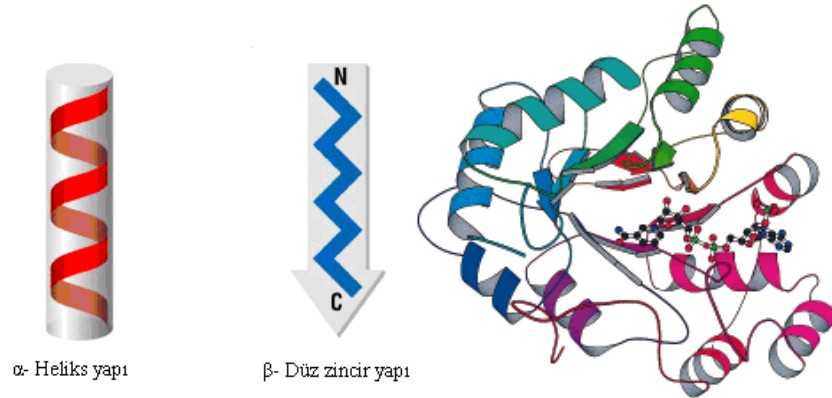
1.1 Aldo-Keto Oksidoredüktaz Süper Aile Üyesi : Aldoz Redüktaz Enziminin Yapısı ve Sınıflandırması

Aldo-keto redüktaz süper ailesi üyeleri ortalama 315-330 amino asitten oluşan genellikle monomerik yapıda proteinlerdir (Hara ve ark., 1983).

Aldo-keto redüktaz süper ailesi enzimleri, aldehit fosfolidiplerin redüksiyonu yoluyla pro-inflamasyon cevabın regülasyonu (Srivastava ve ark., 2004), prostaglandin sentezi (Hayashi ve ark., 1989; Matsuura ve ark., 1998) ve progesteron sinyalizasyonu gibi (Ji ve ark., 2004) in vivo steroidlerin modülasyon ve modifikasyonları dahil olmak üzere pek çok fonksiyondan sorumlu holoenzimlerdir (Hung ve Penning, 1999; Steckelbroeck ve ark., 2004).

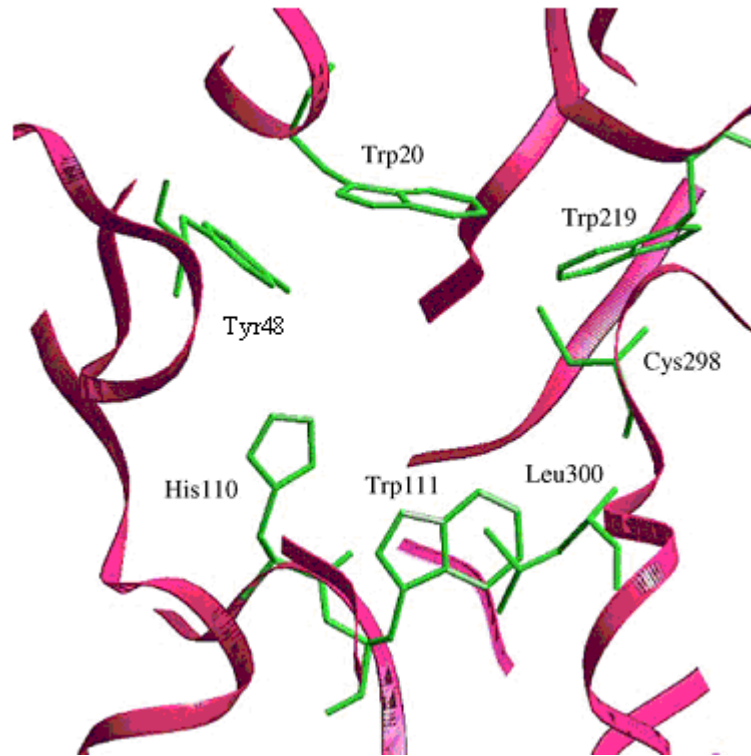
Aldo-keto redüktaz süper ailesinin bir üyesi olan aldoz redüktaz (Jez ve ark., 1997), substrattaki aldehit grubunun redüksiyonundan sorumlu, NADPH kofaktörüne bağımlı, poliol yolağının ilk enzimi olup (Hers, 1956) substrattaki karbonil gruplarının redüksiyonunu katalizlemektedir (Kador ve ark., 1987; Takahashi ve ark., 1993; Del Corso ve ark., 2000). Aldoz redüktaz (AR) enzimi, diyabetik komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Yabe-Nishimura 1998).

AR enzimi 316 amino asitten oluşan (MW: 36 kDa) bir enzimdir ve primer yapısı ilk kez sıçan lensinde tayin edilmiştir (Carper ve ark., 1989). AR proteini, aminoasitlerin β/α katlanması ile oluşmuş fiçı yapısındadır. (Costantino ve ark., 1999). (Şekil 1). Enzimin aktif bölümü fiçının iç kısmındaki hidrofobik bölümünde yer alır ve kofaktör NADPH bu boşluğa menteşe gibi bağlanmaktadır (Rondeau ve ark.1992). Nükleotit yapısındaki kofaktörün nikotinamid halkası fiçının iç kısmında, pirofosfat kısmı ise yapının kenarında yer almaktadır.



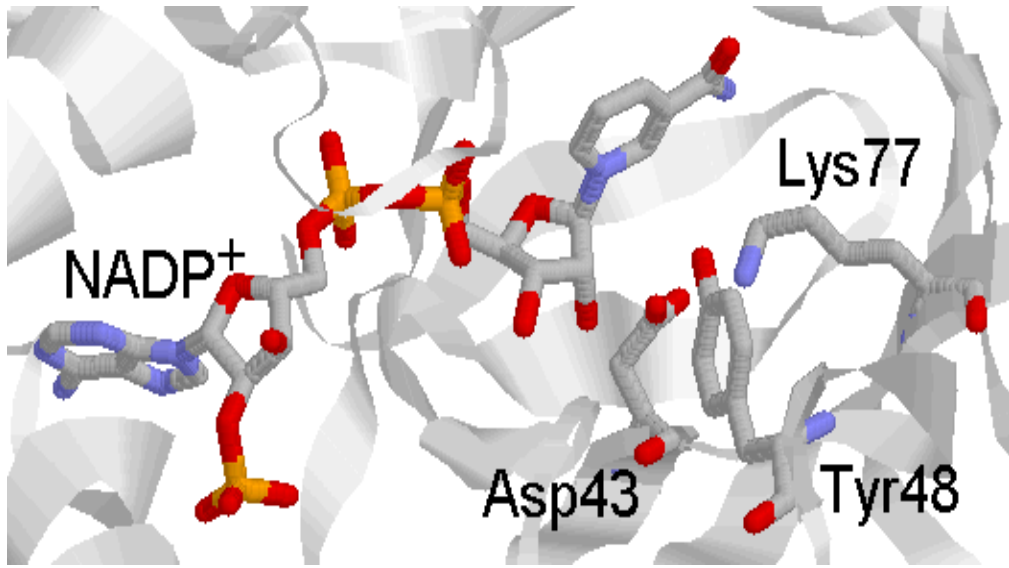
Şekil 1: Aldoz redüktaz enziminin temel yapısı (Costantino ve ark., 1999).

Yapılan mutajenik çalışmalar sonucunda, AR enziminin aktif kısmında, nikotinamit halkasının C4 atomundan uygun uzaklıkta (5-6Å) 3 adet potansiyel proton donörünün varlığı gösterilmiştir (Wilson ve ark. 1992; Tarle ve ark. 1993). Bu donörler Tyr 48 (tirozin), His 110 (histidin) ve Cys 298 (sistein)' dir. (Şekil 2).



Şekil 2 : Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesi. Enzimin protein omurgası pembe şeritlerle, aktif kısımlar yeşil renkle gösterilmiştir. (LiHong Hu ve ark., 2006). Aktif kısımda Tyr: tirozin, Trp: triptofan, Cys: sistein ve Leu: lösin kısa adları ile gösterilmiştir.

Mutajenik çalışmalarda Tyr 48, Phe (fenil alanin) ile değiştirildiği zaman enzim aktivitesinde 5000 kattan fazla düşüş gözlenmiştir (Tarle ve ark., 1993). Tyr 48, Lys 77 (lizin) ve Asp 43 (aspartat)' dan oluşan, proton bağlayan üç üyeli bir ağıncı parçasıdır. (Şekil 3). Tyr 48' in fenolik OH grubunun hidrojen bağlamada etkili olup, Lys 77 (lizin)' nin amino yan zincirinin proton transferini kolaylaştırdığı düşünülmektedir (Wilson ve ark., 1992, Tarle ve ark. 1993).



Şekil 3: Aldoz redüktaz enziminin aktif bölgesindeki proton donörleri (Gabbay KH., 2004). Asp: aspartat, Lys: lizin, Tyr: tirozin kısa adları ile gösterilmiştir.

Bir diğer proton donörü olan His 110, Asn (asparajin) ile değiştirilerek yapılan diğer bir mutajenik çalışmada, enzim aktivitesinde 14 kat düşüş gözlenmiştir (Tarle ve ark., 1993).

Aktif kısımdaki bir diğer potansiyel proton donörü olarak kabul edilen Cys 298' in Ala (alanin) ve Ser (serin) mutantlarında redüktaz aktivitesinde büyük değişiklik gözlenmemiştir (Petrash ve ark., 1992). Cys 298' in proton transferindeki yeri tam olarak bilinmemektedir.

AR, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ile bağlandığında konformasyonel değişime uğrar. Enzime substratın bağlanması ile nikotinamidin C4 atomundaki pro-R hidrojeni, substratın karbonil grubuna transfer olur. Bu proton transferi ile substratın ilgili alkol ürünü meydana gelir (Feldman ve ark, 1977; Flynn, 1982). Alkol ürün yapıdan ayrıldıktan sonra ikinci konformasyonel değişimle, proton kaybederek okside olan kofaktör (NADP⁺) serbest kalır (Grimshaw ve ark., 1990).

Okside koenzimin yapıdan ayrılma hızı, enzimin katalitik aktivite hızını artırıcı yönde etkilemektedir (Grimshaw ve ark. 1995). Bu reaksiyonların, enzimin "aktif olan" forma dönüşümü ile sonuçlandığı görülmüştür (Del Corso ve ark., 1989; Vander Jagt ve ark., 1990).

AR'ın substratla bağlanması, hidrojen bağlarından ziyade hidrofobik etkileşimler sonucunda gerçekleşmektedir (Rondeau ve ark., 1992; Wilson ve ark., 1992).

Karbonil bileşiklerinin redüksiyonundan sorumlu olan AR enzimi, substrat olarak serbest aldehitlerden çok, unsature aldehitlerin glutatyon konjugatlarında daha etkilidir. Yapılan çalışmalarda, redükte glutatyonun N-terminal ucundaki glutamatın ve C-terminal ucundaki glisinin, AR' ın aktif kısmı ile stabilize olduğu ileri sürülmüştür (Dixit ve ark., 2000). Lipid türevi aldehitlerden en çok bulunan ve toksik olan hekzanitroetan (HNE) ve bunun redükte glutatyon (GSH) ile bileşimi, AR için mükemmel substratlardır (Srivastava ve ark., 1998).

Bazı in vitro çalışmalar, lipit türevi aldehitlerin AR tarafından redüksiyonunun katalizlemesindeki yüksek verimliliğin, uzun alkil zincilerle etkileşen enzimin aktif kısmının hidrofobik özelliği ile ilgili olduğunu göstermektedir (Srivastava ve ark.,1999).

Schwann hücrelerinde eksprese olan AR enziminin, farklı doku ve türlerde kinetik ve yapısal özelliklerinin aynı olduğu tesbit edilmiştir (Nishimura ve ark., 1990). İnsanda plasenta, kas ve lens dokularından AR izole edilmiştir (Bohren ve ark., 1989). Pekçok dokuda bulunan AR, lens, beyin, karaciğer ve iskelet kasında yüksek konsantrasyonlarda bulunmuştur (Flynn ve ark., 1975; Wermuth ve ark., 1977). (Tablo 1).

Tablo 1: İnsan dokularında bulunan aldoz redüktaz miktarları (Tsuyoshi Tanimoto ve ark., 1998).

Doku	AR Miktarı (µg/mg protein)
Böbrek (medulla)	29.3
Siyatik sinirler	5.1
Lens	2.8
Testis	1.9
Kalp	1.7
Kornea	1.4
Karaciğer	0.8
Böbrek (korteks)	0.7
Mide	0.7
Dalak	0.7
Akciğer	0.5
İnce bağırsak	0.4
Kolon	0.4

Biyokimyasal çalışmalarda kullanılan E.coli bakteriyel sistem rekombinant AR'ı ile dokulardan veya hücre kültürlerinden elde edilen AR'ın aynı kinetik ve yapısal özellikleri gösterdiği, yapılan çalışmalarda tesbit edilmiştir (Nishimura ve ark. 1990; Old ve ark., 1990; Bohren ve ark., 1991; Petrash ve ark., 1992).

Sıçan ve insan AR'ı, amino asit dizilişleri bakımından yüksek benzerlik göstermektedir (Carper ve ark., 1987; Nishimura ve ark., 1990; Pailhoux ve ark., 1990; Fabre ve ark., 1994). Biyokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler, insan ve sıçan böbreğinde AR dağılımının benzer olduğunu göstermiştir (Terubayashi ve ark. 1989). AR enziminin mRNA' sının sıçan böbrek medullasında, kortekse kıyasla daha fazla eksprese edildiği gösterilmiştir (Nishimura ve ark. 1988).

Aldo-keto oksidoredüktaz süper ailesi üyesi AR'ın (Alditol:NAD(P)⁺ 1-oksidoredüktaz) (Flynn, 1982) kısa adı ALR2' dir. Enzim komisyonu numarası E.C 1.1.1.21 dir (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB), 2006). EC numarasındaki ilk rakam (1), hidrojen, oksijen veya elektronların bir substrattan diğerine transferini katalize eden enzimlere verilen numaradır. İkinci rakam (1) ise proton hareketinin donörün CH-OH grubunda olduğunu, üçüncü rakam (1) ise reaksiyonun NAD(P)H bağımlı olduğunu göstermektedir (IUBMB, 2006).

Aldo-keto oksidoredüktaz süper ailesinin bir başka üyesi olan aldehit redüktaz (ALR1 yada AKR1B10), AR ile yüksek derecede yapısal benzerlik göstermektedir (Cao ve ark., 1998). Bu protein, 316 amino asitten oluşur, AR ile benzer büyüklükte ve aminoasit dizilişi %71 oranında benzerlik göstermektedir. (Şekil 4).

Aldehit redüktaz, AR gibi beyin, böbrek, karaciğer, lens ve iskelet kasından izole edilmiş ve saflaştırılmıştır (Tabakoff ve Erwin, 1970; Flynn ve ark., 1975.). Ancak, lens dokusunda AR'ın konsantrasyonu yüksek, ALR1' in konsantrasyonu düşüktür. Sıçan lensinde, redüktaz ailesi enzimlerinden ağırlıklı olarak AR bulunurken, ALR1, total redüktaz proteinlerinin % 0,6' sından azdır (Herrmann ve ark., 1983; Shiono ve ark., 1987).

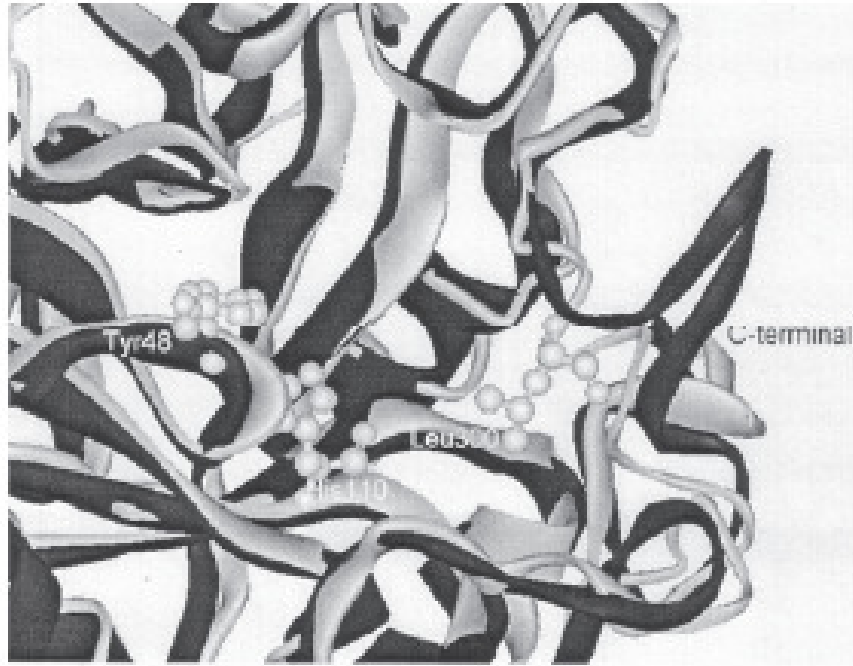
ALR1 substrat olarak alifatik aldehitlerden çok aromatik aldehitleri tercih etmektedir (Wermuth ve ark., 1977; El-Kabbani ve ark. 2005). ALR1 heksozlar üzerine daha az etki etmektedir.

ALR1, birincil olarak ince barsaklarda ve kolonda eksprese edilir, düşük mRNA seviyeleri ile karaciğer, timus, prostat ve testislerde bulunur. ALR1 ağırlıklı olarak ince barsak ve kolonda bulunur ve hazmedilen besinlerdeki toksik aldehitlerin organlara gönderilmeden önce inaktive edilmesinden sorumludur (Cao ve ark., 1998).

Aldoz redüktaz-benzer-1 protein olarak da adlandırılan ALR1' in kanserle ilişkisi gösterilmiştir (Cao D ve ark., 1998). Bir diğer çalışmada ise, tümör oluşturan memeli epitel hücrelerindeki ALR1' in, hücre membranının önemli bir bileşeni olan yağ asiti sentezi regülasyonunu sağladığı rapor edilmiştir (Ma ve ark., 2008).

Sıçan lensi AR'ının substratı olan DL-gliseralehit' in K_m değeri 0,08 mM iken, sıçan lensi ALR1' in DL-gliseralehit için K_m değeri 6,2 mM' dir (Sato ve Kador, 1989). (Tablo 2).

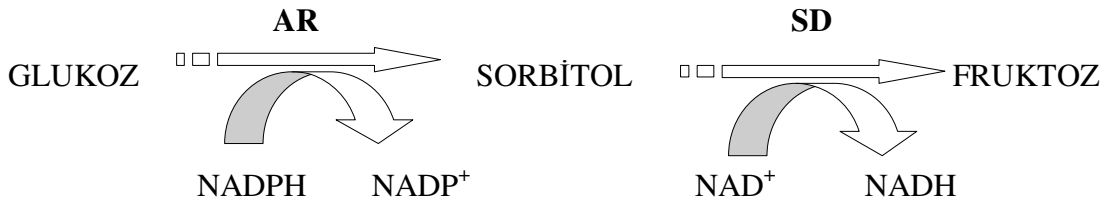
İki enzimin yapısı, C-terminalinin uç kısımları dışında birbirine çok benzemektedir. AR enziminden farklı olarak, ALR1 enziminin aktif kısmındaki C-terminali sonunda Leu 300 bulunmaktadır (El-Kabbania ve Podjarny, 2007). (Şekil 4).



Şekil 4: ALR1 (siyah şeritler) ve AR' ın (beyaz şeritler) gösterimi (El-Kabbania ve Podjarny, 2007).

1.2. Poliöl Yolağı

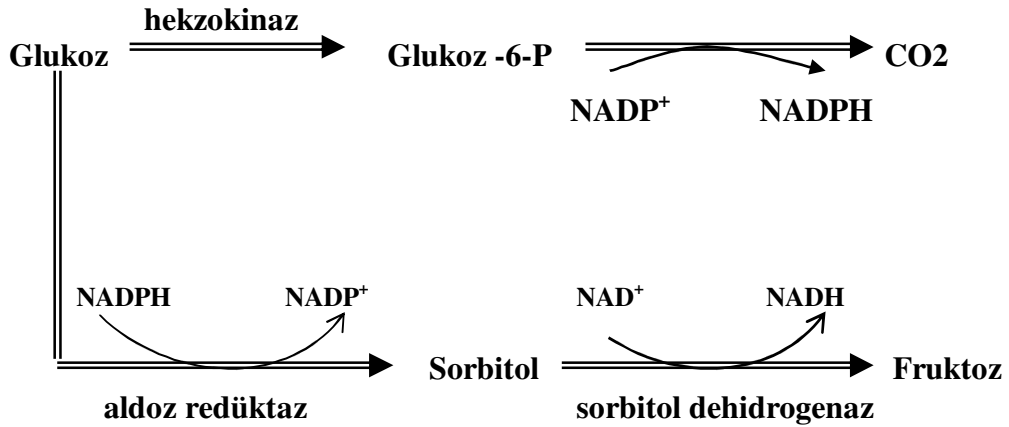
AR, poliöl yolağında bulunan, NADPH varlığında glukozu sorbitole dönüştüren ilk enzimidir. Poliöl yolağındaki diğeri bir enzim ise sorbitol dehidrogenaz (SD) enzimidir. SD şeker alkolün (sorbitol) fruktoza dönüştürümünü NAD^+ bağımlı olarak katalizler (Hers, 1956). (Şekil 5).



Şekil 5: Poliöl yolağı (El-Kabbani, 1998).

1956 yılında Hers, sperm hücrelerinin enerji kaynağı olarak, poliöl yolağı ile glukozun fruktoza dönüştürümünü seminal kesede göstermiştir (Hers, 1956; Kador ve ark., 1986; Bhatnagar ve Srivastava, 1992). Fare testisinde yüksek miktarda AR mRNA' sı tesbit edilmiş olup, fazla miktarda AR enziminin testis metabolizmasında önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gui ve ark., 1995). Poliöl yolağına varlığı daha sonra diyabetik sıçan lensinde de gösterilmiştir (Van Heyningen, 1959).

Normal şartlarda poliöl yolağına giren glukoz, toplam glukozun % 0,1' inden azdır (Vander Jagt ve ark., 1988; Petrash ve ark., 1992). Glukozun büyük bölümü heksokinazlarla fosforillenerek glukoz-6-fosfata dönüştür ve glikoliz reaksiyonu ile metabolize olur (Beyer ve Hutson, 1986; Cardenas ve ark., 1998). (Şekil 6).

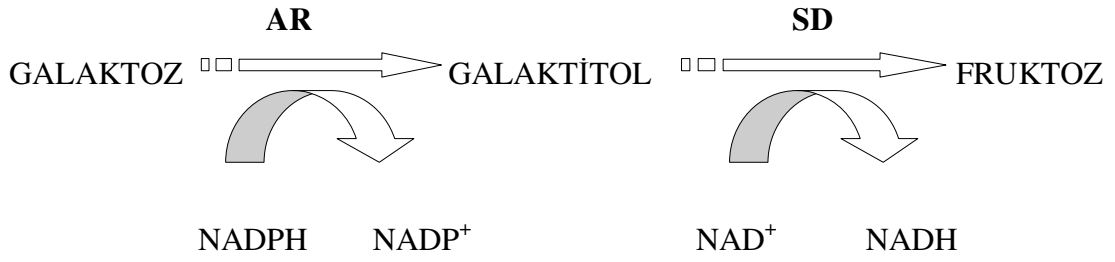


Şekil 6: Glikoliz ve poliol yolağına giren glukozun akibeti (González ve ark., 1984).

Normal glukoz düzeylerinde AR enziminin rolü tam olarak bilinmemekle beraber, testis metabolizmasında enerji kaynağı olarak önemli rolü olduğu düşünülmektedir (Gui ve ark., 1995).

Hiperglisemi durumunda ise glukoz poliol yolağına yönelerek bu yolağın aktivitesini artırır. Hiperglisemide total glukozun 1/3' ü poliol yolağı ile metabolize olmaktadır (Gonzales ve ark. 1984). Sinir ve lens gibi bazı dokularda total glukozun %33'ü poliol yolağı ile metabolize olduğu gösterilmiştir (Cheng ve Gonzalez, 1986).

Poliol yolağının ilk enzimi olan AR substrat olarak aromatik ve alifatik aldehytleri kullanır. AR enziminin hücre içi temel substratı glukoz ve galaktozdur (Vander Jagt ve ark., 1995). Substrat olarak glukoz kullanıldığında sorbitol, galaktoz kullanıldığında ise galaktitol meydana gelir. (Şekil 7). Ancak, meydana gelen galaktitol, sorbitol dehidrogenaz (SD) enzimi için iyi bir substrat değildir (Kinoshita ve ark. 1963). Bu nedenle, diyabette galaktitol, sorbitolden daha hızlı birikir (Jedziniak ve ark. 1973).



Şekil 7. Poliöl yolağında substrat olarak galaktoz (Kinoshita ve ark. 1963; Gabbay ve ark., 1966).

Hiperglisemide, AR enzimine substrat olan heksozlar ile triöz şekerler kıyaslandığında, heksoz şekerlerin K_m değerinin triöz şekerlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu nedenle, aldoheksozlardan oluşan triözler, düşük K_m değerleri ile AR için mükemmel substratlardır (Vander Jagt ve ark., 1995). (Tablo 2).

Tablo 2: Çeşitli substratlar için sıçan lensi AR ve ALR1 K_m değerleri (Sato ve Kador, 1989).

Substrat	Sıçan lens ALR1	Sıçan lens AR
	K_m (mM)	K_m (mM)
DL-Gliseraldehit	6.2	0.08
D-Glukuronat	6.1	19.2
L-Gulonat	10.0	
D-Ksiloz	749	13.5
D-Glukoz	>2000	204
D-Galaktoz	>2000	83

Glukoz, AR için zayıf bir substrat olmasına rağmen, renal dokularda bulunan enzim, diürez sırasında ozmotik dengenin ayarlanabilmesi için sorbitol oluşturur (Burg ve ark., 1997).

