

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**BAZI YENİ İNDOL TÜREVLERİNİN ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM
AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Orçun Erdem KURŞUN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKARA
2010**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Orçun Erdem KURŞUN tarafından hazırlanan ‘**Bazı Yeni İndol Türevlerinin Aldoz Redüktaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri**’ adlı tez çalışması 19. 03. 2010 tarihinde aşığıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Emel EMREGÜL
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Nursel GÜL
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM
Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Orhan ATAKOL

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek lisans tezi

BAZI YENİ İNDOL TÜREVLERİNİN ALDOZ REDÜKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Orçun Erdem KURŞUN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

Çalışmamızda bazı yeni indol türevlerinin aldoz redüktaz enzimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Aldoz redüktaz enziminin aktivitesi hiperglisemi ile karakterize edilen diabetes mellitus da böbrek medullası, siyatik sinirler ve lensde artmaktadır. Bu durum dokularda diyabetik nefropati, diyabetik nöropati, diyabetik retinopati ve katarakt oluşumuna yol açmaktadır. Bu komplikasyonların oluşumunu engellemek veya geciktirmek amacıyla çok sayıda farklı aldoz redüktaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Ancak, bu inhibitörlerden epalrestat dışındakiler aldoz redüktaz enzimini tam olarak inhibe edemediği veya aldoz redüktaz enzimi ile aynı süperaileden olan aldehit redüktazları da inhibe ettiği için yan etkilere neden olmaktadır. Bu nedenle, günümüzde halen yan etkilere neden olmayan ve sadece aldoz redüktaz enzimini tam olarak inhibe edebilen aldoz redüktaz inhibitörlerinin tasarımı devam edilmektedir. Çalışmamızda, aldoz redüktaz enzimi sığır lenslerinden saflaştırılmıştır. Daha sonra 16 adet yeni indol türevi kullanılarak enzim aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Buna göre en fazla inhibisyon %43 oranında 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon isimli inhibitör maddede görülmüştür.

Mart 2010, 102 sayfa

Anahtar Kelimeler: Aldoz redüktaz, yeni indol türevleri, diyabetik komplikasyonlar

ABSTRACT

Master of Thesis

EFFECTS OF SOME NEW INDOL DERIVATIVES ON ALDOSE REDUCTASE ENZYME ACTIVITY

Orçun Erdem KURŞUN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Özlem YILDIRIM

In our study, the effects of new indol derivatives on aldose reductase enzyme activity were investigated. In diabetes mellitus, aldose reductase activities were increased in lens, kidney and nerve tissues. Hyperglycemia causes diabetic retinopathy, nephropathy, neuropathy and cataract formation in these tissues. For prevention or delay the formation of these pathological events a great of number aldose reductase inhibitors can be used. However, except epalrestat all other aldose reductase inhibitors can not only be completely inhibits the enzyme or inhibits aldehyde reductase which to be present in the same superfamily. For these reason, nowadays the design of the aldose reductase inhibitors which do not cause side effects and which can exactly inhibit only the enzyme of the aldose reductase is still carried on. In our study, aldose reductase enzyme was purified from bovine lens tissues. Then, the effects of 16 different indol derivatives on aldose reductase activity were investigated. At the end of the study, we determined that, 5-bromo-1H-indol-3- carboxyaldeyde izonicotinoil hydrozon (43%) has the most inhibitor activity.

March 2010, 102 pages

Key Words: Aldose reductase, new indol derivatives, diabetic complications

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu çalışmada diabetes mellitusa bağlı olarak gelişen ikincil hastalıklardan başta katarakt olmak üzere diğer hastalıklarında oluşumunu engellemek veya geciktirmek amacıyla Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim dalı tarafından sentez edilen bazı yeni indol türevleri olan aldoz redüktaz inhibitörlerinin sıgır lensinden izole edilen aldoz redüktaz enzimi üzerine etkileri in vitro ortamda araştırılmıştır.

Yüksek lisansa kabul edildiğim ilk günden bugüne kadar her zaman yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ayrıca sabır ve hoşgörüsünü benden esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM’a çok teşekkür ederim.

Bununla birlikte hem tez çalışmamda hem de laboratuvar çalışmalarında benden desteklerini esirgemeyen başta değerli danışman hocam Prof. Dr. Özlem YILDIRIM’a (Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji A.B.D), Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya ve Biyokimya A.B.D’da görevlerini sürdürmekte olan sırasıyla Prof. Dr. Sibel SÜZEN ve Doç. Dr. Net DAŞ EVCİMEN hocalarıma ve laboratuvar arkadaşlarımdan başta Uzm. Biyolog Mutlu SARIKAYA olmak üzere hepsine teker teker teşekkür ederim. Ayrıca, yaşamım boyunca gerek maddi ve gerekse manevi yönden desteklerini benden esirgenmeyen sevgili aileme ve tüm arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Orçun Erdem KURŞUN
Ankara, Mart 2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	2
2.1 Diyabetin Tanımı ve Sınıflandırılması.....	2
2.1.1 Tip-1 diyabet.....	3
2.1.1.1 İmmünolojik diyabet.....	4
2.1.1.2 İdiyopatik tip 1 diyabet.....	5
2.1.2 Tip-2 diyabet.....	6
2.1.3 Diğer özel (spesifik) tipler.....	7
2.1.4 Gestasyonel diyabet (GDM).....	8
2.2 Diyabetik Komplikasyonlar.....	9
2.2.1 Diyabetik makrovasküler komplikasyonlar.....	10
2.2.1.1 Aterosklerozis.....	10
2.2.2 Diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar.....	13
2.2.2.1 Diyabetik retinopati ve katarakt.....	14
2.2.2.2 Diyabetik nefropati.....	19
2.2.2.3 Diyabetik nöropati.....	21
2.3 Diyabete Bağlı Hasarların Mekanizmaları.....	23

2.3.1 Poliyol yolağı.....	23
2.3.2 İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumu (AGEs).....	27
2.3.3 Protein kinaz-C yolağı.....	31
2.3.4 Heksoz amin yolağı.....	34
2.4 Aldoz Redüktaz Enziminin tanımı ve Sınıflandırılması.....	36
2.4.1 Enzimin yapısı ve işlevi.....	36
2.4.2 Enzimin dokulardaki konsantrasyonu.....	42
2.4.3 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyon oluşumuna etkileri.....	43
2.4.4 Aldoz redüktaz enziminin diğer hastalıklarla olan ilişkisi.....	44
2.5 Aldoz redüktaz inhibitörleri.....	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	53
3.1 Kullanılan Cihazlar.....	53
3.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	53
3.1.2 Denekler.....	53
3.2 Yöntem.....	54
3.2.1 Aldoz redüktaz enziminin izolasyonu.....	54
3.2.2 Aldoz redüktaz aktivite tayini.....	55
3.2.3 Protein miktar tayini.....	56
4. BULGULAR.....	57
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	86
ÖZGEÇMİŞ.....	102

