

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

DİABETİK POLİNÖROPATİLİ HASTALARDA ERİTROPOİETİN UYGULAMASININ
ERİTROSİT Na⁺-K⁺ ATPaz ENZİM (E.C.3.1.6.37) AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Seval AKBULUT

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

KONYA
2008

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. DİABETES MELLİTUS	9
2.1.1. Tanım	9
2.1.2. Tarihçe	9
2.1.3. Tanı	10
2.1.4. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması	11
2.1.5. Tip I Diabetes Mellitus	12
2.1.5.1. Tip I Diabetes Mellitus'un Patogenezi	12
2.1.5.2. Tip I Diabetes Mellitus'un Kliniği	14
2.1.6. Tip II Diabetes Mellitus	15
2.1.6.1. Tip II Diabetes Mellitus'un Patogenezi	15
2.1.6.2. Tip II Diabetes Mellitus'un Kliniği	16
2.1.7. Gestasyonel Diabetes Mellitus	16
2.1.8. Diabetes Mellitusun Biyokimyasal Yönü	17
2.2 DİABETİK NÖROPATİ	18
2.2.1. Diabetik Nöropati Epidemiyolojisi	18
2.2.2 Diabetik Nöropatide Risk Faktörleri	19
2.2.3. Diabetik Nöropatinin Sınıflandırması	19
2.2.3.1. Simetrik Polinöropatiler	20
2.2.3.1.1. Distal Duysal ve Sensorimotor Polinöropati (DSPNP)	20
2.2.3.1.1.1. Kalın Lif Nöropatisi	20
2.2.3.1.1.2. İnce Lif Nöropatisi	20
2.2.3.1.2. Otonomik Nöropati	20
2.2.3.1.3. Proksimal Simetrik Motor Nöropati	21
2.2.3.2. Fokal ve Multifokal Nöropatiler	21
2.2.3.2.1. Kranial Sinir Lezyonları	21
2.2.3.2.2. Ekstremitte ve Gövde Mononöropatileri	21
2.2.3.2.3. Asimetrik Alt Ekstremitte Motor Nöropatisi	21
2.2.4. Diyabetik Nöropati'de Patoloji	22
2.2.5 Diyabetik Nöropati Patogenezi	22
2.2.5.1. Vasküler Hipotezler	22
2.2.5.2. Metabolik Hipotezler	22

2.2.5.3. İmmünolojik Mekanizmalar	23
2.2.5.4. Nörotrofik Faktörler	24
2.2.5.5. Diğer Faktörler	24
2.2.6. Diyabetik Nöropatinin Evreleri	24
2.2.7. Diyabetik Nöropatinin Tanısı	25
2.2.7.1. Elektrofizyolojik Bulgular	25
2.2.8. Diyabetik Nöropati Ayırıcı Tanısı	25
2.2.9. Diyabetik Nöropati Tedavisi	26
2.3. Na⁺-K⁺ ATPaz ENZİMİ	28
2.3.1. Eritrosit ve Eritrosit Membranının Özellikleri	28
2.3.2. Plazma Membranı Na ⁺ -K ⁺ ATPaz'ı	30
2.3.2.1. Moleküler Yapısı	30
2.3.2.2. α ve β İzofomlarının Yapısı	33
2.3.2.3. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz İzozimlerinin Enzimatik Özellikleri	36
2.3.3. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Enziminin Aktivitesi	37
2.3.4. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Enziminin Regülasyonu	38
2.3.5. Na ⁺ -K ⁺ ATPaz Enziminin Biyomedikal Önemi	40
2.4. ERİTROPOİETİN	41
2.4.1. EPO Üretim Yerleri	41
2.4.2. EPO'nun Etki Mekanizması	42
2.4.3. EPO Salınımının Düzenlenmesi	42
2.4.4. EPO Tedavisi	43
2.4.5. EPO ve Sinir Sistemi	43
2.4.5.1. Sinir Gelişiminde EPO'nun Rolü	44
2.4.5.2. Sinir Sisteminde EPO'nun Nöroprotektif Etkisi	44
3. MATERYAL VE METOD	
3.1. MATERYAL	45
3.1.1. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı	45
3.1.2. Kullanılan Cihazlar	45
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	46
3.1.4. Kullanılan Çözeltiler	46
3.2. METOD	47
3.2.1. Na ⁺ - K ⁺ ATPaz Enzim Aktivitesinin Tayini	47
3.2.2. İstatistik Analizler	47

4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	52
6. ÖZET	62
7. SUMMARY	63
8. KAYNAKLAR	64

KISALTMALAR

- ACTH: Adrenokortikotropik hormon
ADA: Amerikan diabet derneği
ALS: Amniyotrofik lateral skleroz
ARI: Aldoz redüktaz inhibitörleri
ATP: Adenozin trifosfat
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
CD: Bir çeşit T lenfosit
DCCT: Diabetes kontrol and komplikasyonları denemesi
DM: Diabetes mellitus
DN: Diabetik nöropati
DNA: Deoksiribo nükleik asit
DSPNP: Distal simetrik polinöropati
EMG: Elektromiyelografi
EPO: Eritropoietin
EPO-R: Eritropoietin reseptörü
FFA: Free faty acid (serbest yağ asidi)
GADA: Glutamik asit dekarboksilaz antikoru
GH: Growth hormon
GLA: Gama linolenik asit
GLUT: Glukoz taşıyıcısı
GTP: Guanozin trifosfat
HbA_{1c}: Hemoglobin A_{1c} (glikolize hemoglobin)
HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein
HLA: Human lökosit antijen
ICA: Adacık hücre antikoru
IDDM: İnsülin bağımlı diabetes mellitus
IFN: İnterferon
IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL: İnterlökin
INOS: İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
IVIG: İnta venöz immunglobulin
JAK : Janus aktivatör kinaz
KTS: Karpal tünel sendromu

MHC: Major histokompatibilite kompleksi
mRNA: Haberci ribonükleik asit
NDDG: National Diabetes Data Group
NGF: Nöron büyüme faktörü
NIDDM: İnsüline bağımlı olmayan diabetes mellitus
NO: Nitrik oksit
OGTT: Oral glukoz tolerans testi
rhEPO: Rekombinant insan eritropoietini
RT-PCR: Real time polimeraz zincir reaksiyonu
SDS: Sodyum dodesil sülfat
TNF: Tümör nekrosis faktör
WHO: Dünya sağlık örgütü

1. GİRİŞ

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzimi iki alt üniteden meydana gelir; alfa katalitik alt ünitesi ve görevi muhtemelen membrana bağlanma olan beta alt ünitesi. α alt ünitesi 4, β alt ünitesi 3 izoforma sahiptir. Bu izoformlar doku tipine ve gelişim safhasına bağlı olarak farklı genler tarafından kodlanırlar. α_1 izoformu yaygın olarak periferik sinirlerde ve eritrositlerde bulunur (1).

Biyokimyasal seviyede hiperglisemide sinir iletim hızının yavaşlamasını açıklayan etyolojik mekanizmalar, büyük miyelinli fiberlerin atrofisini ve periferik sinirlerdeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmayı gösterirler (2). Sinir dokusunda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmanın diabetik nöropati gelişiminde rol oynadığını ileri süren çok sayıda çalışma mevcuttur. Scarpini ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, diabetik hastalarda hem fiberlerin toplam sayısının hem de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin spesifik aktivitesinin azaldığını göstermeleri önemlidir. Bu durum diabetik nöropatinin sadece sinir fiberlerindeki bir kayıp nedeniyle olmadığını aynı zamanda fiberlerin işlevselliğindeki bir azalma nedeniyle de olduğunu göstermiştir (3). Raccach ve ark. tip 1 DM vakaları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, eritrosit membranı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmayı, periferik nöropatinin oluşması ile ilişkili bulmuşlardır. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki yaşa bağlı farklılığın kadın ve erkeklerde ancak 60 yaş üzerinde olduğu belirtilmiştir. Bu yüzden yaşa bağlı gerçek bir etki tam olarak açıklanamamıştır. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin disfonksiyonunun, sinir iletiminde azalmaya, sinir depolarizasyonunda bozulmaya ve intraaksonal Na^+ konsantrasyonunda artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (4). Vague ve ark. diabetli vakalar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, hasta grubunda kontrol grubuna göre eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin daha düşük olduğunu, nöropatisi olan hastalarda olmayanlara göre enzimde anlamlı bir düşüklük olduğunu bulmuşlardır. Düşük $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi diabetik nöropati için önemli bir risk faktörü oluşturmaktadır (5).

Doss ve ark. yaptıkları bir çalışmada periferik sinirlerdeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin çevresel hipoksik durumlara hassas olduğunu gözlemlemişlerdir (6). Gürbilek ve ark. yaptıkları bir çalışmada diabet süresi uzadıkça $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin azaldığını tespit etmişlerdir. Bu aktivite düşüklüğünün diabetin iyi regüle edilemediğinin bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (7). Diabet, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim disfonksiyonu oluşturarak, diabetli insanların periferik sinirlerinde motor iletim hızını azaltarak nöropati ve elektrofizyolojik anomalilerin patogenezeine etki edebilir.

Eritropoietin, (EPO) 34 kDa ağırlığında bir glikoprotein olup eritropoiezde düzenleyici fonksiyona sahiptir. Fetal hayatta karaciğerde sentezlenirken doğumdan sonra sentez böbreğe kayar. EPO, kök hücrelerin toplanması ve inflamasyon modülasyonu, apoptozisin yavaşlatılması, anjiogenezin stimülasyonu, vazospazmın geri döndürülmesi, glutamat ve reaktif oksijen türleri gibi doku hasarı moleküllerinin üretiminin sınırlandırılması gibi çeşitli etkilere sahiptir. Bundan dolayı EPO, bu mekanizmaların bir kombinasyonu ile nöronları koruyabilir (8).

Bianchi ve ark. yaptıkları bir çalışmada rekombinant insan eritropoietininin (rhEPO) diabetik ratlarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki kaybı düzeltmekte ve önlemekte olduğunu göstermişlerdir. Bu durum farklı deney modellerinde bildirilen rhEPO'nun nörotropik etkisiyle uyumlu olarak fiberlerin fonksiyonlarını da düzeltebileceğini düşündürmektedir (9).

Çalışmamızda, periferik nöropatiyi önlemede ve tedavi etmede rhEPO'nun $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

2.1.1. Tanım

Diabetes mellitus, insülin hormon sekresyonunun ve/veya insülin etkisinin mutlak veya göreceli azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir grup metabolizma hastalığıdır (10,11,12). Diabetes mellitusun etyopatogenezi ile ilgili yapılan çalışmalar hastalığın heterojen, hiperglisemi ile karakterize pekçok durumu içine alan bir sendrom olduğunu ortaya koymuştur (11) Diabetes mellitus, akut metabolik komplikasyonlarının yanı sıra, uzun dönemde vasküler, renal, retinal ya da nöropatik bozukluklara yol açan, morbidite ve erken mortalite riski yüksek, yaygın bir hastalıktır (13).

2.1.2. Tarihçe

Diabetes Mellitus hakkındaki bilgiler milattan önceki yıllara uzanmaktadır. M.Ö. 1500 yıllarında Mısır papirüslerinde aşırı idrarla seyreden bir hastalık tanımlanmıştır. Hastalığa ilk kez diabet adını M.S. 130-200 yılları arasında yaşayan Kapadokyalı hekim, Aretheaus vermiş ve başlıca semptomlarını, ilerleyici tabiatını ve ölüm ile sonuçlandığını bildirmiştir. M.S. 1000 yıllarında İbn-i Sina, diabetiklerde ilk kez gangreni tanımlamış, diabetin sinirsel orjinli olduğunu ve karaciğerin rolü hakkındaki ilk teoriyi bildirmiştir.

Yüzyıllar boyu diabetiklerin idrarı tatlı olarak bilinmekle birlikte 1674 yılında Willis, idrarın bol ve tatlı karışımı bir tadı olması nedeniyle hastalığa Diabetes Mellitus (Mellitus=Bal) adını vermiştir.

19. yüzyıl başlarında pankreas ile hastalık arasındaki ilişki belirlenmiş, 1869'da Langerhans, memelilerde pankreas adacıklarını tanımlamıştır. 19. yüzyıl sonlarında Opie, diabet nedeni ile ölen insanlarda, adacıklarda beta hücrelerinin hasara uğradığını kanıtlamıştır. Oscar Minkowski diabetik komadaki hastanın kanında keton cisimlerinin yüksek konsantrasyonda bulunmalarına ilave olarak karbondioksit miktarının çok düşük olduğunu göstermiştir.

Diabetin biyokimyası ve fizyopatolojisindeki ilerlemeler sonucu GH veya ACTH ile endokrinolojik tipte diabet veya alloxan, streptozocin gibi sitotoksik maddeler ile deneysel diabet oluşturulmuştur. Bu şekilde diabetin ilerlemesine etki gösteren değişik faktörlerin araştırılma olasılığı doğmuştur (14).

2.1.3. Tanı

Diabetes mellitus için 1997 yılında Amerikan Diabet Cemiyeti'nin (ADA) belirlemiş olduğu tanı kriterleri tablo 1'de görülmektedir.

Buna göre açlık venöz plazma glukoz düzeyinin en az iki ardışık ölçümde 126 mg/dl veya daha yüksek olması ile tanı konur. Günün herhangi bir saatinde açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın randomize venöz plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması ve poliüri, polidipsi, polifaji ve zayıflama gibi diabetik semptomların varlığı ile de tanı konabilir (D10). Ayrıca oral glukoz tolerans testinde veya postprandiyal 2.saatte venöz plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması kesin diabetes mellitus tanısı koydurur (15).

Tablo 1. Diabetes Mellitusun Tanı Kriterleri (10)

<p>1. Diabet semptomları (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ve randomize (günün herhangi bir saatinde öğüne bakılmaksızın) ölçülen venöz plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl ve üzerinde olması</p> <p>2. En az 8 saatlik tam açlık sonrası plazma glukoz düzeyinin 126 mg/dl ve üzerinde olması</p> <p>3. Oral glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl ve üzerinde olması</p>
--

WHO'nun 1998 Konsultasyon Raporuna göre hiperglisemik durumlarda yeni tanı kriterleri tablo 2'de belirtilmiştir (16,17).

Tablo 2. Hiperglisemik Durumlarda Yeni Tanı Kriterleri

Hiperglisemi Tipi	Glukoz Konsantrasyonu (mg/dl)			
	Venöz (TK)	Kapiller (TK)	Venöz (Plz)	Kapiller(Plz)
<i>Diabetes Mellitus</i>				
Açlık glukozu	≥110	≥110	≥126	≥126
2. saat glukoz	≥180	≥200	≥200	≥220
<i>Bozulmuş Glukoz Toleransı</i>				
Açlık glukozu	<110	<110	<126	<126
2. saat glukoz	≥120	≥140	≥140	≥160
<i>Bozulmuş Açlık Glisemisi</i>				
Açlık glukozu	100-109	100-109	110-125	110-125
2. saat glukoz	<120	<140	<140	<160

TK: tam kan Plz: Plazma

Açlık plazma glukoz düzeyi 110 mg/dl'nin altında olan ve diabet açısından yüksek risk taşıyan bireylerde belirli aralıklarla OGTT yapılarak bozulmuş glukoz toleransı veya diabet aranmalıdır (10). Asemptomatik bir kişideki diabet tanısı kan glukoz düzeyinin bir kez yüksek bulunmasına dayanmamalı en azından bir kez daha açlık veya herhangi bir zamanda ölçülen kan glukoz düzeyinin ya da OGTT'nin diabetik sınırdan bulunması ile tanı doğrulanmalıdır (16,17).

DM tanısını kolaylaştırmak için kan glukoz ölçümü ve OGTT'den başka bir test olan, glisemi düzeyini yansıtan HbA_{1c} kullanılması düşünülmüş ancak şimdilik yaygın kullanımının mümkün olmaması ve iyi standartize edilememesi sebebiyle rutin tanı testi olarak önerilmemiştir (17).

2.1.4. Diabetes Mellitusun Sınıflandırılması

İlk kez 1979 yılında NDDG tarafından daha sonra da 1985 yılında WHO tarafından diabetin geniş bir sınıflaması yapılmıştır. WHO'nun sınıflaması daha çok kliniksel olup diabeti insüline bağımlı (IDDM) ve insüline bağımlı olmayan (NIDDM) olarak adlandırmıştır (10).

WHO'nun sınıflaması aşağıdaki gibidir.

A) Klinik sınıflama

I. Diabetes Mellitus (DM)

1. Tip I insüline bağımlı olan DM (IDDM)
2. Tip II insüline bağımlı olmayan DM (NIDDM)
 - a. obez olmayan
 - b. obez
3. Malnutrisyon diyabeti
4. Gebelik diyabeti (Gestasyonel diyabet)
5. Diğer tip diyabetler (Pankreatit, Cushing sendromu veya akromegali seyrinde ortaya çıkan veya aterosklerotik nedenlere bağlı, genetik bazı sendromlarla veya insülin reseptör anomalileri ile ortaya çıkan diyabet)

II. Glikoz Tolerans Bozukluğu (IGT)

1. obez olmayan
2. obez

Glikoz tolerans bozukluğuna yukarıda belirtilen diğer tip diabetiklerin hepsi girer.

B) İstatistiksel Risk Grupları

I. Daha önce glikoz tolerans bozukluğu saptananlar

II. Potansiyel olarak glikoz toleransında bozukluk ihtimali bulunanlar (10,11,13,18,19)

ADA tarafından 1997 yılında yeni bir sınıflama önerilmiştir. Bu sınıflama etyolojik olup IDDM ve NIDDM yerine tip 1 ve tip 2 terimlerini önermektedir (10).

ADA Sınıflaması (1997):

I. Tip 1 DM (β hücre yıkımı, çoğunlukla mutlak insülin eksikliği)

A) İmmunolojik

B) İdiopatik

II. Tip 2 DM (İnsülin direnci veya insülin salgı bozukluğu ağırlıklı neden olabilir)

III. Diğer spesifik tipler

A) β hücre fonksiyonunda genetik defekte bağlı olanlar

B) İnsülin etkisinde genetik defekt

C) Ekzokrin pankreas hastalıkları

D) Endokrinopati

E) İlaç ya da kimyasallara bağlı

F) Enfeksiyonlar

G) İmmun diabetin bilinmeyen formları

H) Diabetle birlikteliği olan genetik sendromlar

IV. Gestasyonel Diabetes Mellitus (10,18,19)

ADA tarafından önerilen bu sınıflama 1998 yılında WHO tarafından da düzenlenerek glisemi bozukluklarının etyolojik ve klinik sınıflaması olarak kabul edilmiştir (10).

2.1.5. Tip I Diabetes Mellitus

2.1.5.1. Tip I Diabetes Mellitus'un Patogenezi

Günümüzde immünojenetik bilgilerin ışığı altında tip I diabetin, uygun genetik bir zeminde çevresel faktörlerin etkisiyle beta hücrelerine yönelik başlayan otoimmün destrüksiyon ve bunu izleyerek gelişen inflamatuvar olaylar sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir (20).

a) Genetik Yatkınlık ve İmmunogenetik Patogenez:

Son 20 yıldan bu yana yapılan çalışmaların ışığı altında tip I diabetin ailesel geçiş oranı yüksek bir hastalık olduğu saptanmıştır. Tip I diabetin riskini artıran 14 gen saptanmıştır. Bu genler içinde en önemlisi IDMM 1 ve IDMM 2'dir. IDMM 1 geni 6. kromozomun kısa kolu üzerinde (6p 21) HLA bölgesinde bulunan Class II molekülleri ile ilişkilidir. Makrofaj ya da

antijen sunan hücre yüzeyindeki MHC Class II molekülleri antijenik stimulusla hiperexpres olur ve CD4⁺ T hücre yüzey reseptörü ile birleşerek otoimmün aktivasyonu başlatır (20,21,22).

b) Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Etkenler:

Sağlıklı insanlarda immün sistem efektör hücreleri kendi hücrelerini tanır. Fakat hücresel bütünlüğü bozan birçok faktör immüntoleransın bozulmasına neden olur. Bu faktörlerin başında virüsler, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelir. Özellikle virüslerin çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir.

Tip I diabetin oluşumunda özellikle inek sütünün önemi son yılların güncel konuları arasındadır. Bazı gıda maddelerinin korunmasında kullanılan nitrosamin türevleri ile benzer maddeleri taşıyan tütülenmiş balık gibi gıdalar otoimmün diabeti başlatan faktörler olabilirler (21).

c) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu

Virüs ya da toksinlerle doğal yapısı bozulan beta hücrelerinin salgıladığı sitokinler (IFN α) ya da antijenik peptidler immün sistem elemanlarını uyarır. İlk aşamada endotelial hücre yüzeyinde ve diğer nükleuslu hücre yüzeyinde bulunan HLA Class I molekülleri hiperexpres olur ve beta hücrelerine karşı nonspesifik immün aktivasyonu başlatır. Eğer kişide diabet açısından yatkınlık genleri varsa antijenik uyarı ile beta hücre yüzeyinde ya da makrofaj yüzeyinde bulunan MHC Class II molekülleri hiperexpres olur ve bu spesifik otoimmün reaksiyonun başlamasına neden olur. Aktive T lenfositleri IL 1 β , TNF α , sitotoksik makrofajlar ise nitrikoksit (NO), TNF β ve IFN γ salınımı ile destrüktif insülitisi başlatır. (20,21,22).

d) İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü

Adacıkları önce makrofajlar, CD8⁺ sitotoksik T lenfositleri, daha sonra CD4⁺ T lenfositleri, naturel killer hücreleri ve B lenfositler infiltre eder ve destrüksiyona uğratır. İnsülitis ve IL-1 gibi sitokinlerin etkisiyle NO sentetaz (İNOS), hücre içinde NO yapımını hızlandırır. NO, DNA bant kırılmalarına yol açarak hücre ölümüne ve apoptozise neden olur. Destrüksiyon, hastalığın başlangıç yaşı erken olanlarda daha hızlıdır.

Sağlam beta hücre oranının %20 civarına inmesi ve mutlak insülin yetersizliğinin gelişmesi tip I diabetin başlamasına sebep olur. (20,21).

e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikorları

Son yıllarda otoimmün T hücreleri ile reaksiyona giren birçok beta hücre antijeninin ayırıcı tanısı yapılmıştır. İmmün hasarın belirleyicileri adacık hücre otoantikorları, insülin otoantikorları, glutamik asit dekarboksilaz otoantikorları, tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 β otoantikorlarıdır. Bu otoantikorların bir veya birkaçı, açlık hiperglisemisi ilk olarak saptandığında % 85-90 hastada mevcuttur (22).

2.1.5.2. Tip I Diabetes Mellitusun Kliniği

Preklinik Dönem: Genetik olarak yatkın bireylerde, çevresel faktörlerin beta hücresine karşı otoimmün aktivasyonu tetiklemesinden, klinik semptomlar ortaya çıkıncaya kadar geçen süre preklinik dönem olarak adlandırılır. Tanı kriteri için en önemli triad; genetik risk, humoral otoimmün belirteçleri (ICA, insülin antikoru, GADA,) ve erken faz insülin salgısı bozukluğudur.

Erken Klinik Dönem: Tip I diabette klinik semptomların, hipergliseminin (AKŞ >140 mg/dl) ve immün belirteçlerin ortaya çıkışından başlayarak β hücre rezervinin tamamına yakın bölümünün tükenmesine (C peptid düzeylerinin 0,1 ng/ml' nin altına inmesi) kadar geçen klinik süre erken klinik dönem olarak tanımlanır. Başlangıçta en sık görülen majör semptomları nokturi, susama, poliüri, zayıflama, yorgunluk, ağız kuruması ve polifajidir. Kramplar, huzursuzluk, sinirlilik, infeksiyon eğilimi erken klinik dönemin minör semptomlarını oluşturur. 8 saat açlık sonrası kan glukozunun 126 mg/dl üzerinde olması ya da 75 g glukoz alımından sonra ilk 2 saat içinde venöz plazma glukoz değerinin 200 mg/dl üzerinde olması diabetes tanısı için gerekli değerlerdir. Açlık C peptid değeri 0,1-0,8 ng/ml arasındadır.