Ayrıca son çalışmalarda, AR enziminin, lipid peroksidasyonu türevi aldehitlerin ve onların glutatyon konjugatlarının redüksiyonunu katalizlediği gösterilmiştir (Srivastava ve ark., 1995; Ramana ve ark., 2000).

Kalp, kan damarları, iskelet kası ya da beyin gibi dokularda AR' ın aşırı ekspresyonunun, glukoz metabolizması ve ozmotik regülasyondan başka; aşırı demir yüklemesi (Barisani ve ark., 2000), alkolik karaciğer hastalıkları (O'Connor ve ark., 1999), kalp yetmezliği (Yang ve ark., 2000), miyokardial iskemi (Shinmura ve ark., 2000), vasküler inflamasyon (Rittner ve ark., 1999), restenoz (damar genişletilmesi) (Ruef ve ark., 2000) gibi proseslerle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Ramana ve ark., 2002).

Diyabetin kronik komplikasyonları ve AR' ın aşırı ekspresyonu arasındaki bağlantı ile ilgili çok sayıda araştırma ve yayın bulunmaktadır (Yabe-Nishimura, 1998; Costantino ve ark., 1999; Kaul ve Ramarao, 2001). Diyabetik komplikasyonların majör hedef dokuları; lens (Kinoshita, 1965), retina (Nishimura ve ark., 1988b), arterial duvarlar (Bhatnagar ve ark., 2001) ve siyatik sinirlerdir (Gabbay ve ark., 1966).

1.3. Hiperglisemi ve Aldoz Redüktaz Aktivasyonu

1.3.1. Diabetes Mellitus

Diyabet, insülin sekresyonu ve/veya aktivitesinin yokluğu ya da her ikisinin mutlak veya göreceli azlığı durumunda meydana gelen, yüksek glukoz düzeyi (hiperglisemi) ile karakterize metabolik bir sendromdur (Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of the Diabetes Mellitus, 2001; American Diabetes Association, 2004). Diyabetin temel nedeni, dolaşımdaki insülinin eksikliği ve/veya periferel dokuların insüline yanıt verme yeteneğinin azalmasıdır (insülin rezistansı).

Diyabetin başlıca kronik belirtileri; aşırı idrara çıkma (poliüri), aşırı susama (polidipsi), aşırı yeme (polifaji), glukozüri, ketonüri ve açıklanamayan kilo kaybıdır. Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association- ADA) bu klinik semptomlarla beraber venöz plazmada 200 mg/dl ve üzerinde glukoz bulunması veya 10-12 saatlik açlık glukozun 126 mg/dl ve üzerinde olması durumunu diyabet olarak tanımlamıştır (ADA, The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

ADA, açlık kan glukoz düzeyi 110 – 126 mg/dl arasında olan bireyler için ‘Bozulmuş Açlık Glukozu’ (Impaired Fasting Glucose IFG) tanımını yapmıştır (American Diabetes Association (ADA), 1997).

Oral glukoz testinde, 2. saat plazma glukoz düzeyinin 140-200 mg/dl arasındaki değerleri için ‘bozulmuş glukoz toleransı’ (IGT) adı verilmiştir (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997; ADA, 2004).

Tip 1 diyabetin artışıdaki nedenler tam olarak bilinmemekle beraber, tip 2 diyabetin hızlı ve dramatik artışına genetik nedenlerden çok, yaşlanma, obezite, hareketsiz yaşam gibi diğer faktörlerin katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Davis ve ark, 2001).

Diyabetin sınıflandırılması (WHO, 1985; ADA, 2004b):

A. Diyabet

- Tip 1 diyabet
 1. İmmünolojik
 2. İdiyopatik
- Tip 2 diyabet
 1. Non-obez
 2. Obez
 3. Gençlerde Erişkin Başlangıçlı Diyabet
- Malnutrisyonla ilgili diyabet
- Bazı hastalıklar sonucu oluşan ve diğer durumlarla ilgili diyabet türleri
 1. Pankreas hastalıkları
 2. Hormonal bozukluklarla ilgili hastalıklar
 3. İlaçlara ve diğer kimyasal maddelere maruziyet
 4. İnsülin veya reseptörünün yapısındaki bozukluklar
 5. Bazı genetik sendromlar
 6. Diğer nedenler:
 - a. Beta hücre fonksiyonlarında genetik bozukluk sonucu oluşan diyabet
 - b. İnsülin fonksiyonlarında genetik bozukluk sonucu oluşan diyabet
 - c. Endokrinopatiler sonucu oluşan diyabet
 - d. Enfeksiyonlar sonucu oluşan diyabet

B. Bozulmuş Glukoz Toleransı (Impaired Glucose Tolerance (IGT))

- Non-obez kişilerde görülen
- Obez kişilerde görülen
- Bazı durumlar ve sendromlarla ilgili diyabet

C. Gestasyonel Diyabet (Gestational Diabetes Mellitus (GDM))

1.3.1.1 Tip 1 Diyabet

Tip 1 diyabette, insülin salgılayan pankreasın adacık beta hücrelerinin, genetik faktörler, insan lökosit antijeni ve çevresel nedenlerle, T-lenfosit ve makrofajların otoimmün saldırısı sonucu harabiyeti meydana gelmektedir (ADA, 1997). Pankreastaki bu harabiyet sonucu, tip 1 diyabetli bireylerde insülin sekresyonu yetersiz ya da tamamen yoktur. Buna bağlı olarak serum glukoz düzeyleri normalden yüksektir.

Tip 1 diyabetin etiyolojisinde genetik, çevresel ve otoimmün faktörler rol oynar. Genetik yatkınlık, virüsler, fiziksel uyarıcılar ve stres gibi dış etkenler hastalığı tetikleyerek insülin salgılayan pankreasın beta adacık hücrelerine otoimmün saldırı başlatmaktadır. Bu harabiyetin patolojik görünümüne ‘insülitis’ denir. Tip 1 diyabet, 5-10 yıllık bir sürecin sonucunda ortaya çıkar (Haller ve ark., 2005).

Tip 1 diyabetli bireyler yaşamlarını sürdürebilmek için insüline bağımlı olduklarından ‘İnsüline Bağımlı Diyabet’ (Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM)) olarak da bilinmektedir.

Tip 1 diyabet insidansı, çocuklar ve genç erişkinlerde daha fazla olduğu için ‘Gençlik Diyabeti’ (Juvenil Onset Diabetes Mellitus) olarak da adlandırılır. Tip 1 diyabet, her yaş grubunda görülmekle beraber en sık 7-15 yaşları arasında görülür (Alemzadeh ve Wyatt, 2004). Tip 1 diyabet, % 75 oranında 30 yaş öncesinde başlamasına karşın yaş faktörü sınıflandırmada kriter değildir.

ADA’ nın 2003 yılında yaptığı etiyolojik sınıflandırmaya göre, tip 1 diyabet immünolojik ve idiyopatik olarak 2 gruba ayrılır.

İmmünolojik diyabette, insülin salgılayan pankreasın beta adacık hücrelerinin otoimmün saldırısı sonucu % 80-90' ının harabiyeti söz konusudur. İmmünolojik tip 1 diyabet; aşırı susama hissi (polidipsi), aşırı miktarda idrara çıkma (poliüri), insülin yetersizliğine bağlı olarak kanda ve idrarda keton cisimciklerinin artışına bağlı gelişen koma benzeri asidoz tablosu (ketoasidoz), insülin eksikliği sonucu glukoz kullanımının bozulmasına bağlı olarak yağ dokusunda lipoliz, karaciğer ve iskelet kasında protein yıkımının artması sonucu kilo kaybı ile kendini gösterir.

İdiyopatik diyabete (Tip1B), daha çok etnik ırklarda görülmektedir (Pinero-Piloni, ve ark., 2001). İmmün aracılı tip 1 diyabete kıyasla daha az görülmektedir. Bu bireylerde, adacık hücre antikoru (ICA) negatif olmasına karşın insülin yetersizliği söz konusudur, etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. İdiyopatik tip1 diyabet hastalarının yaşamlarını sürdürebilmeleri için insülin tedavisi gerekmektedir (The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 1997).

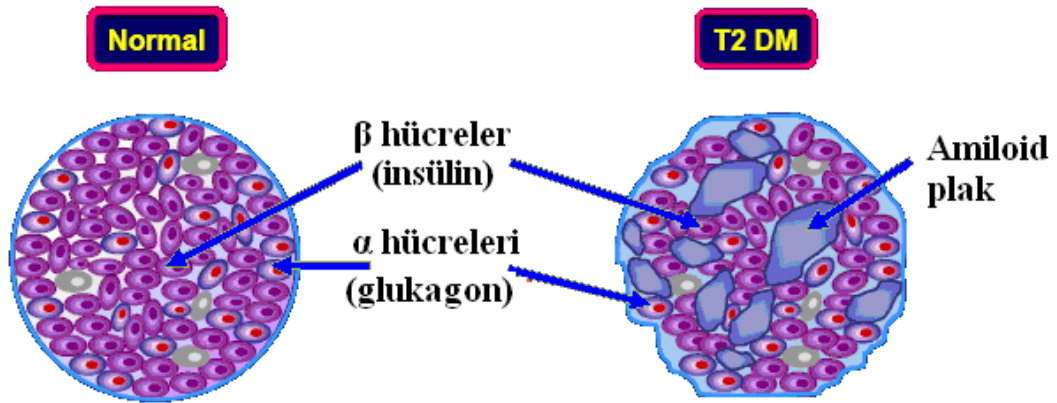
1.3.1.2. Tip 2 Diyabet

İnsülin yetersizliği ve/veya insüline bağımlı olan kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda, insüline yanıt verme yeteneğinin azalması (insülin direnci) tip 2 diyabet gelişimine neden olur (Patricia ve ark., 2003). İnsülin direnci, tip 2 diyabette meydana gelen komplikasyonların en önemli nedenidir (Gilligan ve Spector, 1984).

Normal şartlarda insülin, plazmadaki glukozun, okside olarak enerji üretiminde kullanmak veya glikojen şeklinde depolanmak üzere kas ve yağ dokusu gibi periferik dokulara taşınmasını sağlar. Aynı zamanda, insülin karaciğerdeki glikojenoliz (glikojen yıkımı) ve glukoneogenezi (glukoz yapımı) baskılayarak hepatik glukoz üretimini engeller (Donkin ve ark., 1997).

İnsülin direncinin gelişmesi durumunda, periferik dokularda direnç oluşarak kas ve yağ dokusundaki insülin aracılı glukoz kullanımı azalmakta, karaciğerdeki glukoz supresyonu bozulmaktadır. İnsülin direncine karşı, plazma glukoz düzeyinin yükselmemesi için pankreas beta hücreleri normalden 1,5-2 kat daha fazla insülin üretilmektedir. İnsülin direncinde, pankreasın daha fazla çalışarak normal glukoz düzeyini sağlanması, zamanla beta hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olmakta ve buna bağlı olarak insülin sentezi azalarak tip 2 diyabet ortaya çıkmaktadır (Ferrannini ve ark., 1987; Hollenbeck ve Reaven, 1987).

Tip 2 diyabette, pankreasta amiloid plakların oluşması ile β hücre sayısının azalması sonucunda insülin sekresyonunda yetersizlik meydana gelir (Rhodes, 2005). (Şekil 8).



Şekil 8: Tip 2 diyabette pankreasın adacık hücrelerinde azalış (Rhodes, 2005).

Diyabetik hastaların % 90' ı tip 2 diyabetlidir. Tip 2 diyabet genellikle orta yaş ve üzeri bireylerde görüldüğü için erişkin başlangıçlı diyabet de denmektedir. Tip 2 diyabetin gelişiminde, obezite, genetik faktörler, yaşlanma, stres ve hareketsiz yaşam şekli önemli risk faktörleridir (Sacks, 2005).

Tip 2 diyabetin gelişiminde önemli rolü olduğu düşünülen genetik yatkınlık monozigot ikizlerde (%90) ve Amerikan Pima yerlilerinde gösterilmiştir (Watkins ve ark, 1996). Birinci derece akrabalarında tip 2 diyabetin olması, bireylerin diyabet riskini % 45- 80 oranında artırmaktadır (ADA, 2000).

Tip 2 diyabetin gelişiminde bir diğer risk faktörü de obezitedir. Beden kitle endeksi (BKE) arttıkça diyabet gelişim riskinin arttığı saptanmıştır. BKE' den başka vücuttaki yağ kitlesi miktarının diyabet gelişiminde etkili olduğu, düzenli egzersizin diyabet gelişimini önemli oranda azalttığı ortaya konmuştur (Zimmet ve ark, 1990; WHO, 1999).

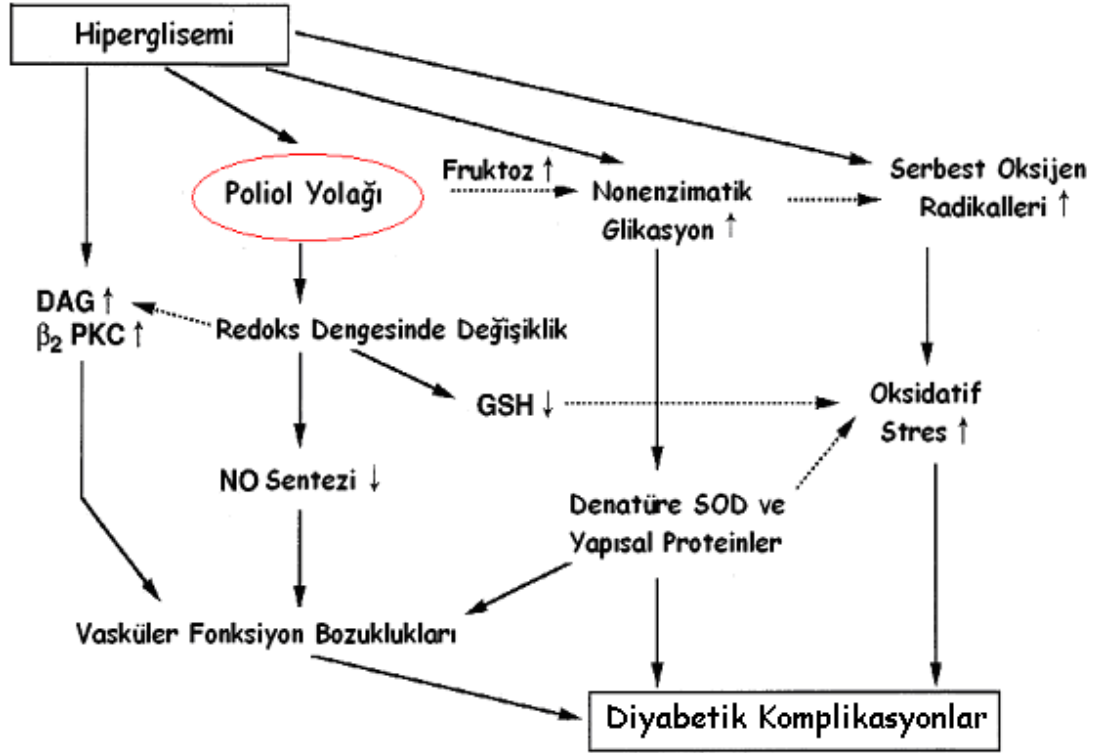
Tip 2 diyabetli bireylerde obezite sıklıkla görülür. Besin diyeti ve kilo kontrolü ile hiperglisemi kontrol altına alınabilmektedir. Ancak, bazı tip 2 diyabetli bireylerde diyetin yanı sıra, oral hipoglisemik ajanlara veya insüline de gerek duyulabilmektedir.

Tip 2 diyabette plazma glukoz düzeyinin yükselmesi, hepatik glukoz supresyonunun bozulmasından kaynaklanır. Karaciğerde glikojenoliz ve glukoneogenez ile glukoz üretimi artar. Glukoneogenezdeki artışın hepatik insülin direnci ve laktat gibi prekürsörlerin artışı ile ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Mithieux ve ark., 1996). Buna bağlı olarak gelişen hiperglisemi endotelial fonksiyon kayıplarından sorumlu tutulmaktadır (Hsueh ve Law, 1998; Jiang ve ark., 1999).

1.3.2. Diyabetik Komplikasyonlar

Diyabet dünyada 180 milyondan fazla insanı etkileyen, Türkiye' de ve dünyada ölüm nedenleri arasında üçüncü sırayı alan önemli bir sağlık sorunudur. 2025 yılında diyabet görülme sıklığının hızla artarak ikiye katlanacağı tahmin edilmektedir (Sicree ve ark., 2003).

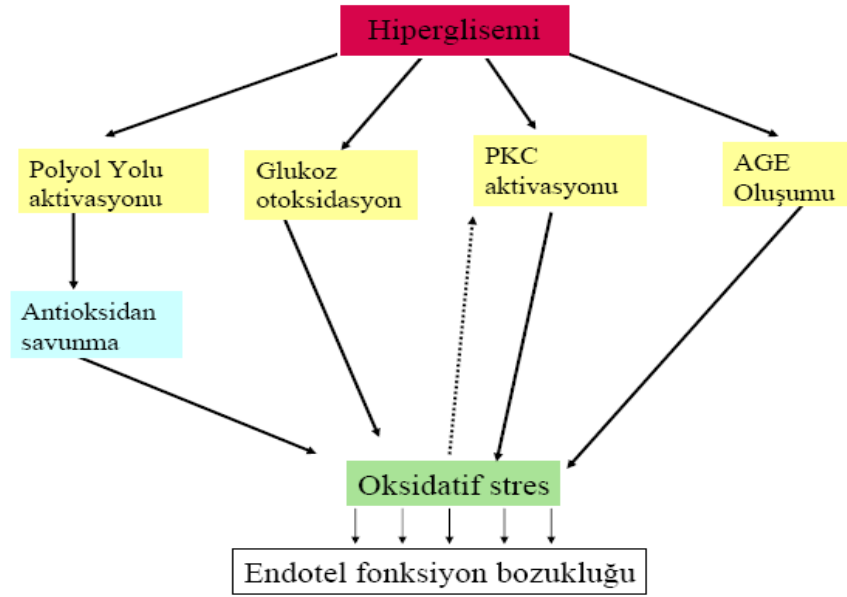
Diyabette vasküler komplikasyonların gelişiminde majör risk faktörü hiperglisemidir. Hiperglisemi bazı yolların aktivitesini arttırarak ve bu yolların birbiriyle olan etkileşimlerini değiştirerek vasküler fonksiyon kaybına neden olmaktadır (UKPDS Research Group, 1998; Temelkova-Kurktschiev ve ark., 2000). (Şekil 9).



Şekil 9 : Hipergliseminin etkilediği yollar (Yabe-Nishimura, 1998).

Bu yollar; polioli yolağı (Zimmet ve Alberti, 2001; Oates, 2008), glukoz oksidasyonu (Lipinski, 2001; Ostenson, 2001; Jakus ve Rietbrock, 2004), PKC aktivasyonu (Brownlee, 2001), nonenzimatik glikasyon ve ileri glikasyon ürünleri (AGE) oluşumudur (Chappey ve ark., 1997; Yamagishi ve Takeuchi, 2004).

Bu yolların aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres endotel fonksiyon bozukluklarına yol açmakta ve bunun sonucunda pek çok vasküler komplikasyon oluşmaktadır (UKPDS Research Group, 1998; Temelkova-Kurktschiev ve ark., 2000). (Şekil 10).



Şekil 10: Hiperglisemi ve endotelial fonksiyon bozukluğu (UKPDS Research Group, 1998; Temelkova-Kurktschiev ve ark., 2000).

İntrasellüler hiperglisemi, NO gibi vazodilatör aktivitenin azalmasına, anjiyotensin II ve endotelin-I (ET-1) gibi vazokonstriktörlerin ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi permeabilite faktörlerinin artmasına neden olur. Bunun sonucunda, vasküler permeabilitede artış ve kan akış hızında değişiklikler meydana gelerek kardiyovasküler hastalıklar (Jay ve ark., 2006) başta olmak üzere pek çok diyabetik komplikasyonlar meydana gelir.

Diyabetin zararlı etkileri makrovasküler ve mikrovasküler olmak üzere ikiye ayrılır. Makrovasküler komplikasyonlar: ateroskleroz, koroner, serebrovasküler ve periferel damar hastalıkları ve diyabetik ayakdır. Mikrovasküler komplikasyonlar ise: retinopati (Robison ve ark., 1983; Engermann ve Kern, 1984), katarakt (Nishimura ve ark., 1988b), nöropati (Yue ve ark., 1982; Nishimura ve ark., 1987; Malik, 2003) ve nefropatidir (The Diabetes and Complication Trial Reserch Group, 1993; Pickup ve Williams, 1997).

1.3.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar, hiperglisemi sonucu vasküler fonksiyon kaybına bağlı olarak gelişen damar hastalıklarıdır. Diyabetik komplikasyonlar arasında kardiyovasküler hastalıklar birinci sırada gelmektedir (National Diabetes Group, 1995). Tip 2 diyabetli bireylerin %70' inin ölüm nedeni kardiyovasküler hastalıklardır (Laasko, 1999). Diyabete bağlı kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde glisemik kontrolün yararlı olduğu görülmüştür (Carroza ve ark., 1993).

Ateroskleroz, arterlerde 'aterom' ya da plak denilen lezyonların oluşumu ile gelişen, damar sertleşmesi olarak adlandırılan bir damar hastalığıdır. Diyabette, endotel hücrelerdeki fonksiyon kaybı sonucu NO gibi vazodilatör ajanların, antikoagülan faktörlerin, inflamatuvar sitokinlerin eksikliği, ateroskleroz gelişimine neden olur (Davignon ve Ganz, 2004; Ajjan ve Grant, 2006).

Hiperglisemi ile artan oksidatif stres okside LDL oluşumunu artırarak, ateroskleroz riskini artırmaktadır (Davignon ve Ganz, 2004; Madamanchi ve ark., 2005).

Diyabet ve kontrolsüz hiperglisemiye ek olarak; hiperlipidemi, hipertansiyon, sigara kullanımı ve ileri yaş, periferik dokularda periferik damar hastalıklarının gelişiminde önemli risk faktörleridir (Cooper ve ark, 1997; Armstrong ve ark., 1998).

Diyabette kontrolsüz hiperglisemiye bağlı olarak gelişen kan akışındaki bozulma sonucu, serebrovasküler fonksiyon bozukluklar ve serebral damar hasarları meydana gelmektedir (Mankovsky ve ark, 1996; Cippolla ve ark, 1997).

Diyabette karşılaşılan en önemli komplikasyonlardan biri de, diyabetik ayak veya diyabetik ayak ülseridir. Diyabetik ayak; diyabetik nöropati, enfeksiyon ve vasküler fonksiyon bozukluklarının bir sonucu olarak ortaya çıkar. Ayakta ağrı hissi, vibrasyon ve pozisyon belirleyememe gibi semptomlar görülür. Vasküler fonksiyonların azalmasıyla kan akışındaki azalma, ayakta açılan yaraların iyileşme sürecini uzatır. Vasküler yetersizlik dokuda oksijen yetersizliğine neden olur. İskemiyle beraber diyabetik ayak ülseri veya gangren gelişir (Linger ve Foster, 1988).

1.3.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonları, kontrolsüz hipergliseminin görülmesinden 15-20 yıl sonra ortaya çıkar. Uzun vadede kontrolsüz hiperglisemiye bağlı olarak; bazal membran kalınlaşması, kan akışı ve viskozitesinde artış, kapiller permeabilite ve trombosit fonksiyonlarında bozukluk sonucu mikroalbuminüri, mikrotrombus (küçük damarlara fibrinin çökmesi) ve iskemik hasar meydana gelmektedir. Sonuçta, diyabete bağlı periferik nöropati (Oates, 2002), retinopati (Reddy ve ark., 2008), katarakt gelişimi (Lee ve ark., 1995) ve nefropati (Sato, 1992) gelişmektedir.

1.3.2.2.1. Diyabetik Retinopati ve Katarakt Gelişimi

Poliol yolağı aktivasyonuna bağlı olarak aşırı sorbitol birikimi, retinopati, katarakt, nöropati ve nefropatinin patogenezinin sorumlu tutulmaktadır. (Reeves ve Cammarata, 1996, Srivastava ve ark., 2005).

Diyabetik retinopati ilk olarak Eduard Jaeger tarafından 1855 yılında tanımlanmıştır (Fischer, 1957; Wolfensberger ve Hamilton, 2001). Deneysel model olarak lenstekli AR'a bağlı katarakt gelişimi ilk defa sıçanlarda gösterilmiştir (Kinoshita ve Nishimura, 1988).

Diyabetik retinopati, gözyaşı yapımında ve kornea hassasiyetinde azalma, kornea endotelinde değişiklikler, yara iyileşmelerinde gecikme ve katarakt gibi komplikasyonlarla kendini göstermektedir (Davidson, 1991).

Van Heyningen, hipergliseminin indüklediği poliol yolağı ile yüksek miktarda sorbitol ve galaktitol oluşumunun katarakt gelişimini stümüle ettiğini göstermiştir. Glukozun redüksiyonu ile biriken sorbitol ozmotik artışa, membran permeabilitesinde değişikliklere ve ardından katarakt oluşumuna neden olmaktadır (Van Heyningen, 1959).

Diyabetik bireylerde körlüğün primer sebebi retinopatidir. Diyabetik retinopatide de major risk faktörü hiperglisemidir (DDCT Research Group, 1993 ve 1995; UKPDS Research Group, 1998). Lensde sorbitol birikimine bağlı gelişen ozmotik stres nedeniyle lentiküler opasite oluşur ve katarakt gelişir (Wynngaarden ve Smith, 1988).