SİMGELER DİZİNİ

3-D	3-Boyutlu (Dimension)
3-DG	3-Deoksiglukoz
ADA	Amerikan Diyabet Birliği (American Diabetes Association)
AGEs	İleri Glikasyon Sonürünleri (Advanced Glycation Endproducts)
AKR1B	Aldo-Keto Redüktaz 1B
Anti-GAD	Glutamikasit Dekarboksilaz-Antikoru
AR	Aldoz Redüktaz
AP-1	Aktivatör Protein-1 (Activator Protein-1)
Arg	Arjinin (Arginine)
ARI	Aldoz Redüktaz İnhibitörü
ARL-1	Aldoz Redüktaz Benzeri protein-1
Asn	Asparajin (Asparagine)
Asp	Aspartik asit (Aspartic acid)
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumine)
Cl	Klor atomu
CML	Karboksimetil Lizin
COX	Siklooksigenaz (Cyclooxygenase)
Cys	Sistein (Cysteine)
DAG	Diaçilgliserol
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DHAP	Di Hidroksi Aseton Fosfat
DM	Diabetes Mellitus
DMF	Dimetil Formamid

DPPH	DiPhenyl-2-PicrylHydrazyl
E.C.	Enzim Komisyonu
ECM	Ekstracellular Matriks
eNOS	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
ERK	Hücre dışı Sinyal Düzenleyen Kinaz (Extracellular Signal-Regulated Kinase)
ET-1	Endotelin-1
F	Flor atomu
F-3-P	Fruktoz-3-fosfat
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GDM	Gestasyonel Diabetes Mellitus
GFAT	Glutamin:Fruktoz-6-fosfat Aminotransferaz
GFH	Glomerular Filtrasyon Hızı
GlcN-6-P	Glukozamin-6-P
Gln	Glisin (Glycine)
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	İndirgenmiş Glutasyon
GSSG	Okside Glutasyon (Glutasyon disülfid)
H	Hidrojen atomu
hALR1	İnsan Aldehit Redüktaz 1 (Human Aldehyde Reductase1)
HbA1	Hemoglobin A1
His	Histidin (Histidine)
HNF-1 α	Hepatosit Nükleer Faktör-1 α
IAA	Adacık Otoantikorları (Islet Autoantibodies)

ICAM	Hücre içi Adezyon Molekülü (Intracellular Adhesion Molecule)
ICAs	Adacık Hücre Antikorları (Islet Cell Antibodies)
ICSA	Adacık Hücre Yüzey Antikorları (Islet Cell Surface Antibodies)
IDDM	İnsüline Bağımlı Diyabet (Insulin Dependent Diabetes Mellitus)
IFG	Bozulmuş Açlık Glukozu (Impaired Fasting Glucose)
IGF	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IGT	Bozulmuş Glukoz Tolerans (Impaired Glucose Tolerans)
ILs	İnterlökinler
IRS	İnsülin Reseptör Substrat
Leu	Lösin (Leucine)
Lys	Lizin (Lysine)
MAPK	Mitojenle Aktive edilen Protein Kinaz (Mitogen Activated Protein Kinase)
MODY	Gençlerde Erişkin Başlangıçlı Diyabet (Maturity Onset Diabetes of Young)
NAD	Okside Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADH	İndirgenmiş Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADP	Okside Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
NADPH	İndirgenmiş Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
NDDG	Ulusal Diyabet Veri Grubu (Naturel Diabetes Data Group)
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
NIDDK	National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases
NIDDM	İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet (Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus)
NO	Nitrik Oksit
NPDR	Non-Proliferative Diyabetik Retinopati

OGTT	Oral Glukoz Tolerans Testi
oxLD	Oksitlenmiş Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (okside Low Density)
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitor-1 (Plasminogen Activator Inhibitor)
PDR	Proliferative Diyabetik Retinopati
PDGF	Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
Phe	Fenilalanin (Phenylalanine)
PKC	Protein Kinaz C
PLA ₂	Fosfolipaz-A ₂
PS	Fosfotidilserin
RAGE	İleri Glikasyon Son ürün Reseptörü (Receptor for Advanced Glycation Endproducts)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SCC	Yassı Hücre Karsinoma (Squamous Cell Carcinoma)
SDH	Sorbitol Dehidrogenaz
Ser	Serin (Serine)
TGF- β	Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (Transforming Growth Factor- β)
TNF- α	Tümör Nekroz Faktör-Alfa
TPA	Tümör Promoter Ajan
Trp	Triptofan (Tryptophan)
Tyr	Tirozin (Tyrosine)
UDP-GlcNAc	Uridin-5'-difosfat-N-asetilglukozamine

VCAM-1	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1(Vascular Cell Adhesion Molecule-1)
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Diabetes mellitus ile aterogenez arasındaki ilişkisi.....	12
Şekil 2.2 oxLDL, virüs, toksinler ve mekanik etkenler ile endotelial fonksiyon kaybı oluşumu.....	13
Şekil 2.3 Hiperglisemi aracılığıyla başlatılan metabolik yollar ve neden oldukları hastalıklar: AGEs, Poliyol yolağı ve PKC yolağı; Nefropati, Retinopati ve Nöropati.....	14
Şekil 2.4 Aldoz redüktaz-PKC yolağı, diyabetik retinopatinin patogeneğinde perisitler ve kapiller	17
Şekil 2.5 Katarakt oluşumu.....	18
Şekil 2.6 Diyabetik nefropati gelişiminde metabolik ve hemodinamik faktörler arasında etkileşim.....	20
Şekil 2.7 Poliyol yolağının sinir hücresi üzerine etkisi.....	22
Şekil 2.8 Hiperglisemi poliyol yolağının aktivasyonunu arttırmaktadır.....	24
Şekil 2.9 Poliyol yolağının aktivasyonu.....	25
Şekil 2.10 Poliyol yolağının pentoz fosfat ve glikoliz yolağına olan etkisi.....	27
Şekil 2.11 İleri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumu.....	28
Şekil 2.12 RAGE-AGEs ilişkisinin endotelial hücreler üzerine etkisi.....	30
Şekil 2.13 PKC aktivasyonu ve diyabetik vasküler komplikasyonlar arasındaki ilişki.....	31
Şekil 2.14 PKC- β ve diyabetik komplikasyonlar.....	32
Şekil 2.15 DAG ve prostaglandin arasındaki ilişki.....	34
Şekil 2.16 Hiperglisemi artan heksoz amin yolağı.....	36
Şekil 2.17 Kofaktörün yapısı ve nikotinamit halkası.....	37
Şekil 2.18 Enzimin (α/β) ₈ fiçı modeli.....	38
Şekil 2.19 Aldoz redüktaz enziminin aktif merkezi.....	38
Şekil 2.20 Kofaktörün enzimin aktif merkeze yerleşmesi.....	39