Klinik Dönem: Klinik semptomların tam olarak yerleştiği ve β hücre rezervinin çok düşük (C peptid seviyesi < 0,1 ng/ml) olduğu dönemdir. Bu dönemde oto antikor titreleri azalmıştır. HbA_{1C}, fruktozamin artmıştır. Hastalar mutlak ekzojen insülin gereksinimi gösterirler ve glisemi ayarı zordur. Bu dönemde ketoasidoz, hipoglisemi gibi akut komplikasyonlara daha sık rastlanır.

İleri Klinik Dönem: Kronik mikroanjiyopati ve makroanjiyopati komplikasyonlarının ortaya çıktığı dönemdir.

Tip I diabetes mellitusun başlama yaşı genelde 30 yaşın altındadır. Sık gözlenir. 12-14 yaşlarında pik yapar (14,23).

2.1.6. Tip II Diabetes Mellitus

2.1.6.1. Tip II Diabetes Mellitus'un Patogenezi

Tip II diabet, klinik olarak plazma glukoz düzeyi artışı ile seyreden ve başlangıçta insülin gereksinimi olmadan kontrol edilebilen bir hastalıktır. Tip II diabetlilerin %80'i obezdir fakat bu, tanı için bir gösterge oluşturmamaktadır. Tip II diabetlilerin %10'unun yavaş gelişen tip I diabet formunda olduğu bildirilmektedir. Bozulmuş glukoz toleransı tip II diabetin öncü bulgusu olarak kabul edilmektedir. Tip II diabet patogenezinde insülin eksikliği ve direnci temel rol oynayarak hiperglisemiyi oluşturmaktadır. Genetik ve çevresel faktörler de hem insülin sekresyonunu hem de duyarlılığını etkileyebilmektedir. Hastalığın fizyopatolojisi ile ilgili olası değişiklikler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir:

a) İnsülin Sekresyonundaki Değişiklikler

1. *Açlık hiperinsülinemisi*: Plazma glukozu 140 mg/dl'nin altında iken insülin normalin 2 katı sekrete edilir. Oysa 140 mg/dl üzerindeki değerlerde β hücresi bu artışı sürdüremez ve insülin sekresyonu azalır.
2. Birinci faz insülin sekresyonunun kaybolması geç dönemdeki hiperglisemi ve hiperinsülinemiden de sorumludur.
3. Pulsatil insülin sekresyonu bozulmuştur.
4. Yapılan bazı çalışmalarda tip II diabetlilerde plazma proinsülin düzeylerinin yüksek bulunduğu bildirilmiştir (24).

b) İnsülin Eksikliği

1. Genellikle β hücre kitlesi %80 oranında azaldığında diabetin olduğu bilinmektedir.
2. Çeşitli çalışmalarda doğum ağırlığı düşük olanlarda ileri yaşlarda diabet gelişme riskinin arttığı ileri sürülmektedir.
3. *Glukoz Toksisitesi*: Tip II diabetlilerde glisemik kontrolün iyileşmesiyle insülin sekresyonunda iyileşme gözlenmesi glikotoksisitenin, patogeneizde en çok suçlanan faktör olmasını sağlamıştır. Yapılan çalışmalarda yüksek glukozlu ortamda β hücrelerinde insülin gen transkripsiyonunun azaldığı ve sürenin uzunluğu ile orantılı olarak bu etkinin kalıcı olduğu gösterilmiştir.
4. *Lipotoksisite*: Plazma glukoz ve serbest yağ asit düzeylerinin uzun süre yüksek kalması insülin sekresyonunun azalmasına neden olur (24).

c) İnsülin Direnci

İnsüline karşı gelişen hedef doku rezistansı dört faktöre bağlanmaktadır.

1. İnsülinin suprese edemediği artmış hepatik glukoz yapımı
2. Glukozun karaciğer hücresi tarafından kullanılmasında bozukluk
3. Periferik dokuların (adaleli yağ dokusu) glukozu kullanımındaki bozukluk
4. Reseptör defektleri

Ayrıca yaş, cins, ırk, vücut yağ kitlesi ve dağılımı, egzersiz, kan basıncı, ailesel diabet öyküsü, sigara içimi ve iskemik kalp hastalığı da insülin duyarlılığını etkilemektedir.

d) Genetik Faktörler

Tip II diabet için son zamanlarda iki şüpheli gen bulunmuştur. Elde edilen verilerle tip II diabetlilerin ancak %5'inin genetik mutasyonlardan etkilenmesi nedeniyle fenotipik özelliklerin daha çok etkili oldukları kabul edilmektedir (24).

2.1.6.2. Tip II Diabetes Mellitusun Kliniği

Genelde sinsi bir başlangıç gösterir. Hastaların %85'i obezdir. Asidoz nadirdir. Yağ birikimi karın, göğüs, ense ve yüzde belirlidir. Başlangıç genelde 40 yaşın üzerindedir. Hiperglisemiye ait semptomlar vardır. Bunlar; poliüri, polidipsi, bulanık görme, parestezi, halsizlik, genel kaşıntı, kronik deri enfeksiyonları ve genital sisteme ait semptomlardır .

Başlangıçta yaşam kalitesini artırıcı yöntemler (kilo kaybı, beslenme planı, egzersiz vb) ve bazı oral ilaçlar uygulanarak glisemik kontrol elde edilmeye çalışılırken daha sonra beta hücre fonksiyonunun progresif azalması nedeniyle insülin replasman tedavisi uygulanması gerekmektedir (25).

2.1.7. Gestasyonel Diabetes Mellitus

İlk olarak gebelikte teşhis edilen veya gebelik esnasında başlayan diabetes mellitus türü için kullanılan bir deyimdir. Bir çok kadında doğumdan sonra glukoz toleransı normale döner. Bir kısmında ise diabet veya glukoz tolerans bozukluğu gebelikten sonra da devam eder. Glukoz toleransı normale dönen kadınlarda da ileri yıllarda diabet gelişebilir. Bu diabet insüline bağımlı veya bağımsız olabilir (26).

2.1.8. Diabetes Mellitusun Biyokimyasal Yönü

Diabetes mellitusta başlıca metabolizma kusuru; glukozun kullanılmasında yetersizlik ve bunun doğurduğu hiperglisemidir.

İnsülin/glukagon oranının azalması, karaciğerde glikojenolizi ve glikoneogenezi artırır. Yapımda artış, kullanımda azalma hiperglisemiye neden olur. Kan glukoz düzeyinin maksimum tübüler reabsorbsiyon eşiğini aşması glukozüri ile sonuçlanır.

Diabette fizyolojik ketojeniz olayının etkinliği artmıştır. Çünkü insülin etkisinin yetersizliğine ve stres hormonlarının fazlalığına bağlı olarak lipoliz meydana gelir ve kanda serbest yağ asitleri (FFA) artar. Kanda FFA'nın artması bir tür insülin direnci doğurur. Kanda FFA'nın artması ile karaciğerden geçen FFA miktarı da artar.

Hepatositlere giren FFA'ların önünde iki yol vardır:

- 1) Sitolde trigliseritlere reesterifiye olur.
- 2) Mitokondriuma girer ve Asetil-CoA'ya okside olur.

Asetil-CoA'nın β oksidasyonu ile keton cisimleri oluşur. (Asetoasetik asit, β -hidroksibütirat ve aseton).

Diabetin klinik ve laboratuvar birçok semptomunu belirleyen dokular; yağ dokusu, kas dokusu ve karaciğerdir. İnsülin eksikliği, bir yandan glukozun yağ hücrelerine girişinde azalmaya bir yandan da lipoliz üzerine inhibisyon etkisinin kalkmasıyla hiperlipemiye neden olur.

İnsülin eksikliği, kas dokusunda negatif protein dengesine ve kasta protein sentezinin azalmasına yol açar. Ayrıca glukozun myositlere girmesi azalmıştır. Glukopeni ile beraber hiperlipeminin artması, kas hücresinin enerji kaynağının glukozdan çok yağ asitleri yönüne kaymasına yol açar. Lipid metabolizmasının birçok ara ürünü hücre içinde birikerek kas hücresine glukozun girmesini, fosforilasyonunu ve oksidasyonunu engeller.

İnsülin eksikliğinin organizmada başka biyokimyasal sonuçları da vardır. Özellikle sorbitol birikmesi, komplikasyonların patogeneğinde rol aldığı için önemlidir. Organizmada bazı dokular, glukozu fruktoza metabolize edebilir. Bunun için glukoz aldoz redüktaz enzimiyle önce sorbitole indirgenir. Sorbitol ise sorbitol dehidrogenaz enzimiyle fruktoza yükseltgenir. Aldoz redüktaz vezikula seminalislerde bulunur ve sperm için gerekli fruktozun oluşumunu sağlar. Ayrıca korneada, sinir dokusunda ve aortun intima ve media tabakasında da aldoz redüktaz enzimi bulunur. Bu dokulara insülin etkisi olmadan da glukoz serbestçe girebilir. Hiperglisemi nedeniyle intrasellüler glukoz artar ve dolayısıyla bu dokuların hücrelerinde sorbitol ve fruktoz birikir. Sorbitol birikmesi osmotik basıncın artmasına ve buna bağlı olarak katarakta, nöropatiye ve sinir ileti hızının yavaşlamasına yol açar (27).

2.2 DİABETİK NÖROPATİ

Nöropati, periferik ve otonom sinir sisteminde oluşan bozukluktur ve diabette hipergliseminin etkisiyle yaygın olarak ortaya çıkar (28). Diabetik nöropati diğer periferik nöropati nedenleri dışında, diabetes mellitus seyrinde klinik veya subklinik düzeyde ortaya çıkabilen, periferik sinir tutulumudur (29). DM tanısı konduğunda hastaların %10'unda nöropati bulunurken, 20 yılın sonunda bu oran %50'ye ulaşmaktadır. Tip 2 diyabet tanısı konduktan sonra 9 yıl içinde nöropati başladığını gösteren çalışmalar vardır (30). Diabetik nöropati hiperglisemi ile yakın ilişki içindedir. Diabet kontrolü kötü olanlarda nöropati sıklığı artmaktadır. Fakat iyi diabet kontrolüne rağmen nöropatinin ortaya çıkması genetik faktörlerin de etkili olabileceğini düşündürmektedir (28).

2.2.1. Diabetik Nöropati Epidemiyolojisi

DM'nin en sık görülen komplikasyonu semptomatik nöropatidir (31). DM'de nöropati prevalansının %5 ile %60 arasında olduğunu bildiren çalışmalar vardır (30). Nöropati bulgu ve semptomları olmaksızın sinir ileti anomalileri katıldığında bu oran %100'e çıkmaktadır (32). Yıllık insidans, diyabetin bilinen süresi ile ilgilidir ve plato yapmaya eğilim göstermez. En sık görülen nöropati formu distal duysal ve otonomik polinöropatidir. Bunun insidansı diyabetin süresine bağlı olarak artmaktadır (33). Mononöropatilerden ise en sık karpal tünel sendromu (KTS) görülür (32). 20 yıldan uzun süreli diyabetiklerde ve diyabet kontrolü kötü olan hastalarda risk iki kat artmaktadır (30). Nöropatinin genç bireylerde DM saptandığı zaman bulunması çok nadirdir. Fakat 40 yaşın üstündeki DM'lilerde sıklık belirgin olarak artmıştır (33). Bununla birlikte Türkiye'de yapılan bir çalışmada diyabetik çocuklarda subklinik ya da klinik nöropatinin oranının yüksek olduğu ve sinir fonksiyonundaki değişikliklerin glisemik kontrolle korele olduğu bildirilmiştir. Semptomatik polinöropati prevalansı tip 1 DM'de % 15, tip 2 DM'de % 13 olarak bulunmuştur (29). Nöropatinin mortaliteye katkısı çok azdır. 1991'de diyabete atfedilen 48951 ölümden sadece 329'unda diyabetin herhangi bir nörolojik komplikasyonu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu çalışmada doğal ölümle ilgili veriler eksiktir. Tip 1 DM'li ve kesin nöropatisi olanların % 44'ünde dizabilite ve Tip 2 DM'si olan ve duysal nöropatisi bulunan hastaların % 74'ünde aktivitede kısmi kısıtlanma bildirilmiştir (34).

2.2.2 Diabetik Nöropatide Risk Faktörleri

18 yaş ve üstünde diabet süresi, HbA_{1C}, sigara içme ve HDL kolesterolün düşüklüğünün nöropati ile birlikteliği saptanmış ve bu 30 yaş ve üstünde daha fazla oranda bulunmuştur (32). Diabetik polinöropatilerde yaş yüksek, diabet süresi daha uzun, vücut kitle indeksi daha az, açlık kan şekeri daha yüksek bulunmuştur (33). Boy uzunluğu, maksimal vücut kitle indeksi, etanol kullanımı, sigara içme, sistolik ve diastolik kan basıncı, estradiol ve kolesterol düzeyleri nöropatili olan ve olmayanlarda farklı bulunmamıştır. Açlık plazma glukoz düzeyi nöropatiyi belirleyen en önemli faktördür (32). DCCT bir çalışmasında nöropatinin diabetin süresi, yaş, erkek cinsiyet ve boy uzunluğu ile bağlantılı olduğunu bulmuştur (33).

2.2.3. Diabetik Nöropatinin Sınıflandırması

Diabetik nöropatinin tanımından beri çeşitli sınıflamalar öne sürülmüştür. En kabul gören ve pratik sınıflama Thomas tarafından ileri sürülen, nöropatilerin; simetrik polinöropati, fokal ve multipl fokal nöropatiler olarak ayrılmasıdır (35,36).

Tablo 3. Diabetik nöropati sınıflandırması

<p>1. P.K. Thomas</p> <p>Simetrik polinöropatiler</p> <p>Duysal veya duysal motor polinöropati Otonom nöropati Simetrik proksimal alt ekstremite motor nöropatisi</p> <p>Fokal ve multifokal nöropatiler</p> <p>Kranial nöropati Gövde ve tarafların mononöropatisi Asimetrik alt ekstremite motor nöropatisi</p> <p>Mikst örnekler</p> <p>2. P. Dyck</p> <p>Simetrik distal nöropati</p> <p>İnce lif tutulumu ön planda (ağrılı veya anesteziik) Kalın lif tutulumu ön planda (ataksik) Otonom</p> <p>Asimetrik nöropati</p> <p>Kranial nöropatiler Pleksopatiler (amiyotrofi dahil) Mono ve poliradikülopatiler Basınca duyarlı nöropati</p> <p>3. P. Low</p> <p>Simetrik nöropatiler</p> <p>1. Distal duysal ve duysal motor nöropati 2. Kalın lif tipi diabetik nöropati 3. İnce lif tipi diabetik nöropati 4. Distal ince lif tipi nöropati 5. İnsülin nöropatisi 6. Kronik inflamatuvar demyelinizan polinöropati (KIDP)</p> <p>Asimetrik nöropatiler</p> <p>1. Mononöropati 2. Mononöropati multiplex 3. Radikülopatiler 4. Lomber pleksopati veya radikülopleksopati 5. KIDP</p>
--

2.2.3.1. Simetrik Polinöropatiler

2.2.3.1.1. Distal Duysal ve Sensorimotor Polinöropati (DSPNP)

Diyabet olgularında en sık ortaya çıkan sinsi başlangıçlı nöropati formudur. En erken duyu etkilenmesi ayak baş parmağında ortaya çıkar ve yukarı doğru ilerler. Üst ekstremiteler daha nadir etkilenir (37) ve bu etki parmaklardan başlar, sonra eller ve önkol etkilenir, eldiven şeklinde hipoestezi olur (33). Semptomu olmayan hastalarda bile aşil refleksi kaybı ve vibrasyon duyusunda azalma vardır (37). En sık semptom, uyuşukluk ve karıncalanma duyusudur (33). DSPNP, kalın lif ve ince lif tipi olarak ikiye ayrılır. Sıklıkla bu iki form birlikte olsa da selektif lif tutulumu olabilir (37).

2.2.3.1.1.1. Kalın Lif Nöropatisi

Başlıca özelliği derin duyu kaybı olan bu nöropatide “diabetik psödötapes” denilen duysal tipte ataksi ve muayenede ciddi vibrasyon duyusu kaybı vardır. Karanlıkta semptomlar artar ve beraberinde distal bölgelerde duyu kaybı da bulunur. Oldukça seyrek görülen bu tablo arka kök ganglionu patolojisini bir ölçüde yansıtır ve beraberinde otonom yetmezlik de vardır (36).

2.2.3.1.1.2. İnce Lif Nöropatisi

Çoğu hasta gençtir ve 20-30 yaş arasındadır. Tip 1 DM hastasıdır ve kadınlarda daha sık görülür (33). Sıklıkla derin ağrı, yanma, burkulma, acı duyusu, spontan şimşekvari ağrı ve hafif dokunmaya aşırı duyarlılık ile birlikte. Bu nöropatide otonomik dokulara karşı oto antikolar ve aktive T lenfositlerin varlığı ve olguların 1/3’ünde iritis saptanması etiyojide otoimmün nedeni düşündürmektedir (30,38).

2.2.3.1.2. Otonomik Nöropati

Duyusal nöropatinin otonomik anormalliklerle birlikte olması nadir değildir, fakat semptomatik otonom nöropati nadirdir. Somatik sinir içindeki otonomik lifler organlara giden liflerden daha kolay tutulur. Otonomik nöropati semptomu olmayan hastalarda kardiovasküler reflekslerde anormallikler diyabet tanısından çok kısa bir süre sonra gözlenebilir. Bu tablo subklinik otonomik nöropati olarak tanımlanır. Farkedilemeyen hipoglisemi, ani, açıklanamayan kardiorespiratuar arrestler ve mesane atonisine sekonder renal infeksiyonlar diyabette yüksek mortalite nedenleridir (38).

2.2.3.1.3. Proksimal Simetrik Motor Nöropati

Kalça ve uyluğu etkileyen rölatif olarak simetrik kuvvetsizlik ve ağrı vardır. Patella refleksi kayıptır. Gliseminin iyi bir kontrolü ile iyileşme sağlanabilir. Olguların yarısında başlangıç tek taraflı olup, diğer taraf yaklaşık 8 hafta sonra kuvvetsiz ve ağrılı hale gelir (35).

2.2.3.2. Fokal ve Multifokal Nöropatiler

2.2.3.2.1. Kranial Sinir Lezyonları

Diabetik nöropatili hastalarda Bell's paralizi gibi 3, 4 ve 6. kranial sinirleri içeren kas zayıflığı ve vizuel değişiklikler gelişebilir (39). En sık gözlenen bozukluk izole üçüncü sinire ait lezyonlardır. Başlangıç genellikle ani ve ağrısızdır veya birlikte baş ağrısı olabilir. Diyabetik üçüncü sinir hasarı olgularında pupiller inervasyon sıklıkla etkilenmez. İzole üçüncü sinir lezyonunun periferik lezyondan ziyade mezensefalik infarktten olabileceği düşüncesi ileri sürülmüştür. Üçüncü sinir lezyonu 3-6 ayda düzelir, rekürrens nadirdir. Dördüncü kranial sinir felcinin %20 nedeni diyabettir. Fasial paralizili hastaların geniş bir kısmında bozulmuş glukoz tolerans testi saptanmıştır (40).

2.2.3.2.2. Ekstremit ve Gövde Mononöropatileri

Tuzak nöropatilerden karpal tünel sendromu en sık görülendir. Normal popülasyonda KTS sıklığı %10 iken, diyabetiklerde %23'dür (35). KTS'de EMG'deki bilek segmenti sinir iletimi belirgin yavaş iken parmak ve önkol segmentlerindeki yavaşlama hafiftir. KTS ve polinöropati birlikteliğinde median ve ulnar sinir elektrofizyolojik bulguları karşılaştırılır. Diyabetik trunkal veya torako-abdominal nöropatili olgular genelde yaşlıdır ve prognoz iyidir. Semptom ve bulgular genellikle 6 ile 24 ay içinde kendiliğinden düzelir (38).

2.2.3.2.3. Asimetrik Alt Ekstremit Motor Nöropatisi

Tip 1 DM'de %0,3, Tip 2'de %1,1 sıklığındadır. Tipik olarak kalçada ve anterior uylukta ciddi ağrı ile başlar, ağrı bazen lomber bölgede veya perinede de olur. Alt ekstremitelerde proksimal kaslarda asimetrik kuvvetsizlik ve atrofi vardır. Patella refleksi azalmış ya da kaybolmuştur, fakat duyu kaybı sıklıkla görülmez. Olguların yarısından fazlasında kilo kaybı görülür. İyileşme 24 aya kadar uzayabilir. Birçok olguda hafif ya da orta derecede güçsüzlük kalıcı olabilir. Birlikte distal simetrik polinöropati sıklığı %60'a kadar bildirilmiştir (38,39). BOS'da protein yüksekliği, oligoklonal band pozitifliği saptanabilir. Sedimentasyon sıklıkla yüksektir. Tipik EMG bulguları, femoral sinir latanslarının uzaması, torasik ve lomber

paraspinal kaslarda belirgin fibrilasyon potansiyelleri ve etkilenen kaslarda aktif reinnervasyondur. Diyabetik amyotrofide bazı hastalarda T hücresi infiltrasyonu gösterilmiştir (41).

2.2.4. Diyabetik Nöropati'de Patoloji

Ağrılı distal diabetik polinöropatide küçük myelinli ve myelinsiz liflerin kaybı bulunur ve aktif aksonal rejenerasyon vardır. Bu da anormal impulsların ortaya çıkışına ve nöropatik ağrıya neden olur. Ağrısız distal polinöropatide ise öncelikle geniş lifler etkilenir. Sural sinir biopsisinde myelinli lif kaybı, akut aksonal dejenerasyon, myelinizasyon ve vaskülopati bulguları saptanmıştır (42).

2.2.5 Diyabetik Nöropati Patogenezi

Metabolik, vasküler, genetik, immün ve nörotropizm gibi birçok faktör patogeneizde rol oynamaktadır. Majör faktörlerin metabolik ve vasküler olabileceği düşünülmektedir.

2.2.5.1. Vasküler Hipotezler

Yapılan çalışmalarda, kapiller lümeni etkileyen çeşitli lezyonlar saptanmıştır. Bunlar; endotel hücrelerinin şişmesi, damar duvarının kalınlaşması ve kapiller lümenin fibrin veya agregasyona uğramış plateletlerle oklüzyonunu içermektedir (40,42). Hidrojen klirens metodu ile periferik kan akımının diyabet oluşturulan ratlarda ilk birkaç günde %80 kadar azaldığı, daha uzun sürede ise %40 kadar azaldığı görülmüştür. Diyabetiklerde, fokal nöropatinin klinik bulgularının ani başlangıcı vasküler nedeni destekler. Nitrik oksit yapımında azalma, eikazonoid yapımında anormallikler ve oksidatif yolunda artış, endonöral mikrovaskülerizasyonda vazokonstriksiyona ve sinir hipoksisine neden olur (43).