Kronik hiperglisemi, diyabetik retinopatide vasküler hasara neden olmaktadır. Diyabetik retinopati, retinal mikrovasküler hücrelerinin (perisit) kaybı sonucu oluşmaktadır. Perisitlerdeki kayıp endotelial hücrelerin aşırı çoğalmasına (proliferizasyon) ve bazal membran kalınlaşmasına neden olur (Chappey ve ark., 1997; Yamagishi ve Takeuchi, 2004). Lens proteinlerinin glikasyonu sonucunda proteinlerin çözünürlüklerinde değişiklik meydana gelmektedir. Çözünürlüğü azalan proteinler yüksek molekül ağırlıklı partiküllerin oluşumuna neden olarak lens opaklaşır ve katarakt gelişir (Perry ve ark., 1987). Lens proteinlerinin oksidasyonu da katarakt oluşumunda önemlidir ve antioksidan vitaminlerin katarakt oluşumunu azalttığı gösterilmiştir (Jacques ve Chylack, 1991).

Normal lensteki sistein ve sistin miktarı, kataraktlı bireylerde değişiklik göstermektedir. Kataraktlı lenslerde sistein azalırken, sistin miktarında artış gözlenmiştir (Takemoto ve Azari, 1976).

1.3.2.2.2. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati, diyabetin periferik ve otonom sinir sistemi üzerindeki komplikasyonudur (Apfel, 1999). Nöropati prevalansı diyabetin süre ve şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Diyabetik nöropatinin patogeneğinde, hiperglisemiye bağlı olarak AR aktivitesinde artış, oksidatif stres ve protein glikasyonu görülmektedir (Yasuda ve ark., 2003). Ayrıca, endonöral mikrovasküler komplikasyonlar, kapiller bazal membran kalınlaşması ve tromboz da meydana gelmektedir. İnsülin yetersizliğine bağlı hiperglisemi, nörovasküler kan akışında azalmaya neden olarak sinir hücrelerinde iskemi oluşturmaktadır. İskemi sinir liflerinde dejenerasyona neden olmaktadır (Sheetz ve King, 2002; Van Dam, 2002). Glisemik kontrol diyabetik nöropatinin gelişmesini önlemede etkilidir (DCCT Research Group, 1993).

Endonöral mikrovasküler dokularda ve nöral liflerde aşırı glikasyon ve (ileri glikasyon ürünleri) AGE'nin oluşması periferik nöropatinin gelişmesine katkıda bulunur (Sugimoto ve ark., 1997; Wautier ve Schmidt, 2004).

Diyabetik sıçanlarda, AGE inhibisyonu ile nörovasküler fonksiyon kaybının önleniği gösterilmiştir (Cameron ve Cotter, 1996; Soulis ve ark., 1999; Coppey ve ark., 2002). Ayrıca, antioksidanlar ve AR inhibitörlerinin de diyabetik nöropatinin önlenmesi ve/veya tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Obrosova ve ark., 2002).

Sinir hücrelerinde, artan AR aktivasyonu ile redoks dengesinin bozulması sonucu $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPaz}$ enzim aktivitesinde azalma gözlenmiştir. Buna bağlı olarak biriken intra-aksonal Na^+ , sinir iletim hızında azalmaya (Simmons ve ark., 1982) ve sinir hücrelerinde yapısal bozukluğa neden olmaktadır (Tornlinson, 1989; Greene ve ark., 1992). Sinir iletim hızının azalmasına hücredeki miyoinositol eksikliği neden olmaktadır. Miyoinositolün hücreye girişı Na^+ bağımlı ve glukoz ile yarışmalıdır. Glukoz, miyoinositolün böbreklerden geri emilimini yarışmalı olarak inhibe ederek (Clements ve Diethelm, 1979; Hammerman ve ark., 1980) hücredeki miyoinositol miktarının azalmasına neden olur (Tornlinson, 1989; Greene ve ark., 1992).

1.3.2.2.3. Diyabetik Nefropati

Diyabetin en önemli komplikasyonlarından biri de diyabete bağlı nefropati nedeniyle gelişen böbrek yetmezliğidir (Kimmelstiel ve Wilson, 1936). Diyabetin neden olduğu ölümlerin %10' u böbrek yetmezliğinden kaynaklanmaktadır (Humphrey ve ark., 1989; Forsblom ve ark., 1998).

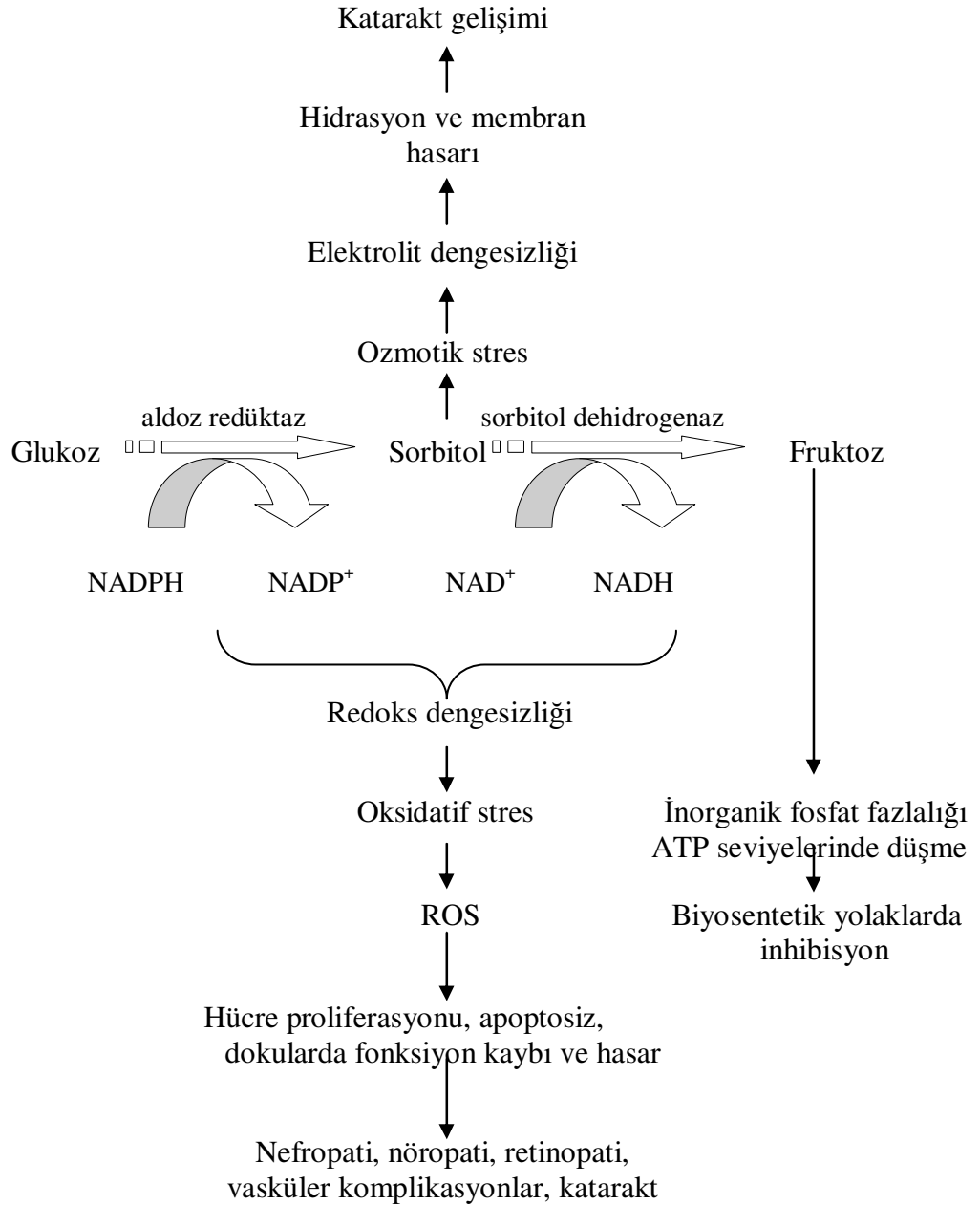
Diyabetik nefropatinin en önemli bulgularından biri mikroalbuminüridir. Mikroalbuminüri, idrarla atılan albümin miktarının fazla olmasıdır ve renal hastalıkların gelişiminde önemli risk faktörüdür (Mayne, 2001).

Diyabetik nefropatide, glomerular filtrasyon hızında artış ve mikroalbuminüri nedeniyle glomerular hasar meydana gelmektedir. Renal kan akışındaki artış arteriel rezistansı değiştirerek filtrasyonda artışa neden olur (Ditzel ve Schwartz, 1967; Hostetter ve ark., 1981). Kollagen, proteoglikanlar gibi bazal membran bileşenlerinin sentez ve katabolizmasındaki değişiklikler, bazal membran kalınlaşmasına neden olmaktadır (Nishi ve ark., 2000).

Miyoinositol, böbrek dışı dokularda reversibl olarak membran fosfolipidleri ve fosfoinozitidlerinin yapısına girer (Hawthorne, 1960). İnositol fosfolipidler ve inositol fosfatlar hücre içi sinyal iletiminde görev alırlar (Serunian, ve ark., 1989; Berridge ve Irvine, 1989; Rhee ve Choi, 1992;). Diyabetik bireylerde bol miktarda miyoinositolün idrarla atıldığı bilinmektedir (Clemens, 1979) .

1.4. Aldoz Redüktaz Enziminin Diyabetik Komplikasyon Oluşumuna Etkileri

Pek çok diyabetik komplikasyon, AR enzim aktivitesinin artışı ile ilişkilidir. (Şekil 11). Diyabette artan poliöl yolağı aktivitesi ile bazı dokularda önemli miktarda sorbitol ve fruktoz birikmektedir (Lou ve Kinoshita, 1967; Souliş- Liparota ve ark., 1995).



Şekil 11. Poliöl yolağının diyabetik komplikasyonlarla ilişkisi (Srivastava ve ark., 2005).

1.4.1. Ozmotik Stres

Poliol yolağının ürünü olan sorbitol ozmotik açıdan aktif bir bileşiktir. Sorbitol hücre membranından difüze olamadığı için hücrelerde birikerek (Lewis ve ark., 2001) ozmotik strese neden olur. Ozmotik stres özellikle retina, lens ve periferik sinirlerde ozmotik hasara neden olmaktadır (Gabbay, 1975).

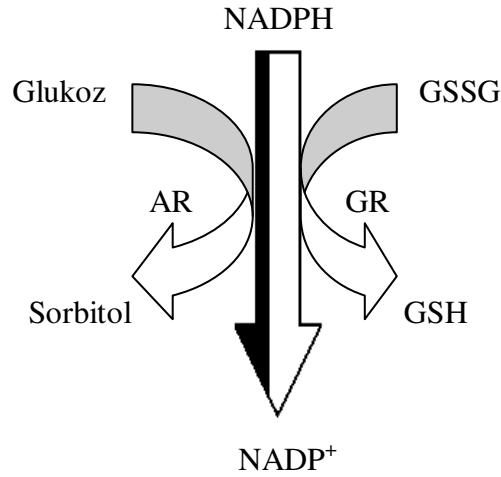
Ozmotik stres, sorbitol birikimi ile hücrenin su içeriğinin artması sonucu meydana gelir. Redoks dengesindeki bozulma, proteinlerin çözünürlüklerini değiştirerek membran direncine zarar verir (Tornlinson, 1989).

Lensde sorbitol birikimine bağlı ozmotik stres sonucu membran yapısı bozulmaktadır (Kinoshita, 1974; Brownlee ve ark., 1984). Katarakt gelişiminin en önemli nedeni de budur (Kinoshita, 1965; Varma ve ark., 1977; Lee ve Chung, 1999).

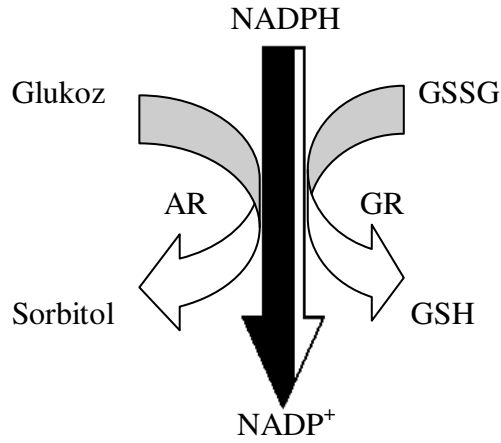
1.4.2. Oksidatif Stres

Diyabette artan reaktif oksijen türleri (ROS) nedeniyle antioksidan savunma sistemi zayıflamıştır (Rosen ve ark., 2001). Poliols yolağı aktivasyonu ile oksidatif stres meydana gelir. Glutasyon redüktaz enzimi (GR), NADPH bağımlı olarak, okside glutasyonun (GSSG) redükte glutatyon (GSH) redüksiyonunu sağlayan enzimdir. AR' nin NADPH için Km değeri, glutasyon redüktaz enziminin NADPH için Km değerinden 10 kat daha düşüktür. Poliols yolağında artan AR aktivitesiyle NADPH' ın fazlaca tüketilmesi, GSH'nun üretiminin azalmasına neden olur (Yeh LA ve Ashton 1990). (Şekil 13). Hücre içi majör antioksidan olan GSH' nun azalması oksidatif strese neden olur (Lee ve Chung, 1999).

Normal Glukoz Düzeyi



Hiperglisemi



Şekil 13: Aldoz redüktaz ve glutatyon redüktaz enzimlerinin NADPH kullanım yarışı (Tomlinson ve ark., 1994).

AR' ı aşırı derecede eksprese edilmiş transgenik farelerde, redükte glutatyonun azaldığı gösterilmiştir. Poliöl yolağının antioksidan savunma sistemine zararlı etkileri bu mekanizma ile açıklanmaktadır (Giugliano ve ark., 1996; Nishimura C., 1998; Nishikawa ve ark. 2000). Sorbitol dehidrogenaz enziminin (SD) aktifleşmesi sonucu oluşan NADH, NADH-oksidad (Nox) enziminin etkisi ile serbest oksijen radikalleri (ROS) oluşumuna neden olur (Teshamariam, 1994; Morre ve ark., 2000). ROS, gliseralehit-3-fosfat dehidrogenaz enzim (GAPDH) inhibisyonuna neden olarak daha fazla glukozun poliöl yolağına yönelmesine ve AR aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Stevens ve ark. 2000).

Diyabette, glutatayon seviyelerinin yanısıra C vitamini, E vitamini ve antioksidan enzimlerinin düzeyleri de düşüktür (Whoaibeb ve Godin, 1987; Van Dam ve ark., 1998; Karasu ve ark., 1995). Diyabet hastalığı, organizmadaki doğal antioksidan savunma sistemi ile adeta anlaşma yapmış gibidir. Reaktif karboniller AR ile daha az reaktif metabolitlerine dönüşmektedir. Glukozun alkollere indirgenmesi, oksidasyon ve glutatayon ile katalizlenen yollar, reaktif karbonil oluşumuna neden olan yollarlardır. Diyabete bağlı redoks potansiyelindeki değişiklikler (NADH/NAD^+ oranının artışı) bu yolların reaktif bileşikleri detoksifiye etme yeteneği ile bir denge içerisinde. (Williamson JR ve ark., 1993). (Şekil 14).

Hiperglisemik durumda poliöl yolağının artışı, glutatayon ve NADPH ' in azalmasına neden olmaktadır (Tomlinson ve ark., 1994). Glutatayon depolarını boşaltacak düzeyde AR aktivitesine sahip hücrelerde, hiperglisemiye bağlı oksidatif stres, NADPH ' a ihtiyaç gösteren yolların oluşumunu engellemektedir.

Şekil 14' de AR enziminin oksidatif stresdeki önemi vurgulanmaktadır. Glukozun, sorbitole ve sonra da fruktoza hızlı dönüşümü GSH düzeylerinin düşmesine ve oksijen radikalleri ($\text{O}_2^{\cdot-}$) oluşumunun artmasına ve (Kashiwagi ve ark., 1994) lipit aldehit ve reaktif karbonil oluşumuna neden olmaktadır. Diğer taraftan da AR, reaktif karbonilleri ve lipit aldehitlerini detoksifiye ederek oksidatif stresi azaltmaktadır (Dunlop M., 2000).

1.4.3. İleri Glikasyon Ürünlerinin Oluşumu

Poliöl yolağı aktivitesinin artması sonucu glukoz fruktoza dönüşür. Sorbitolün, SD enzimi ile NAD bağımlı oksidasyonu sonucunda meydana gelen fruktoz, fruktoz-3-fosfat (F3P) ve 3-deoksiglukoza (3DG) metabolize olur (Grandhee ve Monnier 1991; Lal S. ve ark., 1995; Hamada ve ark., 2000). F3P ve 3DG' un her ikisi de glukozdan daha potent, non-enzimatik glikasyon prekürsörleridir (Szwergold ve ark. 1990; Brownlee, 1992; Hamada ve ark. 1996).

Hiperglisemide, eritrosit, beyin, böbrek, sinir ve lens gibi insüline bağımlı olmayan dokularda (Mueckler M., 1994) glukoz, proteinlere non-enzimatik reaksiyonla bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyon reaksiyonu sonucu oluşan amadori ürünlerinin glikooksidasyonu ile imidazol ve pirol yapısında ileri glikasyon ürünleri (AGE) meydana gelir. AGE, proteinlerin amino grupları ile geri dönüşümsüz çapraz bağ yaparak, proteinlerin yapı ve fonksiyonlarında değişikliğe neden olmaktadır. AGE bileşikleri, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynar (Jakus ve Rietbrock, 2004). Yaşlanmaya bağlı olarak glukoz toleransındaki azalmada da geri dönüşümsüz ileri glikasyon süreci hızlanmaktadır (Hudson ve ark., 2002).

AGE' nin moleküller arasında kovalent bağ oluşturduğu ilk olarak kollajen dokusunda gösterilmiştir. Diyabette, kollajen dokunun hiperglisemiye bağlı oksidatif stres ile hızla yaşlandığı gösterilmiştir (Miyata ve ark, 2000).

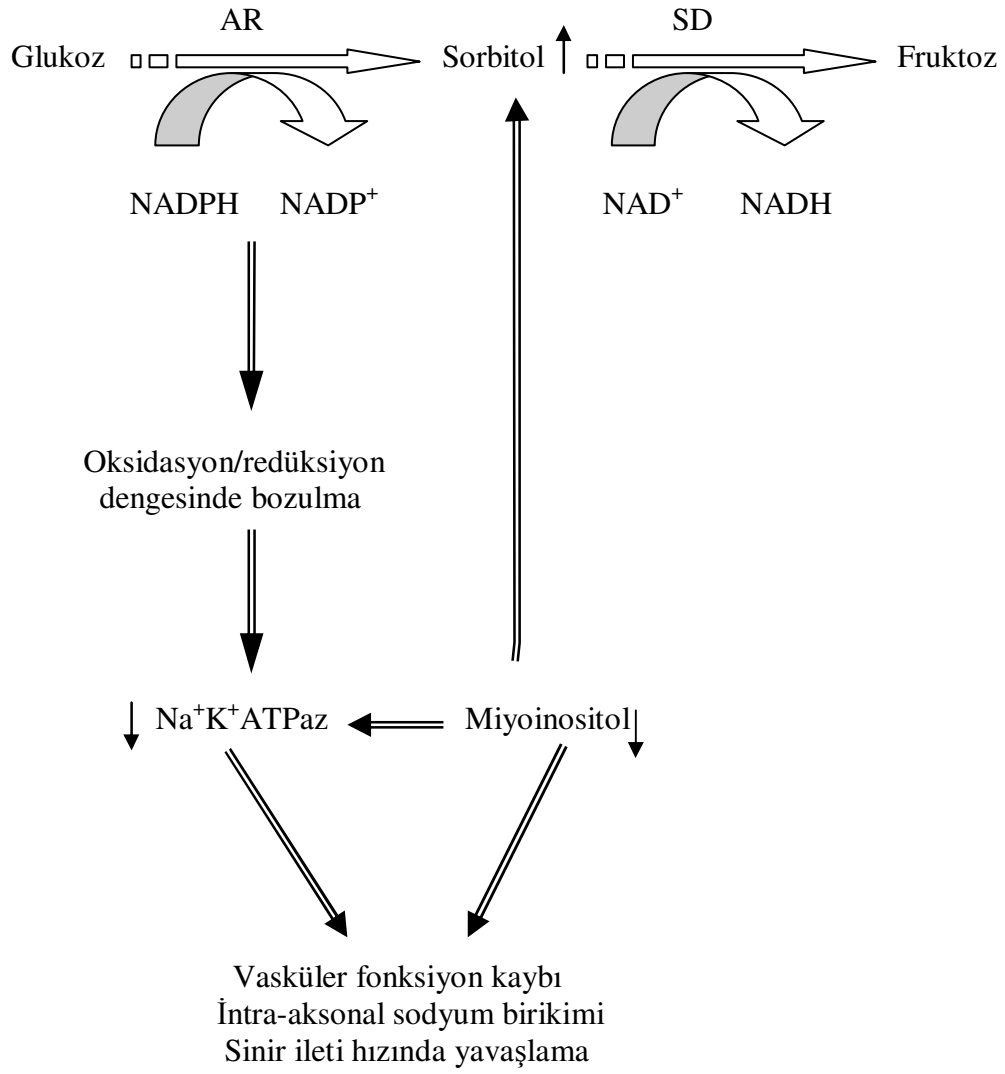
Sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile sitozolik NADH/NAD oranı yükselmektedir. Artan NADH miktarı, gliseraldehit-3-fosfat-dehidrogenaz enzimini (GAPDH) inhibe ederek trioz-fosfat konsantrasyonunun artmasına neden olur (Baynes ve Thorpe., 1999; Dunlop M., 2000; Garcia ve ark. 2001). Hücre içi konsantrasyonu artan gliseraldehit-3-fosfat, trioz-fosfat izomeraz enzimi ile dihidroksiaseton-fosfata (DHAP) dönüşür. DHAP' ın gliserol-3-fosfata redüksiyonu NADH bağımlıdır.

NADH/NAD oranının yüksek olması, DHAP'ın redüksiyonu yoluyla diaçil gliserolün (DAG) de novo sentezini stimüle eder. Artan DAG sentezi PKC yolağının aktive olmasına neden olur (Williamson ve ark. 1993; Garcia ve ark. 2001). Trioz fosfatlar, ileri glikasyon ürünleri (AGE) prekürsörü olan metilenglioksallara (MGO) dönüşür.

1.4.4. Na⁺/K⁺ ATPaz ve Aldoz Redüktaz İlişkisi

Artan AR aktivitesine bağlı olarak, NADPH depolarının boşalması ve GSH düzeyinin azalması ile oksidasyon-redüksiyon dengesi bozulur. Redoks dengesindeki bozulma, membran Na⁺/K⁺ ATPaze enzim aktivitesinde, fosfatidilinositol sentezinde ve miyoinositol miktarında azalmaya neden olmaktadır (Kinoshita, 1974; Chung ve ark., 2003). (Şekil 15).

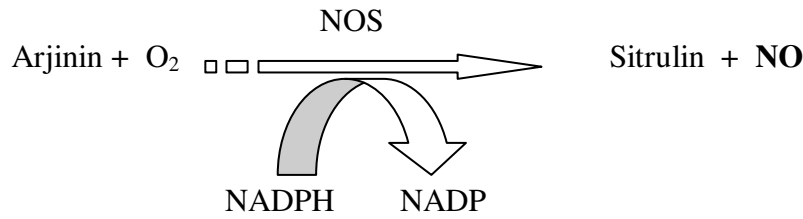
Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde azalma, fosfatidilinozitol sentezinin azalmasının bir sonucudur (Bhadada ve ark., 2001, Chung ve ark. 2003). Fosfatidil inozitol sentezi için gerekli olan miyoinositol (MI) miktarındaki azalma, diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Greene ve ark., 1975; Winegrad, 1987). Glukoz konsantrasyonunun artması ile intrasellüler sorbitol birikimine bağlı olarak hücrelerdeki miyoinositol miktarının azalması, inositol fosfolipid metabolizmasının değişmesine ve Na⁺/K⁺ATPaz enzim aktivitesinin azalmasına neden olmaktadır (Bell ME, ve ark., 1982; Greene ve ark., 1987; Yorek ve ark., 1988). Hücre membranındaki Na⁺/K⁺ATPaz enzim aktivitesinin azalması vasküler fonksiyon kayıplarına ve intraaksonal Na⁺ birikimine neden olarak sinir iletim hızının yavaşlamasına ve sinir hücrelerinde yapısal bozukluklara neden olmaktadır. (Greene ve ark. 1992). (Şekil 15).



Şekil 15: Aldoz Redüktaz enziminin miyoinositol ve Na⁺/K⁺ATPaz enzimine etkisi (Bhadada ve ark., 2001).

1.4.5. Nitrik oksit ve Aldoz Redüktaz İlişkisi

Nitrik oksit sentaz enzimi (NOS), arjininden nitrik oksit oluşumunu katalizlemektedir. (Şekil 16). Bu reaksiyonda AR aktivitesindeki artış, önemli bir vazodilatör olan nitrik oksit (NO) sentezini etkilemektedir. Artan AR aktivitesiyle NADPH rezervlerinin tükenmesine bağlı olarak endotelial NO sentezi azalır (Tesfamariam, 1994). Artan oksidatif strese bağlı olarak, NO' in azalması sonucu ateroskleroz gelişimi artmaktadır (Kurowska., 2002).



Şekil 16: Nitrik oksit sentezi (Palmer ve ark., 1988).

1.4.6. Protein Kinaz C ve Aldoz Redüktaz İlişkisi

Diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C (PKC) aktivatörüdür. Hiperglisemi durumunda glikoliz ara ürünlerinden olan gliseraldehit-3-fosfat, gliserol-3-fosfat'a indirgenmektedir. Gliserol-3-fosfatın açılmesi ile oluşan DAG konsantrasyonunun artması, PKC enzim aktivitesinin artmasına neden olur. Hiperglisemide DAG-PKC aktivasyonu, diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır (Xia ve ark., 1994).