Şekil 2.21 İlme B yapısının açık konformasyondan kapalı konformasyona geçişi.....	40
Şekil 2.22 Substratın aktif merkeze yerleşmesi.....	41
Şekil 2.23 Substratın alkole indirgenmesi, kofaktörün okside hale geçişi.....	42
Şekil 2.24 Aldoz redüktazın diyabetik komplikasyonların oluşuma etkisi.....	43
Şekil 2.25 AKR1B10'nun akciğer hücrelerindeki retinoik asit sinyali üzerine etkisi.....	46
Şekil 2.26 AR enzimine ait olan anyonik ve özgül cepler.....	48
Şekil 2.27 Karboksilik asit ve spirohydantion grupları taşıyan bazı AR inhibitörleri.....	49
Şekil 2.28 AR-Sorbinil kompleksi: Kapalı konformasyondaki enzimin, özgül cebine bağlı olan sorbinil.....	50
Şekil 2.29 AR-Tolrestat kompleksi: Leu300 kalıntısı dirsek pozisyonu olarak özgül cebin açık konformasyona geçmesini sağlamaktadır.....	50
Şekil 2.30 Enzimlerin anyonik bağlanma bölgeleri (Tyr, His ve Trp) ile ARI arasında bağlanma modelleri.....	52
Şekil 2.31 a) İndol türevi olan bileşiklerin AR enzimine genel olarak bağlanma özelliklerini ve tüm önemli polar etkileşimleri b) ARI (4-oxo-4-indolebutanoik asidin) enzime bağlanması.....	52
Şekil 4.1 İnhibitör madde eklenmeden enzime ait absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı eğim grafiği.....	58
Şekil 4.2 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	59
Şekil 4.3 İndol-3-karboksaldehit(4-Bromofenil)hidrazon isimli inhibitör maddenin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	60
Şekil 4.4 1H-İndol-3-karboksaldehit(4-florofenil)hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	61

Şekil 4.5 1H-İndol-3-karboksaldehit(4-klorofenil)hidrazon isimli aldoz redüktazın inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	62
Şekil 4.6 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-İndol-3-karboksaldehit (3,4-diklorofenil) hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	63
Şekil 4.7 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	64
Şekil 4.8 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-bromofenil) hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	65
Şekil 4.9 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-floro fenil)hidrazon isimli bileşiğin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	66
Şekil 4.10 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-klorofenil)hidrazon isimli inhibitör maddenin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	67
Şekil 4.11 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4-diklorofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	68
Şekil 4.12 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N-(4-metoksibenzoil)N'-(indolil-3-metilen)- hidrazinin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	69
Şekil 4.13 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-indol-3-karboksaldehit izonikotinoilhidrazonun , formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	70
Şekil 4.14 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N-(4-metoksibenzoil)N'-(5-Bromo-indolil-3-metilen)-hidrazinin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve	

% aktivasyon değerleri.....	71
Şekil 4.15 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	72
Şekil 4.16 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N,N'-bis-(1H-indol-3-ilmetilen) hidrazin isimli bileşiğin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	73
Şekil 4.17 N,N'-bis-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetilen)hidrazin isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri.....	74
Şekil 4.18 Yeni sentezlenmiş indol türevinin aldoz redüktaz enzimi üzerine % inhibisyon ve aktivasyon değerleri.....	75
Şekil 5.1 Bileşiklerin (1, 2, 3, 4,5, 6 ve 7 numaralı) inhibisyon açısından kendi aralarında karşılaştırılması.....	78
Şekil 5.2 8 ve 10 numaralı bileşiklerin karşılaştırılması.....	79
Şekil 5.3 1 ve 14 numaralı inhibitör maddelerin karşılaştırılması.....	80
Şekil 5.4 12 ve 14 numaralı bileşiklerin karşılaştırılması.....	81
Şekil 5.5 Yüksek oranda inbitör etki gösteren indol türevleri.....	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 ADA 2003 kriterlerine göre diyabet tanısı ve bozulmuş glukoz toleransının derecelendirilmesi.....	3
Çizelge 2.2 Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması.....	4
Çizelge 2.3 Genetik lokuslar üzerinde meydana gelen hasarlar.....	8
Çizelge 2.4 Enzimin insana ait dokulardaki konsantrasyonu.....	42
Çizelge 2.5 Kanseri dokuların tümörlü ve tümörsüz bölgelerindeki aldoz redüktazın özel aktivitesi.....	46
Çizelge 4.1 İnhibitör maddelerin isimleri, yer aldıkları şekillerin şekil ve sayfa numaraları.....	76

1.GİRİŞ

Hiperglisemi ile karakterize edilen diabetes mellitus hastalığında glukozun, insulinden bağımsız olan dokulara (böbrek, sinir, lens, endotelyal hücre) girişinin artması, poliyol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktaz enziminin aktivitesinin artışına neden olmaktadır. Normal koşullar altında bu yolak, hücrelerin osmotik dengesini sağlamakta, enerji ihtiyacını karşılamakta ve toksik yapıdaki aldehitleri detoksifiye etmektedir. Ancak, yolağın aktivitesindeki artış hücrelerde sorbitol ve fruktoz gibi metabolitlerin birikimine neden olduğu gibi, protein kinaz C, ileri glikasyon yolağı, heksoz amin yolağı gibi yolakların da aktivasyonuna neden olmaktadır. Hücrelerde meydana gelen bu değişimler diabetes mellitusa bağlı olarak gelişen ikincil hastalıklara yani, mikrovasküler (katarakt, diyabetik retinopati, nöropati ve nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlara (kardiyovasküler, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar) neden olmaktadır.