2.2.5.2. Metabolik Hipotezler

Hiperglisemi sinirleri birkaç yoldan etkileyebilir. Bunlardan bir tanesi proteinlerin nonenzimatik glikasyonudur (37). Glikasyon sonucunda dokularda ve periferik sinirlerde aşırı glikoprotein birikir. Periferik sinirlerdeki bu aşırı glikasyon aksoplazmik transportta ve mikrovasküler fonksiyonda anormalliğe neden olur. Bir diğeri polioll yoludur. Yüksek plazma glukoz konsantrasyonları glukozun aldoz redüktaz aracılığı ile sorbitole çevrildiği polioll yolunun aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu da sorbitolün dokularda aşırı birikimine ve myoinozitolda azalmaya sebep olur. Myoinozitolün tükenmesi Na^+ - K^+ ATPaz aktivitesinde azalmaya ve sinir iletiminde yavaşlamaya yol açar (44). Myoinozitol transportu bu enzim

üzerinden olduğu için azalmış myoinozitol geri alınımı ve azalmış Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesi artmış intraaksonal Na⁺ birikimine neden olur. Bununla birlikte metabolitlerin poliol yoluna artmış akışı indirekt olarak sinir hasarını etkileyebilir. Hayvan deneylerindeki bu bulgular insan diyabetik nöropati patogeneziye uygulanamaz. İnsanlarda periferik sinirde sorbitol birikimi ile myoinositolde azalma gösterilememiştir ve diyete myoinositol eklenmesi kesin bir yarar sağlamamıştır (45).

Diabetik nöropatide serbest radikallerin özellikle süperoksit gibi oksijen serbest radikallerinin aktivitesinde artış vardır. Bu artış nonenzimatik glikasyon ve artmış poliol yolu aktivitesi ile oluşur. NADPH, aldoz redüktaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak azalmış, buna bağlı olarak serbest radikallerin nötralizasyonu da azalmıştır. Serbest oksijen radikalleri toksik etkileri ile sinir hasarı yapabilir veya NO yapımını inhibe ederek sinir kan akımını azaltabilirler (33).

Primaquin bir peroksidan olup, serbest radikal oluşumunu sağlar. Diyabetik ratlarda sinirde kan akımını, intranöral oksijen miktarını ve sinir ileti hızlarını azaltır (42). Diyabette diğer bir bozukluk karnitin azalmasıdır. Karnitin, yağın açıl CoA oksidasyonu için mitokondriye taşınmasında rol oynar, karnitin yetmezliği ATP üretimini bozar (45). Hiperglisemi, sinir dokusu gibi insülininden bağımsız dokularda, intrasellüler proteinlerin glikasyonunu artırır. Nöronda glikasyondan en fazla etkilenen proteinler aksonal transport için gerekli olan mikrotübüllerin tübülindir. Tübülünlerin glikasyonu diyabetik sinirde aksonal transportun yavaşlamasına neden olur. Nonenzimatik glikozilasyon inhibitörü olan aminoguanidinin deney hayvanlarında endonöral kan damarlarının ve sinir liflerinin fonksiyonunu iyileştirdiği, sinir ileti değerlerini düzelttiği gösterilmiştir (43).

2.2.5.3. İmmünolojik Mekanizmalar

Diyabetik otonomik ve diyabetik lumbosakral radikülopleksonöropatide immünolojik faktörler ön plandadır (30). İnsüline bağımlı diyabetik hastalarda, sempatik gangliona karşı otoantikorlar geliştiği ve bu ganglionların immun hücrelerle infiltre olduğu gösterilmiştir. Diyabetik hastaların sural sinir biyopsisinde endonöral veya epinöral lenfositik infiltrasyon gösterilmiştir. Diabetik sinirlerdeki T hücre infiltrasyonunun başlıca CD8⁺ hücre tipi olduğu saptanmıştır (33). Kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati ile diyabetik nöropatinin birlikteliği de immün veya sitotoksik faktörleri düşündürür (30,32).

2.2.5.4. Nörotrofik Faktörler

Son 15 yılda; beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3) ve neurotrophin 4/5 (NT-4/5) adında sinir büyüme faktörünün (NGF) yapısal homologu olan 3 büyüme faktörü bulunmuştur. GF'lerin ikinci ailesi olan IGF'nin insüline benzer metabolik aktivitesi vardır (IGF1 ve 2). NGF, NT-3, IGF 1 ve IGF 2 ile yapılan çalışmalar bu faktörlerin sinir dejenerasyonunu etkilediğini göstermektedir. Rekombinant insan NGF'sinin subkutan enjeksiyonu, duyuusal semptomları ve soğucu tespit eşiğini değiştirmekte ve diabetik nöropatisi bulunan hastalarda bir miktar yarar sağlamaktadır (44,46). Diabetik hastalarda yapılan çalışmalarda NGF düzeyinin azaldığı ve hedef dokulardan sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transportunun bozulduğu gösterilmiştir. Başka bir çalışmada diabetik hastaların derisinde NGF ekspresyonunun azalması ile ince lif nöropatisinin başlangıç bulguları arasında bir korelasyon olduğu görülmüştür (31).

2.2.5.5. Diğer Faktörler

Kardiovasküler otonomik nöropati ile HLA DR3 ve DR4 haplotipleri arasında birliktelik vardır. Deneysel diyabetiklerde Schwann hücresi ve dorsal kök ganglion hücresinde nükleusun büzüştüğü ve apoptozise uğradığı gözlenmiştir (46). Epidemiyolojik çalışmalar, aşırı alkol ve sigaranın diyabetik nöropatiyi kolaylaştırdığını düşündürmektedir (32).

2.2.6. Diyabetik Nöropatinin Evreleri

Diyabetik nöropati incelemesinde elektrofizyolojik test uygulanırken en az iki sinire bakılması, vibrasyon algılama eşiğı ve ısı ayırımı eşiğı ölçümlerinin yapılması zorunludur. Thomas, bu yaklaşımı kullanarak şu evreleme sistemini önermiştir (35) :

Nöropati yok: Semptom yoktur ve otonomikleri de içeren testlerde ikiden daha az sayıda anormallik vardır.

Asemptomatik nöropati: Semptom yoktur, fakat fonksiyonel testlerde iki veya daha fazla anormallik vardır.

Semptomatik nöropati: Semptomlar hafif derecededir ve birlikte iki veya daha fazla fonksiyonel anormallik vardır.

Sakatlık yapan nöropati: Semptomlar sakatlık ile birlikte ve iki veya daha fazla fonksiyonel anormallikler vardır.

2.2.7. Diyabetik Nöropatinin Tanısı

Diyabete özgü polinöropati yoktur. Diyabetik nöropati tanısı için öykü ve fizik muayene bulgularının ve hastanın klasik klinik değerlendirmelerinin yanısıra morfolojik ve elektrofizyolojik incelemeler ve kantitatif sensoryal testlerin yapılması büyük önem taşır. Hastada klinik yakınma, muayene bulgusu, elektrofizyolojik inceleme ve kantitatif duyu testlerinden en az ikisi mevcutsa nöropati var denebilir (29,30). Sinir iletilerinin anormalliği, derin solumaya kalp atımı cevabının azalması veya valsalva manevrasına anormal cevap en sık ve erken ortaya çıkan bulgulardır (35). Sinir ileti anormalliğinden daha sonra veya aynı anda ortaya çıkan klinik bulgular aşıl refleksinin azalması veya kaybı, baş parmakta vibrasyon duyusunun kaybıdır. Semptomlar iki tiptir;

Negatif semptomlar: Nöronal hipofonksiyon ile gelişir. Taktil ve diğer mekanoreseptör duyularda kayıp, duysal ataksi, termal ve ağrı duyuları kaybı, erkeklerde empotans, gastroparezi, sudomotor kayıp gibi otonomik bozukluklar ve atrofiyi kapsar.

Pozitif semptomlar: Nöronal hiperfonksiyon nedeniyle gelişir. Karıncalanma, sıkıca bastırılma duyusu, parmak ve ayakların altında pamuk varmış hissi veya ağrıdır. (33)

2.2.7.1. Elektrofizyolojik Bulgular

Sinir kan akımı azaldığında ilk olarak elektrofizyolojik etkilenme olmaktadır. Hiçbir elektro diagnostik sonuç diyabet için spesifik değildir. Etkilenmiş kasların EMG'si denervasyonun beklenen bulgularını gösterir. Buna rağmen klinik olarak diyabetik amyotrofi tanısı almış bir olguda myopatik tipte bulgular gösterilmiştir (47). Duyusal sinir ileti bozuklukları diyabetik sinir hasarının erken göstergesidir ve subklinik nöropatinin en sık görülen bulgusudur (46). Değişiklikler, sinir ileti hızında azalma ile birlikte duysal aksiyon potansiyellerinde amplitüd düşmesi ve temporal dispersiyonun artmasını kapsar. Lumbosakral radikülopleksopatide paraspinal ve interkostal EMG'den yararlanır. Polinöropatiye eşlik eden tuzak nöropati varlığında sinirler arasında karşılaştırma yapılmalıdır (47).

2.2.8. Diyabetik Nöropati Ayırıcı Tanısı

Diyabetik hastaların %10'unda nöropatinin diyabete bağlı olmayan nedenlerden oluştuğu bildirilmiştir. Nörolojik hastalıklar hakkında yeterli bilgisi olmayanların tanı koyması, nöropati semptomunun hafif veya nonspesifik olması ve nörolojik olmayan nedenlerin düşünülmesi (özellikle fokal ve multifokal nöropatilerde) yanlış tanıların konulmasına neden olmaktadır.

Rutin testlere (tam kan sayımı ve serum biyokimyası) ek olarak yapılması gereken laboratuvar incelemeleri; serum ve idrar protein elektroforezi (monoklonal protein varsa immünelektroforez), tiroid fonksiyon testleri, karaciğer fonksiyon testleri, bağ dokusu hastalıkları için ANA, RF, SS-A vb ve vitamin B12 düzeyleridir. Bazı testler her hastada yapılmamakla birlikte ayırıcı tanıda akılda tutulmalıdır. İnfeksiyöz ajanlar için seroloji (sifiliz, Lyme, HIV, hepatit), serum lipid profil (Tangier hastalığı, abetalipoproteinemi), göğüs grafisi, metastatik kemik survey (osteosklerotik myeloma veya metastatik hastalık), idrarda ağır metal taraması bunlardan bazılarıdır. Öykü ve klinik bulgular spesifik tanıyı düşündürdüğünde, amiloid için abdominal yağ aspirasyonu veya diğer dokulardan biyopsi yapılabilir. Spondiloz, disk herniasyonu veya maligniteyi ekarte etmek için lumbosakral görüntüleme (MR veya BT, myelografi) yapılabilir. Spesifik kalıtsal hastalıklar için biyokimyasal enzimatik testler yapılır. Moleküler genetik testler (herediter motor ve duysal nöropati tip 1 ve tip 3, basınca duyarlı herediter nöropati, spinoserebellar ataksi 1 ve 3) yapılabilir (33).

2.2.9. Diyabetik Nöropati Tedavisi

Tedavide önemli bir nokta nöropatiyi gelişmeden evvel önlemektir. Sinir hasarını engellemek veya düzeltmek için bu hastaların normal ya da normale yakın kan glukozu kontrollerinin sağlanması gerekmektedir (33). Kan glukozunun yüksekliği kadar, dalgalı seyir göstermesi de önemli bir risktir. Ayrıca hiperinsülinizmden kaçınılmalıdır. HbA_{1c}'nin 7'nin altında tutulması, kolesterolün kontrolü, obeziteden kaçınma, ayak bakımının yapılması nöropati progresyonunu geciktirir (37). Alkol gibi nörotoksinlerden kaçınma, vitamin eksikliğini yerine koyma (B₁₂, B₆, folat) ve semptomatik tedavi tedavinin diğer ana hedefleri olmalıdır (48). Farmakolojik tedavinin temel ilkesi patogeneze uygunluk, semptomatik etki sağlanması, nöropati gidişini yavaşlatmak, durdurmak ve hatta geri döndürmektir (37). Tedavi planlanırken uygulanacak ilaçların yan etkilerine dikkat edilmeli, çoğu kez yaşlı olan diyabetik hastanın kardiovasküler sorunlarının hastayı ilaç yan etkilerine daha hassas hale getirdiği unutulmamalıdır (31).

Aldoz redüktaz inhibisyonu: ARI'leri sorbinil tolrestat, alrestatin, ponrestat, epalrestat ile yapılan hayvan deneylerinde sinir ileti değerlerinin düzeldiği gösterilmiştir (42).

Diyete myoinositol ilavesi: Diyete myoinositol ilavesinin deneysel diabette sinir ileti değerlerini ve sinir Na⁺-K⁺ ATPaz aktivitesini düzelttiği gösterilmekle birlikte insanlarda bu düzelme bulunamamıştır (38). Potansiyel yararları sinir hasarını engelleyebilmeleridir. Bu yüzden en yararlı etki en erken evrede verilmeleri sayesinde olacaktır.

Vasodilatatör ilaçlar: Birçok vasodilatör ilacın, sinir fonksiyonunu ve endonöral kapiller anormallikleri düzelttiği rapor edilmiştir. Bunlar, noradrenerjik antagonistler, kalsiyum kanal blokerleri, renin-anjiyotensin sistem inhibitörleri, çeşitli prostanoid analogları ve nitratlardır (N13,N16). Pentoxifylinin kısmen tıkalı damarlardaki sirkülasyonu düzelttiği ve potansiyel yararları olduğu ileri sürülmektedir (40).

Acetyl L-carnitine (ALCAR): ALCAR'ın SP'nin aksonal transport ve sentezindeki azalmayı engellediği ve böylece duyuşal nöropatiyi düzelttiği ileri sürülmüştür. Diyabetik ratlarda karnitinin karaciğerde yağ asidlerinin beta oksidasyonunu kolaylaştırdığı ve motor sinir ileti değerlerindeki yavaşlamayı engellediği gösterilmiştir (47).

Prostaglandinler: PGE1 analoglarının çeşitli hayvan deneylerinde ve diyabetik hastalarda, diyabetik polinöropatide etkili olabileceği gösterilmiştir (45).

Alfa lipoik asit: Deneysel ve klinik çalışmalarda alfa lipoik asitin yüksek dozlarının, insülin rezistansında ve diyabetik polinöropati tedavisinde terapötik etkinliği olduğu gösterilmiştir (45).

Gama linolenik asit (GLA): GLA'nın askorbat ile kombinasyonu sinir ileti değerlerini ve kan akımını düzeltmede tek başına GLA ve askorbattan daha etkili olduğu saptanmıştır (46).

Gangliosidler: Reinervasyonu sağlayarak nöropatiyi geriletğine dair bulgular vardır (46).

Ginkgo biloba ekstresi: Nöropatisi olan hastalarda otonomik disregülasyonu düzelttiği ve ağrı parametrelerinde düzelme olduğu gösterilmiştir (46).

Aminoguanidine: Deneysel nöropatide endonöral mikrosirkülasyonu düzelttiği gösterilmiş (43).

Nitrik oksit agonisti: NO, diyabetik periferik nöropatinin patogeneğinde rol oynar. NO agonisti L-argininin Na^+ - K^+ ATPaz aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (45).

Vitamin ilavesi: Vitamin tedavisi nöropatilerde sıklıkla nonspesifik tedavidir. Vitamin B₁₂ verilecekse düşük doz verilmelidir (46).

İmmünsosupresif tedavi: Diyabetik amiyotrofinin doğal seyrine uygun, geçerliliği kabul edilen tedavi IVIG veya kortikosteroid gibi immünomodülatör ajanlarla olan tedavidir (49).

Pankreas Transplantasyonu: Pankreas transplantasyonu sensoryal, motor ve otonomik bulguları orta derecede düzelterbilmekte ve ilerlemeyi durdurabilmektedir. Hastalarda genellikle nefropati de olup renal ve pankreas transplantasyonunun birlikte yapılmasının tedavide daha etkili olduğu gösterilmiştir (45).

Ağrı tedavisi: Ağrı üç kategoriye ayrılabilir.

Nosiseptif ağrı; ağrı reseptörlerinin aktivasyonuna bağlıdır.

Nöropatik ve dizestetik ağrı; sinir sistemi hasarından oluşur.

Psikojenik ağrı; afektif veya diğer psikiyatrik hastalıklar sonucu oluşur.

Diabetik nöropatideki ağrı, nosiseptif veya dizestetiktir. Nosiseptör sonlanmaların sensitizasyonu, aktif aksonal dejenerasyon, A delta ve C liflerinin hasarı, rejenere aksonlardan oluşan ektojik uyarılar, aksonal atrofi, periferik kan akımındaki değişiklikler, glisemik kontrol, dorsal kök ganglionundaki anormallikler dizestetik ağrının oluşumunda etkilidir. Ağrı ısrarlı olduğunda birlikte sekonder depresyon olabilir ve daha sonra ciddi ağrı daha da fazla problem oluşturabilir. Öncelikle iyi bir glisemik kontrol sağlanmalıdır ve birlikte ağrının semptomatik tedavisi basit analjeziklerle düzenlenmelidir. Üçüncü basamakta depresyon eşlik ediyorsa buna yönelik tedavi veya destekleyici tedaviler yapılmalıdır. Farmakoterapinin dışında; nöronal blokaj, bölgesel infüzyon, nörostimülasyon, sinir destrüksiyonu ağrı tedavisinde kullanılan yöntemlerdendir. Farmakoterapiye başlanacaksa, en düşük dozla başlanmalı ve etkin doza kadar artırılmalıdır (50).

2.3. Na⁺-K⁺ ATPaz ENZİMİ

2.3.1. Eritrosit ve Eritrosit Membranının Özellikleri

Çapı 6-9 µ olan insan eritrositi, çekirdeksizdir ve bikonkav disk şeklindedir. Birçok hücrede olduğu gibi eritrositlerde de en önemli katyon K⁺dur. Diğer katyonlar ise Na⁺, Ca⁺⁺ ve Mg⁺⁺dur. Önemli anyonlar arasında Cl⁻ ve COOH⁻ bulunmaktadır. Eritrositlerde inorganik fosforun yanısıra 2,3-bisfosfogliserat yer almaktadır. Eritrositlerin iç yapısı enerji tüketilen bir mekanizma ile düzenlenmektedir. Eritrositlerin metabolik aktiviteleri, iyon dengesinin sağlanmasına yönelik enerjinin üretilmesini gerçekleştirmektedir. Na⁺un hücre dışına atılarak K⁺ ile değiştirilmesini sağlayan metabolik aktivite, hemoglobinin oksidatif denatürasyona karşı korunmasında, methemoglobin oluşumunun önlenmesinde ve hücrenin genel şeklinin sürdürülmesinde gerekli olan enerjiyi sağlamaktadır.

Yapısında % 49 protein, % 44 lipid ve % 7 karbonhidrat bulunan eritrosit membranı 6 nm kalınlığındadır. Eritrosit membranında iki tür protein bulunmaktadır:

1.Periferik proteinler: İntegral membran proteinlerine kovalent olmayan bağlar ile bağlanırlar. Hücre membranının şeklinin korunması ve düzenlenmesinde görevli olan bu proteinler, membranın stoplazmik kısmında bulunurlar ve membran elastikiyetini sağlarlar. İsimlendirilmeleri şu şekildedir: α ve β spektrin, ankrin (band 2.1), aktin, protein 4.1, protein 4.2, protein 4.9, band 6.8 (gliseraldehit 3 fosfodehidrogenaz) ve band 7 (tropomyozin).

2.İntegral proteinler: Polipeptid zincir yapısındaki hidrofobik kısımlar yardımı ile ikili lipid tabakasında bulunan fosfolipidlere sıkıca bağlanmakta ve membran proteinlerine

eklenmektedirler. Protein 3 (band 3) ve glikoforinler (A,B,C VE D) bu gruptadır. Glikoforinler glukozdan zengin bazları, kan grubu antijenlerini (A,B,O) meydana getirir (51,7).

Eritrosit membranındaki lipidler hücre etrafında dayanıklı bir yapı oluşturmak üzere iki tabakalı bir yapı meydana getirmektedirler. Bu lipidlerin % 60'ı fosfogliseridlerden, % 25'i kolesterolden, % 5-10'u glikolipidden oluşmuştur. Daha az oranda kolesterol esterleri, serbest yağ asitleri, sülfatidler ve triaçilgliseroller bulunmaktadır. Fosfogliseridler; sfingomyelin, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilserin fraksiyonlarından oluşmaktadır. Bunlardan fosfatidilkolin ve sfingomyelin dış tarafta, fosfatidiletanolamin, fosfatidil inozitol ve fosfatidilserin iç tarafta bulunmaya meyillidir.

Eritrositlerin deformasyonları üç önemli yapısal özelliğe bağlıdır:

1. Bikonkav, diskoid şekil sonucu ortaya çıkan özel yüzey alanı-hacim ilişkisi,
2. Düşük stoplazmik viskozite,
3. Eritrosit membranının viskoelastik yapısı.

Bu özelliklerden birinde meydana gelen değişim, eritrositlerin deformasyonunu etkiler. Negatif yük ile yüklü olan eritrosit membranı H_2O , $COOH^-$ ve Cl^- gibi küçük anyonlara karşı geçirgen, Na^+ ve K^+ gibi katyonlara karşı geçirgen değildir. Plazmada Na^+ , K^+ 'dan daha fazla miktarda bulunmaktadır. Eritrositlerde bu iki iyonun konsantrasyonları tamamen tersine dönmüş durumdadır. Eritrositlerdeki yüksek K^+ konsantrasyonunun eritrosit proteinlerinin yapı ve fonksiyonları ile ilişkili olduğu ve Na^+ 'un ise böyle bir fonksiyonunun olmadığı belirlenmiştir. Na^+ ve K^+ iyonları için eritrosit membranında bir gradient bulunmakta ve bu iyonların membran geçişleri için enerji gerekmektedir. Gerekli olan enerji anaerobik glikoliz ve fosfoglukonat metabolik yollarından sağlanmaktadır. Bu iyonların konsantrasyon farklılıklarının düzenlenmesinde membran ATPaz enzimleri kullanılmakta ve gerekli enerji ATP hidrolizinden elde edilmektedir.

ATPaz'ın 4 tipi vardır:

P-Tipi ATPaz: Çoğunlukla plazma membranında bulunur. ATP tarafından direk fosforile edilir. Bir fosfat analogu olan vanadate ile inhibe edilebilir.

F-Tipi ATPaz: Mitokondride lokalizedir.

V-Tipi ATPaz: Bitki vakuoler membranında ve hayvanların lizozomlarında lokalizedir.

A-Tipi ATPaz: Anyonların transportunun sağlanmasında önemlidir.

Eritrosit membranındaki protein-enzim sistemleri membrandan katyonların geçişinde etkili olur. Bu enzimlerin fonksiyonu ATP'ye bağımlı olup ATP azlığında eritrosit membranından Na^+ , K^+ , Ca^{++} transportu bozulur, hücre içinde Na^+ ve su artar, eritrosit küre şeklini alır.

Sitozolik Ca^{++} artışı eritrosit membranında sertleşmeye neden olur. Eritrositler yaşlandıkça iyon pompalarının aktiviteleri azalmakta ve intrasellüler iyon konsantrasyonları değişmektedir. Böylece hücrenin iç yapısı değişmekte ve sonunda eritrosit parçalanmaktadır.

İnsan eritrosit membranındaki yüksek affinite-düşük kapasiteli bağlanma ve düşük afinite-yüksek kapasiteli bağlanma bölgelerine insülin bağlanmaktadır. Çeşitli dokularda insülinin biyolojik etkilerinin, spesifik-yüksek affiniteli reseptörlerle etkileşimi aracılığı ile olduğu ve de birçok dokuda insülinle Na^+-K^+ ATPaz pompasının stimüle olduğu ifade edilmektedir (52,53).