Artan AR enzim aktivitesi sonucu sorbitolün fruktoza oksidasyonu ve sitozolik NADH/NAD oranının yükselmesi ile gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz enzimi inhibe olmakta ve trioz-fosfat konsantrasyonu artmaktadır. Trioz-fosfatlar, protein kinaz C' nin aktivatörü olan DAG oluşumuna ve bunun sonucunda PKC yolağının aktivitesinin artmasına neden olmaktadır (Garcia ve ark., 2001).

PKC yolağı aktivasyonu, kan akışında değişikliğe, bazal membran kalınlaşmasına, ekstrasellüler matriks (ECM) genişlemesine, vazoaaktif hormonlarda ve vasküler permeabilitede artışa, kılcal damar oluşumuna (anjiyogenez), hücre büyümesine, Na^+/K^+ ATPaz, sitozolik fosfolipaz A2 (cPLA₂), mitojen aktive edici protein (MAP)-kinaz gibi bazı enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olur (Ishii ve ark. 1996; Koya ve King, 1998; Bursel ve King, 1999; Nishikawa T. ve ark.; 2000; Jacobs ve ark., 2003).

Diyabette kan akışındaki değişikliklere bağlı olarak PKC yolağının aktivasyonu, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), endotelin-1 (ET-1) ve NO gibi vazotropik faktörlerle ilgilidir. PKC aktivasyonu eNOS' ın mRNA' sının ekspresyonunu inhibe ederek NO regülasyonunda düzensizliğe neden olur (Kuboki ve ark. 2000).

PKC aktivasyonu, ET-1 aktivitesini artırarak kan akışında değişiklik meydana gelir. PKC aktivasyonu vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), plazminojen aktivatör-inhibitör-1 (PAI-1), nükleer faktör kapa B (NFk-B) ve NADPH-oksidaz aktivitelerindeki artışla kardiyovasküler hastalıklara neden olmaktadır (Jay ve ark., 2006). Böbrek, retina ve sinir dokularında PKC yolağının aktivasyonu, permeabilitede artış, lökosit adhezyonunda yükselmeye neden olarak vasküler hasara neden olur.

Kısacası, diyabette artan AR aktivitesi indirekt olarak PKC aktivitesinde artışa neden olarak diyabetik vasküler hasar oluşumuna katkıda bulunmaktadır.

1.5. Aldoz Redüktazın Diğer Patolojik Proseslerle İlişkisi

1.5.1. Kardiyovasküler Hastalıklar ve Aldoz Redüktaz

İskemi bilindiği gibi, organa yeterli miktarda kan temin edilememesidir. Bu da oksijen yetmezliğine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda, miyokardiyumda oluşan iskemi sırasında, poliol yolağının miyokardiyal glukoz metabolizmasına etkileri incelenmiş ve kardiyak AR aktivitesinin iskemi sırasında arttığı gösterilmiştir (Ramasamy ve ark., 1999; Hwang ve ark., 2002). Buna bağlı olarak miyokardiyumdaki NADH/NAD⁺ oranı artmakta, glikoliz ve ATP üretimi de azalmaktadır. Bu tablo iskemik hasara neden olmaktadır (Williamson ve ark. 1993). AR' ın inhibisyonu kalbi korumaktadır. AR miyokardiyal iskemik hasarda anahtar rol oynamaktadır.

Aldoz redüktaz inhibitörleri (ARI), iskemi sırasında intrasellüler sodyum ve kalsiyumun artışını önlemektedirler. İntrasellüler sodyum düzeyindeki değişiklikler glukoz metabolizmasının ve NA⁺/K⁺ATPaz aktivitesindeki artışa bağlıdır. Bu durumda, ARI' lerini miyokard enfarktüsli hastaların tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (Alexiou ve ark., 2009).

Ayrıca, vasküler yumuşak kas hücrelerinin (VSMC) birikimi aterogenez ve hipertansiyon oluşumunda önemli bir etkidir (Ross, 1993). Mitojenler tarafından VSMC' leri stimüle olmakta ve buna bağlı pek çok yolak da aktive olmaktadır. Bu yolakların aktivasyonu sırasında AR aktivitesi de artmaktadır. Yapılan çalışmalar, ARI'lerinin vasküler yumuşak kas hücrelerinin büyümesini önlediğini göstermiştir (Ruef ve ark., 2000; Ramana ve ark., 2002).

1.5.2. İnflamasyon ve Aldoaz Redüktaz

Proinflamasyon endotoksini ve gram negatif bakteri duvarı bileşeni olan lipopolisakkaritler, enfeksiyon sırasında dolaşıma salınmaktadır (Miller ve ark., 2005). Bu lipopolisakkaritler, vasküler, endotel ve yumuşak kas hücrelerinde enflamasyonun artışına ve immün cevabın oluşumuna neden olurlar. Bu sırada nükleer faktör kapa B (NF-kB), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve interlökin1 (IL-1), protoglandinler ve NO, sitokinlerin stimülasyonu sonucu aktive olur. (Yang ve ark., 1998).

Yapılan bir araştırmada, NF-kB' ye bağlı lipopolisakkarit transkripsiyonunun makrofaj hücrelerinde ARI ile önlenemediği gösterilmiştir (Ramana ve ark., 2006). Buna bağlı olarak IL-1 ve TNF- α oluşumu da azalmıştır. İnflamasyona cevabın dejenerasyonu, sepsis, travma, iskemi, antijen-spesifik immün cevap, akut inflamasyon, akut hepatit ve pankreatit gibi çeşitli klinik tabloların oluşumuna neden olmaktadır (Landry ve ark., 2001).

Sonuç olarak, AR inhibisyonu inflamasyona cevabı kontrol etmektedir ve sekonder doku enfeksiyonlarını önlemektedir. Ayrıca, gözde oluşan oküler enfeksiyonun tedavisinde de ARI' lerinin rolü büyüktür, enfeksiyona bağlı körlüğü önlemektedir (Yadav ve ark., 2007).

1.5.3. Depresyon ve Aldoaz Redüktaz

Periferal nöropati, diyabette oluşan depresyonun nedenlerinden biridir (Viinamak ve ark., 1995). Yapılan çalışmalar, moral bozukluğu ve poliol yolağının aktivasyonu arasında ilişki olduğunu vurgulamaktadır. Depresyon sırasında serebrospinal sıvıda sorbitol düzeylerinin yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Regenold ve ark., 2000; Renegold ve ark., 2004). Artan sorbitolün, beyin dokusunda poliol yolağının aşırı çalışması veya sorbitolün periferden serebrospinal dokuya geçişi ile gerçekleşmektedir (Alexiou ve ark., 2009).

1.5.4. Renal Yetmezlik ve Aldoz Redüktaz

Glomeruloskleroz, mesangial hücrelerin proliferasyonu, ECM proteinlerinin depozisyonu sonucu renal fonksiyonların kaybı ile karakterize bir böbrek hastalığıdır. Dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), ECM proteinlerinin transkripsiyonunu ve sentezini arttırarak glomerulosklerozda önemli rol oynar (Cohen, 2003). Bu proteinler, fibronektin ve IV kollagendir. AR' ın normoglisemi durumunda, TGF- $\beta 1$ tarafından indüklenen fibronektin ve IV kollagen sentezi üzerine etkisi bulunmaktadır (Jiang ve ark., 2006). ARI' lerinin de TGF- $\beta 1$ üzerine etki ederek buna bağlı yolakların aktivitesini azalttığı gözlenmiştir. ECM komponentlerinin normal glukoz konsantrasyonunda AR tarafından oluşturulması, non-diyabetik glomeruloskleroziste AR' ın önemli olduğunu göstermektedir (Alexiou ve ark., 2009).

1.5.5. Over Anomalileri ve Aldoz Redüktaz

Galaktoz ve galaktoz metabolitlerinin birikimi memeli overlerinde hasar oluşturmaktadır (Liu ve ark., 2000). Poliöl yolağı galaktitol oluşumu nedeni ile bu hasarın oluşumuna katılır. Galaktikol (dulsitol), overlerde ozmotik dengesizlik ve GSH depolarının boşalmasına neden olur. ARI' lerinin galaktoz bağımlı toksisiteyi önlediği gösterilmiştir (Meyer ve ark., 1992; Bery, 1995).

1.5.6. Kanser ve Aldoz Redüktaz

Karaciğer, akciğer, over ve rektal kanser dokularında yapılan çalışmalarda, AR' ın aktivitesinin ve ekspresyonunun yüksek olduğu tesbit edilmiştir (Lee ve ark., 2001; Saraswat ve ark., 2006). ARI' leri, kemoterapötik ilaçların yararlanımını arttırmakta ve bu ilaçların düşük dozlarda kullanımını sağlamaktadır. Örnek: doxorubicin, cis-platin (Lee ve ark., 2002).

AR' nin reaktif aldehit bileşiklerini detoksifiye ettiği daha önce açıklanmıştı. Bu aldehit bileşikleri hızlı büyüyen karsinoma hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. AR' nin aşırı ekspresyonu kemoterapötik ajanların artmış rezistansı ve malin tümör sonucu gerçekleşmektedir (Alexiou ve ark, 2009).

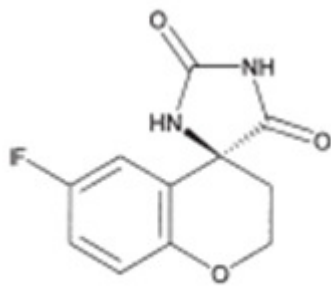
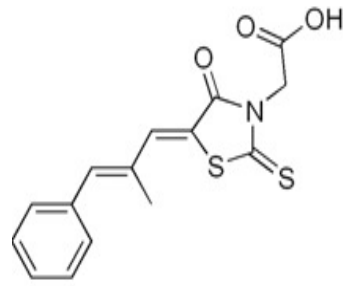
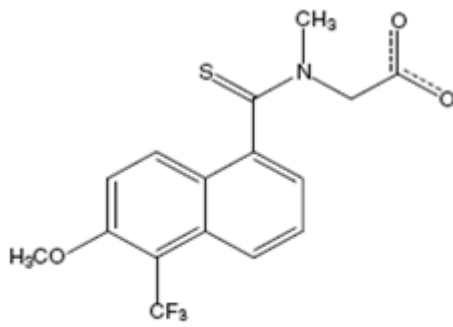
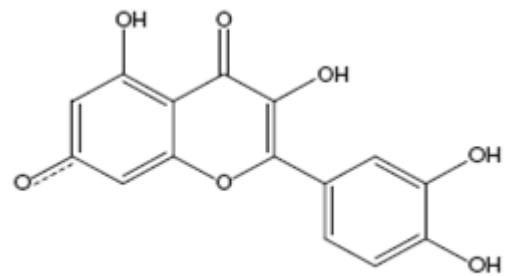
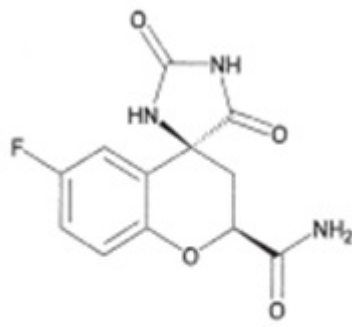
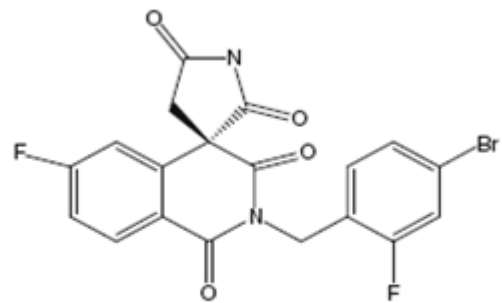
AR' ın, Caco-2 hücrelerinde büyüme faktörü aracılığı ile siklooksigenaz ekspresyonunu ve prostoglandin E2 yapımını indüklediği gösterilmiştir (Tammali ve ark., 2006). AR inhibisyonu, prostaglandin üretimini % 90' dan fazla engellemektedir.

AR, büyüme faktörü aracılığı ile kolon kanser hücrelerinin proliferasyonuna neden olurken, AR inhibisyonu ile hücre büyümesi için gerekli olan sentez fazı engellenir (Tammali ve ark., 2007).

Adrenal korteksindeki benign ya da malign tümörlerde AR gen ekspresyonunun farklılık gösterdiği bulunmuştur. Adrenal korteks karsinomalarında AR ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (Lefrançois-Martinez ve ark., 2004).

1.6. Aldoz Redüktaz İnhibitörleri (ARI)

Diyabetik komplikasyonlara neden olan sorbitol birikiminin önlenmesindeki hedef, poliol yolağının ilk enzimi olan AR inhibisyonudur. On yıldan fazla bir süredir gelecek vadede AR inhibitörlerinin bir çoğu in vitro ve hayvan modellerinde etkili sonuçlar vermiş olmasına karşın sadece biri (Epalrestat) marketlerde yerini almıştır. (Şekil 17).

**Sorbinil****Epalrestat****Tolrestat****Quercetin****Fidelrestat****Minalrestat**

Şekil 17: AR inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Harrison ve ark., 1994; El-Kabbani ve ark., 2004; Steuber ve ark., 2007).

AR'ın hücre içi rolü sadece poliol yolağı ile ilişkili değildir. Daha önce de belirttiğimiz gibi aldehytlerin detoksifikasyonunda da görev almaktadır (Srivastava ve ark., 2005; Kumar ve Reddy, 2007). Bu nedenle ARI'lerinin tasarlanmasındaki en büyük problem, glukoz redüksiyonunun inhibe edilmesinin yanı sıra AR' ın detoksifikasyon rolünün korunmasıdır.

Pek çok ARI, enzimin Tyr 48, His 110 ve Trp 111 parçalarını ve NADP⁺ nin nikotinamit kısmını içeren aktif bölgesi ile hidrojen bağı yapabilen asidik bir grup bulundurur. ARI' lerinin bir diğer özelliğı ise enzimdeki lipofilik kısım ile hidrofobik bağlanan bir ya da daha fazla aromatik grubun bulunmasıdır (Malamas ve ark., 1991; Bruno ve ark., 2002).

Geleneksel olarak, ARI' leri asetik asit parçası (Da Settimo ve ark., 2001) ya da siklik imid grubu içermesine bağılı olarak iki majör sınıfa ayrılır.

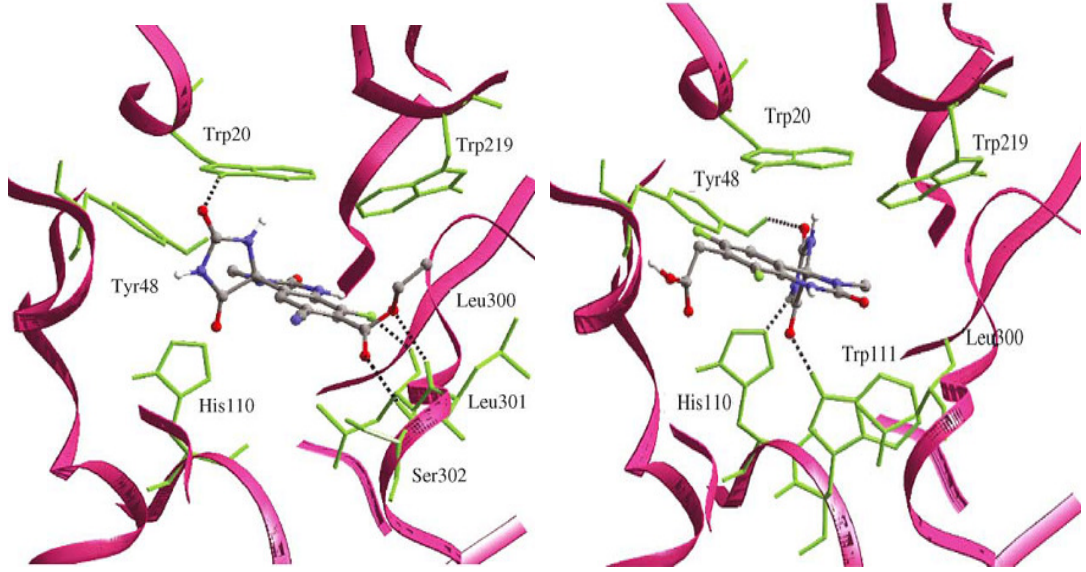
Günümüzde ise AR inhibitörleri üç sınıfa ayrılmaktadır:

- Karboksilik asit AR inhibitörleri
- Hidantoin AR inhibitörleri
- Yapısal olarak farklı AR inhibitörleri

Karboksilik asit içeren inhibitörlerden (arlestatin, tolrestat, epalrestat ve zopolrestat) epalrestat Japonya' da ilaç olarak kullanılmaktadır. Bu inhibitörler 7.4' den düşük pKa değerleri ile fizyolojik pH' da iyonlaşmaları nedeniyle dokuya girişleri zayıf olduğu için in vivo deneylerde düşük aktivite göstermektedirler (Bruno ve ark., 2002; Mylari, ve ark., 2005).

Uzun süredir diyabetik nöropati tedavisinde kullanılan epalrestat, karboksilik asit türevi olan tek AR inhibitörüdür (Kamon ve ark., 1991).

Yeni AR inhibitörlerinin tasarlanmasında docking ve quantum mekaniği gibi metodlar kullanılmaktadır. Buna göre, imidazolidin türevi 2 inhibitör maddenin AR enziminin aktif kısmındaki konumlanması, yapılan bir docking çalışmasında gösterilmiştir (LiHong Hu ve ark., 2006). İnhibitör madde, enzimin aktif kısmındaki Trp 20 (triptofan), Tyr 48 (tirozin), Leu 300-301 (lösin) ve His110 (histidin) amino asitleri ile hidrojen bağı yapmaktadır. (Şekil 18).



Şekil 18: İmidazolidin türevi 2 inhibitör maddenin aldoz redüktaz enzimine bağlanması. Aldo redüktaz enziminin protein omurgası pembe şeritlerle, aktif kısım parçaları yeşil renkle gösterilmiştir. İnhibitör bileşiğinin enzimin aktif kısmında: oksijen atomları; kırmızı; nitrojen; mavi renkte ve hidrojen bağları siyah renkte gösterilmiştir (LiHong Hu L ve ark., 2006).

Hidantoin türevi AR inhibitörleri ise (sorbinil ve fidelrestat) yüksek pKa değerleri ile karboksilik asit ARI'lerine göre daha iyi farmokinetik sonuçlar vermiştir. Ancak bu tür inhibitörler karaciğer toksisitesi, ciltte hassasiyet gibi kabul edilemeyen yan etkileri nedeniyle ilaç olarak kabul edilmemiştir (Pau ve ark., 2004).

Başka bir yaklaşımla geliştirilen karboksilik asit ve hidantoin türevi olmayan yeni AR inhibitörleri (minelrestat ve ranirestat) üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bunlar, dion ve tiyazolidindion (Bruno ve ark., 2002; Evcimen ve ark., 2008) ve sulfonanilid (Inoue ve ark., 2000), piridazin (Mylari ve ark., 2005), hidroksifenil

(Nicolaou ve ark., 2004; Alexiou ve ark., 2008) ve piridoindole (Stefek ve ark., 2008) türevleridir.

Deneyisel modellerde, AR' ın farmakolojik inhibisyonu, birçok pleiotropik komplikasyonu azaltmakta, önlemekte ve/veya ertelemektedir (Bhatnagar ve Srivastava, 1992, Nishimura, 1998).

ARI' leri üzerine yapılan çalışmalarda, AR aktivitesini azaltan ve buna bağlı diyabetik komplikasyonların gelişimini önlediği ya da önemli ölçüde ertelediği gösterilmiştir (Stribling ve ark., 1990; Sorbinil Retinopathy Trial Research Group, 1994; Büyükbingöl E. ve ark., 1994; Şükriüğlu M. ve ark., 2007; Süzen S. ve ark., 2007; Bozdağ O. ve ark., 2007; Evcimen N. D. ve ark., 2008; Bozdağ O. ve ark., 2008a; Bozdağ O. ve ark., 2008b).

Köpeklerle yapılan bir çalışmada AR' ın sorbinil ile inhibisyonunun diyabetik nöropatiyi engellediği ancak retinopati, nefropati ve kasta bazal membran kalınlaşmasını önlemede etkili olmadığı gösterilmiştir (Engerman ve ark., 1994).

Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, ponalrestat ve tolrestat gibi AR inhibisyonu yapan ajanların retinopatiyi önleyemediği gösterilmiştir (Chung S.S.S. ve Chung S.K., 2005).

Diyabetik retinopatide, başarılı bir AR inhibitörü olan benfotiamin, tiamin türevi bir vitamindir. Benfotiamin pentoz fosfat yolağını aktive ederek, ROS' nin oluşumunu engellemektedir. Aynı zamanda mitokondrial ROS düzeyinin azalması sonucu PKC yolağı aktivasyonunu da önlemektedir (Hammes ve ark. , 2003).

Önemli bir ARI olan sorbinilin, hiperglisemiye bağlı bazal membran kalınlaşmasını engellediği gösterilmiştir (Bakillah ve ark., 1996). Sorbinil, diyabetik nöropatide sorbitol birikimini ve miyoinositol azalışını engelleyerek olumlu sonuçlar vermiştir (Bertinmattera ve ark., 1996).

Sorbinil' in diğ er ARI' lerinden farklı olarak, nöropatiden baş ka retinopati, katarakt (Nagaraj ve ark., 1994) ve nefropati (Cohen, 1986) geliş imini de önlediğ i gösterilmiştir. Sorbinil' in diyabet komplikasyonlarına karşı engelleyici etkilerinin yanında Stevens-Jhonson sendromu, hipersensitivite reaksiyonları, toksik epidermal nekrolizis gibi yan etkileri mevcuttur (Pitts ve ark, 1986).

Sorbinil türevi bir diğ er ARI' ü olan fidarestatin nöropatiyi önlediğ i (Hotta ve ark., 2001) ve önemli bir yan etkisinin olmadığ ı gösterilmiştir (Asano ve ark, 2002) .

Aynı gruptan baş ka bir inhibitör olan zenalrestat ile yapılmış çalış malarda sinir iletim hız ında belirgin düzelmeler saptanmıştır (Greene ve ark., 1999).

Genelde AR inhibitörleri nonspesifik olup, yapısal olarak benzeyen enzimleri de inhibe etmesi, bunların uzun dönem klinik kullanıma engel olmaktadır (Srivastava ve ark., 1982; Bhatnagar ve ark., 1990). AR inhibitörlerinin pek çok yan etki göstermesi nedeniyle bu çalış malar halen devam etmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kullanılan Gereçler

2.1.1. Kullanılan Cihazlar

- Spektrofotometre (SHIMADZU UV-1700)
- Hassas Terazi (AND Electronic Balance FY-300)
- Hassas Terazi (Sartorius – CP 224S)
- pH-Metre (Inolab WTW Series pH 720)
- Magnetik Karıştırıcı (Torrey Pines Scientific)
- Vorteks (Heidolph)
- Otomatik Pipetler (Gilson)
- Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj (Sorvall RCM 120 EX)
- Yüksek Devirli Soğutmalı Santrifüj (Sigma 3K30)
- Soğutmalı Santrifüj (Sigma)
- Derin Dondurucu (-80 °C) (Bosch)
- Buzdolabı (Arçelik)

2.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Amonyum sülfat (Sigma), sodyum klorür (Merck), NADPH (Sigma), DL-gliseraldehit (Sigma), KH_2PO_4 (Sigma), K_2HPO_4 (Sigma), DMF (Merck) , Bio-Rad Reagent (BIO-RAD), metanol (Reidel-de Haën), sığır serum albumini (BSA) (Sigma) firmalarından temin edilmiştir. Aldoz redüktaz enzimi üzerine olası inhibitör etkileri bakılan yeni bir seri 2,4-TZD türevi maddeler, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda sentezlenmiştir.

2.1.3. Denekler

Deney için normal diyetle beslenmiş 30 adet 600-800 kg ağırlığındaki sığırlardan elde edilen lensler kullanılmıştır. Haymana mezbahanesinde kesilen sığırlardan alınan gözler bekletilmeden buz kutularına alındıktan sonra -80°C’ de saklanmıştır. Daha sonra, lensler donuk göz dokusundan çıkarılarak deneyler yapılmıştır. Sığır lens dokularından AR enzimi izole edilmiştir ve enzim aktivitesi tayin edilmiş, inhibisyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm deneyler üçer defa tekrarlanmıştır. Hayvanların bakımları ilgili ulusal ve uluslararası kanun ve yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Aldoz Redüktaz Enziminin İzolasyonu

Deneylerde 30 adet sığırdan elde edilen lensler kullanılmıştır. Lens dokularından AR enzimi izole edilmiştir (Das ve Srivastava, 1985) ve enzim aktivite tayinleri yapılmıştır.

Lensler buz üzerinde parçalandıktan sonra üzerine 3 hacim distile su eklenir ve homojenize edildikten sonra +4 °C, 10000g' de 20 dakika santrifüj edilir. Supernatan üzerine, %40 doygunluk oluşturabilmek için doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklenir. Suspansiyon 15 dakika karıştırıldıktan sonra +4 °C, 10000g' de 20 dakika santrifüj edilir. Supernatandaki inert proteinler ayrıldıktan sonra % 50 saturasyon için tekrar doymuş amonyum sülfat ilave edilip 15 dakika karıştırılır ve +4 °C, 10000g' de 20 dakika santrifüj edilir. %50 doygunluktaki supernatana toz amonyum sülfat eklenerek % 75 doygunluk sağlandıktan sonra hemen +4 °C, 10000g' de 20 dakika santrifüj edilir. Elde edilen pellet, 5 ml 0,05 M NaCl içerisinde çözülür.