Enzim komisyonu tarafından 1.1.1.21 kodu verilen aldoz redüktaz enzimi, α/β fiçı modelinde ve aktif bölgesi substrat veya inhibitör madde ile etkileşime girebilen hidrofobik ve hidrofilik kısımlar taşımaktadır. İnhibitör maddeler bu bölgeyle ne kadar uyumlu olursa, enzimin aktivitesinin de o oranda azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle enzimin inhibisyonu için çeşitli aldoz redüktaz inhibitörleri (karboksilik asit grubu, siklik imid grubu taşıyanlar ve sülfonil nitrometan türevleri) geliştirilerek, diyabete bağlı olarak gelişen ikincil hastalıklardan başta katarakt olmak üzere diğerlerinin de oluşumu engellenmek ya da geciktirilmek istenmektedir. Bu amaç doğrultusunda planladığımız tez çalışmamızda, aldoz redüktaz inhibitörü olacak şekilde dizayn edilerek sentezlenmiş, saflaştırılmış ve kimyasal yapıları MNR, Kütle, FT-IR Spektrometreleri ve Elementel Analiz ile aydınlatılmış orjinal indol türevi ilaç etken maddelerinin (A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel Süzen danışmanlığında sentezlenen) aldoz redüktaz enziminin aktivitesi üzerine etkileri *in vitro* ortamda çalışılmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Diyabetin Tanımı ve Sınıflandırılması

Diyabet, insülin sekresyonundaki, insülin etkinliğindeki ya da her iki yoldaki bir bozuklukla sonuçlanan ve hiperglisemi ile kendini gösteren metabolik hastalıktır (Anonymous 2004a). Diyabette görülen sürekli hiperglisemi durumu, özellikle gözler, böbrekler, sinirler, kalp ve kan damarları gibi çeşitli dokularda fonksiyon kayıplarına neden olmaktadır (Anonymous 2004a).

Diyabetin başlıca belirtileri, aşırı susama (polidipsi), aşırı idrara çıkma (poliüri), aşırı yeme (polifaji), glukozüri, ketonüri ve açıklanamayan kilo kaybıdır (Anonymous 1999). 1997-2003 yıllarında “Amerikan Diyabet Birliği” (American Diabetes Association, ADA) ve 1999 yılında “Dünya Sağlık Örgütü” (World Health Organization, WHO) tarafından diyabetin tanı kriterleri yeniden düzenlenmiş ve tanı için yukarıda açıklanan belirtilerin yanısıra kan-glukoz değerinin de önemli olduğu vurgulanmıştır. Buna göre, tokluk kan glukoz düzeyinin 200 mg/dl ve üzerinde olması, veya en az sekiz saatlik açlıktan sonra plazma glukoz değerinin 126 mg/dl ve üzerinde bulunması, diyabet tanısı için yeterli görülmüştür (Engelgau 2004, Anonymous 2004a, Clee ve Attie 2007). Bunun yanısıra, açlık kan glukoz düzeyi 100 mg/dl altında ise ya da şeker yüklemesinden sonraki 2. saatte ölçülen kan glukoz seviyesi 140 mg/dl altında ise bu bireylerin normal kan glukoz düzeylerine sahip oldukları belirtilmektedir (Anonymous 2003).

Açlık kan glukoz düzeyi 100-125 mg/dl arasında olan bireyler için “Bozulmuş Açlık Glukozu” (Impaired Fasting Glucose, IFG) tanımı yapılmış ve bu bireylere oral glukoz tolerans testinin uygulanması öngörülmüştür. Oral glukoz tolerans testinde, 2. saat sonunda plazma glukoz düzeyinin 140-199 mg/dl aralığında çıkması, “Bozulmuş Glukoz Tolerans” (Impaired Glucose Tolerans, IGT) olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1). Bu testin sonucu 200 mg/dl ve üzerinde olması durumunda ise doğrudan diyabet tanısı konmaktadır (Anonymous 2003).

Çizelge 2.1 ADA 2003 kriterlerine göre diyabet tanısı ve bozulmuş glukoz toleransının derecelendirilmesi (Anonymous 2003)

KATEGORİ	AÇLIK PLAZMA GLİKOZU	OGTT 2. SAAT GLİKOZU
NORMAL	<100 mg/dl	<140 mg/dl
IFT (Bozulmuş Açlık Toleransı)	* 100 -125 mg/dl	-----
IGT (Bozulmuş Glukoz Toleransı)	-----	140-199 mg/dl
Diabetes Mellitus	≥ 126 mg/dl	≥ 200 mg/dl
* Açlık plazma glukoz değeri IFT çıkarsa OGTT uygulanır.		

Diyabetin sınıflandırılma çalışmaları ilk kez 1979 yılında Amerikan Ulusal Diyabet Veri Grubu (NDDG, National Diabetes Data Group) ve ardından 1985 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılmıştır (Anonymous 1999, Anonymous 2002). Bu veriler, 2003 yılında ADA tarafından tekrar gözden ele alınmış ve halen kullanılmakta olan haline getirilmiştir (Çizelge 2.2), (Anonymous 1999, Anonymous 2004a).

2.1.1 Tip 1 diyabet

İnsüline bağımlı diyabet ya da gençlik diyabeti olarak da bilinen Tip-1 diyabet, pankreasın insülin sentezleyen beta hücrelerinin otoimmün olarak hasar görmesi sonucunda oluşmaktadır. Beta hücrelerinde meydana gelen hasar sonucu insülin hormonu ya yetersiz miktarda salgılanmakta ya da hiç salgılanmamaktadır. Buna bağlı olarak bu bireylerde hiperglisemi görülmektedir (Anonymous 1999, Hoogwerf vd. 2006).

Çizelge 2.2 Diabetes mellitusun etiyolojik sınıflandırılması (Anonymous 2004a)

I. Tip 1 Diyabet
A. İmmünolojik diyabet
B. İdiyopatik diyabet
II. Tip 2 Diyabet
III. Diğer Spesifik Tipler
A. Beta hücre fonksiyonlarında genetik bozukluk sonucu oluşan diyabet
B. İnsülin fonksiyonlarında genetik bozukluk sonucu oluşan diyabet
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları sonucu oluşan diyabet
D. İlaç ya da kimyasallara bağlı oluşan diyabet
E. Enfeksiyonlar sonucu oluşan diyabet
IV. Gestasyonel Diyabet

Tip 1 diyabet, diyabetik bireylerin yaklaşık % 10 unu oluşturmaktadır. Diyabetin bu tipi genellikle 35 yaş altında görülmektedir. Hastalık, en sık 7–15 yaş arasında ortaya çıkmaktadır. Avrupa Diyabet Çalışma Grubu, 1989-1994 yıllarında 44 Avrupa ülkesi ve İsrail'in yer aldığı ve 0-15 yaş aralığını kapsayan araştırmada, Tip 1 diyabetin görülme sıklığının 3,2/100.000 olarak saptamıştır (Abacı vd. 2007). Ülkemizde ise 1996 yılında, 19 bölgeyi kapsayan çok merkezli bir çalışmada 0–15 yaş arası diyabet insidansı 2.52/100000 olarak bulunmuştur. Tip 1 DM görülme sıklığının 2010 yılında, 1997 yılına oranla % 40 düzeyinde artacağı tahmin edilmektedir (Abacı vd. 2007).