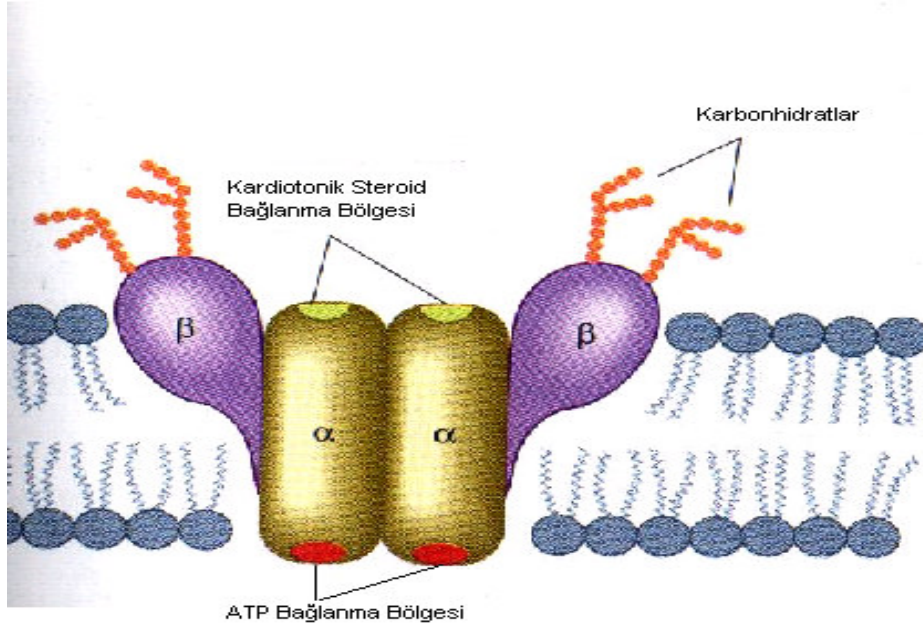
2.3.2. Plazma Membranı Na^+-K^+ ATPaz'ı

1957 yılında Jens Skou ATP'yi hidroliz eden bu enzimi keşfetmiştir. Na^+-K^+ ATPaz yapısı ve enzimatik özellikleri iyi tanımlanmış bir aktif transport sistemidir. Bu sistemin hücre hacminin regülasyonu, hücrelerarası pH'ın korunması gibi görevleri vardır. Plazma membranının her iki tarafında Na^+ ve K^+ iyonlarının elektrokimyasal gradientini kurmak ve korumaktan sorumlu olan integral membran proteindir. Bu gradientler, ozmoregülasyon, çeşitli organik ve inorganik moleküllerin Na^+ eşleşmeli transportu ve sinir ve kasın elektriksel uyarılabilirliği için esansiyeldir (54).

Bu enzim genellikle iyon pompası olarak nitelendirilir (55). Na^+-K^+ ATPaz enzimi, çoğu hücre membranında bulunabilen, ATP'den sağlanan enerjiyle gradiente karşı extrasellüler sıvıdan 2 K^+ iyonu, hücrelerden 3 Na^+ iyonu transportunu sağlayan bir aktif transport sistemidir (56).

2.3.2.1. Moleküler Yapısı:

Na^+-K^+ ATPaz iki ana polipeptid, α , β ve γ alt ünitelerinin sitokiometrik bileşiminden meydana gelen bir oligomerdir (57-60). Enzimin α ve β alt ünitelerinin primer yapısı ve membran organizasyonu şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Plazma membranı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ının dimerik yapısı (en.wikipedia.org)

α alt ünitesi, oldukça geniş bir membran proteinidir. Molekül ağırlığı 90-100 kD'dur ve non glikoziledir. Bu ünite enzimin katalitik aktivite gösteren ve iyon bağlayan bölgesini oluşturur (61). α alt ünitesinin katyon, ATP ve inhibitör (ouabain) bağlanma bölgeleri vardır. (57-60).

β alt ünitesi membranı bir defa karşıdan karşıya geçen bir polipeptittir (62-64). Molekül ağırlığı 45-55 kD olup glikoprotein yapıdadır ve fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir (7). β alt ünitesi enzimin normal aktivitesi için esansiyeldir ve enzimin Na^+ ve K^+ afinitesinin modülasyonu ile ilgili olduğu görülmektedir. Buna ek olarak omurgalı hücrelerde β alt ünitesi α polipeptininin doğru katlanmasının stabilizasyonunda da rol oynar (62-64).

Üçüncü protein γ alt ünitesi olarak adlandırılır. Enzim preparasyonlarının saflaştırılmasında tanımlanmıştır. γ alt ünitesi; ouabain türevlerinin fotoafinitesi ile kovalent olarak sınıflandığı gösterilinceye kadar purifikasyonun bir kontaminantı olduğu düşünülüyordu. Küçük, 8-14 kDa ağırlığında, hidrofobik bir polipeptit olduğu ifade edilmektedir. γ alt ünitesinin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesi için gerekli olmadığını gösteren çalışmalar vardır. Ek olarak γ alt ünitesinin enzimin E1 konformasyonunu stabilize edebileceği gösterilmiştir. γ alt ünitesinin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz fonksiyonunu modifiye edebildiğine dair deliller vardır. γ alt ünitesinin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz fonksiyonundaki kesin rolü daha ileri çalışmalara gereksinim duymaktadır (65).

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın hücrede bir çok esansiyel proteinle birlikte birkaç izozimi olan proteinlerden biri olduğu bilinmektedir. Gerçekten her iki α , β polipeptitlerin farklı moleküler formları farklı genlerle kodlanmıştır. Memelilerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın ilk olarak doğrudan gösterilmesi Sweadner tarafından başarılmıştır (66). Sweadner alt ünitenin iki formunu bulmuştur. Bunları renal formu (α) ve beyin formu (α^+) olarak tanımlanmıştır. Enzimin bu alışılmamış katalitik alt ünitesinin SDS-poliakrilamid jelde göçü daha yavaş ve quabain duyarlılığı daha yüksektir. Bu öncü çalışma her iki izoformun biyokimyasal özelliklerine odaklanmış çalışmalar tarafından takip edilmiştir. Böylece α^+ ; N etilmalemidde karşılık daha yüksek bir reaktivite göstermektedir. Vitamin B türevi pyriithiamine daha yüksek bir duyarlılık ve α^+ 'ya kıyasla tripsine karşı artmış direnç göstermektedir. Bu özellikler izoformlar arasında yapı farklılıkları olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Daha sonra α ve α^+ 'nın NH_2 terminalinde farklılıklarının gösterilmesi izoform farklılığı için genetik temeli ortaya koymuştur. Urayama ve ark. ratlarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ları, santral sinir sistemiyle sınırlandırılmış beyin tipi ve çoğu organda bulunan böbrek tipi $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz olarak iki gruba ayırmışlar. Moleküler biyolojik tekniklerin ulaştığı nokta vertebralılarda en azından 3 α polipeptidin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Şimdi bunlar α_1 , α_2 ve α_3 olarak bilinmektedir. Son zamanlarda Shamraj ve Lingnel rat testislerinde dördüncü bir α izoformunu da tanımlamışlardır. Molekül ağırlıkları doku kaynağına bağlı olarak değişmektedir. Memelilerin %98'nde α alt biriminin sayısı, 8 tane transmembran α helikal segment ve 2 tane büyük stoplazmik domainden meydana gelmiştir. β alt birimi ise tek bir helikal transmembran ve tek bir extrasellüler domainden oluşmuştur . (67)

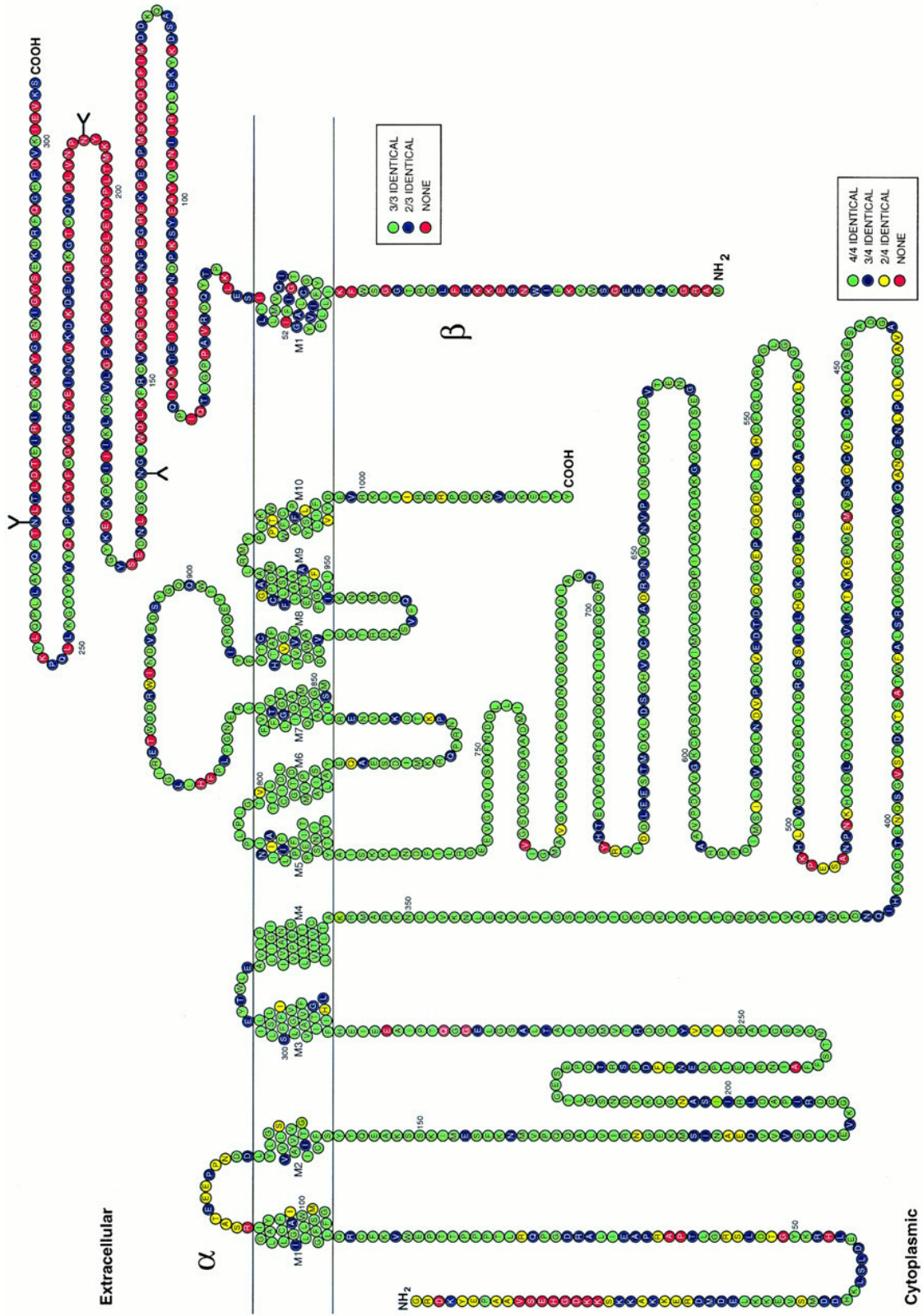
$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın izoformları birkaç memeli türünden klonlanmıştır ve bu izoformların bütün memelilerde var olduğu ortaya konmuştur. İleri çalışmalar göstermektedir ki Na pompasının moleküler farklılığı β alt üniteye kadar uzar. Şimdilerde 3 farklı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz β izoformu tanımlanmıştır. İzoformlardan ikisi (β_1 ve β_2) kuşlarda ve memelerin farklı dokularında bulunmuştur. Halbuki β_3 amfibianlarda, farelerde, ratlarda ve insanlarda belirlenmiştir. Na pompasının hem α hem β izoformları, ifade olarak doku-spesifik model sergilemektedir. β_1 alt üniteleri ile birleşmiş α_1 izoformları yaklaşık olarak her dokuda bulunur. İlâveten $\alpha_1\beta_1$ böbreklerin başlıca izozimidir. Klasik olarak $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın kaynağı olarak kullanılmıştır (68,69).

Böbreklerde diğer $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformlarının mevcudiyeti tartışma konusudur. α_2 ve α_3 izoformları hem RT-PCR ile hem de quabain titrasyon analizi ile renal korteks, medulla ve papillada tesbit edilmiştir. α_1 ve β_1 'in geniş doku dağılımının aksine, diğer α ve β

polipeptitlerin ekspresyonu sınırlanmıştır. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformlarının ekspresyon örnekleri hem mRNA hem de protein seviyesinde en çok ratlarda ayrıntılı olarak çalışılmıştır. α_4 izoformu testise özgü bir izoformdur. α_2 izoformları adipositlerde, kaslarda, kalpte ve beyinde, α_3 izoformları ise sinir dokusunda bol olarak bulunur. Sinir sisteminde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformlarının ifadesi en karışık duruma ulaşır. Nöron hücreleri tek izozim veya farklı $\alpha\beta$ heterodimer kombinasyonlarından oluşan çoklu izozimleri içermektedir. Halbuki nöronlar α_3 polipeptidin başlıca kaynağıdır. Glial hücreler tercihen α_2 'yi eksprese eder. α izoformları doku-bağlı tarzda dağılmıştır. α_2 izoformu; iskelet kaslarında, pineal bezde ve sinir dokusunda bulunur. Halbuki α_3 testislerde, retina, karaciğer ve akciğerde mevcuttur. Buna ilaveten $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformlarının ekspresyon örnekleri, gelişimin yanı sıra hormonal regülasyona bağlıdır ve hastalık sürecinde değişebilir (70).

2.3.2.2. α ve β İzoformların Yapısı

α izoformların tamamlanmış aminoasit sekansı; insan ve ratlardan polipeptidler için CDNAs kodlanmasıyla ortaya çıkarılmıştır (71,72). Ratlarda α alt ünitelerinin uzunluk değişimi azdır. α_3 izoform 1014 aminoasit ile en küçüğüdür. α_1 1024, α_2 1021 ve α_4 1028 kalıntı ile en büyüğüdür. Aminoasit sekuansı, bölge spesifik sınıflandırma ve immünolojik ve proteolitik çalışmalar α alt ünitelerinin muhtemel transmembran oryantasyonunun anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmalarda dört transmembran alan ile bir NH_2 terminal segmenti, kabaca polipeptidin 1/3'ün büyük stoplazmik alan ve 6 membran mesafe alan bir karboksit terminal bölge ihtiva ettiğini ileri sürülmektedir. Bu membran topografisi Ca^{++} , H^+ , ve $\text{H}^+\text{-K}^+$ ATPaz'lar için önerilen modellere benzemektedir (73).



Şekil 2. Na^+/K^+ -ATPaz enzimi alt üniteleri (70).

Şekil 2’de gösterildiği gibi en yüksek yapısal farklılık (izoformlar arasında) NH₂ terminalinde meydana gelir. Ekstraselüler qubain bağlanma yeri transmembran segment 1 ve 2 arasında ve aminoasit 403–503 arasındaki stoplazmik bölgedir. Aksine en büyük benzerlikler ATP bağlama ve fosforilasyon yerlerinin lokalize olduğu sitoplazmik orta bölge içinde meydana gelir (transmembran hidrofik bölgeler ve COOH terminal bölge) (70).

α alt ünitesi translasyonel veya posttranslasyonel modifikasyona uğrar, bunlardan bazıları izoforma spesifiktir. Matür α_1 ve α_2 polipeptidlerinde ilk 5 aminoasit bölünür. α_3 izoformunun benzer bir işlemde geçip geçmediği bilinmemektedir. α_3 izoformu için doku-spesifik posttranslasyonel bir modifikasyon önerilmektedir. İzoform-spesifik antikor beyinde α_3 olarak tanımlanmış ATP bağlanma yerinin yakınında bir bölgede aktivite gösterir, fakat kalpte benzer izoforma aktivite göstermez. Bu reaktifliğin eksikliği sentez esnasında proteinin modifikasyonu tarafından epitop antikorun blokajı olarak yorumlanır (74,57).

β izoformların aminoasit sekuansı; fare, insan ve ratların CDNA’larından ortaya çıkarılmıştır. Ratlarda β_1 izoformunun 304, β_2 izoformunun 290 ve β_3 izoformunun 279 aminoasiti vardır. Bütün izoformlar genel temel yapıyı paylaşırlar. β izoformlar kısa NH₂ terminal sitoplazmik bölge, bir transmembran mesafe segment ve bir geniş ekstraselüler alandan ibarettir. Bütün memeli türleri boyunca β_1 ve β_2 izoformların homolojisi yaklaşık %95’tir. Bu değer memeli olmayan türlerde %60’a düşer. Farklı β izoformları arasında homoloji, katalitik altünite için daha düşük bulunmuştur. β altünitesinin transmembran alanı hem izoformlar hem de türler arasında en çok korunmuş bölgedir. Bütün β izoformlar ağırlıkta glikozilattır. Memelilerde β_1 izoformları 3 tane N-bağlı glikozilasyon bölgesine sahiptir. β_2 izoformlar için farz edilen N-bağlı glikozilasyon bölgeleri türlere bağlı olarak değişir. Ratlar 7, insanlar 8 , fareler 9 potansiyel glikozilasyon bölgesine sahiptir. Bütün alanların kullanılıp kullanılmadığı bilinmemektedir. Tunikamisin ile Na⁺-K⁺ ATP’az alt ünitesinin glikozilasyonunun inhibisyonu, qubain için normal affiniteyle, katalitik olarak yeterli Na⁺ pompaları ile sonuçlanır (70).

Bütün β alt ünite N-bağlı glikozilasyon bölgelerinin ifade edildiği bir enzim, quabain affinitesi ve korunmuş K⁺ ile birlikte aktif enzime dönüşür. Bununla birlikte proteoliz için enzimin yüksek duyarlılığı ve α alt ünite ile benzononglikosilat β alt ünitenin kabiliyetinin azalması, glikozilasyonun protein katlanmasında bir rolü olduğu iddia edilmektedir. β_1 alt ünitenin yapısında bir diğer önemli özellik 3 disülfid köprüsünün olmasıdır ki, bunlar rat polipeptidlerinde, Cys125- Cys148- Cys158- Cys174- Cys212- Cys215 arasında meydana gelir. Bütün sisteinler sekans içinde bağlantılı pozisyonlar β_2 ve β_3 izoformları içinde

muhafaza edilmiştir. İndirgeyici ajanlarla $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın muamelesi ve $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın inaktivasyonunun sonuçları disülfit bağlarının enzim fonksiyonu için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer Na pompası β izoformlarında sülfhidril köprülerinin rolü ve yeri bilinmemektedir (75).

2.3.2.3. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz İzozimlerinin Enzimatik Özellikleri

Bireysel izozimlerin enzimatik özelliklerinin anlaşılması, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ı karakterize eden kompleks moleküler farklılıklar için temel belirlenmesinde yardımcı olabilir. Böbrekteki bütün Na pompalarında $\alpha_1\beta_1$ izozimlerinin fonksiyonel özellikleri kapsamlı olarak analiz edilmiştir. Na pompası izozimlerinin katalitik özelliklerinin değerlendirilmesindeki ilk girişim, böbrek ve beyinde enzimlerin substrat afinitelerinin kıyaslanmasıyla olmuştur. Bu ilk çalışmalar Na^+ , K^+ ve ATP için onların affinitelerinde bariz farklılıklara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra Sweadner $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın, rat axolemma ve rat böbreklerinde özelliklerini kıyaslamıştır (76,77).

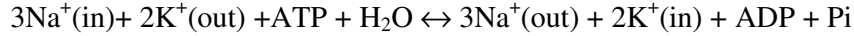
Böbrek $\alpha_1\beta_1$ izozimi, $\alpha_2\alpha_3$ alt ünitelerinden oluşmuş nöral enzime göre daha düşük oranda ATP, benzer oranda K^+ ve daha yüksek oranda Na^+ afinitesi göstermiştir. Böylece Na^+ ve K^+ afinitelerinde, ratların farklı dokularında kısmi olarak saflaştırılmış $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'lar arasında farklılıklar bulunmuştur. Ratların bütün adipositlerinde α_1 izoziminin K_m 'i Na^+ için α_2 izozimininkinden 3 kat daha düşük bulunmuştur. İzozimlerin enzimatik özelliklerinde diğer bir farklılık, pineal bezde $\alpha_3\alpha_2$ $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformunun bulunmasıdır. Bu izoform pineal $\alpha_1\beta_1$ 'e göre daha yüksek Na^+ afinitesi göstermektedir (70).

Gelişim boyunca Na pompa izoformlarının miktarlarının değişimi birkaç dokuda meydana gelir. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoform ifadesinin adlandırılmasının dikkate değer örneği gelişen rat kalbinde bulunmuştur. Bu dokuda hayatın ikinci ve üçüncü haftaları arasında α_3 izoformunda α_2 izoformu tarzında değişiklik vardır ve daha sonra bu yetişkin miyokardiyumunun baskın izoformu haline gelir. İlginç bir şekilde bu bulgu miyokardiyumun elektrofizyolojik özelliklerinde önemli değişiklikler ile de çakışmaktadır (78,79). Na pompası izozimleri hormonlar tarafından farklı olarak ayarlanabilir. Hormonlar özel bir izoformun ifadesinin ayarlanmasıyla aksiyonları ortaya çıkabilir veya bireyin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesini direkt olarak etkileyebilir (80). Örneğin rat iskelet kasında insülin, plazma membranına intrasellüler depolanmadan önce α_2 $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın hızlı translokasyonunu sağlayabilir. Bu sonuçlar ile hücre yüzeyinde ilave fonksiyonel Na pompalarının gereksinimi ve $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesi artar. İlaveten $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz izoformlarının normal ekspresyonu patolojik durumlar

tarafından değiştirilebilir. Örneğin birkaç kardiyak hastalıkta kalbin Na⁺-K⁺ ATPaz izoform kompozisyonu değişmiştir. Bu değişiklikler, hastalık esnasında değişmiş homeostazisin yeniden şekillenmesinde hücrel girişimi yansıtabilir (81).

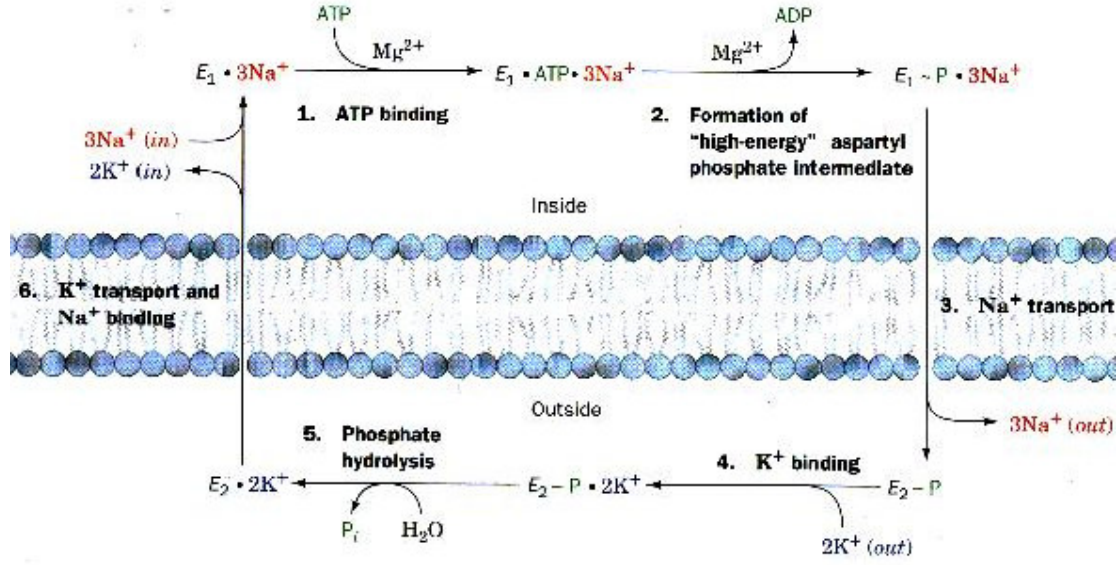
2.3.3. Na⁺-K⁺ ATPaz Enziminin Aktivitesi

Membrana yerleşmiş olan enzim, hücre içinde Na⁺, hücre dışında K⁺ bağlamaktadır. Na⁺-K⁺ ATPaz enziminin sitozolik bölgesinde 3 Na⁺ ve ATP bağlayabilen bir bölge bulunmaktadır. Enzimin extrasellüler yüzü ise K⁺ bağlayabilen bir bölge içerir. ATP, enzimin aspartik asit rezidüsünü fosforiller ve enzimde yapısal değişikliğe yol açar. Bunun neticesinde hücre dışına 3Na⁺ hızla salıverilmekte ve 2K⁺ bağlanmaktadır. K⁺ iyonlarının bağlanması aspartik asit yapısından fosforun hidrolizine neden olmaktadır. Bu esnada meydana gelen yapısal değişiklik K⁺ iyonlarının sitozole salıverilmesine yol açmaktadır (51).