2.2.2. Aldoz Redüktaz Aktivite Tayini

Kullanılan çözeltiler:

1. Doymuş amonyum sülfat çözeltisi
2. İnhibitör madde stok çözeltisi (10^{-4} M)
3. İnhibitör madde çözücüsü: %50 dimetil formamid (DMF) - %50 metanol
4. 0,006 M stok NADPH çözeltisi
5. 0,15 M stok gliseraldehit çözeltisi
6. 0,067 M. fosfat tamponu pH=6,2
7. 0,05 M NaCl çözeltisi

Sıgırlardan elde ettiğimiz AR enziminin aktivitesi, spektrofotometrik olarak 340 nm de UV-1700 ile NADPH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür (Cerelli ve ark., 1986). 0,2 ml fosfat tamponu, 0,1 ml NADPH (2×10^{-5} M final konsantrasyon), 0,1 ml inhibitör madde çözeltisi ve 2,3 ml distile su içeren inkübasyon ortamına 6,148 mg protein eklenerek hacim 2,9 ml ye tamamlanmıştır. Reaksiyon, spektrofotometre küvetine 0,1 ml DL-gliseraldehit (5×10^{-4} M final konsantrasyon) ilavesi ile başlatılmıştır.

NADPH konsantrasyonundaki azalma 340 nm de, 37 ° C de ölçülmüştür. Absorbans değerleri lineer olan aralıklar tespit edildikten sonra, eğim hesapları yapılmıştır.

Eğim değerleri, aşağıdaki formüle uygulanarak enzimin U/L cinsinden aktivite hesapları yapılmıştır. Bu değerlerden hareketle % inhibisyon oranları hesaplanmıştır.

$$U/L = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V(L)}{v(L)} \times \frac{1000}{\epsilon \times d} \quad (\mu \text{ mol/min}^{-1}/L^{-1})$$

ΔA = Test tüpündeki absorbans farkı

Δt = Zaman (Dakika)

$\frac{\Delta A}{\Delta t}$ = Eğim

ϵ = Ekstinsiyon Katsayısı ($3.4 \times 10^2 \text{ mmol}^{-1} \times \text{mm}^{-1}$)

d = Işık Yolu (10 mm)

$V(L)$ = Total Hacim

$v(L)$ = Enzim Hacmi

2.2.2. Protein Miktar Tayini

Kullanılan çözeltiler:

1. Sığır serum albumin çözeltisi (BSA): (2 mg/ml)

2. BIO-RAD Reagent

Çalışmamızda protein miktar tayini için Bradford metodu (Bradford, 1976) kullanılmıştır. Protein miktar tayininde standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanılmıştır. Stok BSA çözeltisinden konsantrasyonu 0,4 , 0,6 , 0,8 ,1,0, 1,2, 1,4 mg/ml olan standartlar hazırlanmıştır.

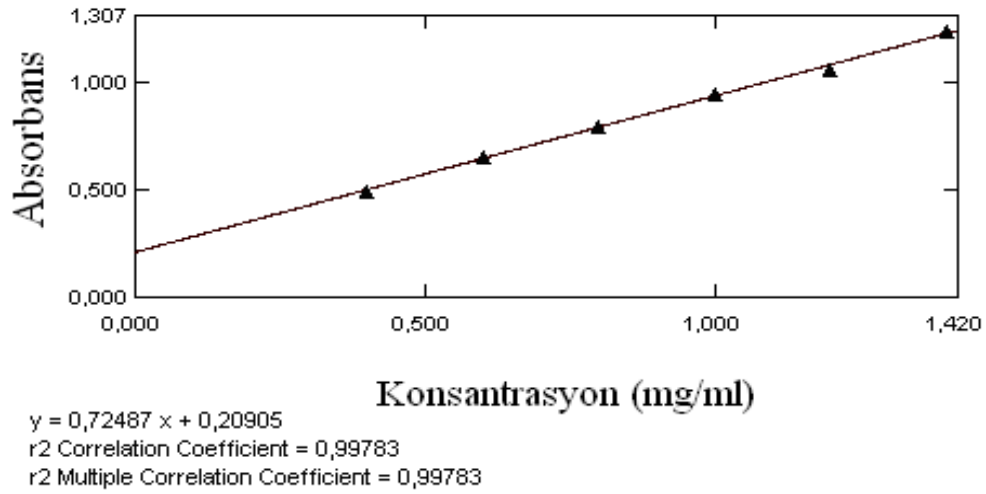
Organik boya olarak kullandığımız BIO-RAD Reagent, 1/5 oranında dilüe edildikten sonra Whatman no. 1 filtre kağıdından süzölmüştür. Deney tüpüne standart çözeltilerden 0,1 ml alınarak üzerlerine hazırlanmış olan organik boyadan 5' er ml eklenmiş ve spektrofotometrede 595 nm' de ölçümler yapılmıştır.

Protein miktar tayininde daha hassas sonuç elde etmek için enzim, 1/40 oranında dilüe edilmiştir. Standartlarda olduğu gibi 0,1 ml enzime 5 ml organik boya eklendikten sonra fotometrik ölçümü yapılmış ve standart grafiğinden protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

Sığır lenslerinden elde edilen enzimin protein miktar tayini Bradford metodu ile yapılmıştır (Bradford, 1976). Buna göre, stok BSA çözeltisinden 0,4 , 0,6, 0,8 , 1,0 , 1,2 , 1,4 mg/ml olan standart çözeltiler hazırlanmış ve 595 nm’ de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. (Şekil 19).

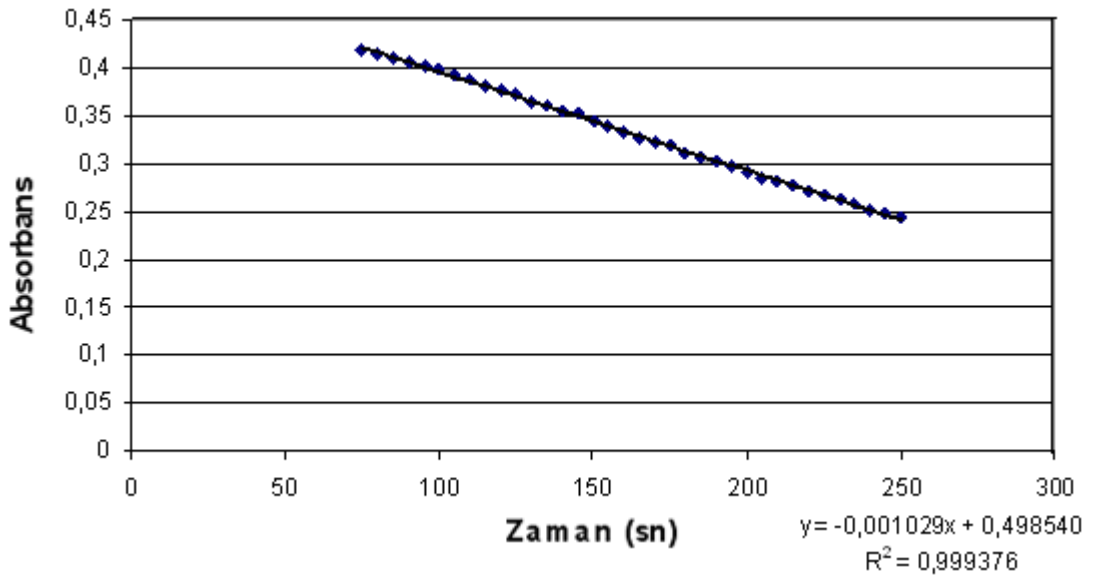
0,1 ml, 1/40 oranında dilüe edilmiş enzime 5 ml BIO-RAD çözeltisi eklendikten sonra spektrofotometrik ölçümü yapılmıştır. Standart grafiğe göre mg/ml cinsinden protein miktarı 30,74 mg/ml olarak hesaplanmıştır.



Şekil 19: Protein miktar tayini standart grafiği.

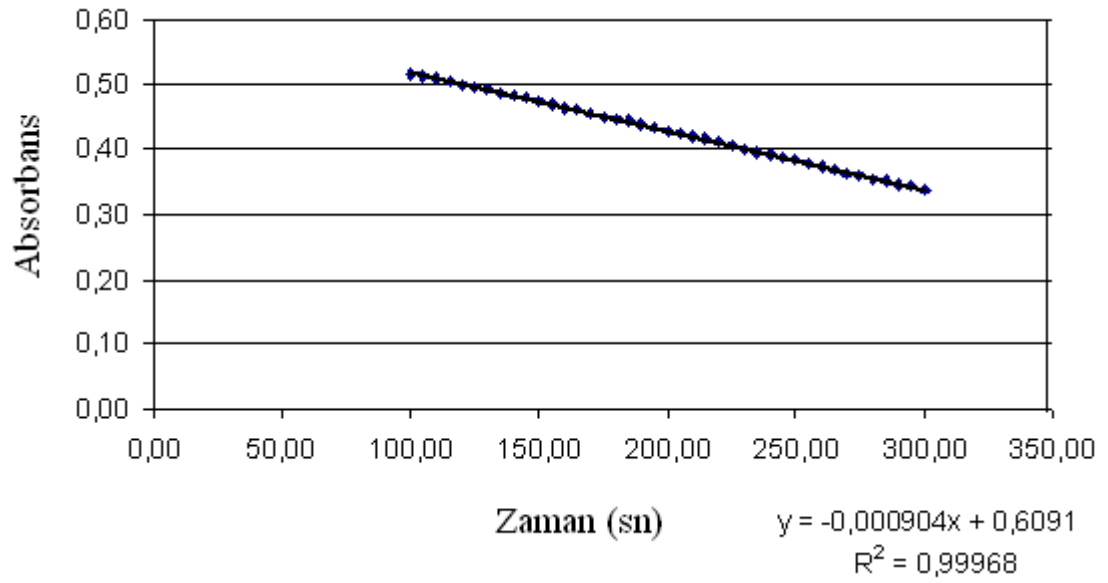
Deneylerimiz, 600-800 kg ağırlığındaki 30 adet sığırın lenslerinden elde edilen enzim numunelerinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen enzimin, aktivite tayini yapılmıştır.

Enzim aktivitesi, öncelikle inkübasyon ortamında inhibitör madde ve çözücüsü bulunmadan tayin edilmiştir. Bu ölçüm, kontrol aktivite olarak adlandırılmıştır. Kontrol aktivite tayini, inkübasyon ortamına 6,148 mg protein eklenerek gerçekleştirilmiştir. Bu protein konsantrasyonu ile aktivite 4.539×10^{-3} U/L bulunmuştur. (Şekil 20).



Şekil 20: Aldoz redüktaz enzimi kontrol aktivite grafiği.

Daha sonra, enzim aktivitesi inhibitör maddenin çözücüsü olan %50 DMF + %50 metanol karışımının inkübasyon ortamına ilavesi ile tekrar tayin edilmiştir. Bu ölçüm ise bazal enzim aktivitesini oluşturmaktadır. Bu şekilde çözücünün, enzim aktivitesi üzerine olası etkisi incelenmiştir. İnhibitör madde çözücüsü olan %50 DMF + %50 metanol karışımının inkübasyon ortamına ilavesi ile yapılan ölçümle bazal enzim aktivitesi $3,992 \times 10^{-3}$ U/L olarak bulunmuştur. (Şekil 21).



Şekil 21: Aldoz redüktaz enzimi bazal aktivite grafiği.

Sonuç olarak, inhibitör madde çözücüsünün AR enzim aktivitesini yaklaşık % 12,03 oranında azalttığı tespit edilmiştir. İnhibitör maddelerin AR enzim aktivitesinde oluşturduğu inhibisyonu hesaplayabilmek amacı ile bazal enzim aktivitesi %100 olarak kabul edilmiş ve inhibitör maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkisi doğru orantı yolu ile hesaplanmıştır.

AR enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi test edilecek olan maddelerin formülleri Tablo 3’de gösterilmiştir.

Tablo 3: Tiyazolidindion türevi inhibitör maddelerin formülleri.

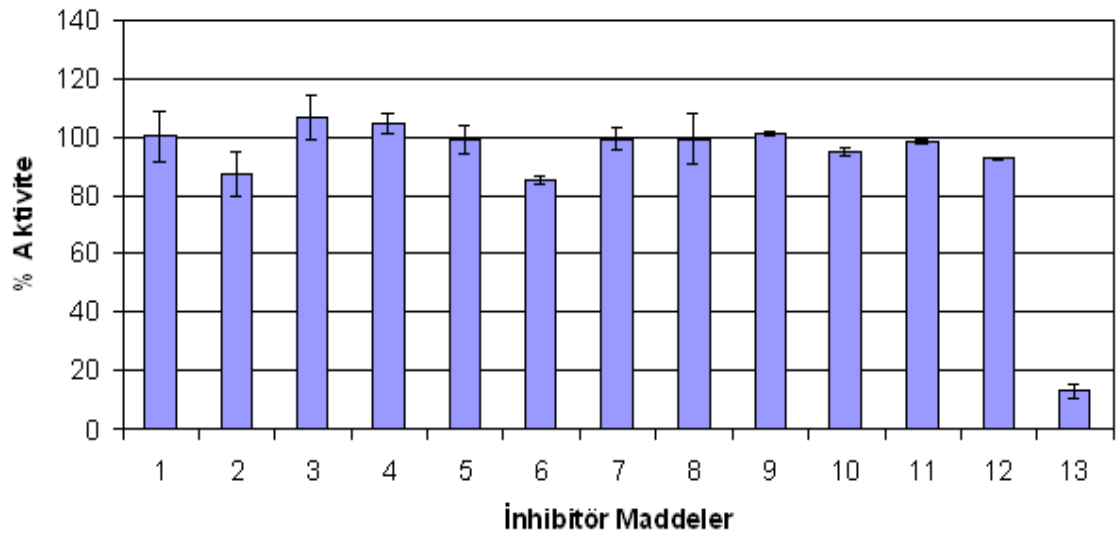
No	Kapalı formül	Açık Formül
1	$C_{17}H_{12}ClN_5O_2S_3$	
2	$C_{17}H_{11}ClFN_5O_2S_3$	
3	$C_{17}H_{11}Cl_2N_5O_2S_3$	
4	$C_{17}H_{11}BrClN_5O_2S_3$	
5	$C_{17}H_{10}Cl_3N_5O_2S_3$	
6	$C_{17}H_{11}ClN_6O_4S_3$	
7	$C_{18}H_{12}ClN_5O_3S_3$	

Tablo 3 Devam: Tiyazolidindion türevi inhibitör maddelerin formülleri.

No	Kapalı formül	Açık formül
8	$C_{18}H_{11}ClFN_5O_3S_3$	
9	$C_{18}H_{11}Cl_2N_5O_3S_3$	
10	$C_{18}H_{11}BrClN_5O_3S_3$	
11	$C_{18}H_{10}Cl_3N_5O_3S_3$	
12	$C_{18}H_{11}ClN_6O_5S_3$	
13	$C_{10}H_6ClN_5O_2S_3$	

Kontrol ve bazal AR enzim aktiviteleri tayin edildikten sonra, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Prof.Dr. Oya Bozdağ ve arkadaşlarının sentezlemiş olduğu 2,4-tiyazolidindion (TZD) türevi maddeler ile çalışılmıştır. 13 adet TZD türevi inhibitör maddelerin 10^{-4} M konsantrasyondaki stok çözeltilerinden 0,1 ml kullanılarak enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. Böylelikle, inkübasyon ortamında 3.3×10^{-6} M (final konsantrasyonu) inhibitör madde kullanılmıştır. İnhibitör maddelerle yapılan enzim aktivite tayininde kontrol ve bazal aktivitede olduğu gibi 6,148 mg protein kullanılmıştır. Herbir inhibitör madde ile enzim aktivite tayinleri gerçekleştirilmiştir. 13 adet TZD türevinin aktivite tayinleri tamamlandıktan sonra, U/L cinsinden enzim aktivitelerinin hesabı yapılmıştır. İnhibitör maddelerle enzim aktiviteleri tablo 4’ de verilmiştir.

Bazal enzim aktivitesi ($3,992 \times 10^{-3}$ U/L) %100 aktif kabul edilerek, % aktiviteler hesaplanmıştır. (Şekil 22). Buna göre inhibitör maddelerin % inhibisyon oranları tablo 4’de görüldüğü gibidir.



Şekil 22: İnhibitör maddeler ile aldoz redüktaz enziminin % aktivite değerleri. İnhibitör maddelerle % enzim aktivitesi, bazal aktivite ($3,992 \times 10^{-3}$ U/L) % 100 kabul edilerek hesaplanmıştır. İnhibitör maddeler, tablo 3’ de görüldüğü gibi 1 ile 13 arasında numaralandırılmıştır.

Tablo 4: TZD türevleri ile aldoz redüktaz enzim aktiviteleri ve oluşturdukları % inhibisyon oranları. Sonuçlar 3 paralel çalışmanın ortalamasıdır. % inhibisyon değerleri, ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. Bazal aktivite: $3,992 \times 10^{-3}$ U/L ve kontrol aktivite: $4,539 \times 10^{-3}$ U/L' dir.

İnhibitör Madde	Enzim Aktivitesi (U/L)	% İnhibisyon
1	$3,999 \times 10^{-3} \pm 0,356 \times 10^{-3}$	İnhibitör etki gözlenmemiştir.
2	$3,484 \times 10^{-3} \pm 0,309 \times 10^{-3}$	$12,70 \pm 7,732$
3	$4,264 \times 10^{-3} \pm 0,313 \times 10^{-3}$	İnhibitör etki gözlenmemiştir.
4	$4,176 \times 10^{-3} \pm 0,134 \times 10^{-3}$	İnhibitör etki gözlenmemiştir.
5	$3,970 \times 10^{-3} \pm 0,217 \times 10^{-3}$	$0,56 \pm 4,81$
6	$3,411 \times 10^{-3} \pm 0,051 \times 10^{-3}$	$14,55 \pm 1,29$
7	$3,970 \times 10^{-3} \pm 0,158 \times 10^{-3}$	$0,55 \pm 3,97$
8	$3,970 \times 10^{-3} \pm 0,350 \times 10^{-3}$	$0,55 \pm 8,77$
9	$4,043 \times 10^{-3} \pm 0,030 \times 10^{-3}$	İnhibitör etki gözlenmemiştir.
10	$3,793 \times 10^{-3} \pm 0,044 \times 10^{-3}$	$4,96 \pm 1,12$
11	$3,926 \times 10^{-3} \pm 0,044 \times 10^{-3}$	$1,65 \pm 1,10$
12	$3,690 \times 10^{-3} \pm 0,025 \times 10^{-3}$	$7,55 \pm 0,65$
13	$0,529 \times 10^{-3} \pm 0,088 \times 10^{-3}$	$86,74 \pm 2,21 (IC_{50}: 0,0972 \text{ M})$

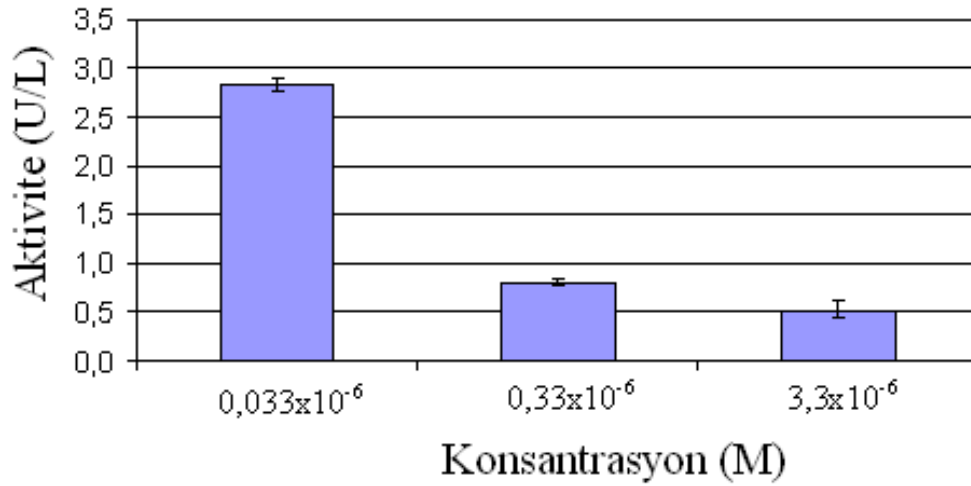
Ölçümler sonucunda 13 numaralı TZD türevi, $\% 86,74 \pm 2,21$ oranında inhibisyon göstermiştir. (Tablo 4).

1, 3 ve 4 numaralı TZD türevi bileşiklerde inhibisyon gözlenmemiştir. Buna karşın, aynı grup TZD türevlerinden 2, 5 ve 6 numaralı bileşiklerde sırası ile $\%15,01$, $\%0,56$ ve $\%16,57$ oranında inhibisyon gözlenmiştir. (Tablo 4).

Diğer taraftan, 7-12 arasında numaralandırılmış olan TZD türevi bileşikleri ile yapılan çalışmada 9 numaralı bileşikte inhibisyon görülmemiş, 7, 8, 10 ve 11 numaralı bileşiklerde ise çok düşük oranlarda inhibisyon gözlenmiştir. Aynı gruptan 12 numaralı bileşikte ise $\% 7,55 \pm 0,65$ oranında inhibisyon gözlenmiştir. (Tablo 4).

İnhibisyon oranı yüksek olan inhibitör maddelerin olası farmasötik kullanımlarının belirlenebilmesi amacı ile IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. IC_{50} (half maximal inhibitory concentration), enzimin $\% 50$ inhibisyonu için gereken inhibitör madde konsantrasyonudur.

13 numaralı TZD türevi bileşiğinin 10^{-4} M, 10^{-5} M ve 10^{-6} M konsantrasyonlarda stok çözeltilerinden 0,1 ml inkübasyon ortamına eklenerek, sırasıyla: $3,3 \times 10^{-6}$ M, $0,33 \times 10^{-6}$ M ve $0,033 \times 10^{-6}$ M final konsantrasyonları ile AR enzim aktivitesi üzerine olası etkileri çalışılmıştır. Ölçümler sonunda elde edilen enzim aktiviteleri sırası ile; $0,529 \times 10^{-3}$ U/L, $0,808 \times 10^{-3}$ U/L, $2,822 \times 10^{-3}$ U/L' dir. (Şekil 23).

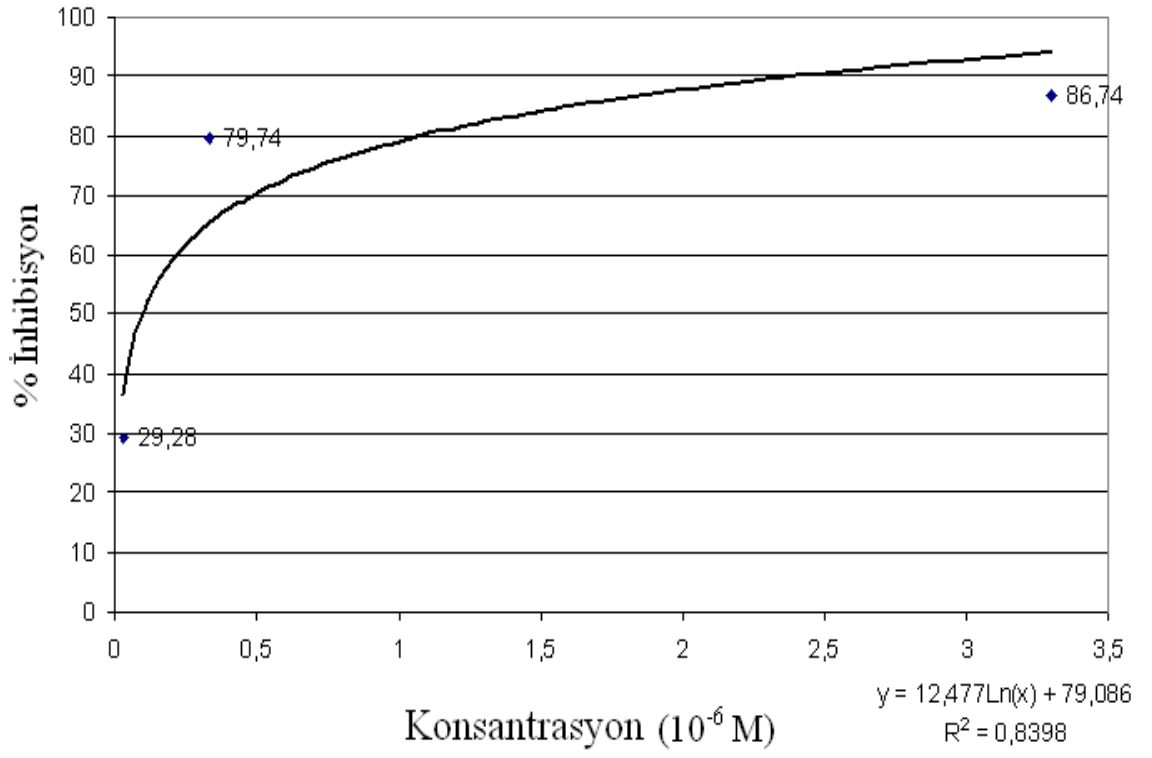


Şekil 23: 13. numaralı TZD türevi bileşiğinin, $3,3 \times 10^{-6}$ M, $0,33 \times 10^{-6}$ M ve $0,033 \times 10^{-6}$ M final konsantrasyonları ile aldoz redüktaz enzim aktivitesi.

13 numaralı TZD türevi bileşiğinin $3,3 \times 10^{-6}$ M, $0,33 \times 10^{-6}$ M ve $0,033 \times 10^{-6}$ M final konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon oranları sırası ile: % $86,74 \pm 2,21$, % $79,74 \pm 0,64$, % $29,28 \pm 1,91$ olarak hesaplanmıştır.

Final konsantrasyonlarına karşı % inhibisyon oranları grafiğe geçirilerek IC_{50} değeri hesaplanmıştır. (Şekil 24). Buna göre AR enziminin % 50 inhibisyonu için gereken 13 numaralı TZD türevi bileşiğin final konsantrasyonu IC_{50} : $0,0972 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur.

% 50' den az inhibisyon gösteren TZD türevlerinin farmasötik amaç ile kullanımı söz konusu olmadığı için bu maddelerin IC_{50} değerlerinin hesaplanması gerekli görülmemiştir.