Tip 1 diyabet, otoimmünitenin varlığına göre, immünolojik diyabet ve idiyopatik diyabet olarak iki gruba ayrılmaktadır.

2.1.1.1 İmmünolojik diyabet

Genetik açıdan diyabete yatkın olan bireyler çeşitli dış etkenlerle karşılaştığında (virüsler, stres, fiziksel ve kimyasal uyaranlar) hastalık tetiklenmektedir. Bu durumda,

pankreasın beta hücrelerine karşı, T-lenfosit ve makrofaj hücreleri immün yanıt oluşturmaktadır. Böylece, beta hücrelerinin insülin salgılama kapasiteleri azalmakta ya da yok olmaktadır. Bu saldırının patolojik görünümüne ise “insülitis” adı verilmektedir. Böyle bireyler yaşamlarını sürdürebilmek için insüline gereksinim duyarlar (Devendra vd. 2004).

Tip 1 diyabet, çoğunlukla anti-GAD’ın (glutamik asit dekarboksilaz otoantikorları), ada hücre antikorlarının veya insülin antikorlarının varlığı ile saptanmaktadır (Anonymous 1999).

Diyabet gelişiminde ilk tanımlanan antikor, endokrin pankreas hücre sitoplazmasına karşı gelişen adacık hücre antikorudur (ICAs = Islet Cell Antibodies). Daha sonra yapılan araştırmalarda, glutamik asit dekarboksilaza karşı gelişen (anti-GAD65A), insülin otoantikorları (IAA: insuline autoantibodies), transmembran protein tirozin fosfataza karşı gelişen (IA-2, IA-2 β) antikorlar ve hücre yüzeyine karşı gelişen adacık hücre yüzey antikorları (ICSA) da tanımlanmıştır. Radyoaktif işaretli özel antikorlar aracılığıyla kolaylıkla saptanabilen bu antikorların, immün kaynaklı Tip 1 DM tanısında önemli rolü olduğu saptanmıştır. Tek antikor pozitifliği olanlarda hastalık gelişimi daha yavaş seyirli iken, çoklu antikor pozitifliği olan bireylerde bu otoimmün yıkım sürecinin daha hızlı gerçekleştiği saptanmıştır (Abacı vd. 2007).

2.1.1.2 İdiyopatik tip 1 diyabet

İdiyopatik tip 1 diyabet, geniş kentsel alanlarda yaşayan obez zenci Amerikalı bireylerde daha fazla görülen diyabet şeklidir. Diyabetin bu tipi genellikle, diyabetik ketoasidozis gibi Tip 1 diyabetin tipik belirtilerini taşımaktadır, ancak daha sonraki klinik belirtiler Tip 2 diyabete benzemektedir. İdiyopatik diyabetin patogenezi bilinmemesine rağmen lipotoksisite, glukoz toksisitesi veya transkripsiyon faktörleri ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (Pinero-Pilona vd. 2001). Ayrıca, immunolojik diyabette olduğu gibi, otoimmün saldırı sonucu oluşan beta hücre harabiyeti

gözlmemektedir. Diyabetin bu tipi, insülin eksikliğine (insulinopenia) ve ketoasidosise olan yatkınlığı ile bilinmektedir (Anonymous 1999).

2.1.2 Tip 2 diyabet

Tip 2 diyabet, insülin bağımsız diyabet ya da erişkin başlangıçlı diyabet olarak da bilinmektedir. Bu tip, diyabetik bireylerin yaklaşık % 90'nını oluşturmaktadır. Yavaş yavaş gelişmekle beraber, genetik yatkınlık ve çevresel faktörlerin önemli olduğu bilinmektedir (Anonymous 1999, Zimmet vd. 2001).

Tip 2 diyabet, genellikle 40 yaşından sonra ortaya çıkan, yaşın ilerlemesiyle beraber görülme sıklığı artan, diyabet belirtilerinin hafif olduğu bazen de hiç olmadığı ve kronik komplikasyonların sık görüldüğü diyabet tipidir (Sağlam 2004).

Bu hastalığın gelişiminde, pankreastaki beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak insülin hormonunun yetersiz salgılanması ya da etki gösterememesi (insülin direnci) ve karaciğerden şeker üretiminin artması önemli rol oynamaktadır (Pratley ve Weyer 2001, Özata 2006). Genetik ve çevresel faktörler nedeniyle kas ve yağ dokusu gibi periferik dokularda oluşan insülin direnci, kan glukoz düzeyini arttırmaktadır. Bu durum, pankreasın beta hücrelerinin daha fazla insülin hormonu sentezlemesine neden olmaktadır. Böylece, beta hücreleri bir süre sonra fonksiyon kaybına uğrayarak daha fazla insülin salgılayamaz ve insülin konsantrasyonu giderek azalır (Kahn 2001, Özata 2006, Jain ve Saraf 2008).

Buna karşın, normal koşullarda karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi baskılayan insülin hormonunun karaciğer üzerindeki etkisinin azalması, kan glukoz seviyesini daha da yükseltmektedir. Bu durum Tip 2 diyabetin gelişimini başlatır (Kahn 2001, Özata 2006, Jain ve Saraf 2008).

Değişik yaşam tarzlarının Tip 2 diyabetin görülme sıklığını etkilediği bilinmektedir. Obezite ve fiziksel aktivite eksikliği riski arttırırken, dengeli beslenmenin diyabet riskini azalttığı düşünülmektedir (Hu vd. 2001, Tanasescu vd. 2001).

Ayrıca, tip 2 diyabetin etiyolojisinde genetik yatkınlığın önemi, ikizlerle yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Buna göre, tek yumurta ve çift yumurta ikizlerinde sırasıyla % 80'nin üzerinde ve % 50 oranında tip 2 diyabet görülmektedir (Radha ve Mohan 2007). Birinci derecede akrabalarda Tip 2 diyabetin görülmesi ise bireylerin diyabet riskini % 45-80 oranında arttırdığı bildirilmiştir (Anonymous 2000).