Enzim iki tane konformasyonel bölgeden oluşmuştur. Bu iki bölge E₁ ve E₂'dir. Bu bölgelerin değişik görevlere sahip farklı alt bölümleri vardır. Değişik katalitik aktivite ve değişik bağlanma spesifiteleri göstermeleri örnek olarak verilebilir.

E₁ kapalı, içe bakan yüzde, yüksek affiniteli Na bağlayıcı bölüme sahip (K_m=0,2mM ve bu intrasellüler Na⁺'dan küçük) ve Na⁺ ile bağlandığı zaman aktive ürün E₁-P'nin oluşması için ATP ile reaksiyona giren kısımdır. E₂-P dışa bakan yüzdendir, yüksek affiniteli K⁺ bağlayıcı bölümdür (K_m=0,05M ekstrasellüler K⁺'dan düşük) ve K⁺ bağlandığı zaman Pi + E₂'yi oluşturmak için hidrolize olur.



Şekil 3: Na^+ - K^+ ATPaz vasıtası ile Na^+ ve K^+ 'un aktif transportu (57)

Enzim aktivitesi şu şekilde özetlenebilir:

- * Hücrede bulunan Na^+ iyonlarından 3 tanesi E_1 bölgesine bağlanarak yüksek enerjili $\text{E}_1 \cdot \text{ATP} \cdot 3\text{Na}^+$ oluşturmak üzere ATP ile kompleks oluşturur.
- * Bu enerjili kompleks, yüksek enerjili aspartil fosfat ara ürünü olan $\text{E}_1 \approx \text{P} \cdot 3\text{Na}^+$ 'u oluşturmak için reaksiyona girer.
- * Bu yüksek enerjili ara ürün, düşük enerjili $\text{E}_2 \cdot \text{P} \cdot 3\text{Na}^+$ 'a dönüşür. Bağlı Na^+ hücre dışına salınır, böylece Na^+ membrandan transfer edilmiş olur.
- * $\text{E}_2 \cdot \text{P}$, hücre dışında iki tane K^+ a bağlanır ve $\text{E}_2 \cdot \text{P} \cdot 2\text{K}^+$ 'u oluşturur.
- * Fosfat grubu hidrolize edilerek $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+$ oluşturulur.
- * $\text{E}_2 \cdot 2\text{K}^+$ 'nın yapısı değişir, iki molekül K^+ u hücre içine aktarır. Onu 3 Na^+ ile değiştirir ve transport siklusu tamamlanır (7).

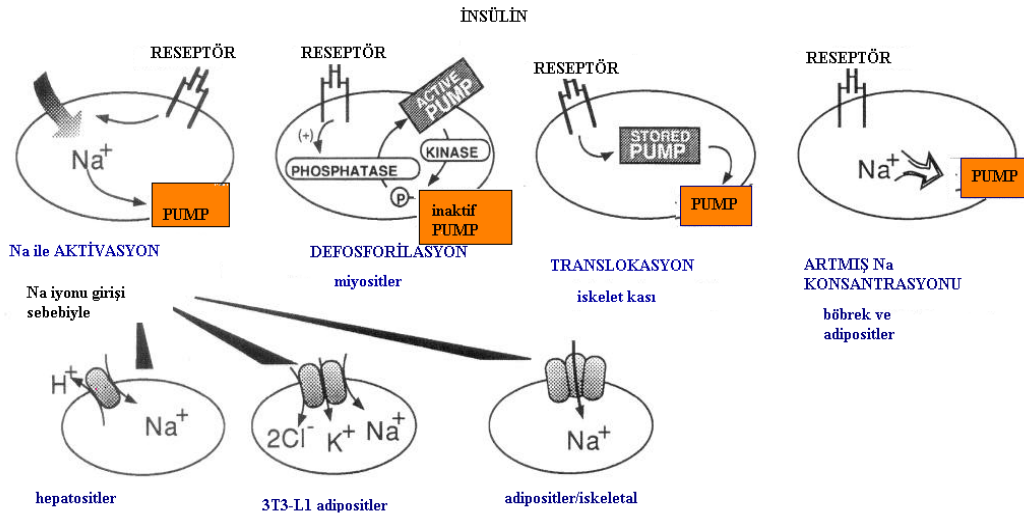
Na^+ 'un dışarı atılması hücrede osmotik dengenin sağlanması için şarttır. Aksi halde hücre turgora uğrar ve parçalanır.

2.3.4. Na^+ - K^+ ATP'az Enziminin Regülasyonu

Na^+ - K^+ ATPaz aktivitesinin regülasyonu farklı hücresel mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir. Plazma membranında mevcut enzim moleküllerinin sayısının modülasyonu tarafından veya hücre yüzeyinde hazır Na^+ - K^+ ATPaz'ın aktivitesinin etkilenmesiyle sağlanabilir. Örneğin plazma membranındaki enzimin miktarı sentez oranının değişmesiyle modifiye edilebilir. Alternatif olarak hücre yüzeyinde Na^+ pompasının aktivitesi, Na^+ pompası

fonksiyonunda hızlı düzenlenme sağlanmasıyla direkt olarak regüle edilebilir. Bu hızlı yanıtta rol oynayan birkaç etken vardır. İntrasellüler Na^+ konsantrasyonu, intrasellüler Ca^{+2} ve endojen quabain Na pompa aktivitesinin potansiyel kısa dönem düzenleyicileridirler (80).

α_1 Na^+ - K^+ ATPaz aktivitesinin kısa süreli regülasyonu için, Na^+ girişine sekonder, Na^+ konsantrasyonunun artması, fosforilasyon, defosforilasyon, altünitelerin plazma membranına translokasyonu ya da Na^+ 'a ilginin artması ile sonuçlanan bir mekanizma ileri sürülmektedir. Bu altünitenin uzun süreli regülasyonunda etken olarak gen transkripsiyonu, translasyon ve protein degradasyonundaki değişiklikler ileri sürülmektedir. Bu değişiklikler kompleks intrasellüler sinyal ağı üzerinde gerçekleşir ve proteinkinaz ve fosfatazın inhibisyon veya aktivasyonunu içermektedir (82).



Şekil 4. İnsülin ile Na^+ - K^+ ATPaz düzenlenme mekanizması (80).

Na^+ - K^+ ATPaz altünitelerinin hücre içi depolanma bölgelerinden plazma membranına translokasyonunun, iskelet kasında insüline cevapta Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesi için ana regülatör mekanizma olduğunu ileri sürülmüştür. Sweeney and Klip, rat kasında α_2 altünitesinin tercihi olarak insülinle yer değiştirtirdiğini rapor etmişlerdir. 30 dk uzun süre insülinde sonra iskelet kası preparasyonları izole edildiğinde α_1 ve β_1 izoformları plazma membranında artmış olarak bulunmuştur. Hücre içi membranda ise bu izoformlar azalmış olarak bulunmuştur. α_2 ve β_2 dağılımında ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Kas hücreleri içinde Na^+ - K^+ ATPaz subünitelerinin dağılımını insülinin regüle edebileceği ileri sürülmüştür.

İnsülinle regüle edilmiş Na^+ - K^+ ATPaz aktivitesi ve insülinle regüle edilmiş glukoz transportu arasında ilginç korelasyonlar vardır. İnsülin; altünitelerin hücre içi depo

kompartmentlerinden, plazma membranına translokasyonunu gerçekleştirir. Bu sistemler hücre içinde sırasıyla K^+ ve glukoz alınmasına aracılık eder. GLUT 1 gibi α_1 subünitesi de her yerde bulunur. GLUT 4 gibi α_2 subünitesi de dokuya spesifiktir (kas, kalp, yağ dokusu). Diabette glukoz alımına insülin direnci olduğu gibi Na^+-K^+ ATPaz'a insülin direnci de olabileceği kabul edilir. Na^+-K^+ ATPaz'ın α_2 altünitesinin ve GLUT 4'ün insüline cevapta hücre içi membrandan hücre yüzeyine yer değiştirdiği gösterilmiştir. İnsülin altünite dağılımını yağ hücrelerinde değiştirmedeği, kaslarda değiştirdiği ileri sürülmüştür (83,84).

Protein kinaz A'nın cAMP aktivasyonu, protein kinaz C'nin diaçil gliserol aktivasyonu ve kalmodulin kinaz'ın serbest intraselüler Ca^{+2} konsantrasyonu kaskadları aktivitesi hormonal regülasyonuna aracılık eden sinyal kaskadları olarak önerilir ve genellikle enzimin fosforilasyonu ile sona erer. Na^+-K^+ ATPaz pompasının yukarıda bahsedilen kinazlar tarafından fosforilasyona tabi olabileceği ileri sürülmüştür. Protein kinaz A ve protein kinaz C'nin Na^+-K^+ ATPaz katalitik aktivitesini modifiye edebileceği ileri sürülmüştür (80).

İnsülin tedavisi gören diabetik hayvanların kas hücre membranlarında, ısrarcı hiperglisemiye rağmen Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinin kısmi restorasyonu kaydedilmiştir. İnsülinin, Na pompası üzerinde direkt olarak onun Na afinitesini artırmak suretiyle hareket ettiği, fakat membranda mevcut olan pompa sayısı değiştirmedeği ileri sürülmüştür (85).

2.3.5. Na^+-K^+ ATPaz Enziminin Biyomedikal Önemi:

Na^+-K^+ ATPaz pompası ile oluşturulan elektropotansiyel ve elektrokimyasal gradient, sinir hücrelerinin uyarılabilirliğini sağlar. Diabetik polinöropatide bu enzim aktivitesi düşük bulunmuştur. Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinin düşmesi yüksek intraaksonal Na^+ konsantrasyonuna ve sinir hücresi membranının depolarizasyonunun blokajına yol açar. Diabetik ratların siatik sinirinde Na^+-K^+ ATPaz aktivitesi ve sinir iletim hızı arasında anlamlı korelasyon olduğu rapor edilmiştir (86). Ayrıca glukoz ve aminoasitlerin bazı hücrelere girebilmesi için gerekli olan serbest enerjiyi sağlar.

Bazı otoriteler; elektriksel stimülasyon, metrazol veya kobalt implantasyonu ile indüklenen nöbetleri takiben enzim aktivitesinde artış gözlemişler. Bununla birlikte bazı otörler ise Al veya Co implantasyonu, elektroşokla oluşturulan nöbet sonraları ve insanda epilepsi sonrası bu enzim aktivitesinin düştüğünü bildirmişlerdir (87). Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinin pankreatik kanal sekresyonunda esansiyel olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (88).

Hem IDDM'li hem de NIDDM'li hastalarda Na^+-K^+ ATPaz aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (4,89,90). Ancak normal kişilerde oluşturulan hipergliseminin etkisi buna zıttır.

Çünkü verilen glukoz sağlıklı kişilerde hiperinsülinemiye yol açar. İnsülinin ise bu enzim aktivitesi üzerine stimülatör etkisi olduğu iyi bilinir.

2.4. ERİTROPOİETİN

Eritropoietin (EPO) eritropoezisi uyaran bir hematopoetik growth faktör ve sitokindir (8). EPO, 34 kDa ağırlığında olup eritropoezde regülatör fonksiyona sahiptir (8,92,93,96). 165 aminoasit ve *in vivo* etkinlik için gerekli olan dört oligosakkarit zinciri içeren glikoprotein yapısında bir hormondur (94). Nispeten ısıya ve pH'ya dayanıklı asidik bir α_2 globulin olan bu glikoproteinin yaklaşık % 40'ı karbohidrattır ve sialik asitle zenginleştirilmiş dört kompleks karbohidrat zinciri vardır (92). Biyolojik yarı ömrü 4-6 saattir (92,94,95). EPO'yu kodlayan gen 7. kromozom üzerinde yer alır (92,93). Genin transkripsiyon hızı oksijen bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilir. Sentezlendiği hücreden serbestlenirken yapısına karbohidrat zincirleri eklenir, bu glikozilasyon EPO'nun biyolojik aktivitesi için önem taşır ve antijenitesini sağlar (93). Molekülün karbohidrat kısımlarındaki sialik asitlerin çok az bir kaybı dahi EPO'yu hem biyolojik olarak etkisiz hale getirir hem de yarı ömrünü 5 dakikaya indirir (91,94).

Eritropoietin, eritroid serinin geç öncül hücreleri için büyüme ve "survival" faktörü olarak etki eder ve apoptozislerini önler, bu hücrelerin daha geç diferansiasyon basamaklarına taşınmasını sağlar, sonuçta olgun eritrositler üretilir. Eritropoietin, eritroid öncül hücrelerinin yüzeyindeki EPO reseptörleri aracılığıyla etkisini gösterir (93). EPO reseptörü, sitokin reseptör ailesinden tek bir transmembran domain içeren lineer bir proteindir. Reseptörün tirozin kinaz etkinliği vardır ve bir dizi serin ve treonin kinazı etkinleştirerek, hedef hücrelerinde büyüme ve gelişmeye neden olur. EPO, DNA yarılmasını önleyerek eritrositer seri kök hücrelerinin yaşamasını sağlar (94).

2.4.1. EPO Üretim Yerleri

Erişkinlerde EPO'nun %85'i böbreklerde %15'i karaciğerde yapılır. Bu organlarda EPO mRNA'sı bulunur. Dalak ve tükrük bezlerinden de EPO elde edilebilir ancak EPO mRNA'sı olmayan bu dokularda EPO yapımı olmaz (94). Beyin, testis ve akciğerden az miktarda parakrin fonksiyon gören EPO salınmaktadır. Ayrıca kemik iliği makrofajlarının da lokal olarak EPO ürettikleri öne sürülmektedir (98). Erişkinlerde EPO, böbreğin peritübüller kapiller yatağındaki intertsiyel hücreler tarafından ve karaciğerdeki perivenöz hepatositler tarafından sentezlenir (94). Ekstrarenal EPO'nun esas üretim yeri karaciğerdir (92).

Karaciğerde İto hücrelerinde de EPO varlığı gösterilmiştir (98,99). Eritrosit yapımı ve EPO üretiminin kemik iliği ve böbrekler tarafından yüklenilmesinden önceki fetal ve yenidoğan evresinde en önemli EPO ve eritrosit yapım merkezi karaciğerdir (94).

2.4.2. EPO'nun Etki Mekanizması

EPO etkilerini ya hücre içine girerek ya da hücrenel bir aracı (ikincil haberci) ile gerçekleştirebilir. Etkisinin hızlı oluşu ve molekül ağırlığının fazla oluşu hücre zarıyla etkileşerek ikinci haberciye açığa çıkardığını akla getirir. Hücre zarında EPO'nun yarattığı etki stoplazmada aracı bir protein meydana getirmektedir. Bu aracı bir protein kinaz olabilir. Aracı protein diğer yandan nukleusta DNA fraksiyonları ve DNA sentezini artırmakta ve bunu izleyerek stoplazmada hemoglobin ve çeşitli proteinlerin sentezi artmaktadır (95).

EPO'nun reseptöre bağlanmasını takiben oluşan EPO-reseptör kompleksi hücre içine alınır ve stoplazmada GTP bağlayıcı protein vasıtasıyla taşınır. EPO, hücre içi Ca^{+2} konsantrasyonunu hızlı bir şekilde artırır. Hücre içi Ca, EPO'nun hücre içi transportunda rol alır. Mesajın nukleusa nasıl taşındığı hakkında protein kinaz C aktivasyonu ve protein fosforilasyonunun stimülasyonu sebep olarak düşünülmektedir (92).

2.4.3. EPO Salınımının Düzenlenmesi

EPO salınımının temel uyarıcısı doku hipoksisidir (92). Androjenler ve kobalt tuzları da EPO salınımını uyarır. Yeni elde edilen veriler, böbreklerde ve karaciğerde EPO salınımını düzenleyen O_2 reseptörünün bir hem proteini olduğunu ve EPO geninden EPO mRNA'sının transkripsiyonunun bu proteinin deoksi formu tarafından uyarılıp oksid formu tarafından inhibe edildiğini göstermiştir (92,94). EPO sentezini etkileyen faktörler şunlardır:

1. Düşük kan oksijen kapasitesi
2. Düşük arteriyel O_2 basıncı
3. Artmış kan O_2 afinitesi
4. Düşük böbrek kan akımı (92)

Yüksek irtifada oluşan alkaloz EPO salınımını kolaylaştırır. Katekolaminler, renin anjiyotensin sisteminin EPO sisteminden bağımsız olmasına rağmen tıpkı renin salınımı gibi EPO salınımını da bir β -adrenerjik mekanizma ile kolaylaştırır. Adenozin de EPO sentezini uyarırken bir adenozin antagonisti olan teofilin inhibe eder (94). Glikokortikoidler, troid hormonları, büyüme hormonu, vazopressin ve testosteron EPO sentezini artırır (92).

2.4.4. EPO Tedavisi

Miyake ve arkadaşları tarafından 1977'de pürifiye edilen EPO hormonunun Ekim 1983'de geni klonlanmıştır (93). Rekombinant DNA teknikleriyle insan eritropoietini laboratuvarlarda üretilebilmektedir. Doğal eritropoietin ve üretilen yapay eritropoietin kemik iliğinde aynı etkiyi gösterirler (97). Aralık 1985'te Eschbach tarafından ilk defa bir hastada rekombinant EPO kullanılmıştır. Haziran 1986'da Seattle grubu ve Londra/Oxford grubu tarafından son dönem böbrek yetmezliği anemisini düzeltmede eritropoietinin etkili olduğu gösterilmiştir (93).

Eritropoietin tedavisi için genel olarak kabul edilen başlangıç Hb düzeyi 9,5 gr/dl iken Hct düzeyi %30'un altındaki düzeylerdir. Ülkemizde ise genel olarak Hb 8 gr /dl'nin ve Hct %24'ün altında olduğunda EPO tedavisi başlanmaktadır. Bunda ilacın maliyetinin yüksek oluşunun rolü büyüktür. Bunlara ek olarak, hastada anjina, anemiye sekonder kalp yetmezliği, anemiye bağlı diğer semptomlar ve düzenli kan transfüzyonu ihtiyacı varsa EPO tedavisi başlanmalıdır. Hemodiyaliz hastalarında İV yolla ortalama doz, haftada 3 defa 50 u/kg (150 u/kg/hafta) olarak başlanır. rhEPO tedavisine yanıtı izlerken tedavinin 4-6. haftasında Hct artışı %3, Hb artışı 1 gr/dl olmalıdır (93). Buna göre doz ayarlamaları yapılmalıdır.

Eritropoietinin tehlikesi, damar içi pıhtılaşmalar ve vizkozitesi artan kanın vital organlarda akımının azalmasıdır. Yüksek dozda alınan eritropoietin, sıvı kaybı ve subklinik enfeksiyonların etkisiyle kanın agrege olmasına ve kapillerden geçememesine neden olur. Kanın vizkozitesi artar, koyulaşır, kan akımı yavaşlar, kalp çalışmasında bozukluklar görülür, kalp yetersizliği, akciğer ödemi, beyinde oksijen yetmezliği ve ani ölümler görülebilir (97).

2.4.5. EPO ve Sinir Sistemi

EPO, eritropoezisi uyaran bir hematopoetik growth faktör ve sitokindir. Son yıllarda, EPO'nun sinir sisteminde önemli nonhematopoetik fonksiyonları olduğu gösterilmiştir. EPO, sinir sisteminin gelişimi, korunması ve onarımı süreçlerinde önemli rol oynamaktadır.

Çok sayıda invitro ve invivo çalışma EPO'nun ve EPO reseptörünün sinir sisteminde ve nöronal hücrelerde bulunduğunu ve EPO'nun çeşitli hücre kültürü ve deneysel hayvan modellerinde nöroprotektif etki gösterdiğini ortaya koymuştur. EPO, kök hücrelerin toplanması ve inflamasyonun modülasyonu, apoptozisin yavaşlatılması, angiogenезin stimülasyonu, vazospazmın geri döndürülmesi, glutamat ve reaktif oksijen türleri gibi doku hasarı moleküllerinin üretimini sınırlandırılmasını içeren çeşitli olaylarda koordineli bir biçimde hareket etmektedir. Bundan dolayı EPO, bu mekanizmaların bir kombinasyonu ile nöronları koruyabilir (8).

2.4.5.1. Sinir Gelişiminde EPO'nun Rolü

EPO ve EPO reseptörü kemirgenler, primatlar ve insanların embriyonik, fetal ve adult beyninin spesifik bölgelerinde tespit edilmiştir. EPO, genel bir morfojendir ve erken gelişim sırasında nörogenezi indükler. Embriyogenezde EPO reseptörünün fonksiyon bozukluğunda nöral progenitör hücre sayısında azalma, nörogenezde azalma ve nöronal apoptoziste artış vardır (8).

2.4.5.2. Sinir Sisteminde EPO'nun Nöroprotektif Etkisi

rhEPO tedavisi nörofizyolojik testler ve elektrofizyolojik değerlendirmeden elde edilen bulgular ile gösterildiği gibi beyin fonksiyonlarında yararlı bir etkiye sahiptir. Bu gelişme htc düzeylerinde progresif bir artış ile ve bu yüzden beyin hipoksik durumunun düzeltilmesi ile koreledir. Bununla birlikte birkaç *in vivo* ve *in vitro* çalışmada EPO'nun da direk bir nörotrofik ve nöroprotektif etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (8).

Neonatal ratların tek taraflı bir siatik sinir transectionunda 2 hafta sistemik olarak EPO verilmesi motor nöronların kaybını anlamlı olarak önlemiştir (100). Tek doz asiyaloEPO tedavisi adult ratların siatik sinir yaralanmasında fonksiyonel kaybı anlamlı olarak azaltmıştır (101). Bu bulgular motor nöropati ve ALS gibi motor nöronların dejenerasyonunu ve ölümünü gerektiren hastalıkların tedavisinde EPO'nun potansiyel kullanımını akla getirmektedir.

EPO reseptörleri sisteinlerin korunması ile karakterize olan sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir. EPO reseptörüne EPO bağlanmasında sitoplazmik trozin kinazı, Janus ailesinin bir üyesi olan JAK2 için artmış afiniteye sahiptir. JAK2, onun aktif bölgelerinin transfosforilasyonu ve EPO reseptörünün hücre içi etki alanında trozin rezidülerinin fosforilasyonu ile aktive olur (96).

Bu etki EPO reseptörlerini aktifleştirir ve EPO reseptörlerinin stoplazmik kuyruğu ayırt edici sinyal moleküllerini toplayabilir. JAK2 ile EPO reseptörünün fosforilasyonu EPO kaynaklı sinyal yolağının başlangıcı için gereklidir (96).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. MATERYAL

Bu çalışma için S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 21.09.2007 tarih ve 2007/202 sayılı kararıyla onay alınmıştır. Çalışma 48-72 ($60 \pm 8,5$) yaşları arasında toplam 11 diabetik polinöropatili hasta (3 erkek, 8 kadın) ile 48-56 ($51,3 \pm 3,05$) yaşları arasında sağlıklı 10 kontrol (5 erkek, 5 kadın) vakası üzerine gerçekleştirildi.