Şekil 24: 13 numaralı TZD türevinin % inhibisyon grafiği. Grafikte, 13 numaralı TZD türevi bileşiğinin $3,3 \times 10^{-6}$ M, $0,33 \times 10^{-6}$ M ve $0,033 \times 10^{-6}$ M final konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine % inhibisyonu 3 nokta halinde gösterilmiştir.

4. TARTIŞMA

Diyabet, bilindiği gibi çok sık görülen bir metabolik hastalıktır. Bu metabolik hastalık nöropati, nefropati, retinopati, katarakt ve hızlandırılmış ateroskleroza bağlı artan miyokardiyal enfarktüs ve inme riski gibi pek çok dejeneratif komplikasyon ile ilişkilidir. Tip I ve tip II diyabetin her ikisinde de bu patolojilere rastlanmak mümkündür. Bu komplikasyonların önlenmesi ve kontrolü diyabetik hastaların yaşam kalitesi ve ölüm oranları açısından halen ciddi ve önemli bir terapötik problemdir. (Hanefeld ve ark., 1996; Viberti, 2005).

Yüksek kan glukoz düzeyine uzun süre maruz kalınması ikincil diyabetik komplikasyonların nedenidir. Bilindiği gibi bu patolojilerin moleküler mekanizmaları çok çeşitlidir. Bunlar; glikasyon son ürünleri, PKC yolağının aşırı aktivasyonu, poliol ve heksosamin yolaklarının aktivasyonu gibi. Kan glukoz düzeyinin dikkatli kontrolü sonucu bu zararlı etkiler geciktirilebilir (Eastman ve ark., 1993; Hanefeld ve ark., 1996). Ancak, diyabetli kişilerde kan glukozu her zaman normal düzeyde tutulamayacağından, uzun vadeli komplikasyonlar kaçınılmazdır. Buna ek olarak; tip II diyabet teşhisi konulmuş hastalarda genellikle vasküler komplikasyonlar teşhis sırasında bulunmaktadır (Viberti, 2005).

Hiperglisemi sırasında glukozun poliol yolağına katılımı, insulin bağımsız dokular olan retina, lens, böbrek ve sinir dokularında sekonder diyabetik komplikasyonlara neden olduğu bilinmektedir. (Yabe-Nishimura C, 1998; Brownlee, 2001; Oyama T. ve ark., 2006).

Bilindiği gibi, AR enziminin poliol yolağı dışında pek çok metabolik yolakla ilişkisi bulunmaktadır. Bunlar; kardiyovasküler hastalıklar (Ramasamy ve ark., 1999; Hwang ve ark., 2002), inflamasyon (Ramana ve ark., 2006), depresyon (Regenold ve ark., 2000; Renegold ve ark., 2004), renal yetmezlik (Jiang ve ark., 2006; Alexiou ve ark., 2009), over anomalileri (Meyer ve ark., 1992; Bery, 1995) ve kanserdir (Lee ve ark., 2001; Saraswat ve ark., 2006). AR enziminin bu regülatör etkileri inhibisyon çalışmalarının önemini arttırmaktadır. Örneğin, kolon kanseri tedavisi, romatoid artirit gibi pek çok hastalığın tedavisinde de AR inhibitörleri kullanılmaktadır. (Srivastava ve ark., 2005; Ramana ve Srivastava, 2006; Tammali, 2007).

Son yıllarda pek çok ARI çalışmaları gerçekleştirilmiş ancak pek çoğunda farmokinetik problemler, düşük etki veya yan etkiler gözlenmiştir. (Costantino ve ark., 1997; Costantino, 1999; El-Kabbani ve ark., 2004)

ARI'ların bazı yapısal gereklilikleri olduğu yapılan pek çok araştırmada vurgulanmıştır (Urzhumtsev A ve ark., 1997; Lee ve ark., 1998; Costantino ve ark., 2000). Yapılarında, asidik proton, hidrojen bağı yapan gruplar ve aromatik yapı bulunması, bileşiğin enzim ile olan ilişkisini arttırmaktadır. (Costantino ve ark., 1997; Urzhumtsev ve ark., 1997; Lee ve ark., 1998). Bu bilgidен hareketle, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından yeni bir seri 2,4-tiyazolidindion (TZD) türevi 13 adet bileşik sentezlenmiştir. Bu çalışmada, 2,4-TZD türevi 13 adet bileşiğin olası AR inhibitör etkileri incelenmiştir.

Elde edilen aktivite sonuçlarına göre, 13 numaralı bileşikte en yüksek inhibitör etki gözlenirken, 1-12 arasında numaralandırılmış bileşiklerde ise yeterli inhibisyon gözlenmemiştir.

Sonuçta, 2,4-TZD sınıfı bileşiklerde, daha etkili moleküllere ulaşabilmek için, 2,4-TZD halkasının asidik karakterinin korunması ve/veya artırılması, enzim-inhibitör etki potansiyelinin artırılmasını sağlayabilecek bir yaklaşım olarak değerlendirilebilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tüm dünyada ilgili laboratuvarlarda ARI'leri ile yapılan çalışmalar, diyabette AR enzim aktivitesine bağlı komplikasyonların geciktirilmesi veya önlenmesi açısından halen devam etmektedir. Bu çalışma, bazı TZD türevleri ile sınırlıdır. Ancak, 13 numaralı TZD türevi bileşiğinin yapısı, daha sonra çalışılacak olan yeni ARI maddelerinin tasarlanmasına ışık tutacaktır. Pek çok farklı ARI' ü olabilecek bileşiklerle çalışmalara, ilaç sentez çalışması yürütülen alanlarda devam edilecektir.

ÖZET

Bazı Yeni Tiyazolidindion Türevlerinin Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesine Etkileri

Çalışmamızın amacı, bazı 2,4-TZD türevlerinin aldoz redüktaz enzimi üzerine olan olası inhibitör etkilerinin incelenmesidir.

Diyabet, poliol yolağına akışı artırarak diyabetik katarakt, retinopati, nöropati ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonların patogeneğinde önemli rol oynar. AR, (ALR2: E.C: 1.1.1.21), glukozun sorbitole dönüşümünü, poliol yolağının birinci basamağında, NADPH bağımlı olarak katalize eder. Poliol yolağı, SD'nin, NAD bağımlı olarak sorbitolün fruktoza oksidasyonu ile tamamlanır. AR aktivitesi ile sorbitolün hücre içinde sentezi ve birikimi, diyabetik komplikasyonların temel nedenidir. Buna ek olarak, poliol yolağı oksidatif stres oluşumuna katkıda bulunur. AR ve SD enzimlerinin neden olduğu NADPH/NADP⁺ ve NADH/NAD⁺ oranlarının değişmesi sonucunda antioksidan enzimler için gereken kofaktörler azalır. Hayvan modellerinde ARI'leri ile tedavinin sorbitol birikimini ve doku hasarını önlediği gösterilmiştir. Bu çalışmada, 2,4-TZD türevlerinin yeni bir serisi sentezlenmiştir. Bu maddelerin sıgır lensi AR'ını inhibe etme yeteneğı, in vitro spektrofotometrik çalışma ile test edilmiştir. İnhibisyon çalışmaları, herbir bileşimin 10⁻⁴ M konsantrasyondaki stok çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. AR enzimi üzerine, 1-6 arasında numaralandırılmış TZD türevi bileşikleri en fazla % 14,55 oranında ve 7-12 arasında numaralandırılmış TZD türevi bileşikleri en fazla % 7,55 oranında inhibitör aktivite gösterirken, 13 numaralı TZD türevi bileşik % 86,74 ile en yüksek oranda inhibitör aktivite göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Aldoz redüktaz, tiyazolidindion, inhibisyon.

SUMMARY

Effects of Some New Thiazolidinedione Derivates on Aldose Reductase Enzyme Activity

The aim of our study is, to determine the probable inhibitory effect of some 2,4-TZD derivatives.

Diabetes causes increased flux through the polyol pathway, which is thought to play critical role in the pathogenesis of various diabetic complications, such as diabetic cataract, retinopathy, neuropathy and nephropathy. AR (ALR2: E.C: 1.1.1.21) catalyzes the NADPH-dependent conversion of glucose to sorbitol, the first step in the polyol pathway of glucose metabolism. The pathway is completed by SD, which catalyzes the NAD-linked oxidation of sorbitol to fructose. Synthesis and accumulation of sorbitol in cells due to AR activity is the main cause of diabetic complications. In addition, the polyol pathway is the major contributor to oxidative stress. AR and SDH-mediated alteration of NADPH/NADP⁺ and NADH/NAD⁺ ratio result in depletion of cofactors required for antioxidant enzymes. Treatment with AR inhibitors has been shown to prevent sorbitol accumulation and tissue injury in animal models. In this study, a new series of 2,4-TZD derivatives synthesized. The synthesized compounds were tested for their ability to inhibit bovine lens AR by an in vitro spectrophotometric assay. The inhibition study was performed merely by using 10⁻⁴ M concentrations stock solution of each compound. TZD derivative compound 13 showed the highest inhibitory activity on AR (86,74 %), while TZD derivative compounds 1-6 showed maximum 14,55 % and TZD derivative compounds 7-12 showed maximum 7,55 % inhibitory activity on aldose reductase enzyme.

Key Words: Aldose reductase, thiazolidinedione, inhibition.

KAYNAKLAR

- AJJAN RA, GRANT PJ. (2006). Cardiovascular disease prevention in patients with type 2 diabetes: The role of oral anti-diabetic agents. *Diab Vasc Dis Res.*;3(3):147-58
- ALEMZADEH R, WYATT D.T. (2004). Diabetes Mellitus. In: Behrman R.E, Kliegman R.M, Jenson H.B (eds). Nelson Textbook of Pediatrics. 17 edition. Pennsylvania: Elsevier Saunders;. p.1947-72.
- ALEXIOU, P.; NICOLAOU, I.; STEFEK, M.; KRISTL, A.; DEMOPOULOS, V.J. (2008). Design and synthesis of *N*- (3,5-disfluoro-4-hydroxyphenyl) benzenesulfonamides as aldose reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 16, 3926-3632.
- ALEXIOU P; PEGKLIDOU K; CHATZOPOULOU M; NICOLAOU I; DEMOPOULOS V J. (2009). Aldose Reductase Enzyme and its Implication to Major Health Problems of the 21st Century. *Current Medicinal Chem.*, 16, 734-752.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (1997). The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. Volume 20, Supplement 1:1183-97.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (1997b). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 20:1183-97.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. (2000). Type 2 Diabetes in Children and Adolescents. *Diabetes Care*. Vol. 23. No:3.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION (2004). "Screening for Type 2 Diabetes" *Diabetes Care*, 27 Suppl:S11-S14.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. (2004b). *Diabetes Care*; 27, Suppl. 1.
- APFEL SC. (1999). Nerve regeneration in diabetic neuropathy. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 1: 3-11.
- ARMSTRONG DG, LAVERY LA, QUBEDEAUX TL, WALKER SC. (1998). Surgical morbidity and the risk of amputation due to infected puncture wounds in diabetic versus nondiabetic adults. *Arch intern med*;158:289-292.
- ASANO, T., SAITO, Y., KAWAKAMI, M., YAMADA, N. (2002). Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *J. Diabetes Complications*. 16,133.

- BAGNASCO, S.M.; UCHIDA, S.; BALABAN, R.S.; KADOR, P.F.; BURG, M.B. (1987). Induction of aldose reductase and sorbitol in renal inner medullary cells by elevated extracellular NaCl, *Proc Natl Acad Sci U S A*; **84**(6):1718-20.
- BAKILLAH, A., GRIGOROVABORSOS, A.M., GUILLOT, R., URIOS, P., STERNBERG., M. (1996). Effect of aldose reductase inhibitor on type IV collagen production human endothelial-cells cultured in high glucose. *Diabetologia*. **39**:641-648.
- BARISANI, D., MENEVERI, R., GINELLI, E., CASSANI, C., AND CONTE, D. (2000). Iron overload and gene expression in HepG2 cells: analysis by differential display *FEBS Lett*. **10**;469(2-3):208-12.
- BAYNES JW, THORPE SR. (1999). Role of oxidative stress in diabetic complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*; **48**:1-9.
- BELL ME, PETERSON RG, EICHBERG J. (1982). Metabolism of phospholipids in peripheral nerve from rats with chronic streptozotocin-induced diabetes: increased turnover of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *J Neurochem*.;**39**(1):192-200.
- BERRIDGE MJ, IRVINE RF. (1989). Inositol phosphates and cell signalling. *Nature*. **341**(6239):197-205.
- BERTIMATTERA, L., DAY, N., PETERSON, R.G., EICHBERG, J. (1996). An aldose reductase inhibitor but not myoinositol blocks enhanced polyphosphoinositide turnover in peripheral-nerve from diabetic rats. *Metabolism Clin Exp*. **45**:320-327.
- BERY G T. (1995). The role of polyols in the pathophysiology of hypergalactosemia. *Eur. J. Pediatr.*, **154**, S53-64.
- BEYER, T. A., AND HUTSON, N. J. (1986). Introduction: evidence for the role of the polyol pathway in the pathophysiology of diabetic complications. *Metabolism* **35**, 1–31.
- BHADADA, S.K., SAHAY, R.K., JYOTSNA, V.P., AGRAWAL, J.K., (2001). Diabetic Neuropathy: Current Concepts. *Journal, Indian Academy of Clinical Medicine*. **2**(4):305-318.
- BHATNAGAR, A., LIU, S., DAS, B., ANSARI, N. H., AND SRIVASTAVA, S. K. (1990). Inhibition kinetics of human kidney aldose and aldehyde reductases by aldose reductase inhibitors. *Biochem, Pharmacol*, **39**, 1115-1124.
- BHATNAGAR, A., AND SRIVASTAVA, S. K. (1992). Aldose reductase: congenial and injurious profiles of an enigmatic enzyme. *Biochem. Med. Metab. Biol*. **48**, 91–121.
- BHATNAGAR, A.; RUEF, J.; LIU, S.; SRIVATAVA, S.; SRIVATAVA, S.K. (2001). Regulation of vascular smooth muscle cell growth by aldose reductase. *Chem. Biol. Interact.*, **30**, 130.

- BOHREN KM, BULLOCK B, WERMUTH B AND GABBAY KH (1989). The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* **264**: 9547-9551.
- BOHREN, K.M., PAGE, J.L., SHANKAR, R., HENRY, S.P., GABBAY K.H. (1991). Expression of human aldose and aldehyde reductases. Site-directed mutagenesis of a critical lysine 262. *J.Biol. Chem.* **266**:24031-24037.
- BOZDAĞ-DÜNDAR O., DAŞ-EVCİMEN N., CEYLAN-ÜNLÜSOY M., ERTAN R., SARIKAYA M. (2007). Some new thiazolyl thiazolidinedione derivatives as aldose reductase inhibitors. *Medicinal Chemistry Research*, **16**:39-47.
- BOZDAĞ-DÜNDAR O., DAŞ-EVCİMEN N., CEYLAN-ÜNLÜSOY M., ERTAN R., SARIKAYA M. (2008a). "Synthesis and aldose reductase enzyme inhibition activity of some new substituted-thiazolyl thiazolidinedione derivatives." *European Journal of Medicinal Chemistry*. 43:2412-2417.
- BOZDAĞ-DÜNDAR O., E. J. VERSPOHL, N. DAŞ-EVCİMEN, R. M. KNAUP, K. BAUER, M.SARIKAYA, B.EVRANOS, R. ERTAN. (2008b). " Synthesis and biological activity of some new flavonyl-2,4-thiazolidinediones." *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.**16**:6747-6751.
- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and Sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**:248-252.
- BROWNLEE M, VIASSARA H, CCRAMI A. (1984). Non-enzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications, *Ann Intern Med*; **101**:527-37.
- BROWNLEE M, (1992). Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* **15**: 1835–1843.
- BROWNLEE, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Vol. **414**. 813-820.
- BRUNO, G.; CONSTANTINO, L.; CURINGA, C.; MACCARI, R.; MONFORTE, F.; NICOLÒ, F.; OTTANA, R.; VIGORITA, G.M. (2002). Synthesis and aldose reductase inhibitory activity of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones. *Bioorg. Med. Chem.*, **10**, 1077-1084.
- BURG, M.B. (1995). Molecular basis of osmotic regulation, *Am J Physiol.*; **268**(6 Pt 2):F983-96.
- BURG, M.B.; KWON, E.D.; KULTZ, D. (1997). Regulation of gene expression by hypertonicity, *Ann. Rev. Physiol.*; **59**:437-55.
- BURSEL SE, KING GL. (1999). Can protein kinase C inhibition and vitamin E prevent the development of diabetic vascular complications? *Diabetes Res Clin Pract*; **45**:169-182.

- BUYUKBINGOL, E., DAS, N., KLOPMAN, G. (1994). Synthesis of 1,4-dihydro-4-oxo-quinoline-3-carboxylic acid derivatives as inhibitors of lens aldose reductase. *Arch Pharm.* **327**:129-131.
- CAMERON NE, COTTER MA. (1996). Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism* **45**:1147–1152.
- CAO, D; TAT FAN. S.; CHUNG S. (1998). Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *J. Biol. Chem.* **273**(19), 11429-11435.
- CARDENAS, M. L., CORNISH-BOWDEN, A., AND URETA, T. (1998) Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**, 242–264.
- CARBONE, V.; CHUNG, R.; ENDO, S.; HARA, A.; EL-KABBANI, O. (2008). Structure of aldehyde reductase in ternary complex with coenzyme and the potent 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor 3,5-dichlorosalicylic acid: implications for inhibitor binding and selectivity. *Arch. Biochem. Biophys.*, **479**, 82.
- CARPER, D., NISHIMURA, C., SHINOHARA, T., DIETZCHOLD, B., WISTOW, G., CRAFT, C., KADOR, P. & KINOSHITA, J. H. (1987). Aldose reductase and e-crystallin belong to the same protein superfamily as aldehyde reductase, *FEBS Lett.* **220**, 209-213.
- CARPER, D.A.; WISTOW, G. NISHIMURA, C.; GRAHAM, C.; WATANABE, K.; FUJII, Y.; HAYASHI, H.; HAYAISHI, O. (1989). A superfamily of NADPH-dependent reductases in eukaryotes and prokaryotes. *Exp. Eye Res.*, **49**, 377-388.
- CARROZZA, J.P., KUNTZ, R.E., FISHMAN, R.F., BAIM, D.S. (1993). Restenosis after arterial injury caused by coronary stenting in patients with diabetes mellitus. *Ann Intern Med.* **118**:344-349.
- CERELLI MJ, CURTIS DL, DUNN JP, NELSON PH, PEAK TM, WATERBURY LD. (1986). Antiinflammatory and aldose reductase inhibitory activity of some tricyclic arylacetic acids. *J Med Chem.*; **29**(11):2347-51.
- CHAPPEY, O., DOSQUET, C., WAUTIER, M.P., WAUTIER, J.L. (1997). Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur J Clin Invest.* **27**:97-108.
- CHENG, H.M., GONZALEZ, R.G. (1986). The effect of high glucose and oxidative stress on lens metabolism, aldose reductase and senile cataractogenesis. *Metabolism.* **35**:10-14.
- CHUNG, S.S.M., CHUNG, S.K. (2003). Genetic analysis of Aldose Reductase in diabetic complications. *Current medicinal chemistry.* **10**:1375-1387.
- 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**:S233-236.

- CHUNG SSS, CHUNG SK. (2005). Aldose reductase in diabetic microvascular complications. *Current Drug Targets*; **6**:475-86.
- CIPOLLA, M.J., PORTER, J.M., OSOL, G. (1997). High glucose concentrations dilate cerebral arteries and diminish myogenic tone through an endothelial mechanism. *Stroke*. **28**:410-411.
- CLEMENS, R,S, (1979). Diabetic Neuropathy New Concepts of its Etiology, *Diabetes*, **28**: 604-11.
- CLEMENTS, R.S. JR., DIETHELM, A.C. (1979). The Metabolism of Myoinositol by the Human Kidney, *J. Lab. Clin. Med.*, **93**: 210-9.
- COHEN, M.P. (1986). Aldose reductase, glomerular metabolism, and diabetic nephropathy. *Metabolism*. **35**(4 suppl 1):55-9.
- COHEN M M. (2003). TGF β /Smad Signalling System and its Pathologic Correlates. *Am J Med Genet A*; **116A**(1):1-10.
- COOPER, M.E., GILBERT, R.E., JERUMS, G. (1997). Diabetic vascular complications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 24:770-775.
- COPPEY LJ, GELLETT JS, DAVIDSON EP, DUNLAP JA, YOREK MA. (2002). Effect of treating streptozotocin-induced diabetic rats with sorbinil, myo-inositol or aminoguanidine on endoneurial blood flow, motor nerve conduction velocity and vascular function of epineurial arterioles of the sciatic nerve. *Int J Exp Diabetes Res* **3**:21–36.
- COSTANTINO, L., RASTELLI, G., CIGNARELLA, G., VIANELLO, P., BARLOCCO, D. (1997) . New aldose reductase inhibitors as potential agents for the prevention of long-term diabetic complication. *Exp. Opin. Ther. Patents*, **7**, 843-858.
- COSTANTINO, L.; RASTELLI, G.; VIANELLO, P.; CIGNARELLA, G.; BARLOCCO, D. (1999). Diabetes complications and their potential prevention: aldose reductase inhibition and other approaches. *Med. Res. Rev.*, **19**(1), 3.
- COSTANTINO, L., RASTELLI, G., GAMBERONI MC., BARLOCCO D., (2000). Pharmacological approaches to the treatment of diabetic complications. *Exp. Opin Ther Pat.*; **10** 1245-1262.
- DAS, B., AND SRIVASTAVA, S. K. (1985). Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase II from human erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.* **238**, 670-679.
- DA SETTIMO, F., PRIMOFIORE, G., DA SETTIMO, A., LA MOTTA, C., TALIANI, S., SIMORINI, F., NOVELLINO, E., GRECO, G., LAVECCHIA, A. AND BOLDRINI, E. (2001). [1,2,4]Triazino[4,3-a]benzimidazole acetic acid derivatives: a new class of selective aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.* **44**, 4359 – 4369.

- DAVIS, S.N., GRANNER, D.K. (2001). Insulin, Oral Hypoglysemic Agents and the Pharmacology of the Endocrine Pancreas. In: Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. 10th Edition. Ed.: J.G. Hardman, L.E.Limbird,p.:1679-1715.
- DAVIDSON J. K. (1991). Clinical Diabetes Mellitus, Diabetic Eye Disease, *Thime Medical Puplishers*, p: 427-444.
- DAVIGNON, J., GANZ, P. (2004). Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation*. **109**:II27-III32.
- DCCT RESEARCH GROUP. (1993). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long term complications in insulin dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med*. **329**:977-986.
- DCCT RESEARCH GROUP. (1995). The relationship of glycemic exposure to the risk of development and progression of retinopathy in the DCCT. *Diabetes*. **44**:968-83.
- DEL CORSO, A., BARSACCHI, D., GIANNESSI, M., TOZZI, M. G., CAMICI, M., AND MURA, U. (1989). Change in stereospecificity of bovine lens aldose reductase modified by oxidative stress. *J.Biol. Chem*. **264**, 17653-17655.
- DEL CORSO, A., COSTANTINO, L., RASTELLI, G., BUONO, F. MURA, U. (2000). Aldose reductase does catalyse the reduction of glyceraldehyde through a stoichiometric oxidation of NADPH. *Exp. Eye Res*. **71**:515-521.
- DITZEL, J., SCHWARTZ, M. (1967). Abnormally increased glomerular filtration rate in short-term insulin treated diabetic subjects. *Diabetes*. **16**:264-267.
- DIXIT BL, BALENDIRAN GK, WATOWICH SJ, SRIVASTAVA S, RAMANA KV, PETRASH JM, BHATNAGAR A, SRIVASTAVA SK.(2000). Kinetic and structural characterization of the glutathione-binding site of aldose reductase. *J Biol Chem*.; **275**(28):21587-95.
- DONKIN SS, BERTICS SJ, ARMENTANO LE. (1997). Chronic and transitional regulation of gluconeogenesis and glyconeogenesis by insulin and glucagon in neonatal calf hepatocytes. *J Anim Sci*.**75**(11):3082-7.
- DONOHUE, P. J., ALBERTS, G. F., HAMPTON, B. S. & WINKLES, J. A. (1994). A delayed-early gene activated by fibroblast growth factor-1 encodes a protein related to aldose reductase, *J.Biol. Chem*. **269**, 8604-8609.
- DUNLOP M. (2000). Aldose reductase and the role of polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int*; **58**(suppl 77):S3-S12.
- EASTMAN, R. C.; SIEBERT, C. W.; HARRIS, M.; GOLDEN, P. J. (1993). Clinical review 51: Implications of the Diabetes Control and Complications Trial. *Clin. Endocrinol. Metab*. **77**(5):1105-7.