2.1.3 Diğer özel (spesifik) tipler

Diabetes mellitusun bu sınıfı, beta hücresine ait genetik bozukluklara, insülin etkinliğine ait genetik hasarlara, endokrinopatilere, ekzokrin pankreas hastalıklarına, enfeksiyonlara ve kimyasal veya ilaç kullanımına bağlı olarak gelişen diyabet tiplerini kapsamaktadır (Anonymous 2007).

Farklı kromozomlardaki (7., 12., 13., 17. ve 20. kromozomlar) beş genetik lokus üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda, beta hücrelerinde oluşan fonksiyon kayıpları (Çizelge 2.3) gençlerde erişkin başlangıçlı diyabet (Maturity Onset Diabetes of Young, MODY) olarak tanımlanmaktadır. En yaygın formu 12. kromozomda bulunan hepatosit nükleer faktör (HNF)-1 α olarak adlandırılan hepatik transkripsiyon faktörünü ifadelendiren gendeki mutasyonlardır (Lebovitz 1999, Anonymous 2002).

İnsülin reseptörleri ile ilgili genetik mutasyonlar sonucu oluşan metabolik anormallikler hiperinsülinemi ve hiperglisemiden, şiddetli diyabete kadar sıralanabilmektedir. Akromegali, Cushing's sendromu gibi hastalıklarda aşırı miktarda salgılanan bazı hormonların da (büyüme hormonu, kortizol vb.) diyabete neden olabileceği bildirilmektedir (Anonymous 2002).

Çizelge 2.3 Genetik lokuslar üzerinde meydana gelen hasarlar (Lebovitz 1999)

Tip	Gen	Kromozom	Oluşan Hata
MODY 1	Hepatik nükleer faktör-4 α	20q	β hücrelerinde bozukluk
MODY 2	Glukokinaz	7p	İnsülin salgılanmasında azalma
MODY 3	Hepatik nükleer faktör-1 α	12q	β hücrelerinde bozukluk
MODY 4	İnsülin promotor faktör-1	13q	Pankreans gelişiminde azalma
MODY 5	Hepatik nükleer faktör-1 β	17 cen-q	β hücrelerinde bozukluk ve renal hastalık

Nikotinik asit gibi bazı ilaçlar insülin sekresyonunu bozabilmektedir. Bu kimyasal ajanlar tek başlarına diyabete neden olmayabilirler ancak, insülin direncini geliştirebilmektedirler (Anonymous 2003). Bununla birlikte, sıçan zehri olan vacor ve pentamidin gibi toksinler, beta hücrelerini tahrip etmektedir. Ayrıca, belli başlı bazı virüslerin de (Sitomegalovirüs, Cocksackievirus B ve adenovirus vb.) diyabete neden olduğu bilinmektedir (Anonymous 2003).

2.1.4 Gestasyonel diyabet (GDM)

Gestasyonel diabetes mellitus, gebelik sırasında başlayan veya ilk kez gebelik sırasında saptanan glukoz intoleransı olarak tanımlanmaktadır. Görülme sıklığı % 7 olarak bilinmektedir (Setji vd. 2005). Birinci derecede akrabalarda aile öyküsü, obezite, ileri gebelik yaşı, glukozüri, önceki gebelikte görülen anomaliler (ölü doğum veya makrozomi) GDM için risk faktörleridir (Metzger vd. 2007). Gestasyonel diyabet, insülin antagonist hormonların en yüksek düzeylere ulaştığı ikinci veya üçüncü trimester zamanında gelişmektedir. Gebe bayanların hemen hemen %7'sinde geliştiği bildirilmiştir (Anonymous 2004b).

2.2 Diyabetik Komplikasyonlar

Diabetes mellitus, populasyonun yaklaşık %5-7'sinde görülmektedir. Bu hastalığın neden olduğu makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonların ekonomiye büyük bir yük getirdiği bilinmektedir (Gugliucci 2000). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2002 yılında yapılan bir çalışmada, sadece diyabet sonucu oluşan bu komplikasyonların sağlık sistemine ekonomik maliyetinin 132 milyar dolar olduğu bildirilmiştir (Setter vd. 2003).

Diyabetin tüm tipleri kronik hiperglisemi ile karakterize olmaktadır (Brownlee 2001). Hiperglisemi, insüliniden bağımsız olan lens, retina, periferik sinir sistemi, renal glomerulus ve endotelial dokularda da metabolik bozukluklara neden olur. Zamanla bu dokulara ait mikrovasküler (katarakt, diyabetik retinopati, nöropati ve nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar (kardiyovasküler, periferik arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar) ortaya çıkmaktadır (Klip vd. 1994, King vd. 2005, Iwata vd. 2007).

Hipergliseminin neden olduğu diyabetik hastalıklarla ilgili dört temel mekanizma bulunmaktadır ve bu mekanizmaların birbirlerini tetiklediği bilinmektedir. Bunlar; poliol yolağı, ileri glikasyon son ürünlerin oluşumu, protein kinaz C izoformlarının aktivasyonu ve heksozamin yolağıdır (Brownlee 2001). Ayrıca bu yollar, endotelial fonksiyon kaybına da neden olmaktadır (De Vriese vd. 2000).

Makrovasküler ve mikrovasküler hastalıklar, Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalarda mortalitenin (ölüm oranı) ve morbiditenin (hastalığa yakalan bireylerin sayısı) temel nedenleridir. Endoteliumun düzenleyici rolünün kaybı diyabetik vasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (De Vriese vd. 2000).

2.2.1 Diyabetik makrovasküler komplikasyonlar

Hiperglisemi tetiklediği metabolik basamaklar aracılığıyla büyük damarların iç kısmını saran endotel hücrelerini fonksiyon kaybına uğratarak, kardiyovasküler, periferik, arteriyel ve serebrovasküler hastalıklar gibi makrovasküler hastalıklara yol açmaktadır (King vd. 2005).

Hipergliseminin, makrovasküler hastalıkların oluşumunda ve gelişiminde etkili olmasına karşın, dislipidemi, hiperinsülinemi ve adipoz doku kökenli faktörlerin de baskın rolü olduğu bildirilmiştir (Bakker vd. 2009). Makrovasküler hastalıkların gelişiminde hipergliseminin rolü, ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunda önemli yer tutmakta ve bu ürünler aterosklerotik plakların oluşumuna neden olmaktadır (Magalhães vd. 2008).

2.2.1.1 Ateroskleroz

Kardiyovasküler, serebrovasküler ve periferik arteriyel hastalıkları kapsayan makrovasküler hastalıklar, hiperglisemi aracılığıyla oluşan ateroskleroz sonucu meydana gelmektedir. Ayrıca, hiperglisemi ile beraber dislipidemi ve insülin direnci de ateroskleroz gelişiminde rol oynamaktadır (Beckman vd. 2002, King vd. 2005).