Hastalar Konya ili ve çevresinde yaşayan, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji kliniğine başvuran ve EMG ölçümü ile polinöropati tanısı almış, eritropoietin tedavisine yeni başlanacak hastalardan seçilmiştir. Hastalarda EPO tedavisi için neorecormon marka eritropoietin beta 150 U/kg/hafta dozunda kullanıldı. Hastalarımızın tedavi öncesi hemoglobin değerleri 8,6-10,8 g/dl (ortalama 9,99 g/dl), hemotokrit değerleri 25,9-34,1 (ortalama % 29,6) üre değerleri 86-265 mg/dl (ortalama 144 mg/dl), kreatinin değerleri 2,6-8,3 mg/dl (ortalama 4,9 mg/dl), glukoz değerleri 107-334 mg/dl (ortalama 193,5 mg/dl) arasında değişmekte idi.

Kontrol vakalarının sigara, ilaç kullanımı, diabet, hipertansiyon, böbrek yetmezliği ve diğer hastalık hikayeleri yoktu.

3.1.1. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı

Hasta grubunda tedaviye başlamadan ve tedavinin 30'uncu günü ve kontrol grubunda Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Enzim aktivitesi ölçümü için heparinize kan örnekleri alındı. Bu örnekler santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Alttaki şekilli elemanlar yıkanarak santrifüj edildi. Süpernatantları atılarak yıkama ve santrifüj işlemi üç kez tekrarlandı. Sonuçta elde edilen eritrosit membranında Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü yapılmaya kadar -80°C 'de saklandı. Daha sonra tüm örnekler aynı anda çözündürülerek Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesi tayini yapıldı.

Polinöropati tanısı için hastaların tedavi öncesi EMG ölçümleri yapıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

- Soğutmalı Ultra Santrifüj : Hettich Rotina 46 R
- Terazi: Shimadzu Librar EL-120HA
- Hassas Terazi: Precisa 125 A
- Vorteks: Elektro-Mag

- Benmari: Nüve Bath NB 20
- Manyetik Karıştırıcı : Elektro-Mag
- EMG cihazı: Nihon Kohena Neuropack

3.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

- Tris : Cat No: Sigma T-1378
- HCl : Cat No: Merck 814
- NaCl : Cat No: Merck 847
- KCl : Cat No : Merck 340
- MgCl₂ : Cat No : Sigma M-8266
- Na₂ATP : Cat No : Sigma A7699
- SDS: Merck 9263888
- EDTA: Sigma ED2SS
- Heparin : Nevparin 5000 IU/ml

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

0,1 N HCl çözeltisi : Bir miktar distile su üzerine 8,3 ml HCl ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlandı.

0,08 M Tris çözeltisi : 10,114g Tris tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Yıkama çözeltisi : Bir miktar distile su üzerine 26,56 ml 0,1 N HCl çözeltisi ilave edildi, üzerine 31,25 ml 0,08 M tris çözeltisi eklendi. 9,125g NaCl tartılıp çözeltiliye ilave edildi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

10 mM pH = 7,4 tris tamponu : Bir miktar distile su üzerine 0,1 N HCl çözeltisinden 42,5 ml, 0,08 M tris çözeltisinden 50 ml eklendi. Son hacim distile su ile 800 ml'ye tamamlandı.

Medium Çözeltisi : 5,85 g NaCl, 0,372 g KCl, 0,57 g MgCl₂, 0,037 g EDTA, 0,165 g Na₂ATP tartılıp bir miktar distile suda çözüldü. Üzerine 159,41 ml 0,1 N HCl çözeltisi ve 187,54 ml 0,08 M tris çözeltisi ilave edilip karıştırıldı. Son hacim distile su ile 1litreye tamamlandı.

%10'luk SDS çözeltisi : 10 gr. SDS tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.2. METOD

3.2.1. Na⁺ - K⁺ ATP az Enzim Aktivitesinin Tayini

Eritrosit membran Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü, modifiye edilmiş Kitao – Hattori metodu ile yapıldı (102).

Alınan antikoagülanlı 10 ml kan, 4000 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası plazması atıldı ve geriye kalan eritrosit pelleti aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Hafifçe alt üst edildikten santrifüj işlemi tekrarlandı ve santrifüj sonrası numunenin süpernatantı atıldı. Alttaki eritrosit pelleti tekrar aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra eritrosit pelleti 10 mM pH = 7,4 tris tamponuyla (6 birim pellet 34 birim tampon ile muamele edildi) hemoliz edildi. Hemolize numune +4°C'de 15 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası numune 11.000 rpm'de 70 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası numune süpernatantı atılıp altta kalan hacim kadar tris tamponu ile muamele edilerek 11.000 rpm'de 70 dk. tekrar santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Elde edilen eritrosit ghostu aynı miktarda 10 mM pH = 7,4 tris tamponu içine alınarak çalışma numunesi hazırlandı. Bu numuneler Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü yapılmaya kadar -80°C'de saklandı. Daha sonra tüm numuneler aynı anda çözülerek çalışmaya başlandı. Temiz bir deney tüpüne hazırlanan numuneden 200 µl alınıp üzerine 800 µl medium çözeltisi ilave edilip iyice karıştırıldı. Karışım su banyosunda 37°C'de 10 dk. inkübe edildi. İnkübasyon süresinin bitişiyile birlikte numune hemen su banyosundan çıkarıldı. Hiç bekletilmeden numuneye reaksiyonu durdurmak için 50 µl %10' luk SDS çözeltisi ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Elde edilen bu karışımdan Beckman Coulter Synchron LX marka otoanalizörde Beckman marka inorganik fosfor ve mikroprotein ticari kitleri kullanılarak inorganik fosfor ve mikroprotein ölçümü yapıldı. Sonuç µmolP_i.mg.prt⁻¹.10dak⁻¹ olarak hesaplandı.

3.2.2. İstatistik Analizler

Hasta ve kontrol grubuna ait elde edilen Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi değerleri SPSS for windows 15.0 programı kullanılarak değerlendirildi. Hasta grupları ve kontrol grubu arası karşılaştırma için Mann-Whitney U testi, tedavi öncesi ve tedavi 30'uncu gün Na⁺-K⁺ ATPaz emzim aktivitesi değerleri arasındaki karşılaştırma için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı.

4. BULGULAR

Vakalarımıza ait Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi bulguları tablo 5’de belirtilmiştir.

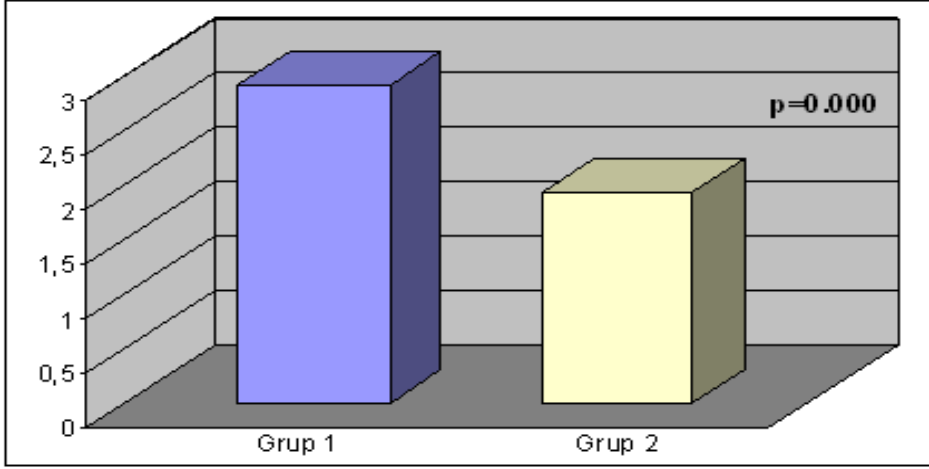
Tablo 4. Çalışma ve kontrol vakalarına ait Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi bulguları
(Grup 1: Kontrol, Grup 2: Tedavi öncesi, Grup 3: Tedavi 30’uncu gün)

Parametre	n	Grup	X±SD
Na ⁺ -K ⁺ ATPaz enzim aktivitesi (μmolP _i .mg.prt ⁻¹ .10dak ⁻¹)	10	1	2,91±0,38
	11	2	1,93±0,38
	11	3	2,40±0,63

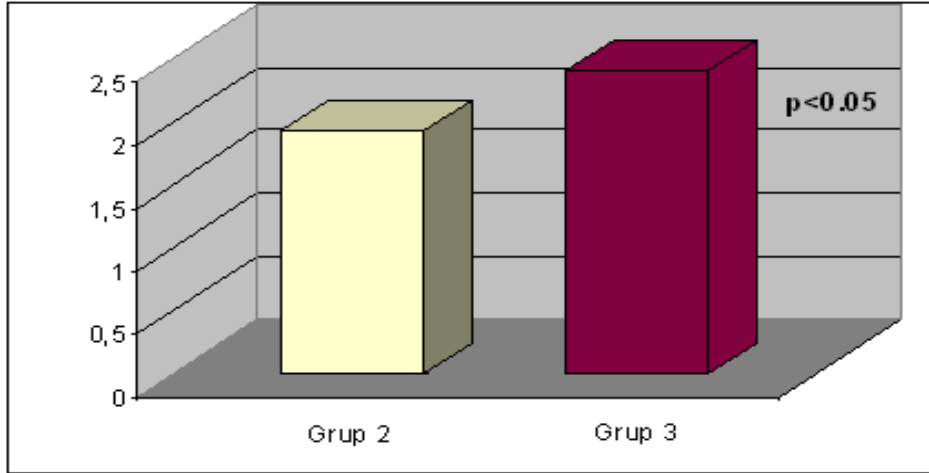
Tablo 5. Gruplar arası karşılaştırma

(Grup 1: Kontrol, Grup 2: Tedavi öncesi, Grup 3: Tedavi 30’uncu gün)

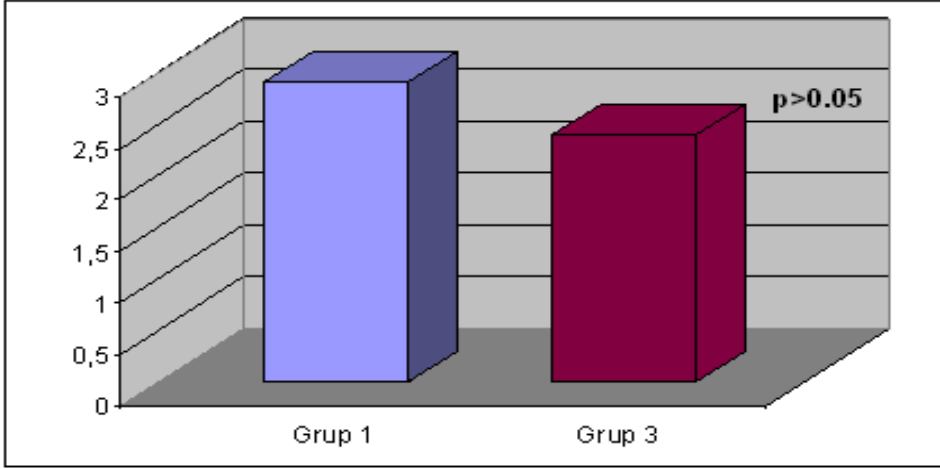
Karşılaştırılan Gruplar	p
Grup 1- Grup 2	0.000
Grup 2- Grup 3	<0.05
Grup 3-Grup 1	>0.05



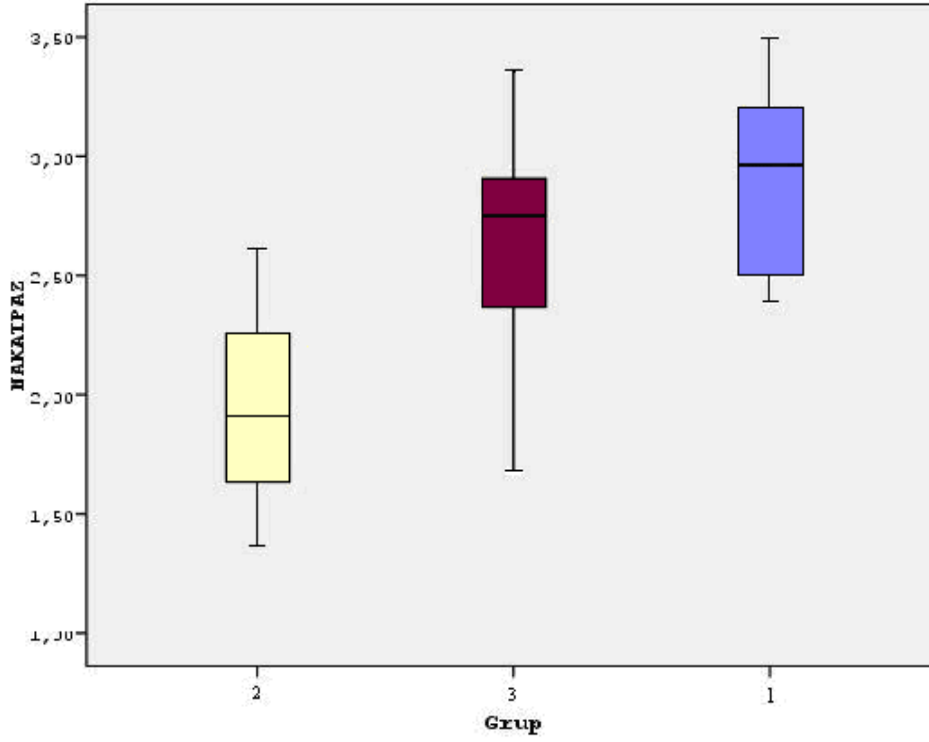
Grafik 1. Kontrol ve tedavi öncesi hasta Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi değerleri



Grafik 2. Hasta tedavi öncesi ve tedavi 30'uncu gün Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi değerleri



Grafik 3. Kontrol ve tedavi 30'uncu gün Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi değerleri



Grafik 4. Tüm gruplara ait Na⁺-K⁺ ATPaz enzim aktivitesi değerlerinin karşılaştırılması

Kontrol grubu ve tedavi öncesi hasta grubu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulundu ($p=0.000$). Tedavi öncesi hasta grubunun değerleri kontrol grubundan anlamlı olarak dūřüktü.

Tedavi öncesi ve tedavi 30'uncu gün hasta grubu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulundu ($p<0.05$). Tedavi 30'uncu gün hasta grubu değerleri tedavi öncesi hasta grubu değerlerinden anlamlı olarak yüksekti.

Kontrol grubu ve tedavi 30'uncu gün hasta grubu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi değerleri karşılaştırıldığında aralarında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Diabette oksidatif stresin eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açtığı, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma olduğu ileri sürülmüştür (103).

Tip 2 diabetli hastalarda eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin inhibisyonunun serbest radikal aracılı reaksiyonlarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (104). Ayrıca eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin azalışının, artmış oksidatif stres mekanizmaları ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (105). Diğer taraftan diabetik kişilerde ileri glikasyonun arttığı gözlenmiştir. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın glikasyonu, deneysel diabetik nöropatide sinir disfonksiyonuyla ilişkilidir. Diabetik kişilerde mikroanjyopati varlığında azalmış $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesi ve artmış ileri glikasyon son ürünleri arasında korelasyon olduğu ileri sürülmüştür, Arai (106), yüksek olan glukoz konsantrasyonu nedeniyle oluşan glikasyon aracılığıyla enzimatik inaktivasyonun meydana gelebileceği göstermiştir.

Eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesi intra ve ekstraselüler katyon homeostazisinde santral bir rol oynar. Bu enzimdeki değişikliklerin diabetes mellitus komplikasyonları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tip 2 diabetli hastalarda bu ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada nöropati ve retinopati mevcut olan diabet hastalarında, kontrol grubuna ve nöropati veya retinopati mevcut olmayan diyabet hastalarına göre eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesi daha düşük bulunmuştur (107).

Diabetik nöropati gelişiminde sinir dokusunda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde azalmaya işaret eden çalışmalar vardır. Enzimatik aktivitedeki bir azalma intraaksonal Na^+ konsantrasyonunu artırır ve sinir membran depolarizasyonunu bloklar. Siyatik sinirin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalma; aksiyon potansiyeli ile indüklenen depolarizasyondan sonra, normal membran akson repolarizasyonunu değiştirebilir, böylece sinir iletim hızında bir azalma beklenebilir (85).

Bizim çalışmamızda diabetik nöropatisi olan hasta grubunda eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi anlamlı olarak düşük bulundu. Bu aktivite kaybı %34 kadardı. Hasta grubunda hiperglisemi, hiperüremi ve bariz anemi mevcuttu. Hiperüremiye bağlı olarak ortaya çıkan anemik tablonun klinik olarak belirginleşmesi sonucu hipoksi meydana gelmekte, hipoksiye bağlı serbest radikal üretimi artmakta ve metabolik stres gelişmektedir. Enzim aktivitesi düşüklüğü genel olarak buna bağlanmaktadır. Bu süreçte hücre zarı yapı ve fonksiyonları bozulmakta ve buna bağlı olarak da enzimde aktivite kaybı meydana

gelmektedir. Bu hücrel hasar sonucu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin en fazla olduğu dokularda özellikle sinir dokusunda belirgin şekilde sinir iletim hızında bozulma ve akson potansiyeli ile indüklenen depolarizasyondan sonra oluşan repolarizasyonda değişim görülür ve sinir hücresinde enzim aktivitesinin kaybına bağlı olarak sinir iletim hızında azalma meydana gelebilir. Bu süreçte hiperglisemi sonucu glikozilasyon ile de enzim aktivite kaybına uğramaktadır.

Wright ve Nukada yaptıkları araştırmada (108) diabetin 16 hafta indüksiyonundan sonra, 4. haftadan sonra ani bir duraklama ile sinir iletim hızında önemli bir azalma tesbit etmişlerdir. Sinir iletim hızındaki azalma; siyatik sinirlerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmadan kısmen sorumlu tutulmuştur. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesindeki azalmanın, Na kanallarının ve nodlardaki intraaksonal sodyum akümülyasyonunun inaktivasyonunun artması ile birlikte olduğu ileri sürülmüştür (109).

Diabetik nöropatinin patofizyolojisine sinir dokusu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi disfonksiyonu da katkıda bulunur. Enzim aktivitesinin azalması, sinir iletiminde azalmaya yol açan ve sinir depolarizasyonunu bozan Na^+ konsantrasyonunda artışa neden olur (110).

Raccach ve ark (4), diabetik ratlarda siyatik sinir ve eritrosit membranında $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin korele olduğunu göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada nöropatili hastalarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesini düşük bulmuşlar ve eritrosit Na-K ATP'az enzim aktivitesindeki azalmayı periferik nöropati varlığıyla ilişkilendirmişlerdir.

DN'nin patogenezinde kritik bir role sahip olan $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki anormallik diabetik sinirlerde azaldığı gösterilen miyoinozitol konsantrasyonuna bağlı olabilir. Miyoinozitolun azalmasının, siyatik sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde protein kinaz C'ye bağlı azalmaya yol açan membran fosfoinozitininin metabolik turnoverini sınırladığı düşünülür (111).

DN'de mikrovasküler anormallikler ve sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde azalma bulunmuştur. Bozulan NO metabolizmasına sekonder gelişen sinir kan akımı bozukluğu ve sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi düzeyi düşüklüğünün her ikisi de distal simetrik polinöropati gelişiminde etkilidir (112).

Deneyel DN'de sinir iletim hızında dramatik bir azalma bildirilmiştir. Bunu açıklayan hipotezlerden biri $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin önemli derecede azalmasıdır. Hem hayvan hem de insan çalışmalarında siatik sinir ve eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (113).

Gerbi ve ark (114) yaptıkları çalışmada $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin tüm formlarını myelin kılıf ve ranvier boğumunda exprese etmişlerdir. Diabete bağlı değişikliklere dair yapılan bu

çalışmada sinir iletim hızındaki azalma ile sinir dokusu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmanın korele olduğu bulunmuştur. Membran $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki bu defekti, enzimin α_1 ve α_3 alt ünitelerinin protein miktarlarındaki azalma ile ilişkilendirmişlerdir.

Raccach ve ark (115) DN'li hastalarda eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesini anlamlı olarak düşük bulmuşlar ve nöropatiye yatkın kişilerde belki de tüm hücre membranlarında genetik olarak $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde düşüklük olduğunu öne sürmüşlerdir.

Streptozotocin-diyabetik rat deneylerinde diabetik nöropatide eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz fonksiyonunda defekt tanımlanmıştır. Bu deneylerde motor sinir iletim hızında bir azalmanın, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın α_1 izoformunun ekspresyonunun azalması sonucu $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesinde bir azalmaya sebep olduğu görülmüştür (85).

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin eritrositlerde (eritrositlerdeki α_1 izoformudur) düşük bulunması ve α_1 izoformunun sinir dokusunda da baskın izoform olması dolayısıyla, bu izoformu kodlayan gen olan ATP1A1 için nöropatiye yatkınlıkla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (116). Farklı bir çalışmada bu kişilerde nöropatiye yatkınlığın eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enziminin alt ünitelerindeki polimorfizmden kaynaklandığını gösterilmiş ve bu farklılığın bölgesel olarak diabetik kişilerde nöropatiye yatkınlığı ortaya çıkardığı ileri sürülmüştür (117).

Perfüzyon bozukluğu DM'li hastalarda ve deneysel modellerde periferik sinir disfonksiyonu etyolojisine major bir katkı yapar. Diğer katkı yapan faktörler oksidatif stres artışı, nöral serbest radikal koruyucu mekanizmaların bozulması ve siatik sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde azalmadır (118). Eğer aktivite kaybına neden olan serbest radikal üretimi, lipid peroksidasyonu ve protein glikozilasyonundaki azalma önlenirse yani hipoksik şartların düzeltilmesi, üriseminin tedavisi ve hipergliseminin regüle edilmesi sağlanırsa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde görülen azalma önlenebilir. Çünkü $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki herhangi bir azalma hücre içi Na^+ ve K^+ konsantrasyonlarını etkileyebilir, sinyal geçiş yolağını değiştirebilir ve kontraktilite ve nöropati ve retinopati gibi hücresel disfonksiyona yol açan dönüşümdeki exitabilye etkileyebilir, apoptozise kadar ilerleyecek süreci hızlandırabilir.

İnsanlarda ve STZ bağımlı nöropatide periferik sinirlerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi azalması ve bozulan nosiseptif eşikle ilişkili intraepidermal sinir fiber dansitesi azalmasının her ikisi de tanımlanmıştır (11,120).

DM'de gözlenen eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalma hipoinsülinemi ve hiperglisemi ile ilişkili olabilir. Hiperglisemi enzimin β alt ünitesinin glikozilasyonunda bir artma yoluyla $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesini azaltabilir. Bu konudaki diğer bir hipotez, azalmış $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesine ve lipid metabolizması değişikliklerine yol açan myoinozitol metabolizmasında hiperglisemiye bağlı geri döndürülebilir bir defektin varlığıdır. Eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi genetik ve çevresel faktörlere bağlıdır. Jannot ve ark. (121) çalışmalarında periferik DN'den yakınan tip 1 DM hastalarında eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir.

İnsülinin periferik sinirlerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın doğal aktivatörü olması nedeniyle, onun $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ı sitümüle etmesindeki muhtemel bir problemin, nöropati gelişmesine yol açabileceği de ileri sürülmüştür. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesinde azalmayla beraber insülin direnci meydana gelebileceği ve bu defektin polioliol yolu aracılığıyla hiperglisemi ile de ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (82).