- EL-KABBANI, O, CARPER DA, MCGOWAN MH, DEVEDJIEV Y, REES- MILTON KJ, FLYNN TG. (1997). Studies on the inhibitor-binding site of porcine aldehyde reductase: crystal structure of the holoenzyme-inhibitor ternary complex. *Proteins*; **29**:186-192.
- EL-KABBANI, O., WILSON, D. K., PETRASH, M. AND QUIOCHO, F. A. (1998). Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Mol. Vis.* **4**, 19 – 25.
- EL-KABBANI, O.; RUIZ, F.; DARMANIN, C.; CHUNG, R. P. (2004). Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition.. *T. Cell. Mol. Life Sci.* **61**, 750.
- EL-KABBANI, O.; DARMANIN, C.; SCHNEIDER, T. R.; HAZEMANN, I.; RUIZ, F.; OKA, M.; JOACHIMIAK, A.; SCHULZE-BRIESE, C.; TOMIZAKI, T.; MITSCHLER, A.; PODJARNY, A. (2004). Ultrahigh resolution drug design. II. Atomic resolution structures of human aldose reductase holoenzyme complexed with Fidarestat and Minalrestat: implications for the binding of cyclic imide inhibitors. *Proteins*, **55**(4):805-13.
- EL-KABBANI O, CARBONE V, DARMANIN C, OKA M, MITSCHLER A, PODJARNY A, SCHULZE-BRIESE C, CHUNG RP. (2005). Structure of aldehyde reductase holoenzyme in complex with the potent aldose reductase inhibitor fidarestat: implications for inhibitor binding and selectivity. *J Med Chem.*; **48**(17):5536-42.
- EL-KABBANIA O., AND PODJARNY A. (2007). Selectivity determinants of the aldose and aldehyde reductase inhibitor-binding sites *Cell Mol Life Sci.*; **64**(15):1970-8.
- ENGERMANN, RL., AND KERN, T. S. (1984). Experimental galactosemia produces diabetic-like retinopathy. *Diabetes*. **33**.97-100.
- 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.
- EVCIMEN NET D.-, OYA BOZDAG-DUNDAR, MUTLU SARIKAYA, RAHMIYE ERTAN. (2008). “In vitro aldose reductase inhibitory activity of some flavonyl-2,4-thiazolidinediones”. *JEIMC*, **23**:297-301.
- EURODIAB ACE (2000). Study Group. Variation and trends in incidence of childhood diabetes in Europe. *Lancet*; **11**:873-6.
- FABRE, S., MANIN, M., PAILHOUX, E., VEYSSIERE, G. & JEAN, C. (1994). Identification of a functional androgen response element in the promoter of the gene for the androgen-regulated aldose reductase like protein specific to the mouse vas deferens, *J. Biol. Chem.* **269**, 5857-5864.
- FELDMAN HB, SZCZEPANIK PA, HAVRE P, CORRALL RJ, YU LC, RODMAN HM, ROSNER BA, KLEIN PD, LANDAU BR. (1977). Stereospecificity of the hydrogen transfer catalyzed by human placental aldose reductase. *Biochim Biophys Acta.*; **480**(1):14-20.

- FERRANNINI E, BUZZIGOLI G, BONADONNA R, GIORICO MA, OLEGGINI M, GRAZIADEI L, PEDRINELLI R, BRANDI L, BEVILACQUA S. (1987). Insulin resistance in essential hypertension. *N Engl J Med.* 317(6):350-7.
- FISCHER F. (1957). The first case of diabetic retinopathy; Eduard von Jaeger, Vienna, 1855. *Wien Med Wochenschr.* **23**;107(47):969-72.
- FLYNN, T. G., SHIRES, J. AND WALTON, D. J. (1975). Properties of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-dependent aldehyde reductase from pig kidney: amino acid composition, reactivity of cysteinyl residues, and stereochemistry of Dglyceraldehyde reduction. *J. Biol. Chem.* **250**, 2933 – 2940.
- FLYNN, T. G. (1982). Aldehyde reductases: monomeric NADPH-dependent oxidoreductases with multifunctional potential. *Biochem. Pharmacol* **31**, 2705-2712.
- FORSBLOM, C.M., GROOP, P.H., EKSTRAND, A., TOTTERMAN, K.J., SANE, T., SALORANTA, C. (1998). Predictors of progression from normoalbuminuria to microalbuminuria in NIDDM. *Diabetes Care.* **21**:1932-8.
- GABBAY, K.H.; MEROLA, L.O.; FIELD, R.H. (1966). Sorbitol pathway: presence in nerve and cord with substrate accumulation in diabetes. *Science*, **151** (707), 209.
- GABBAY KH. (1975). Hyperglycemia, polyol metabolism, and complications of diabetes mellitus. *Annu Rev Med*; **26**:521-36.
- GABBAY KH. (2004). Aldose reductase inhibition in the treatment of diabetic neuropathy: where are we in 2004?. *Curr Diab Rep.*; **4**(6):405-8.
- GARCIA, S.F., VIRAG, L., JAGTAP, P., SZABO, E., MABLEY, J.G., LIAUDET, L., MARTON, A., HOYT, D.G., MURTHY, K.G., SALZMAN, A.L., SOUTHAN, G.J., SZABO, C. (2001). Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly(ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med.* **7**:108-113.
- GILLIGAN JP, SPECTOR S. (1984). Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*; **6** (suppl III):11144-9.
- GIUGLIANO D, PAOLISSO G, CERIELLO A. (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes care*; **19**(3):257-267 64.
- GONZALES, R. G.; BARNETT, P.; AGUAYO, J.; CHENG, H.M.; CHYLACK, L.T.J. (1984). Direct measurement of polyol pathway activity in the ocular lens. *Diabetes*, **33**, 196.
- GRANDHEE SK, MONNIER VM. (1991). Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine. Glucose, fructose and ascorbate as pentosidine precursors. *J. Biol. Chem.* **266**:11649-11653.

- GREENE, D. A., DEJESUS, P. V., JR. & WINEGRAD, A.I. (1975). Effects of insulin and dietary myoinositol on impaired peripheral motor nerve conduction velocity in acute streptozotocin diabetes. *J. Clin. Invest.* **55**(6), 1326-1336.
- GREENE DA, LATTIMER SA, SIMA AA.(1987). Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med.* **5**;316(10):599-606.
- GREENE. D.A., SIMA, A.A.F., STEVENS, M.J., FELDMAN, E.L., LATTIMER, S.A. (1992). Complications:neuropathy, parhogenetic considerations. *Diabetes Care.* **15**:1902-1925.
- GREENE, D.A., AREZZO, J.C., BROWN, M.B. (1999). Effect of aldose reductase inhibition on nerve conduction and morphometry in diabetic neuropathy. Zenarestat Study Group. *Neurology.* **53**:580-591.
- GRIMSHAW, C.E., SHAHBAZ, M., PUTNEY, C.G. (1990). Mechanistic basis for nonlinear kinetics of aldehyde reduction catalyzed by aldose reductase. *Biochemistry.* **29**:9947-9955.
- GRIMSHAW, C.E., BOHREN, K.M., LAI, C.J., GABBAY, K.H. (1995). Human aldose reductase–rate constants for a mechanism including interconversion of ternary complexes by recombinant wild-type enzyme. *Biochemistry.* **34**:14356-14365.
- GRIMSHAW, C.E., BOHREN, K.M., LAI, C.J., GABBAY, K.H. (1995). Human aldose reductase subtle effects revealed by rapid kinetic studies of the c298a mutant enzyme. *Biochemistry.* **34**:14366-14373.
- GUI T, TANIMOTO T, KOKAIY, NISHIMURA C. (1995). Presence of a closely related subgroup in the aldo-ketoreductase family of the mouse. *Eur. J. Biochem.* **227**, 448-453.
- HALLER, M.J., ATKINSON, M.A., SCHATZ, D. (2005). Type 1 diabetes mellitus: etiology, presentation and management. *Pediatr Clin North Am.* **52**:1553-78.
- HAMADA, Y., ARAKI, N., HORIUCHI, S., HOTTA, N. (1996). Role of polyol pathway in nonenzymatic glycation. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11** Suppl 5,95.
- HAMADA Y., NAKAMURA J., NARUSE K., KOMORI T., KATO K., KASUYA Y., NAGAI R., HORIUCHIS., HOTTA N. (2000). Epalrestat, an aldose reductase inhibitor, reduces the levels of Nepsilon-(carboxymethyl)lysine protein adducts and their precursors in erythrocytes from diabetic patients. *Diabetes Care.* **23**: 1539-1544.
- HAMMES HP, 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**(3):294-99.
- HAMMERMAN, M.R, SACKTOR, B. DAUGHADAY, W.H. (1980). Myoinositol Transport in Renal Bruch Border Vesicles and its Inhibition by D-Glucose, *Am.J.Physiol*, **239**: F 113-20.

- HANEFELD, M.; FISCHER, S.; JULIUS, U.; SCHULZE, J.; SCHWANEBECK, U.; SCHMECHEL, H.; ZIEGELASCH, H. J.; LINDNER, J. (1996). Risk factors for myocardial infarction and death in newly detected NIDDM: the Diabetes Intervention Study, 11-year follow-up. *Diabetologia*, **39**, 1577.
- HARA, A., DEYASHIKI, Y., NAKAYAMA, T. AND SAWADA, H. (1983). Isolation and characterization of multiforms of aldehyde reductase in chicken kidney. *Eur. J. Biochem.* **133**, 207 – 214.
- HARRISON, D. H.; BOHREN, K. M.; RINGE, D.; PETSKO, G. A.; GABBAY, K. H. (1994). An anion binding site in human aldose reductase: mechanistic implications for the binding of citrate, cacodylate, and glucose 6-phosphate. *Biochemistry.*, **33**, 2011.
- HAYASHI, H., FUJII, Y., WATANABE, K., URADE, Y. AND HAYAISHI, O. (1989). Enzymatic conversion of prostaglandin H₂ to prostaglandin F₂ alpha by aldehyde reductase from human liver: comparison to the prostaglandin F synthetase from bovine lung. *J. Biol. Chem.* **264**, 1036 – 1040.
- HAWTHORNE, J. N. (1960). The inositol phospholipids. *J. Lipid Research*, **1**, 255.
- HERRMANN RK, KADOR PF, AND KINOSHITA JH. (1983). Rat lens aldose reductase: Rapid purification and comparison with human placental aldose reductase. *Exp Eye Res* **37**:467.
- HERS HG. (1956). The mechanism of the transformation of glucose in fructose in the seminal vesicles. *Biochim Biophys Acta*; **22**(1):202-3.
- HOLLENBECK, C., REAVEN, G.M. (1987). Variations in insulin stimulated glucose uptake in healthy individuals with normal glucose tolerance. *J Clin Endocrinol Metab.* **64**.1169-73.
- HOSTETTER, T.H., TROY, J.L., BRENNER, B.M. (1981). Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* **19**: 410-415.
- HOTTA N, TOYOTA T, MATSUOKA K, SHIGETA Y, KIKKAWA R, KANEKO T, TAKAHASHI A, SUGIMURA K, KOIKE Y, ISHII J, SAKAMOTO N; SNK-860 DIABETIC NEUROPATHY STUDY GROUP. (2001). Clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy: a 52-week multicenter placebocontrolled double-blind parallel group study. *Diabetes Care*; **24**(10):1776-82.
- HSUEH, W.A., LAW, R.E. (1998). Cardiovascular risk continuum: implications of insulin resistance and diabetes. *Am. J. Med.* **105**:4S-14S.
- HUDSON BI, HOFFMAN MA, BUCCIARELLI L, WENDT T, MOSER B, LU Y, GU W, STERN DM., D'AGATI V, YAN SD, YAN SF, GRANT PJ, SCHMIDT AM. (2002). Glycation and diabetes: The RAGE connection. *Curr Sci*; **83**(12):1515-1521.

- HUMPHREY, L.L., BALLARD, D.J., FROHNERT, P.P., CHU, C.P., O'FALLON, W.M., PALUMBO, P.J. (1989). Chronic renal failure in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A population-based study in Rochester, Minnesota. *Ann Intern Med.* **111**:788-796.
- HUNG, C. F. AND PENNING, T. M. (1999). Members of the nuclear factor 1 transcription factor family regulate rat 3 α hydroxysteroid/ dihydrodiol dehydrogenase (3 α -HSD/DD AKR1C9) gene expression: a member of the aldo-keto reductase superfamily. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1704 – 1717.
- HWANG Y C; SATO S; TSAI J Y; YAN S; BAKR S; ZHAN H; OATES P J; RAMASAMY R. (2002). Aldose reductase activation is a key component of myocardial response to ischemia. *FASEB J.*, **16**, 243-245.
- INOUE, J.; CUI, Y.; SAKAI, O.; NAKARMURA, Y.; KOGISO, H.; KADOR, P. (2000). Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel N-nitromethylsulfonanilide derivatives. *Bioorg. Med., Chem.* **8**, 2167-2173.
- 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 beta inhibitor. *Science.* 272,728.
- JACOBS, J.R.C., DAS-EVCIMEN, N., KING, G.L. (2003). New treatments for prevention of insulin resistance and diabetes complications: PKC involvement. In:RAZ, I., SKYLER, J.S., SHAFRIR, E., eds. Diabetes from Research to Diagnosis and Treatment. London: Martiz Dunitz. 455-479. PUBMED DE BULAMADIM-
- JACQUES P.F., CHYLACK L.T. (1991). Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* **53**:352-355.
- JAKUŠ, V., RIETBROCK, N. (2004). Advanced Glycation End-Products and the Progress of Diabetic Vascular Complications. *Physiol. Res.* **53**:131-142.
- JAY, D., HITOMI, H.; GRIENDLING, K. K. (2006). Oxidative stress and diabetic cardiovascular complications. *Free Rad. Biol. Med.*, **40**, 183.
- JEDZINIAK J. A., YATES E. M. AND KINOSHITA J. H. (1973). Lens polyol dehydrogenase. *Exp. Eye Res.* **16**: 95–104.
- JEZ, J.M.; BENNET, M.J.; SCHLEGEL, B.P; LEWIS, M; PENNING,T.M. (1997). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem. J.*, **326**, 625-636.
- JI, Q., AOYAMA, C., NIEN, Y. D., LIU, P. I., CHEN, P. K., CHANG, L., STANCZYK, F. Z. AND STOLZ, A. (2004). Selective loss of AKR1C1 and AKR1C2 in breast cancer and their potential effect on progesterone signaling. *Cancer Res.* **64**, 7610 – 7617.

- JIANG, Z.Y., LIN, Y-W., CLEMONT, A., FEENER, E.P., HEIN, D.K., IGARASHI, M., YAMAUCHI, T., WHITE, F.M., KING, G.L. (1999). Characterization of selective resistance to insulin signaling in the vasculature of obese Zucker (fa/fa) rats. *J. Clin. Invest.* **104**:447-457.
- JIANG T; CHE C; LIN Y ; LI L; ZHANG N. (2006). Aldose reductase regulates TGF- β 1-induced production of fibronectin and type IV collagen in cultured rat mesangial cells. *Nephrology* , **11**, 105-112.
- KADOR PF, KINOSHITA JH, BRITTAIN DR, MIRRLEES DJ, SENNITT CM, STRIBLING D. (1986). Purified rat lens aldose reductase. Polyol production in vitro and its inhibition by aldose reductase inhibitors. *Biochem J.* **240**(1):233-7.
- KADOR, P.F., KINOSHITA, J.H., STRIBLING, D., BRITTAIN, D.R., MIRRLESS, D.J., SENNITT, C.M. (1987). Rat lens aldose reductase and polyol production: a reply. *Biochem. J.* **247**:495-496.
- KAMON, N., MABUCHI, H., TAKEDA, R., TERASHIMA, H. (1991). Effects of aldose reductase inhibitor (ONO-2235) on human erythrocyte sorbitol concentrations in 75 g oral glucose tolerance tests. *Horm. Metab. Res.* **23**,226.
- KARASU C, DDEWHURST M., STEVENS EJ, TOMLINSON DR. (1995). Effects of anti-oxidant treatment on sciatic nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats; comparison with essential fatty acids. *Diabetologia*, **38**:129-34.
- KARJALAINEN, J., KNIP, M., HYOTY, H., LINIKKI, P., ILONEN, J., KAAR, M.L., AKERBLUM, H.K. (1988). Relationship between serum insulin antibodies, islet cell and antibodies and Coxacki-B4 and mumps virus specific antibodies at the clinical manifestation of type 1 diabetes. *Diabetologia*. **31**:146-52.
- KASHIWAGI A, ASAHINA T, IKEBUCHI M, TANAKA Y, TAKAGI Y, NISHIO Y, KIKKAWA R, SHIGETA Y. (1994). Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. *Diabetologia* **37**: 264–269
- KAUL, C.L.; RAMARAO, P. (2001). The role of aldose reductase inhibitors in diabetic complications: recent trends. *Methods. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, **23**, 465., 39, 53.
- KIMMELSTIEL, P., WILSON, C. (1936). Intercapillary lesions in glomeruli of kidney. *American Journal of Pathology*. **12**:83–97.
- KINOSHITA J. H., FUTTERMAN S., SATOH K. AND MEROLA L. O. (1963). Factors affecting the formation of sugar alcohols in ocular lens. *Biochim. Biophys. Acta* **74**: 340–350.
- KINOSHITA, J.H. (1965). Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalmol.* **4**:786-790.

- KINOSHITA, J.H. (1974). Mechanisms initiating cataract formation. Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol.* **13**:713-724.
- KINOSHITA J. H., AND NISHIMURA, C. (1988). The involvement of aldose reductase in diabetic complications. *Diabetes Metabo. Rev.* **4**, 323-337.
- KOYA D, KING GL. (1998). Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*; **47**:859-866.
- 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.
- KUMAR P A; REDDY G B. (2007). Focus on molecules: aldose reductase *Exp. Eye Res.*, **85**,739-40.
- KUROWSKA EM. (2002). Nitric oxide therapies in vascular diseases. *Curr Pharm Des*; **8**:155-66.
- LAASKO M. (1999). Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes*; **48**:937-42.
- LAL S, SZWERGOLD BS, TAYLOR AH, RANDALL WC, KAPPLER F, BROWN TR. (1995). Production of fructose and fructose-3-phosphate in maturing rat lenses. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **36**:969-973.
- LANDRY D W; OLIVER J A. (2001). Mechanisms of disease: The pathogenesis of vasodilatory shock. *N. Engl. J. Med.*, **345**, 588-595.
- LEE, A. Y.; CHUNG, S. K.; CHUNG, S. S. (1995). Demonstration that polyol accumulation is responsible for diabetic cataract by the use of transgenic mice expressing the aldose reductase gene in the lens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 2780.
- LEE, A.Y., CHUNG, S.S. (1999). Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J.* **13**:23-30.
- LEE EK, REGENOLD WT, SHAPIRO P. (2002). Inhibition of aldose reductase enhances HeLa cell sensitivity to chemotherapeutic drugs and involves activation of extracellular signal-regulated kinases. *Anticancer Drugs*. **13**(8):859-68.
- LEE YS, CHEN Z, KADOR PF. (1998). Molecular modeling studies of the binding modes of aldose reductase inhibitors at the active site of human aldose reductase. *Bioorg Med Chem.* **(10)**:1811-9.

- 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.
- LEFRANÇOIS-MARTINEZ A-M; BERTHERAT J.; VAL P.; TOURMAIRE C.; GALLO-PAYET N; HYNDMAN D.; SVEYSSIÈRE G.; BERTAGNA H.; JEAN C.; MARTINEZ A. (2004). Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocr. Metab.*, **89**, 3010-3019.
- LEWIS EJ, HUNSICKER LG, CLARKE WR, BERL T, POHL MA, LEWIS JB, RITZ E, ATKINS RC, ROHDE R, RAZ I; COLLABORATIVE STUDY GROUP. (2001). Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes, *N Engl J Med*. **345**:851-6.
- LIHONG HU L, CHEN G, CHAU RM. (2006). A neural networks-based drug discovery approach and its application for designing aldose reductase inhibitors, *J Mol Graph Model.*; **24**(4):244-53. Epub 2005 Oct 13.
- LINGER, R.H., FOSTER, D.W. (1988). Diabetes Mellitus. In: Williams Textbook of Endocrinology **9th** ed. *WB Saunders Company*:1017.
- LIPSKY B.A. (1997). Osteomyelitis of the foot in diabetic patients. *Clin Infect Dis*; **25**:1318-26.
- LIPINSKI, B. (2001). Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and Its Complications*. **15**:203-210.
- LIU G; HALE G E; HUGHES C. (2000). Galactose metabolism and ovarian toxicity. *Reprod. Toxicol.*; **14**, 377-384.
- LOU, M. F., KINOSHITA, J.H. (1967). Control of lens glycolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **141**: 547-559.
- MA J.; YAN R.; ZU X.; CHENG J-M;RAO K.; LIAO D-F.; CAO D. (2008). Aldo-Keto Reductase family 1B10 affects fatty acids synthesis by regulating the stability of acetyl-CoA carboxylase- α in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.*, **283**, 3418-3423.
- MADAMANCHI, N.R., HAKIM, Z.S., RUNGE, M.S. (2005). Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost.* **3**:254-67.

- MALAMAS S M; MILLEN , J. (1991). Quinazolineacetic acids and related analogs as aldose reductase inhibitors. *J. Med. Chem.*, **34**, 1492-1503.
- MALIK, R.A. (2003). Current and future strategies for the management of diabetic neuropathy. *Treat. Endocrinol.*, **2**, 389-400.
- MANKOVSKY, B.N., METZGER, B.E., MOLITCH, M.E., BILLER, J. (1996). Cerebrovascular disorders in patients with diabetes mellitus. *Journal of Diabetes and its Complications*. **10**:228-242.
- MATSUURA, K., SHIRAISHI, H., HARA, A., SATO, K., DEYASHIKI, Y., NINOMIYA, M. AND SAKAI, S. (1998). Identification of a principal mRNA species for human 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase isoform (AKR1C3) that exhibits high prostaglandin D2 11-ketoreductase activity. *J. Biochem. (Tokyo)* **124**, 940 – 946.
- MAYNE D.P, ED (2001): Nephropathy: In clinical chemistry in diagnosis and treatment **6th** edition; *ELST print*; 331-332.
- 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**, 1837-43.
- MILLER SI; ERNST RK; BADER M W. (2005). LPS, TLR-4 and infectious disease diversity. *Nat. Rev. Microb.*, **3**, 36-46.
- MITHIEUX G, VIDAL H, ZITOUN C, BRUNI N, DANIELE N, MINASSIAN C. (1996). Glucose-6-phosphatase mRNA and activity are increased to the same extent in kidney and liver of diabetic rats. *Diabetes*. **45**(7):891-6.
- MIYATA T, KURUKAWA K, DE STRIHOU CVY. (2000). Advanced glycation and lipoxidation end products: Role of reactive carbonyl compounds generated during carbohydrate and lipid metabolism. *J Am Soc Nephrol*; **11**:1744-1752.
- MORRE DM, LENAZ G., MORRE DJ. (2000). Surface oxidase and oxidative stress propagation in aging. *J.Exp.Biol*. **203**:1513-1521
- MUECKLER M. (1994). Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. **219**(3):713-25.
- MYLARI, B L.; ARMENTO, SJ.; BEEBE, DA.; CONN, E L.; COUTCHER, J.B.; DINA, M.S.; O'GORMAN, .M.T.; LINHARES, M.C.; MARTIN, W.H.; OATES, PJ.; TESS, D.A.; WITHBROE, G.J.; ZEMBROWSKI, W.J. (2005). A novel series of non-carboxylic acid, non-hydantoin inhibitors of aldose reductase with potent oral activity in diabetic rat models: 6-(5-chloro-3-methylbenzofuran-2-sulfonyl)-2H-pyridazin-3-one and congeners, *J.Med. Chem.*, **48**, 6326-6339.

- NAGARAJ, R.H., PRABHAKARAM, M., ORTWERTH, B.J., MONNIER, V.M. (1994). Suppression of pentosidine formation in galactosemic rat lens by an inhibitor of aldose reductase. *Diabetes*. **43**:580-586.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP. (1979). Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and categories of glucose intolerance. *Diabetes*. **28**:1039-57.
- NATIONAL DIABETES DATA GROUP. (1995). Diabetes in America. **2nd** ed. Bethesda (MD): National Institutes of Health.
- NICOLAOU, L.; ZIKA, Ch.; DEMOPOULOS, V.J. (2004). 1-(3,5-difluoro-4-hydroxyphenyl)-1H-pyrrol-3-yl phenylmethanone as a bioisostere of a carboxylic acid aldose reductase inhibitor. *J. Med. Chem.*, **47**, 2706-2709.
- NISHI S, UENO M, HISAKI S, IINO N, IGUCHI S, OYAMA Y, IMAI N, ARAKAWA M, GEJYO F. (2000). Ultrastructural characteristics of diabetic nephropathy. *Med Electron Microsc.*; **33**(2):65-73.
- NISHIKAWA T., EDELSTEIN D., BROWNLEE M. (2000). The missing link: a single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney Int*; **58**(suppl 77):S26- S30.
- NISHIMURA, C., LOU, M. F., AND KINOSHITA, J. H. (1987). Depletion of myo-inositol and amino acids in galactosemic neuropathy. *J. Neurochem*. **49**, 290-295.
- NISHIMURA, C.; GRAHAM, C.; HOHMAN, T.C.; NAGATA, M.; ROBINSON, W.G. JR.; CARPER, (1988). Characterization of mRNA and genes for aldose reductase in rat. *J. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 1052.
- NISHIMURA, C., AKAGI, Y., ROBISON, W.G. JR., KADOR, P.F., AND KINOSHITA, J. H. (1988b). In Polyol Pathway and Its Role in Diabetic Complications. (Sakamoto, N., Kinoshita JH, Kador, PF., and Hotta, N., eds) pp. 182-188, *Excerpta Medica*, Amsterdam.
- NISHIMURA, C., MATSUURA, Y., KOKAI, Y., AKERA, T., CARPER, D., MORJANA, N. (1990). Cloning and expression of human aldose reductase. *J. Biol. Chem*. **265**:9788-9792.
- NISHIMURA, C. (1998). Aldose Reductase in Glucose Toxicity: A Potential Target for the Prevention of Diabetic Complications. *Pharmacol. Rev.*, **50**, 21.
- NOMENCLATURE COMMITTEE OF THE INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). (14.03.2006). International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse. Erişim: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>.
- OATES, P. (2002). Polyol pathway and diabetic peripheral neuropathy. *J. Int Rev. Neurobiol*. **50**, 325.