Damarların iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerin oluşturduğu tek katlı epitel tabaka, doku ile kan arasında ara yüz oluşturarak metabolik aktivitelerin (kan akışının ayarlanması, besin dağılımı, pıhtılaşma ve lökositlerin damar çeperinden dokulara sızması gibi) gerçekleşmesini sağlamaktadır (Beckman vd. 2002).

Endotelin üç önemli fonksiyonu vardır ve bunlar aterogenez oluşumu ile ilişkilidir;

1-Doku boşluğu ve intravasküler boşluk arasında seçici geçirgen bir bariyer olarak rol oynamak,

2- Damar duvarına lipoproteinlerin taşınmasını ve modifikasyonunu sağlamak,

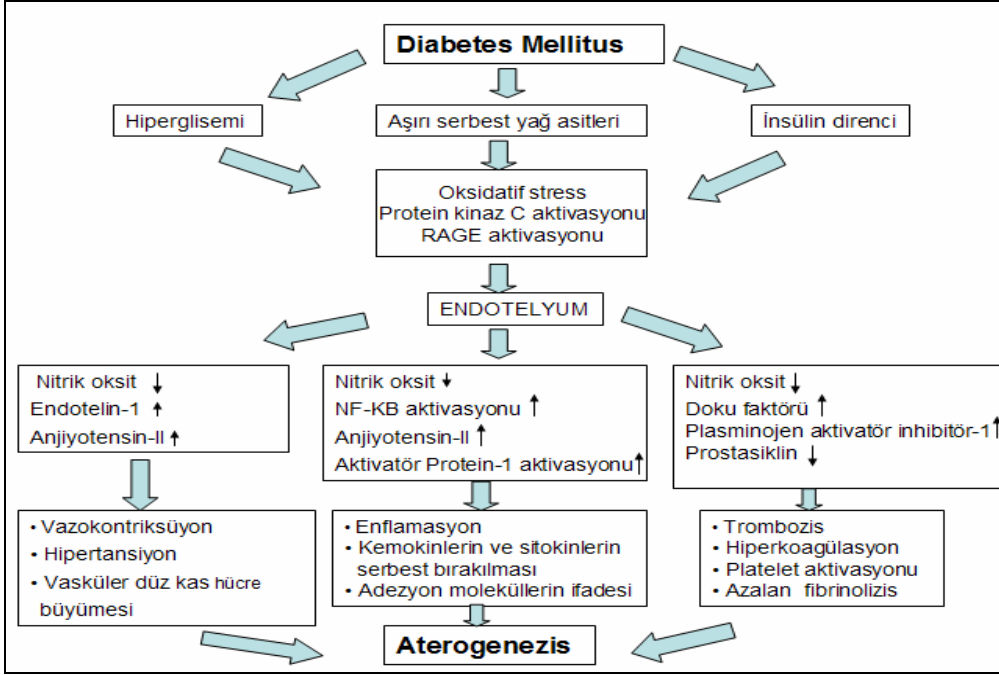
3- Lökositler için yapışkan olmayan yüzey oluşturmak (VanEpps ve Vorp 2007).

Ayrıca, endotel hücreler nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türlerini (ROS), prostaglandinleri, endotelin, anjiotensin-II gibi kan damar fonksiyonunu ve yapısını düzenleyen biyoaktif maddeleri sentezlemektedir (Beckman vd. 2002). Bu fonksiyonların kaybı aterogenez gelişiminde çok önemli yer tutmaktadır. Endotelial fonksiyon kaybında, endotel hücrelerinin yaralanması ateroskleroz gelişiminin en erken belirtisi olarak gösterilmektedir (VanEpps ve Vorp 2007, Bakker vd. 2009).

Endotelde meydana gelen fonksiyon kaybına mekanik etki, immunolojik saldırı, toksinler ve virüsler gibi farklı etkenler neden olabilmektedir (VanEpps ve Vorp 2007). Kan bileşenlerinin (lipid, protein) glikasyon ve oksidasyon yollarıyla yapısal değişikliğe uğratılması endotel ve düz kas hücrelerinde gen ifadesini değiştirerek sitokinlerin, kemotoksik faktörlerin, adezyon moleküllerin üretimini arttırabilmektedir (Eckel vd. 2002).

Ayrıca, hiperglisemi aracılığıyla azalan nitrik oksit, artan oksidatif stress ve ileri glikasyon son ürünleri, transkripsiyon faktörü nükleer faktör kappa B (NF- κ B) ve aktivatör proteinlerin aktivasyonunu arttırmaktadır. Bu faktörler aterogenezis oluşumunda etkili olan endotelium yüzeyindeki lökosit hücre adezyon molekülleri, lökosit çeken kemokinler, interlökin ve tümör nekroz faktör gibi aracılardan gen ifadesini düzenlemektedirler (Şekil 2.1), (Beckman vd. 2002).

Endotelial yaralanmaya ve enflamasyona yanıt olarak, oksitlenmiş olan lipoproteinler (oxLDL) arterlerin endotel duvarında birirmektedir. Daha sonra dolaşımdaki monositler arteriyal duvara sızarak makrofaj hücrelerine dönüşmektedirler. Makrofaj hücreleri ise oxLDL fagosite ederek köpük hücrelerine farklılaşmaktadır. Oluşan köpük hücreleri, T lenfositler ve düz kas hücreleriyle yağlı çizgi (fatty streak) adı verilen lezyonlar oluşmaktadır (VanEpps ve Vorp 2007, Fowler 2008).