Sinir iletim hızındaki azalmanın, diabetik sinirlerin osmoregülasyonunda önemli bir rol oynayan myelinize sinirlerde $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalma veya akut hiperosmolar hipergliseminin neden olduğu aksonal büzülmeden dolayı da olabileceği ileri sürülmüştür (122).

Krishnan ve ark (123) yaptıkları çalışmada nodal Na akımındaki azalmanın ve Na-K pompa fonksiyonundaki bozukluğun DN'li hastalarda iletim yetmezliğini tetiklemeye sebep olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Koç ve ark. (107) Tip 2 DM'li hastalarda yaptıkları çalışmada eritrosit $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin nöropatili hastalarda anlamlı olarak azaldığını ve diabetin devamı ile enzim azalmasının korele olduğunu göstermişlerdir.

DN'ye yol açan faktörler arasında uzun süren hiperglisemi, oksidatif stres ve polioliol yolağı aktivitesinde artış, aldoz redüktaz aktivitesinde azalma, nonenzimatik glikasyon artışı ile ileri glikasyon ürünlerinin birikimi ve $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalma sayılabilir. Polioliol yolağı aktivite artışı; doku myoinozitol seviyelerinde azalma, protein kinaz C aktivitesinde değişiklikler ve motor sinir iletim hızında yavaşlamaya sebep olduğu düşünülen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi bozukluğu ile bağlantılıdır. Myoinozitoldeki azalma, $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde azalmaya yol açan membran fosfoinozitininin metabolik döngüsünü sınırlar. Fosfotidil inozitol metabolitlerinin disfonksiyonu hücre membranındaki kalmodulin ve protein kinaz C aktivitesini azaltır ve sonuçta $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde azalmaya katkıda bulunur. Diabetik hayvanlarda bozulmuş $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi, sinir iletim

hızındaki yavaşlama ile yakından ilişkilidir ve bu hayvanlarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi eritrosit ve nöral dokunun her ikisinde de benzer düzeylerde bulunur.

Çalışmamızda, EMG ile nöropatisi tespit edilmiş olan hasta grubumuzda kontrol grubumuza göre eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi anlamlı olarak azalmış bulundu. Bu aktivite kaybı sadece hemotopoetik sürecin bozulmasıyla ortaya çıkan hipoksik süreçle değil diabetik hastalarda meydana gelen enerji metabolizmasındaki anormallikle oluşan enerji açlığı (ATP) ile açıklanabilir. Bu enerji açlığı ATP'ye en fazla gereksinim duyan ATPaz fonksiyonunda da bozulmaya neden olabilir. Böylece bu süreçte eğer hastanın glisemisi regüle edilirse enzim aktivitesinde bir iyileşme görülebilir. Çünkü insülin enzim aktivitesini düzenlemektedir.

DN'nin özelliği sinir iletim hızında azalma ile birlikte $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin azalmasıdır. Leonelli ve ark. (124) insanlarda perifereik sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmanın sadece sinir kaybına sekonder olmadığını ayrıca muhtemelen DN'nin patogeneze de katkıda bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Farmakolojik tedavilerin $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesindeki azalmayı ve sinir iletim hızındaki yavaşlamayı geri döndürebildiğini veya önleyebildiğini gözlemlemişlerdir.

DN'de siatik sinir $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinde gözlemlenen bozukluk, ratlarda insülin tedavisi ile azalan miyoinozitol konsantrasyonlarının düzelmesi, diyetle miyoinozitol eklenmesi, aldoz redüktaz inhibitörlerinin verilmesi ve protein kinaz C aktivasyonunun düzenlenmesi ile iyileştirilmiştir (111).

Diabetik ratların siyatik sinirlerinde çeşitli teropatik müdahalelerden sonra iletim hızının hem kısmi, hem de total olarak düzelmesinin daima $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesindeki kısmi düzelmeye birlikte olduğu gözlemlenmiştir (109).

Enzim aktivitesi artırılmasına yönelik tedavi yaklaşımlarında EPO da önemli bir komponent olarak görülmektedir. Çünkü anemi gelişen ve tedavi edilemeyen DM'li hastalarda hematopoezis ile bozulan, uzun süre devam eden hipokside çeşitli dokularda apoptozise yol açan yollar aktive olabilmektedir.

EPO ve IGF-1 nöronal apoptozisi inhibe eden sitokinlerdir. Bununla birlikte onların maksimal antiapoptotik etkileri yüksek konsantrasyonlarda bile yalnız nöronlar farklı saatler içinde tedavi edildiğinde gözlenmiştir. Memelilerin sinir sisteminde EPO ve EPO-R ifade edilmiştir. Ekzojen veya endojen EPO serebral iskemi veya hipoksinin, spinal kord veya retinal injurinin ve nörodejeneratif hastalıkların hayvan modellerinde nöroprotektif etkiye sahiptir. EPO, fosfatidilinozitol 3 kinazı aktive eder ve Akt'ye bağlı bir yolak boyunca

apoptozisi inhibe eder. Akt, EPO ile aktive edildiğinde nöronal apoptozisi önleyen bir serin treonin kinazdır (125).

Campana ve ark (96) periferik sinir sistemi hücrelerinin lokal olarak EPO ve EPO-R sentezlediğini göstermişlerdir. Schwan hücrelerinde ağırlı nöropatiden sonra siatik sinirde özellikle EPO-R düzeyi artmıştır. EPO schwan hücrelerinde lokalizedir ve JAK 2 fosforilasyonunu uyarmaktadır. Campana ve ark çalışmalarında EPO-R ile direk bağlantısı bilinen JAK 2 fosforilasyonuna EPO'nun direk etkilerini araştırmışlardır. EPO-R'ye bağlanan EPO'nun sitoplazmik tirozin kinazının janus ailesinden bir üyesi olan JAK 2 afinitesinde bir artış gözlemlenmiştir. JAK 2, aktif bölgesinin transfosforilasyonu ve EPO-R'nün hücre içi kaynağı tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile uyarılmaktadır.

Masuda ve ark (126) EPO'nun NO aracılı serbest radikallerin oluşumunu veya bu radikallerin toksisitesini antagonize ederek nöroprotektif etki oluşturabildiğini göstermişlerdir.

Diabetik hastalar nöropatiye eğilimlidirler. Bu hastaların periferik sinir sisteminin özellikle duyu kısımları üremi geliştiğinde daha fazla etkilenir. Hassan ve ark (127) anemik ve prediyalitik hastalarda yaptıkları çalışmada 5 aylık subkutanöz EPO tedavisinin motor polinöropatiyi düzelttiğini göstermişlerdir. EPO'nun bu nonhematopoetik etkisinin insan nöronlarında EPO-R'nin direk etkisi ile bağlantılı olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Diğicaylıoğlu ve ark, (125) IGF-1 ve EPO'nun akut nöroprotektif etkisi üzerine ratlarda yaptıkları çalışmada serebrokortikal hücre kültürlerini, caspase-9/-3'ü aktive ederek nöronal apoptozise sebep olan N-methyl-D-aspartata (NMDA) maruz bıraktıktan sonra ortama direk IGF-1 ve EPO eklemişlerdir. Sinyal üretim yolağı ile ilişkili olan EPO ve IGF 1'in invitro olarak nörodejenerasyonu önlediğini göstermişlerdir. Bu etki, bu sitokinlerin caspase 3 aktivasyonu ve caspase proteolitik aktivitesinin inhibitörü olan XIAP tarafından kolaylaştırılan caspase aktivasyonuna karşı nöronal apoptozisi önlemesiyle ilişkilidir ve bu sonuçlar PI3-K-Akt aktivasyonu yoluyla IGF-1 ve EPO' nun ortak hareketine işaret eder. Ayrıca IGF-1, eritrositin oluşumsal ve yaşamsal gelişiminde EPO ile birlikte çalışmaktadır.

Erbayraktar ve ark (101) çalışmalarında siatik sinirlerin çok yüksek düzeyde EPO-R exprese ettiğini bildirmişlerdir.

Siren ve ark (128) çalışmalarında EPO'nun nöronal apoptozisin potent bir inhibitörü olduğunu, serebral iskemi ve metabolik strese karşı koruyucu olduğunu invivo ve invitro olarak göstermişlerdir.

Tip 1 DM'de tanımlanan EPO bağımlı anemi renal fonksiyon ile değil otonomik sinir fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Burada azalmış EPO cevabında otonomik DN'nin

sorumluluğu olasıdır. Bu hipotez β_2 adrenoreseptörlerin stimülasyonunun EPO üretimini arttırdığını gösteren hayvan çalışmalarınca ve insan otonom sinir sisteminde oluşan hastalıklarda (multiple sistem atrofisi ve pür otonomik yetmezlik) anemi gelişimi ile desteklenmiştir (129).

Spallone ve ark (130) tip 2 DM'de aşikar nefropati gelişiminden önce hemoglobin ve EPO düzeyleri arasındaki fizyolojik ilişkinin kaybı ile EPO üretiminde erken bir bozulmayı gösterdiler. Hemoglobin ve otonomik nöropati gelişimi arasındaki bu anlamlı ilişki erken EPO bozukluğunda otonomik nöropatinin gelişimine işaret eder.

EPO-R, sinirlerin schwan hücreleri ve aksonlarında lokalizedir. Campana ve ark (132) yaptıkları çalışmada schwan hücrelerinde EPO ile aktive olan sinyal yolağının elementlerini saptamışlardır. EPO, 5-10 dk içinde JAK 2 fosforilasyonuna sebep olmuş ve JAK 2, EPO tarafından gerçekleştirilen schwan hücre proliferasyonu için gerekli olan ERK/MAP kinaz yolunu yukarı doğru ilerletmiştir. Hemotopoetik hücrelerde EPO uyarımı hücre içi sinyal yolağının aktivasyonuna öncülük eden JAK 2 aktivasyonunu ve EPO-R'nin trozin fosforilasyonunu sağlar. Bu hücrelerde ERK/MAP kinazın aktivasyonu kısmen EPO'nun neden olduğu proliferasyonla koreledir.

Bosman ve ark (132) şiddetli otonomik DN'li hastalarda EPO eksikliği ile anemi olabileceğini araştırmışlar. Renal ve nörolojik komplikasyonlu diabetik hastaların EPO ilişkili kronik anemilerinin patogenezinin karmaşık olduğunu ve bu hastalarda sitokinlerle EPO üretiminin inhibisyonu, böbrekte oksijen duyarlılığının azalması, diabetik böbrekte oksijen gereksiniminin azalması ve otonomik bozukluğun incelenmeye ihtiyaç duyduğunu ileri sürmüşlerdir.

Santral sinir sisteminde EPO üretimi ve EPO'nun nöroprotektif etkileri tanımlanmıştır. EPO'nun nöroprotektif etkisinin EPO-R ekspresyonu ile korele olduğu bildirilmiştir (133).

Höke ve ark (134) PSS'de schwan hücresi kaynaklı EPO'nun endojen bir nöroprotektan gibi davrandığını ve periferik nöropatilerde görülen distal aksonal dejenerasyonun önlenmesinde efektif olduğunu göstermişler ve EPO'nun kazanılmış periferik nöropatilerin tedavisi için klinik kullanımını önermişlerdir.

Bizim çalışmamızda Hb değeri ortalama 9,99 g/dl, Htc değeri ortalama % 29,6 olan ve 150U/kg/hafta dozunda EPO ile tedavi edilen diabetik nöropatili hastalarda tedaviden 1 ay sonra Na^+ - K^+ ATPaz enzim aktivitesi çalışıldı. Aktivitede tedavi öncesine göre anlamlı bir artış bulundu. Bu artış %24 civarındaydı. Nöropati bulgularında gerileme, ağrı şikayetlerinde belirgin azalma klinisyen muayenesi ile gözlemlendi. EPO tedavisi Hb değeri 12 g/dl üstünde bir değere ulaşıncaya kesildi.

Campana ve Myers (135) uzamış ağrı ile ilişkili radikülopatilerde EPO'nun motor nöronlar tarafından üretilen TNF'yi down regüle ettiğini göstermişler ve ağrı üreten sitokinlerin regülasyonunda EPO'nun ilgili olduğunu schwan hücrelerinde tanımlamışlar. Sistemik EPO verilmesinin dorsal kök gangliyon apoptozisini azalttığını göstermişlerdir. Bu sonuçlarla rhEPO'nun spesifik nöroprotektif bir mekanizma yoluyla nöropatik ağrının efektif bir tedavisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Muhtemelen TNF down regülasyonu apoptotik süreci engeller. Sonuçta JAK 2 yolu aktive olur ve hücrenin dejenerasyonu ve ölümünü engelleyen süreç gelişir.

DM'de görülen oksidatif stres, poliöl yolağı aktivasyonunun sebep olduğu antioksidan defans mekanizmalarında azalmalar, ileri glikasyon son ürünlerinin üretimi ve glukoz otooksidasyonu DN gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Hannah ve ark (136) benzer dozda EPO ve γ linolenik asitin STZ kaynaklı diabette periferik sinir hasarını önlediğini ve oluşan hasarı geri döndürdüğü bildirmişlerdir.

Iwasaki ve ark (100) çalışmalarında EPO ve IL3'ün motor nöronlar için yaşamsal bir rol oynadığını göstermişler ve motor nöronların ölümünü ve dejenerasyonunu kapsayan hastalıklarda bu hematopoetik faktörlerin tedavide potansiyel kullanımını önermişlerdir.

rhEPO tedavisi, nörofizyolojik testler ve elektrofizyolojik değerlendirmeden elde edilen bulgular ile gösterildiği gibi beyin fonksiyonlarında yararlı bir etkiye sahiptir. Bu gelişme hematokrit düzeylerinde progresif bir artış ve bu yüzden beynin hipoksik durumunun düzeltilmesi ile koreledir. Bununla birlikte birkaç *invivo* ve *invitro* çalışmalarda EPO'nun da direk bir nörotrofik ve nöroprotektif etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. Neonatal ratların tek taraflı siatik sinir transeksiyon çalışmasında 2 hafta sistemik olarak EPO verilmesinin motor nöronların kaybını anlamlı olarak önlediği gösterilmiştir (8).

EPO'nun nöroprotektif etkisi ile ilgili mekanizmalar hakkındaki sorular tam olarak cevaplanamamıştır. EPO, kök hücrelerin toplanması ve inflamasyon modülasyonu, apoptozisin yavaşlatılması, angiogenez stimülasyonu, vazospazmın geri döndürülmesi, glutamat ve reaktif oksijen türleri gibi doku hasarı moleküllerinin üretiminin sınırlandırılmasını içeren çeşitli mekanizmalarda koordineli bir biçimde hareket etmektedir. Bundan dolayı EPO, bu mekanizmaların bir kombinasyonu ile nöronları koruyabilir.

EPO, periferik DN'de gösterilen patojenik gelişmelerde tedavi amacıyla uygulanabilir. Bu komplikasyonun biyokimyasal değişikliklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. İlâveten artmış oksidatif stres ve vasküler değişikliklerin fonksiyonel ve yapısal anomalilere neden olduğu bilinmektedir. Özellikle STZ diabetik ratlarda muhtemelen hiperglisemi tarafından

oluşturulan oksidatif stres yoluyla schwann hücreleri ve dorsal kök gangliyonu duyu nöronlarının apoptozisine ait bulgular vardır.

Önceki bir çalışmada EPO, ratlarda serebral iskeminin *invivo*, hipoksik nöronların *invitro* nöronal apoptozisini engellediği gösterilmişti (128). Daha sonraki bir çalışmada EPO'nun siatik siniri mekanik hasara uğramış ratların dorsal kök gangliyonlarında apoptozisi engellediği gösterilmişti (136). rhEPO'nun nörotrofik etkisi aynı zamanda bu etki için de önemli olabilir. Periferik nöropatinin diğer patojenitesi inflamasyondur ve daha önce yapılan çalışmalarda deneysel DN'nin makrofaj infiltrasyonu ve inflamatuvar sitokinlerin endonöral indüksiyonuyla ilişkili olduğu bildirilmişti. Bu aynı zamanda rhEPO tarafından uyarılır. Çünkü rhEPO'nun deneysel otoimmün ensefalomyelit ve serebral iskemi modellerinde beyin inflamasyonunu azalttığı çalışmalarda gösterilmişti (137).

Biyokimyasal seviyede hiperglisemide sinir iletim hızının yavaşlamasını açıklayan potansiyel etyolojik mekanizmalar büyük myelinli fiberlerin atrofisini ve periferik sinirlerdeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesindeki azalmayı da kapsamaktadır. Daha önceki bir çalışmada periferik sinirlerdeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın çevresel hipoksik durumlara hassas olduğu gözlenmişti (6). Diğer bir çalışmada diabetik hastalarda hem fiberlerin toplam sayısının hem de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz'ın spesifik aktivitesinin azaldığı gösterilmişti (3). Bu durum DN'nin sadece sinir fiberlerindeki bir kayıp nedeniyle olmadığını aynı zamanda enzimin fonksiyonlarındaki bir azalma sebebiyle de olduğunu göstermiştir. rhEPO diabetik ratlarda $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesindeki kaybı düzeltmekte ve önlemektedir. Bu durum farklı deney modellerinde bildirilen rhEPO'nun nörotropik etkisiyle uyumlu biçimde, rhEPO'nun hasarlı fiberlerin fonksiyonlarını da düzelterek düştürmektedir (9).

Çalışmamızda EPO tedavisinin 30. günündeki eritrosit zarı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesinin tedavi öncesindeki $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz aktivitesine göre %24 arttığını gözlemledik. Bu süreçte hematolojik parametrelerde ve hipoksik şartlarda düzelmeye gözlemlendi. Ayrıca hastaların hiperglisemileri de regüle edildi.

Diabetik ratlarda apoptozis, dorsal arka kök gangliyonlarının ve sinir aksonlarını örten myelin kılıfı üreten schwann hücrelerinin kaybına liderlik eder. İlâveten biyokimyasal değişiklikler, oksidatif stres, mikrovasküler değişimler ve inflamasyon sadece sinir hücrelerinin ölümünde değil nöronal disfonksiyonunda da rol oynar. EPO, bu sürecin başından sonuna kadar çeşitli etkilerden nöronları koruyabilir. Kanıt, SOD gibi antioksidan enzimlerin ve Bcl-xc gibi antiapoptotik peptitlerin aktivasyonu, nükleer faktör kb transkripsiyon faktör yolu ve IP3 kinaz-Akt (protein kinaz B) kaskatı kapsayan nöroprotektif yolları tetikleyebilen EPO reseptörlerinin aktivasyonu periferik ve santral sinir sisteminin her

ikisinde de değerlidir. İlaveten erişkin sinir sisteminde n6ronların 6retimine liderlik eden n6ronal progenit6r h6crelerin proliferasyonunu EPO'nun arttırabildiğine dair bazı kanıtlar vardır (138).

Çeşitli alışma grupları glutamat toksisitesine karşı EPO'nun k6lt6re edilmiş n6ronları koruduğunu ve stroke rat modellerinde n6rolojik disfonksiyonu ve iskemik n6ronal hasarı azalttığını bildirmişlerdir. Siren ve ark (128) alışmalarında sistemik EPO verilmesinin sadece serebral iskeminin hayvan modellerinde değil ayrıca mekanik travma, ekzotoksin ve n6roinflamasyon için de n6roprotektif olduğunu g6stermişler. İskemik injuriden sonra beyin dokusunda EPO ve EPO-R gen ekspresyonunda belirgin değişikliklerin meydana geldiğini g6stermişler. Bundan dolayı EPO'nun iskemik injuriden sonra n6ron yaşamında kritik bir rol oynadığını fakat bu koruyucu rol6n doğası ve mekanizmasının halen açıklanamadığını 6ne s6rm6şlerdir.

Sonuç olarak bu çalışmada, EPO tedavisinin n6ropatiyi iyileştirebildiği ve bu iyileştirmenin belirteç olarak kullanılabilen eritrosit Na^+ - K^+ ATP'az enzim aktivitesi artışı ile desteklendiği ortaya konmuştur.

6. ÖZET

Diabetik polinöropatili hastalarda eritropoietin uygulamasının $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim (E.C.3.1.6.37) aktivitesi üzerine etkilerinin araştırılması için yapılan bu çalışma 48-72 ($60 \pm 8,5$) yaşları arasında, EMG ile polinöropati teşhisi konulmuş ve EPO tedavisine başlanacak toplam 11 diabetik polinöropatili hasta (3 erkek, 8 kadın) ile 48-56 ($51,3 \pm 3,05$) yaşları arasında tamamen sağlıklı 10 kontrol (5 erkek, 5 kadın) vakası üzerine gerçekleştirildi.

Hastalardan EPO tedavisi öncesi ve tedavinin 30'uncu günlerinde ve kontrol grubundan da bir kez heparinize kan örnekleri alındı ve örneklerden eritrosit membranı izole edilerek eritrosit membranı $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi ölçümü yapıldı. Enzim aktivitesi modifiye edilmiş Kitao-Hattori metodu ile ölçüldü.

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktiviteleri sırasıyla kontrol grubu, tedavi öncesi hasta grubu ve tedavi 30'uncu gün hasta grubunda $2,91 \pm 0,38 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.\text{10dak}^{-1}$, $1,93 \pm 0,38 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.\text{10dak}^{-1}$ ve $2,40 \pm 0,63 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.\text{10dak}^{-1}$ olarak ölçüldü.

$\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi düzeyi, tedavi öncesi hasta grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük, Epo tedavisinden sonra 30'uncu günde tedavi öncesine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi düzeyinin Epo tedavisinden sonra yükseldiği ve 30'uncu günde hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü.

EPO tedavisinin nöropatiyi iyileştirebildiği ve bu iyileştirmenin, belirteç olarak kullanılabilen $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaz enzim aktivitesi artışı ile desteklendiği sonucuna varılmıştır.

7. SUMMARY

This study was performed on 11 patients (3 males and 8 females) between ages 48-72 ($60 \pm 8,5$) years with diabetic polyneuropathy who were diagnosed with EMG and decided to take EPO therapy and 10 healthy controls (5 males and 5 females) between ages 48-56 ($51,3 \pm 3,05$) years in order to investigate the effects of EPO therapy on Na^+ - K^+ ATPase enzyme activities in patients with diabetic polyneuropathy.

Heparinised blood samples were taken from the control group for once and from the patients for twice before and 30 days after the EPO therapy and erythrocyte membranes were isolated and erythrocyte membrane Na^+ - K^+ ATPase enzyme activities were measured. The enzyme activities were determined by Kitao-Hattori method.

Na^+ - K^+ ATPase enzyme activities were measured as $2,91 \pm 0,38 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.10\text{min}^{-1}$, $1,93 \pm 0,38 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.10\text{min}^{-1}$ ve $2,40 \pm 0,63 \mu\text{molP}_i.\text{mg.prt}^{-1}.10\text{min}^{-1}$ in control group, patient group before and 30 days after the therapy respectively.

Na^+ - K^+ ATPase enzyme activities were found to be decreased in patient group before the therapy compared to the control group and to be increased in patient group after 30 days of the beginning of the EPO therapy compared to the patient group before the therapy. It was observed that Na^+ - K^+ ATPase enzyme activities were increased after EPO therapy and there was no significant difference between control group and patient group 30 days after the therapy.

It was concluded that EPO therapy could improve neuropathy and this improvement was supported with the increase in Na^+ - K^+ ATPase activities which could be used as a marker.