- OATES, P. J. (2008). Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr. Drug Targets*, **9**, 14.
- OBROSOVA IG, VAN HUYSEN C, FATHALLAH L, CAO XC, GREENE DA, STEVENS MJ. (2002). An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *FASEB J.*; **16**(1):123-5. Epub 2001 Nov 14.
- O'CONNOR, T., IRELAND, L. S., HARRISON, D. J., AND HAYES, J. D. (1999). Major differences exist in the function and tissue-specific expression of human aflatoxin B1 aldehyde reductase and the principal human aldo-keto reductase AKR1 family members. *Biochem. J.* **343**, 487–504.
- OLD, S.E., SATO, S., KADOR, P.F., CARPER, D.A. (1990). In vitro expression of rat lens aldose reductase in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:4942-4945.
- OSTENSON, C.G. (2001). The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica.* **171**:241-247.
- OYAMA, T.; MIYASITA, Y.; WATANABE, H.; SHIRAI, K. (2006). The role of polyol pathway in high glucose-induced endothelial cell damages. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **73**, 227.
- PALMER RM, ASHTON DS, MONCADA S. (1988). Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* **333**:664-666.
- PAILHOUX, E. A., MARTINEZ, A., VEYSSIERE, G. M. & JEAN, C. G. (1990) Androgen-dependent protein from mouse vas deferens : cDNA cloning and protein homology with the aldo-keto reductase superfamily, *J. Biol. Chem.* **265**, 19932-19936.
- PATRICIA, I., KIRSTI, H., VESA O., KIRSI, A. V., JUKKA, K., OLOF, S., ELE, F., JUHANI, K., PIRJO, N. (2003). Insulin-Mediated Hepatic Glucose Uptake Is Impaired in Type 2 Diabetes: Evidence for a Relationship with Glycemic Control. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* **88**(5):2055-2060.
- PAU, A.; ASPRONÏI, B.; BOATTO, G.; GRELLA, G E.; DE CAPRARIIS, P.; CONSTANTINO, L.; PINNA, G A. (2004). Synthesis and aldose reductase inhibitory activities of novel thienocinnolinone derivatives. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **21**, 545-552.
- PERRY R.E., SWAMY M.S., ABRAHAM E.C. (1987). Progressive changes in lens crystallin glycation and high-molecular-weight aggregate formation leading to cataract development in streptozotocin-diabetic rats. *Exp. Eye Res.* **44**:269-282.
- PETRASH, J.M., HARTER, T.M., DEVINE, C.S., OLINS, P.O., BHATNAGAR, A., LIU, S.Q. (1992). Involvement of cysteine residues in catalysis and inhibition of human aldose reductase – site-directed mutagenesis of cys-80, cys-298 and cys-303. *J. Biol. Chem.* **267**:24833-24840.

- PICKUP, J.C., WILLIAMS, G. (1997). Textbook of diabetes. 2nd ed. Blackwell Science DLD. Volume 1.
- PINERO-PILON A A, LITONJUA P, AVILES-SONTA L, RASKIN P. (2001). Idiopathic type 1 diabetes in Dallas, Texas: a 5-year experience. *Diabetes Care* **24**:1014–1018.
- PITTS, N.E., VREELAND, F., SHAW, G.L., PETERSON, M.J., MEHTA, D.J., COLLIER, J., GUNDERSEN, K. (1986). Clinical experience with sorbinil--an aldose reductase inhibitor. *Metabolism*. **35**(4 Suppl 1):96-100.
- PORDJARNYAA.A.; CACHAU, R.E.; SCHNEIDER, T.; VAN ZANDT, M.; JOACHIMIAK, A. (2004). Subatomic and atomic crystallographic studies of aldose reductase: implications for inhibitor binding. *Cell Mol. LifeSci.*, **61**, 763-773.
- RAMANA, K. V., DIXIT, B. L., SRIVASTAVA, S., BALENDIRAN, G. K., SRIVASTAVA, S. K., AND 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.
- RAMANA K V; WILLIS MS; WHITE MD;HORTON JW; DIMAIO J M; SRIVASTAVA D; BHATNAGAR A; SRIVASTAVA S K. (2006). Endotoxin-induced cardiomyopathy and systemic inflammation in mice is prevented by aldose reductase inhibition. *Circulation*. **114**, 1838-1846.
- RAMANA, K. V.; SRIVASTAVA, S. K. (2006). Mediation of aldose reductase in lipopolysaccharide-induced inflammatory signals in mouse peritoneal macrophages. *Cytokine* **36**, 115.
- RAMASAMY R; LIU PJ; OATES SS. (1999). Attenuation of ischemia induced increases in sodium and calcium by the aldose reductase inhibitor Zopolrestat. *Cardiovasc. Res*, **42**, 130-139.
- REDDY, G. B.; SATYANARAYANA, A.; BALAKRISHNA, N.; AYYAGARI, R.; PADMA, M.; VISWANATH, K.; PETRASH, J. M. (2008). Erythrocyte aldose reductase activity and sorbitol levels in diabetic retinopathy. *Mol. Vis*. **14**, 593.
- REEVES, R.E., CAMMARATA, P.R. (1996). Osmoregulatory alterations in myo-inositol uptake by bovine lens epithelial cells. Part 5. Mechanism of the myo-inositol efflux pathway. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **37**, 619.
- REIBER GE. (2001). Epidemiolgy of foot ulcers and amputation in the diabetic foot. In:Levin and O'neil's The Diabetic Foot. .St Louis, CV Mosby,**6th** ed, pp 13-32.

- REGENOLD W T; KLING M A; (2000). Hauser P. Elevated sorbitol concentration in the cerebrospinal fluid of patients with mood disorders. *Psychoneuroendocrinology*, **25**, 593-606.
- RENEGOLD W T; PHATAK P; KLING MA; HAUSER P. (2004). Post-mortem evidence from human brain tissue of distributed glucose metabolism in mood and psychotic disorders. *Mol. Psych.*, **9**, 731-733.
- REPORT OF THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF THE DIABETES MELLITUS. (2001). *Diabetes Care*; **24** supplement 1 American Diabetes Association Recommendations.
- RHEE SG, CHOI KD. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem.*; **267**(18):12393-6.
- RHODES CJ. (2005). Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? *Science*. **307**(5708):380-4.
- RITTNER, H. L., HAFNER, V., KLIMIUK, P. A., SZWEDA, L. I., GORONZY, J. J., AND WEYAND, C. M. (1999). *J. Clin. Invest.* **103**, 1007-1013.
- ROBISON, W. G., JR., KADOR, P. F. AND KINOSHITA. J. H. (1983). Retinal capillaries: basement membrane thickening by galactosemia prevented with aldose reductase inhibitor. *Science* **221**, 1177-1179.
- RONDEAU, J.M., TETE FAVIER, F., PODJARNY, A., REYMANN, J.M., BARTH, P., BIELLMANN, J.F. (1992). Novel NADPH-binding domain revealed by the crystal structure of aldose reductase. *Nature*. **355**:469-472.
- ROSS R, (1993). The pathogenesis of atherosclerosis- A perspective for the 1990s. *Nature*, **362**, 801-809.
- RÖSEN P, NAWROTH PP, KING G, MÖLLER W, TRITSCHLER HJ, PACKER L. (2001). The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev*; **17**(3):189-212.
- RUEF, J., BODE, C., ROSANI, M., RUNGE, M. S., AND BHATNAGAR, A. (2000). Involvement of aldose reductase in vascular smooth muscle cell growth and lesion formation after arterial injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 1745-1752.
- SACKS, D.B. (2005). Carbohydrates. In: Burtis, C.A., Ashwood, E.R. Tietz Fundamentals of clinical chemistry, Sacks, D. **Fifth** edition. p.:427-462.
- 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**, CR525-529.

- SATO S, KADOR PF. (1989). Rat lens aldehyde reductase. *Invest Ophthalmol Vis Sci*;30(7):1618-22.
- SATO, S. (1992). Rat kidney aldose reductase and aldehyde reductase and polyol production in rat kidney. *Am. J. Physiol.* **263**, F799.
- SAWADA, H., HARA, A., NAKAYAMA, T. AND KATO, F. (1980) Reductases for aromatic aldehydes and ketones from rabbit liver: purification and characterization. *J. Biochem. (Tokyo)* **87**, 1153 – 1165.
- SERUNIAN LA, HABER MT, FUKUI T, KIM JW, RHEE SG, LOWENSTEIN JM, CANTLEY LC. (1989). Polyphosphoinositides produced by phosphatidylinositol 3-kinase are poor substrates for phospholipases C from rat liver and bovine brain. *J Biol Chem.* ;**264**(30):17809-15.
- SHEETZ MJ, KING GL. (2002). Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA.* 288: 2579-2588.
- SHINMURA, K., LIU, S.-Q., TANG, X.-L., KODANI, E., XAUN, Y. T., BHATNAGAR, A., AND BOLLI, R. (2000). *Circulation* **102**, Suppl. II, II-120.
- SHIONO T, SATO S, REDDY VN, KADOR PF, AND KINOSHITA JH. (1987). Rapid purification of rat lens aldose reductase. *Prog Clin Biol Res* 232:317.
- SICREE, R., SHAW, J., ZIMMET, P., TAPP, R. (2003). The global burden of diabetes. In D. Gan (Ed.), *Diabetes atlas*. (2nd edR). Brussels, Belgium' International Diabetes Federation.
- SIMMONS, D.A, WINEGRAD, A.I, MARTIN, D.B. (1982). Significance of Tissue Myoinositol Concentrations in Metabolic Regulation in Nerve, *Science*, **217**: 848-57.
- SORBINIL RETINOPATHY TRIAL RESEARCH GROUP. (1994). A randomized trial of Sorbinil an aldose reductase inhibitor in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* **327**:129-131.
- SOULIS-LIPAROTA, T., COOPER, M.E., DUNLOP, M., JERUMS, G. (1995). The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia.* **38**:387-394.
- SOULIS T, SASTRA S, THALLAS V, MORTENSEN SB, WILKEN M, CLAUSEN JT, BJERRUM OJ, PETERSEN H, LAU J, JERUMS G, BOEL E, COOPER ME. (1999). A novel inhibitor of advanced glycation end-product formation inhibits mesenteric vascular hypertrophy in experimental diabetes. *Diabetologia* **42**:472– 479.
- SUGIMOTO K, NISHIZAWA Y, HORIUCHI S, YAGIHASHI S. (1997). Localization in human diabetic peripheral nerve of N(epsilon)-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia.* **40**(12):1380-7.

- SRIVASTAVA, S. K., PETRASH, J. M., SADANA, I. J., ANSARI, N. H., AND PATRIDGE, C.A. (1982). Susceptibility of aldehyde and aldose reductases of human tissues to aldose reductase inhibitors. *Curr. Eye Res.* **2**, 407-410.
- SRIVASTAVA, S., CHANDRA, A., BHATNAGAR, A., SRIVASTAVA, S. K., AND ANSARI, N. H. (1995). Lipid peroxidation product, 4-hydroxynonenal and its conjugate with GSH are excellent substrates of bovine lens aldose reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217**, 741-746.
- SRIVASTAVA S.; CHANDRA A; WANG LF; SEIFERT WE, JR.; DA-GUE, BB; ANSARI N H; SRIVASTAVA S K; BHATNAGAR A. (1998). Metabolism of the lipid peroxidations 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., AND BHATNAGAR, A. (1999). Structural and kinetic determinants of aldehyde reduction by aldose reductase, *Biochemistry* **38**, 42-54.
- SRIVASTAVA, S., SPITE, M., TRENT, J. O., WEST, M. B., AHMED, Y. AND BHATNAGAR, A. (2004). Aldose reductase-catalyzed reduction of aldehyde phospholipids. *J. Biol. Chem.* **279**, 53395 – 53406.
- 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. *Endocrine Reviews*. **26**(3):380-392.
- STECKELBROECK, S., JIN, Y., OYESANMI, B., KLOOSTERBOER, H. J. AND PENNING, T. M. (2004). Tibolone is metabolized by the 3 α /3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activities of the four human isozymes of the aldo-keto reductase 1C subfamily: inversion of stereospecificity with a $\Delta^5(10)$ -3-ketosteroid. *Mol. Pharmacol.* **66**, 1702 – 1711.
- STEFEK, M.; SNIRE, V.; DJOUBISSIE, P-O.; MAJEKOVA, M.; DEMOPOULOS, V.J.; RACKOVA, L.; BEZAKOVA, Z.; KARASU, C.; CARBONE, V.; EL-KABBANI, O. (2008). Carboxymethylated pyridoindole antioxidants as aldose reductase inhibitors: Synthesis, activity, partitioning, and molecular modeling. *Bioorg. Med. Chem.*, **16**, 4908-4920.
- STEPHENS L. R., T. R. JACKSON AND P. T. HAWKINS. (1993). Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochem. Biophys. Acta*, **1179**, 27.
- STEUBER, H.; ZENTGRAF, M.; GERLACH, C.; SOTRIFFER, C. A.; HEINE, A.; KLEBE. (2006). Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking and co-crystallisation conditions. *J. Mol. Biol.* **363**, 174.

- STEUBER, H.; CZODROWSKI, P.; SOTRIFFER, C. A.; KLEBE, G. J. (2007). Tracing changes in protonation: a prerequisite to factorize thermodynamic data of inhibitor binding to aldose reductase. *Mol. Biol.* **373**, 1305.
- STEVENS, M.J., LATTIMER, S.A., KAMIJO, M., VANHUYSSEN, C., SIMA, A.A.F., GREENE, D.A. (1993). Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia*. **36**:608–614.
- STEVENS, M.J., OBROSOVA, I., CAO, X., VAN HUSYEN, C., GRENE, D.A.(2000). Effects of DL- α -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. **49**, 1006.
- STOLZ, A., RAHIMI-KIANI, M., AMEIS, D., CHAN, E., RONK, M. & SHIVELY, J. E. (1991). Molecular structure of rat hepatic 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Biol. Ckem.* **266**, 15 253-15 257.
- STRIBLING, D., ARMSTRONG, F. M., HARDMAN, M., PERKINS, C. M., AND SMITH, J.C. (1990). Aldose reductase in the etiology of diabetic complications: 4. Retinopathy. *J.Diabetic Complications* **4**, 102-107.
- SUGIMOTO K, NISHIZAWA Y, HORIUCHI S, YAGIHASHI S. (1997). Localization in human diabetic peripheral nerve of N(epsilon)-carboxymethyllysine-protein adducts, an advanced glycation endproduct. *Diabetologia* **40**:1380 –1387.
- SÜZEN S., N.DAŞ-EVCİMEN, P. VAROL, M. SARIKAYA. (2007).” Preliminary Evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of 2-phenylindole derivatives: Affiliation to antioxidant activity.” *Medicinal Chemistry Research* ,**16**:112-118.
- SZWERGOLD. B.S., KAPPLER, F., BROWN, T. R. (1990). Identification of fructose 3-phosphate in the lens of diabetic rats. *Science*. **247**, 451.
- ŞÜKÜROĞLU M., B.ÇALIŞKAN-ERGÜN, N.DAŞ-EVCİMEN, M. SARIKAYA, E.BANOĞLU, S.SÜZEN. (2007). “Screening and evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of some pyridazine derivatives.” *Medicinal Chemistry Research* ,**15**:443-451.
- TABAKOFF, B. AND ERWIN, V. G. (1970). Purification and characterization of a reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-linked aldehyde reductase from brain. *J.Biol. Chem.* **245**, 3263 – 3268.
- TAKAHASHI, M., FUJII, J., TESHIMA, T., SUZUKI, K., SHIBA, T., TANIGUCHI, N. (1993). Identity of a major 3-deoxyglucosone-reducing enzyme with aldehyde reductase in rat liver established by amino acid sequencing and cDNA expression. *Gene*. **127**:249-253.
- TAKEMOTO L.J., AZARI P. (1976). Aminoacid composition of normal and cataractous human lens proteins. *Exp. Eye Res.* **23**:1-7.

- TAMMALI R.; RAMANA K.V.; SINGHAL S.S.; AWASTHI S.; SRIVASTAVA K. (2006). Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostoglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Res.*, **66**, 9705-9713.
- TAMMALI R; RAMANA K V; SRIVASTAVA K. (2007). Aldose reductase regulates TNF- α -induced PGE2 production in human colon cancer cells. *Cancer Lett.*, **252**, 299-306.
- TARLE, I., BORHANI, D.W., WILSON, D.K., QUIOCHO, F.A., PETRASH, J.M. (1993). Probing the active site of human aldose reductase. Site-directed mutagenesis of Asp-43, Tyr-48, Lys-77 and His-110. *J. Biol. Chem.* **268**:25687-25693.
- TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.S., KOEHLER, C., HENKEL, E., LEONHARDT, W., FUECKER, K., HANEFELD, M. (2000). Postchallenge plasma glucose and glycemic spikes are more strongly associated with atherosclerosis than fasting glucose or HbA1c levels. *Diabetes Care.* **12**:1830-1834.
- TERUBAYASHI. H.; SATO, S.; NISHUMURA, C.; KADOR, P.F.; KINOSHITA. (1989). Localization of aldose and aldehyde reductase in the kidney, *J.H. Kidney Int.*, **36**,843.
- TESFAMARIAM, B. (1994). Free radical in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med.* **16**:383-391.
- THE EXPERT COMMITTEE ON THE DIAGNOSIS AND CLASSIFICATION OF DIABETES MELLITUS. (1997). Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*; **20**: 1183- 1197.
- THE DIABETES AND COMPLICATION TRIAL RESEARCH GROUP (1993). The effect of intensive treatment of diabetes. Dermendez G, Nodas J, Sa'pi Z: Lipoblastoma-Like lipatrophy induced by human insulin: Morphological evidence for local dedifferentiation of adipocysts?. *Diabetologia* **200**;954.
- TOMLINSON DR, STEVENS EJ, DIEMEL LT. (1994). Aldose reductase inhibitors and their potential for the treatment of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci.***15**(8):293-7.
- TORNLINSON, D.R. (1989). Polyols and myo-inositol in diabetic neuropathy of mice and men. *Mayo Clin Proc.* **64**:1030.
- TSUYOSHI TANIMOTO, KEIKO MAEKAWA, SATOSHI OKADA, CHIHIRO YABE-NISHIMURA. (1998). Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta* **365** 285-292.
- UKPDS RESEARCH GROUP. (1998). Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin, compared with conventional treatment and risk of complications in patients with Type 2 diabetes (UKPDS). *Lancet.* 352:837-853.

- URZHUMTSEV A., TETE-FAVIER F., MITSCHLER A., BARBANTON J., BARTH P., URZHUMTSEVA L., BIELLMAN IF., PODJARNY A., MORAS D. (1997). A 'specificity' pocket inferred from the crystal structures of the complex of aldose reductase with the pharmaceutically important inhibitors tolrestat and sorbinil. *Structure*. ;**5**(5):601-12.
- VAN DAM PS, VAN ASBECK BS, BRAVENBOER B, VAN OIRSCHOT JF, GISPEN WH, MARX JJ. (1998). Nerve function and oxidative stress in diabetic and vitamin E-deficient rats. *Free Radical Biol Med*; **24**(1): 18-26.
- VAN DAM PS. (2002). Oxidative stress and diabetic neuropathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev*. **18**: 176-184.
- VANDER JAGT, D.L., STANGEBYE, L.A., HUNSAKER, L.A., EATON, R.P. SIBBITT, W.J. (1988). Purification of aldose reductase from human placenta and stabilization of the inhibitor binding site. *Biochem. Pharmacol*. **37**:1051-1056.
- VANDER JAGT, D. L., ROBINSON, B., TAYLOR, K. K., AND HUNAAKER, L. A. (1990). Aldose reductase from human skeletal and heart muscle. Interconvertible forms related by thiol-disulfide exchange. *J. Biol Chem*. **266**,20982-20987.
- VANDER JAGT, D.L., KOLB, N.S., VANDER JAGT, T.J., CHINO, J., MARTINEZ, F.J., HUNSAKER, L.A. (1995). Substrate specificity of human aldose reductase: identification of 4-hydroxynonenal as an endogenous substrate. *Biochim. Biophys. Acta*. **1249**:117-126.
- VAN HEYNINGEN. (1959). Metabolism of xylose by the lens, 2. Rat lens in vivo and in vitro. *Biochem J.*; **73**:197-207.
- VARMA SD, MIZUNO A, KINOSHITA JH. (1977). Diabetic cataracts and flavonoids. *Science*. **195**(4274):205-6.
- VIBERTI, G. J. (2005). Thiazolidinediones-benefits on microvascular complications of type 2 diabetes. *Diabetes Complications*, **19**, 168.
- VIINAMAKI H; NISKANEN L; UUSITUPA M. (1995). Mental well-being in people with non-insulin-dependent diabetes. *Acta. Psychiatr. Scand.*, **92**, 392-397.
- WATKINS, P.J., DRURY, P.L., HOWELL, S.L. (1996). Diabetes and its management **5th** ed. Blackwell Co p:3.
- WAUTIER JL, SCHMIDT AM. (2004). Protein glycation: a firm link to endothelial cell dysfunction. *Circ Res* **95**:233–238.
- WERMUTH, B., MUNCH, J. D. AND VON WARTBURG, J. P. (1977). Purification and properties of NADPH-dependent aldehyde reductase from human liver. *J. Biol. Chem*. **252**, 3821 – 3828.

- WHOAIIBEB SA, GODIN DV. (1987). Alterations in free radical tissue-defense mechanism in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*; **36**:1014-18.
- WILLIAMSON, J.R., CHANG, K., FRANGOS, M., HASAN, K.S., IDO, Y., KAWAMURA, T., NYENGAARD, J.R., VAN DEN, E.M., KILO, C., TILTON, R.G. (1993). Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. **42**, 801.
- 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.
- WINEGRAD AI.(1987). Banting lecture 1986. Does a common mechanism induce the diverse complications of diabetes? *Diabetes*. **36**(3):396-406.
- WOLFENSBERGER TJ, HAMILTON AM. (2001). Diabetic retinopathy--an historical review. *Semin Ophthalmol.*; **16**(1):2-7.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1985). WHO Study Group. Diabetes Mellitus. Geneva. *Tech Rep Ser.* **727**:1-113.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1999). Department of Noncommunicable Disease Surveillance: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation, *WHO Publ.*, Geneva.
- WYNGAARDEN JB, SMITH JR LH. (1988). Cecil Textbook of Medicine, 1-2, Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1360-1381.
- XIA P, INOUCHI T, KERN TS, ENGERMAN RL, OATES PJ, KING GL. (1994). Characterization of the mechanism for the chronic activation of diacylglycerolprotein kinase C pathway in diabetes and hypergalactosemia. *Diabetes*; **43**(9):1122-29.
- YABE-NISHIMURA, C. (1998). Aldose reductase in glucose toxicity: a potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacol Rev.*; **50**(1):21-33.
- YADAV UC, SRIVASTAVA SK, RAMANA KV. (2007). Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **48**(10):4634-42.
- YAMAGISHI, S., TAKEUCHI, M. (2004). Inhibition of protein kinase C might be harmful to diabetic retinopathy. *Med Hypotheses*. **63**:135-137.
- YANG RB; MARC MR; GRAY A; HUANG A; XIE MH; ZHANG M; GODDARD A; WOOD WI; GURNEY AL; GODOWSKI PJ. (1998). Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, **395**, 284-288.

- YANG, J., MORAVEC, C. S., SUSSMAN, M. A., DIPOLA, N. R., FU, D., HAWTHORN, L., MITCHELL, C. A., YOUNG, J. B., FRANCIS, G. S., MCCARTHY, P. M., AND BOND, M. (2000). Decreased SLIM1 expression and increased gelsolin expression in failing human hearts measured by high-density oligonucleotide arrays. *Circulation* **102**, 3046–3052.
- YASUDA H, TERADA M, MAEDA K, KOGAWA S, SANADA M, HANEDA M, KASHIWAGI A, KIKKAWA R. (2003). Diabetic neuropathy and nerve regeneration. *Progress in Neurobiology*. **69**: 229-285.
- YEH LA, ASHTON MA. (1990). The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reserved by oral sorbinil. *Metabolism*. **39**:619-622
- YOREK MA, DUNLAP JA, GINSBERG BH. (1988). Effect of sorbinil on myo-inositol metabolism in cultured neuroblastoma cells exposed to increased glucose levels. *J Neurochem* ;**51**(2):331-8.
- YUE. D. K.. HANWELL. M. A.. SATCHELL P.M., AND TURTLE. J. R. (1982). The effect of aldose reductase inhibition on motor nerve conduction velocity in diabetic rats. *Diabetes*. **31**,789-794.
- ZEINA, D., YONG, S.P., VERONICA, A., TODD, H., CHIARA, G., MARA, L. (2004). Studies of Rat and Human Retinas Predict a Role for the Polyol Pathway in Human Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. Vol,**53**:2404-2411.
- ZEINDL-EBERHART, E., JUNGBLUT, P. R., OTTO, A. & RABES, H. M. (1994). Identification of tumor-associated protein variants during rat hepatocarcinogenesis, *J. Biol. Chem.* **269**, 14589- 14 594.
- ZIMMET, P., DOWSE, G., FINCH, C., SERJEANSTON, S., KING, H. (1990). The epidemiology and natural historu of NIDDM-Lessons from South Pasific. *Diabetes/Metabolism Reviews*. **6**:91-124.
- ZIMMET, P.; ALBERTI, K. G. M. M. (2001). Shaw, Global and societal implications of the diabetes epidemic. *J. Nature*, **414**, 782.

ÖZGEÇMİŞ

ADI: Asiye Gül
SOYADI: İŞBİLEN
DOĞUM TARİHİ: 21.07.1972
UYRUĞU: T.C.
T.C. No: 33125340966
MEDENİ DURUMU: BEKAR

İLETİŞİM ADRESİ:

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD. Tandoğan/ ANKARA
GSM: 0.533.448 74 28

EĞİTİM:

- Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya ABD Tezli Yüksek Lisans Programı (2008-2009)
- Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimi (1991-1995)
- Güven Lisesi (1987-1990)
- Cebeci Ortaokulu (1983-1986)
- Bahçelievler İlköğretim Okulu (1978-1983)

YABANCI DİL: İNGİLİZCE