8. KAYNAKLAR

1. Vague P, Dufayet D, Coste T, Moriscot C, Jannot F, Raccach D. Association of diabetic neuropathy with Na/K-ATPase gene polymorphism. *Diabetologia* 1997;40:506-511.
2. Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest.* 2003;111:431-433.
3. Scarpini, E, Bianchi R, Moggio M, Sciacco M, Fiori MG, Scarlato G. Decrease of nerve Na⁺-K⁺ ATPase activity in the pathogenesis of human diabetic neuropathy. *J Neurol Sci.* 1993;120:159-167.
4. Raccach D, Fabreguetts C, Azulay JP, Vague P. Erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase activity, metabolic control and neuropathy in IDDM patients. *Diabetes Care.* 1996;19:564-568.
5. Vague P, Dufayet D, Lamotte MF, Mouchot C, Raccach D. Genetic factors, Na/K ATPase activity and neuropathy in diabetics. *Bull Acad Natl Med.* 1997;181:1811-1821.
6. Doss D, Kuruvilla R, Bianchi R, Peterson RG, Eichberg J. Effects of hypoxia and severity of diabetes on Na,K-ATPase activity and arachidonoyl-containing glycerophospholipid molecular species in nerve from streptozotocin diabetic rats. *J Periph Nerv Syst.* 1997;2:155-163.
7. Dağlar C. Diabetes Mellituslu Hastalarda Hastalık Süresinin Eritrosit Membranı Na⁺/K⁺ATPaz Enzim Aktivitesi, MDA, DHEA(S), Glukoz ve Lipidler Üzerine Etkisi. Uzmanlık Tez Çalışması 2000.
8. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Research.* 2004;1000:19-31.
9. Bianchi R, Buyukakilli B, Brines M, Savino C, Cavaletti G, Oggioni N, Lauria G, Borgna M, Lombardi R, Cimen B, Comelekoglu U, Kanik A, Tataroglu C, Cerami A, Ghezzi P. Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy. *PNAS.* 2004;101:823-828.
10. Altuntaş Y. Diabetes Mellitusun Tanımı, Tanısı, Sınıflaması. “Yenigün M.(ed) Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;51-62.”
11. Arslan M. Diabetes Mellitus. “İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Süleymanlar G. Temel İç Hastalıkları. Cilt 2 Ankara: Güneş Kiatabevi 2005;2279-2331.
12. Bennet PH, Rewers M, Knowler WC. Epidemiology of Diabetes Mellitus. “Rifkin H.(ed) Textbook of Diabetes. Fifth Edition. London: Appleton Lange 1998;373- 400.”

13. Bağrıaçık N. Diabetes Mellitus: Tanımı, Tarihçesi, Sınıflaması ve Sıklığı. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakóltesi S¼rekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu İstanbul. 1997;9-18.
14. Yılmaz C, Yılmaz MT, İmamoğlu Mř. Diabetes Mellitus. İstanbul: Gri Kitabevi 2000;13-15.
15. Smith C, Marks AD, Lieberman M. Mark's Temel Tıbbi Biyokimyası. 2. Baskı Ankara: G¼neř Kitabevi 2007;50-51.
16. WHO, Department of Noncommunicable Disease Surveillance: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO consultation, WHO Publ. Geneva. 1999.
17. Satman İ. Diabetes Mellitusun Epidemiyolojisi. "Yenig¼n M.(ed) Her Y¼n¼yle Diabetes Mellitus. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;69-83."
18. Andreoli TE, Bennett JK, Carpenter CJ, Plum F, Smith LHJ. Cecil Essentials of Medicine. İstanbul: Y¼ce Yayım1995;513-523.
19. Kadayıfçı A. Dahiliye. İstanbul: Atlas Yayıncılık 2003;422-433.
20. Yenig¼n M. Diabetes Mellitusun Fiziopatolojisi. "Yenig¼n M.(ed) Her Y¼n¼yle Diabetes Mellitus. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;85-128."
21. T¼z¼n M. Ege Üniversitesi Tıp Fakóltesi İç Hastalıkları Ders Notları. İzmir: G¼ven Kitabevi 2005;7-20.
22. Onat T, Emerk K, S¼zmen EY. İnsan Biyokimyası. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2006;280-289.
23. Yılmaz T. Tıp 1 Diabetes Mellitusun Patogenezi. "Yenig¼n M.(ed) Her Y¼n¼yle Diabetes Mellitus. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;165-170."
24. Altuntaş Y. Tıp 2 Diabetes Mellitusun Patogenezi. "Yenig¼n M.(ed) Her Y¼n¼yle Diabetes Mellitus. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;219-236."
25. Koloğlu S. Temel ve Klinik Endokrinoloji. Ankara: Fidan Yayıncılık 1996;375-376.
26. Myers RA. NMS İ Hastalıkları. "Yılmaz C.(ed) 3. Baskı İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 1998;475-490."
27. Hatemi H. Diabetes Mellitus. İstanbul: Y¼ce Yayınları 1988;8-23.
28. zcan ř. Diyabet Hemşireliği: Temel Bilgiler. İstanbul: Y¼cel Basımevi 2002;152-155.
29. Fiicioğlu C, Aydın A, Haktan M, Kiziltan M. Peripheral neuropathy in children with insulin-dependent diabetes mellitus. Turk J Pediatr. 1994;36:97-104.
30. Said G. Diabetic Neuropathy: on updata. J Neurol. 1996;243:431-440.

31. Öge AE, Parman Y. Polinöropatiler. Nöroloji İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Ders Kitapları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2004;591-618.
32. Younger DS, Bronfin L. Overview of diabetic neuropathy. Semin Neurol. 1996;16:107-113
33. Özer F. Diabetik Nöropati. "Yenigün M. (ed) Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Cilt 2 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001:417-465."
34. Bird SJ, Brown MJ. The clinical spectrum of diabetic neuropathy. Semin Neurol. 1996;16:115-121.
35. Thomas PK. Classification, differential diagnosis, and staging of diabetic peripheral neuropathy. Diabetes. 1997;46:54-57.
36. Kızıltan ME. Diabet ve Periferik Nöropati. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Diabetes Mellitus Sempozyumu İstanbul. 1997;69-77.
37. Terzi M, Cengiz N, Onar MK. Diabetik Nöropati. O.M.Ü. Tıp Dergisi 2004;21:39-49.
38. Said G, Slama G, Selva J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fibre diabetic polyneuropathy. Brain. 1983;106:791-807.
39. Aring AM, Jones DE, Falko JM. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. American Family Physician 2005;71:2123-2128.
40. Hopf HC, Gutmann L. Diabetic 3rd nerve palsy: evidence for a mesencephalic lesion. Neurology. 1990;40:1041-1045.
41. Chokroverty S, Sander HW. AAEM case report #13: diabetic amyotrophy. Muscle Nerve. 1996;19:939-945.
42. Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharma AK, Boulton AJ, Ward JD. Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy. Diabetologia. 1993;36:454-459.
43. Archer AG, Roberts VC, Watkins PJ. Blood flow patterns in painful diabetic neuropathy. Diabetologia. 1984;27:563-567.
44. Yücel A, Çimen A. Nöropatik Ağrı: Mekanizmalar, tanı ve tedavi. Ağrı 2005;17:5-12.
45. Sima AA. Metabolic alterations of peripheral nerve in diabetes. Semin Neurol. 1996;16: 129-137.
46. Zochodne DW. Neurotrophins and other growth factors in diabetic neuropathy. Semin Neurol. 1996;16:153-161.
47. Trajborg W. The electrophysiologic profile of diabetic neuropathy. Semin Neurol. 1996;16:123-127.

- 48.** Powers AC, Araz M. Diabetes Mellitus. "Braunweld E, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Cilt 2 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2004;2109-2123"
- 49.** Sander HW, Chokroverty S. Diabetic amyotrophy: current concepts. *Semin Neurol.* 1996;16:173-178.
- 50.** Ross EL. The evolving role of antiepileptic drugs in treating neuropathic pain. *Neurology.* 2000;55:41-46.
- 51.** Onat T, Emerk K, Sözmen EY. 1. Baskı. İnsan Biyokimyası. Ankara: Palme Yayıncılık 2002; 642-647.
- 52.** Dutta-Roy AK, Roy TK, Sinho AK. Control of erythrocyte membrane microviscosity by insulin. *Biochim Biophys Acta.*1985;816:187-190.
- 53.** Moore RD. Effect of insulin upon ion transport. *Biochim Biophys Acta.*1983; 737: 1-49.
- 54.** Stryer L. Biochemistry. Fourth Edition. Newyork: Freeman and Company 1997: 310-314.
- 55.** Gözükara EM. Biyokimya. Cilt 1 İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2001;45-46.
- 56.** Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Third Edition Philadelphia: Saunders Company 1999:1058.
- 57.** Lingrel JB, Kuntzweiler T. Na⁺,K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 1994;269:19659-19662.
- 58.** Mercer RW. Structure of the Na⁺,K⁺-ATPase. *Int Rev Cytol.* 1993;137:139-168.
- 59.** Pedemonte CH, Kaplan JH. Chemical modification as an approach to elucidation of sodium pump structure-function relations. *Am J Physiol.* 1990;258:1-23.
- 60.** Pressley TA. Structure and function of the Na,K pump: ten years of molecular biology. *Miner Electrolyte Metab.* 1996;22:264-271.
- 61.** Topcu C. Manyetik alanların MDA, GSH seviyeleri ve Na-K ATP'az enzim aktivitesi üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Konya, 2001.
- 62.** Blanco G, DeTomaso AW, Koster J, Xie ZJ, Mercer RW. The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit. *J Biol Chem.* 1994;269: 23420-23425.
- 63.** Chow DC, Forte JG. Functional significance of the β -subunit for heterodimeric P-type ATPases, *J Exp Biol.* 1995;198:1-17.
- 64.** McDonough AA, Geering K, Farley RA. The sodium pump needs its β subunit, *Faseb J.* 1990; 4:1598-1605.

65. Reeves AS, Collins JH, Schwartz A. Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;95:1591-1598.
66. Sweadner KJ. Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin. *J Biol Chem.* 1979; 254: 6060-6067.
67. Urayama O, Sweadner KJ. Ouabain sensitivity of the alpha 3 isozyme of rat Na,K-ATPase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988;156:796-800.
68. Pressley TA. Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within alpha-subunit of Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol.* 1992;262:743-751.
69. Takeyasu K, Lemas V, Fambrough DM. Stability of Na⁺-K⁺-ATPase alpha-subunit isoforms in evolution. *Am J Physiol.* 1990;259:619-630.
70. Blanco G, Mercer RW. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am J Physiol.* 1998;275:633-650.
71. Schneider JW, Mercer RW, Caplan M, Emanuel JR, Sweadner KJ, Benz EJ, Levenson R. Molecular cloning of rat brain Na,K-ATPase α -subunit cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:6357-6361.
72. Lingrel JB, Orlowsky J, Shull MM, Price EM. Molecular genetics of Na,K-ATPase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1990;38:37-89.
73. Arystarkhova E, Gibbons DL, Sweadner KJ. Topology of the Na,K-ATPase. Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating. *J Biol Chem.* 1995; 270:8785-8796.
74. Arystarkhova E, Sweadner KJ. Isoform-specific monoclonal antibodies to Na,K-ATPase α subunits. Evidence for a tissue-specific post-translational modification of the α subunit. *J Biol Chem.* 1996;271:23407-23417.
75. Beggah AT, Jaunin P, Geering K. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na,K-ATPase. *J Biol Chem.* 1997; 272:10318-10326.
76. Urayama O, Nakao M. Organ specificity of rat sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase. *J Biochem.* 1979;86:1371-1381.
77. Sweadner KJ, Gilkeson RC. Two isozymes of the Na,K-ATPase have distinct antigenic determinants, *J Biol Chem.* 1985;260:9016-9022.
78. Orlowski J., Lingrel JB. Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs. *J Biol Chem.* 1988;263:10436-10442.

- 79.** Lucchesi PA, Sweadner KJ. Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity. *J Biol Chem.* 1991;266:9327-9331.
- 80.** Ewart HS, Klip A. Hormonal regulation of the Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity. *Am J Physiol.* 1995;269:295-311.
- 81.** Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A. Insulin induces translocation of the α 2 and β 1 subunits of the Na⁺/K⁺-ATPase from intracellular compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle. *J Biol Chem.* 1992; 267:5040-5043.
- 82.** Sweeney G, Klip A. Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how?. *Mol Cell Biochem.* 1998;82:121-133.
- 83.** Weidmann P, Ferrari P. Central role of sodium in hypertension in diabetic subjects. *Diabetes Care.* 1991;14:220-232.
- 84.** Mueckler M. The molecular biology of glucose transport: relevance to insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complications.* 1993;7:130-141.
- 85.** Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccah D, Tsimaratos M. C-peptide, Na⁺,K⁺-ATPase, and diabetes. *Experimental Diab Res.* 2004;5:37-50.
- 86.** Greene DA, Chakrabarti S, Lattimer SA, Sima AAF. Role of sorbitol accumulation and myo-inositol depletion in paradonal swelling of large myelinated nerve fibers in the insulin-deficient spontaneously diabetic bio-breeding rat. Reversal by insulin replacement, an aldose reductase inhibitor and myo-inositol. *J Clin Invest* 1987;79:1479-1485.
- 87.** Oner P, Oztas B, Kocak H. Brain cortex Na⁺-K⁺ ATPase activities in streptozotocin-diabetic and pentylenetetrazol-epileptic rats. *Pharmacol Res.* 1997;36:69-72.
- 88.** Hootman SR, Jones JE, Kapoor R, Nguyen KL, de Ondarza J. Sodium, potassium-activated adenosine triphosphatase activity is impaired in the guinea pig pancreatic duct system in streptozotocin-induced diabetes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;243:869-873.
- 89.** Rahmani JD, Mourayre Y, Vague P, Boyer J, Juan-Vague I. In vivo insulin effect on ATPase activities in erythrocyte membrane from insulin dependent diabetics. *Diabetes.* 1987;36:991-995.
- 90.** Okegbile EO, Odusan O, Adeola O. Erythrocyte membrane digoxin-sensitive Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase of non-insulin dependent diabetic humans. *Biosci Rep.* 1997;17:499-506.

- 91.** Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman AM. Hematology III. Edition. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 1986:370-372.
- 92.** Üçok K, Kaptanoğlu B, Gökbel H, Tatlı M, Kara M. Eritropoietin: yapısı, metabolizması ve etki mekanizması. SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi 1995;2:41-45.
- 93.** Bakkaloğlu S, Tümer N, Ekim M, Yalçınkaya F. Kronik böbrek yetmezliğinde anemi ve eritropoietin kullanımı. Office Journal of the Turkish Nephrology, Association 1998;2:54-58.
- 94.** Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. 20. Baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevleri 2002;444-445.
- 95.** Torunoğlu M. Fizyopatoloji. 2. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık 1990;233-237.
- 96.** Campana WM, Myers RR. Erythropoietin and erythropoietin receptors in the peripheral nervous system: changes after nerve injury. FASEB J. 2001;15:1804-1806.
- 97.** Lavoie C, Diguët A, Milot M, Gareau A. Erythropoietin (rHuEPO) doping: effects of exercise on anaerobic metabolism in rats. Int J Sports Med. 1998;19:281-286.
- 98.** Macdoughall IC, Eckardt KU. Hematological disorders. "Davison AM, Cameron JS, Grünfeld JP, Kerr DNS, Ritz E, Winearls CG (eds) Oxford Textbook of Clinical Nephrology. Oxford Medical Publications. 1998;1935-1954."
- 99.** Bondurant MC, Koury MJ. Anemia induces accumulation of erythropoietin mRNA in the kidney and liver. Molecular Cell Biology 1986;6:2731-2733.
- 100.** Iwasaki Y, Ikeda K, Ichikawa Y, Igarashi O, Iwamoto K, Kinoshita M. Protective effect of interleukin-3 and erythropoietin on motor neuron death after neonatal axotomy. Neurol Res. 2002;24:643-646.
- 101.** Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Erbayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Hand CC, Wuerth JP, Cerami A, Brines M. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. Proc Natl Acad Sci. 2003;100:6741-6746.
- 102.** Kitao T, Hattori K. İnhibition of erythrocyte ATPase activity by a clacynomycin and reverse effect of ascorbate on ATPase activity. Experientia. 1983;39:362-364.
- 103.** Rabbini RA, Petrucci E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M. Diabetes mellitus and subjects ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte. Eur J Clin Invest. 1997;27:327-332.
- 104.** Konukoglu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi H. Relation of erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase activity and cholesterol and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus. Clin Invest Med. 2003;26:279-84.

- 105.** Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Tara C, Rema M, Mohan V. Association of hypoglutathionemia with reduced Na⁺-K⁺ ATPase activity in type 2 diabetes and microangiopathy. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2006;282:169-176.
- 106.** Arai M. Advanced glycation endproducts and their receptor: do they play a role in diabetic cardiomyopathy? *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:1305-1308.
- 107.** Koç B, Erten V, Yılmaz MI, Sönmez A, Koçar IH. The relationship between red blood cell Na⁺-K⁺ ATPase activities and diabetic complications in patients with type 2 diabetes mellitus. *Endocrine*. 2003;21:273-278.
- 108.** Wright RA, Nukada H. Vascular and metabolic factors in the pathogenesis of experimental diabetic neuropathy in mature rats. *Brain*. 1994;117:395-407.
- 109.** Sima AA, Sugimoto K. Experimental diabetic neuropathy: an update. *Diabetologia*. 1999;42:773-788.
- 110.** Greene DA, Lattimer SA, Sima AF. Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium ATPase in the pathogenesis of diabetes complications. *N Engl J Med*. 1987;316:599-605.
- 111.** Bianchi R, Marini P, Merlini S, Fabris M, Triban C, Mussini E, Fiori MG. ATPase activity defects in alloxan-induced diabetic sciatic nerve recovered by ganglioside treatment. *Diabetes*. 1988;37:1340-1345.
- 112.** Ekberg K, Johansson BL. Effect of C-peptide on diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Experimental Diabetes Research*. 2008;2008:1-5.
- 113.** Coste TC, Gerbi A, Vague P, Pieroni G, Raccach D. Neuroprotective effect of docosahexaenoic acid-enriched phospholipids in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2003;52:2578-2585.
- 114.** Gerbi A, Sennoune S, Pierre S, Sampol J, Raccach D, Vague P, Maixent JM. Localization of Na,K-ATPase a/b isoforms in rat sciatic nNerves: effect of diabetes and fish oil treatment. *J. Neurochem*. 1999;73:719-726.
- 115.** Raccach D, Gallice P, Pouget J, Vague P. Low Na⁺-K⁺ ATPase activity in the rde cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy. *Diabete & Metabolisme*. 1992;18:236-241.
- 116.** Vague P, Brunetti O, Valet AM, Attali I, Lassmann-Vague V, Vialettes B. Increased prevalence of neurologic complications among insulin dependent diabetic patients of Algerian origin. *Diabete Metab*. 1997;14:706-711.
- 117.** Topçu C. Diabetli hastalarda Na⁺-K⁺ ATPaz gen polimorfizminin araştırılması. Doktora tezi. 2006.

- 118.** Hohman TC, Cotter MA, Cameron NE. ATP-sensitive K⁺ channel effects on nerve function, Na⁺,K⁺ ATPase and glutathione in diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*. 2000;397:335-341.
- 119.** Berry EM. Dietary fatty acids in the management of diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr*. 1997;66:991-997.
- 120.** Yagihashi S. Nerve structural defects in diabetic neuropathy: do animals exhibit similar changes? *Neurosci Res Commun*. 1997;21:25-32.
- 121.** Jannot MF, Raccach D, Dufayet D, Coste T, Vague P. Genetic and environmental regulation of Na/K adenosine triphosphatase activity in diabetic patients. *Metabolism*. 2002;51:284-291.
- 122.** Takigawa T, Yasuda H, Terada M, Maeda K, Haneda M, Kashiwagi A, Kitasato H, Kikkawa R. Increases in K⁺ conductance and Ca⁺² influx under high glucose with suppressed Na⁺/K⁺-pump activity in rat myelinated nerve fibers. *Neurophysiology*. 2000;11:2547-2551.
- 123.** Krishnan AV, Lin CS, Kiernan MC. Activity-dependent excitability changes suggest Na⁺/K⁺ pump dysfunction in diabetic neuropathy. *Brain*. 2008;131:1209-1216.
- 124.** Leonelli E, Bianchi R, Cavaletti G, Caruso D, Crippa D, Garcia-Segura LM, Lauria G, Magnaghi V, Roglio I, Melcangi RC. Progesterone and its derivatives are neuroprotective agents in experimental diabetic neuropathy: a multimodal analysis. *Neuroscience*. 2007;144:1293-1304.
- 125.** Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA. Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *PNAS*. 2004;101:9855-9860.
- 126.** Masuda S, Nagao M, Sasaki R. Erythropoietic, neurotrophic and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol*. 1999;70:1-6.
- 127.** Hassan K, Simri W, Rubenchik I, Manelis J, Gross B, Shasha SM, Kristal B. Effect of erythropoietin therapy on polyneuropathy in predialytic patients. *J Nephrol*. 2003;16:121-125.
- 128.** Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *PNAS*. 2001;98:4044-4049.

- 129.** Hadjadj S, Torremocha F, Fanelli A, Brizard A, Bauwens M, Maréchaud R. Erythropoietin-dependent anaemia: a possible complication of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab.* 2001;27:383-385.
- 130.** Spallone V, Maiello MR, Kurukulasuriya N, Barini A, Lovecchio M, Tartaglione R, Mennuni G, Menzinger G. Does autonomic neuropathy play a role in erythropoietin regulation in non-proteinuric type 2 diabetic patients? *Diabetic Medicine.* 2004;21:1174-1180.
- 131.** Li X, Gonias SL, Campana WM. Schwann cells express erythropoietin receptor and represent a major target for Epo in peripheral nerve injury. *GLIA.* 2005;51:254-265.
- 132.** Bosman DR, Osborne CA, Marsden JT, Macdougall IC, Gardner WN, Watkins PJ. Erythropoietin response to hypoxia in patients with diabetic autonomic neuropathy and non-diabetic chronic renal failure. *Diabetic Medicine.* 2002;19:65-69.
- 133.** Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, et al. Derivatives of erythropoietin That are tissue protective but not erythropoietic. *Science.* 2004;305:239-242
- 134.** Höke A, Keswani SC. Neuroprotection in the PNS: Erythropoietin and immunophilin ligands. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1053:491-501.
- 135.** Campana WM, Myers RR. Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci.* 2003;18:1497-1506.
- 136.** Shotton HR, Clarke S, Lincoln J. The effectiveness of treatments of diabetic autonomic neuropathy is not the same in autonomic nerves supplying different organs. *Diabetes.* 2003;52:157-164.
- 137.** Conti G, Stoll G, Scarpini E, Baron PL, Bianchi R, Livraghi S, Scarlato G. p75 neurotrophin receptor induction and macrophage infiltration in peripheral nerve during experimental diabetic neuropathy: possible relevance on regeneration. *Exp. Neurol.* 1997;146:206-211.
- 138.** Lipton SA. Erythropoietin for neurologic protection and diabetic neuropathy. *N Engl J Med.* 2004;351:2516-2517.

TEŐEKKÜR

Uzmanlık tezi çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet Gurbilek'e, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nefroloji Kliniđinden Doç. Dr. Lutfullah Altıntepe ve tım klinik çalışanlarına, Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniđinden Uzm. Dr. Aynur Karakuřu'ya, Meram Tıp Fakóltesi Bařhekim Yard. Uzm. Dr. Fatih Kara'ya ve manevi desteklerini daima hissettiğim asistan arkadaşlarıma teőekkür ederim.

Asistanlık eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İdris Mehmetoğlu olmak üzere anabilim dalında görev yapan tım öğretim üyelerine ve Merkez Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına, ayrıca tım hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere ulaşmamda en büyük pay sahibi olan aileme teőekkürü borç bilirim.

Dr. Seval AKBULUT