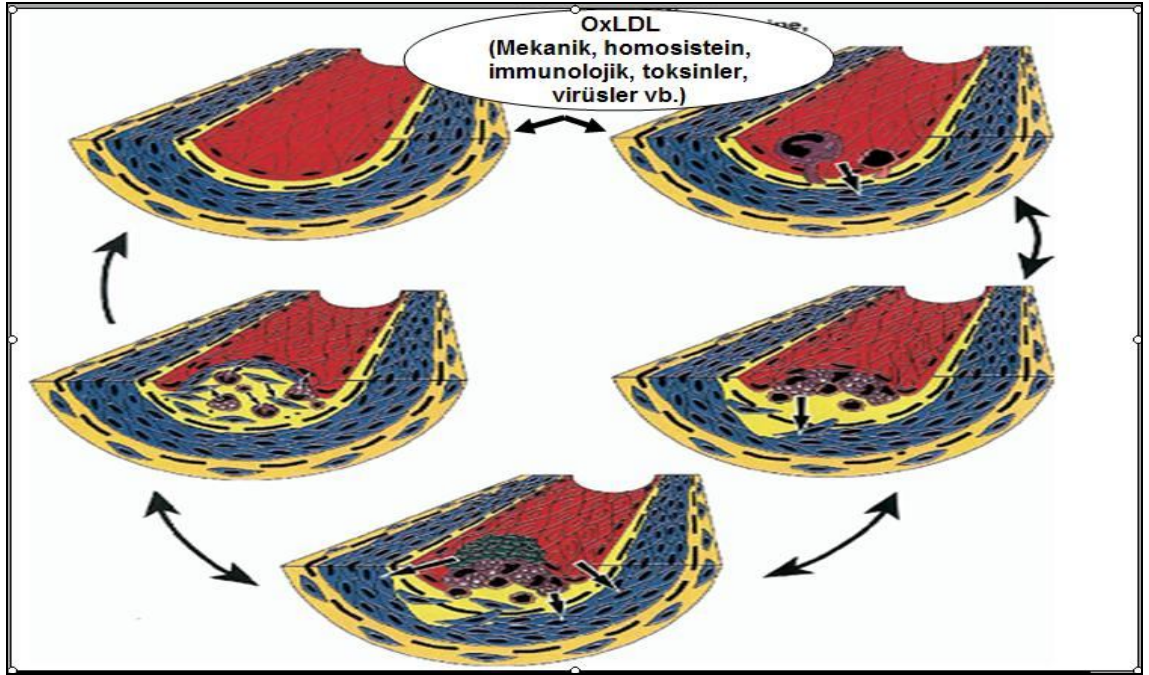


Şekil 2.1 Diabetes mellitus ile aterogenez arasındaki ilişkisi (Beckman vd. 2002)

Bu lezyonlar aterosklerotik oluşumun habercisi olarak tanımlanmaktadır (Beckman vd. 2002). Bununla beraber, köpük hücreleri makrofaj çoğalmasını ve T-lenfositlerin çekimini uyarmaktadır. T-lenfositler ise arteriyal duvarlarda düz kas hücrelerin çoğalmasını ve kollajen birikimini uyarmaktadır (Fowler 2008). Bununla beraber hem endotel, hem de makrofaj hücreleri, düz kas hücrelerinin orta tabakadan intimaya göç etmesini sağlayan (Şekil 2.2) sitokinleri ve büyüme faktörlerini sentezlemektedir (Eckel vd. 2002).

Diyabetik endotel hücreler, düz kas hücreleri tarafından *de novo* olarak sentezlenen kollajenlerin daha az salgılanmasını sağlayan sitokinleri sentezlemektedir. Ayrıca, diyabetlilerde kollajen yıkımına neden olan matriks metaloproteinazların üretimi de arttırmaktadır (Beckman vd. 2002).

Kollajen yıkımı arttığında veya sentezi azaldığında, oluşan plaklar bozulabilir ve trombus oluşumu tetiklenmektedir. Sonuçta, trombus oluşumu ile vasküler tıkanma meydana gelmektedir (Beckman vd. 2002).



Şekil 2.2 oxLDL, virüs, toksinler ve mekanik etkenler ile endeotelyal fonksiyon kaybı oluşumu (VanEpps ve Vorp 2007)

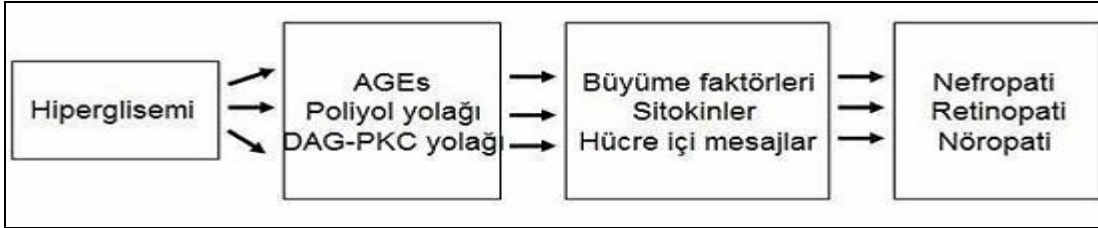
Monositler/makrofajlar T lenfositlerin yüzeye tutunması fonksiyon kaybını arttırmaktadır (üst sağ). Lipid birikiminden dolayı makrofajlar köpük hücrelerine dönüşürler (orta sağ). Trombus oluşumu (orta sol).

2.2.2 Diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar

Uzun süre seyreden yüksek kan glukoz seviyesi, retina, böbrekler ve sinirler gibi çeşitli dokulardaki mikrovasküler damarları etkileyerek bu dokularda fonksiyonel ve yapısal değişikliklere neden olmaktadır (Riihimaa 2002).

Hiperglisemi, diyabetik mikrovasküler hasarların gelişiminden ve ilerlemesinden sorumlu en büyük risk faktörü olarak bilinmektedir. Bu dokularda ve kan damarlarında enzimatik olmayan glikasyon, poliyol yolağı ve protein kinaz-C yolaklarını aktive ederek buralarda yapısal ve fonksiyonel değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 2.3) (Riihimaa 2002, Moreno ve Fuster 2004, Noh ve King 2007). Hiperglisemik koşullar, periferel sinirlere, retina ve böbreklere ait mikrovasküler damarların kan akışında ve kasılmalarında değişiklikler meydana getirmektedir (Setter vd. 2003).

Bu bulguların yanı sıra, poliyol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktaz konsantrasyonunun, böbrek medullasında, siyatik sinirlerde ve lens dokusunda daha yüksek olması nedeni ile hiperglisemi bu dokularda diyabetik nefropati, diyabetik nöropati, diyabetik retinopati ve katarak oluşumuna neden olmaktadır (Tanimoto vd. 1998).



Şekil 2.3 Hiperglisemi aracılığıyla başlatılan metabolik yollar ve neden oldukları hastalıklar: AGEs, Poliyol yolağı ve PKC yolağı; Nefropati, Retinopati ve Nöropati (Riihimaa 2002)

Kapillerde bazal membran kalınlaşması ve ekstravasküler matriksin aşırı büyümesi, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların ortak özellikleridir. Yüksek plazma glukoz seviyesi ile doku hasarı arasındaki ilişki, dokularda ileri glikasyon ürünlerinin oluşumu ve birikimine bağlı olmaktadır (Wautier ve Guillausseau 2001). Ayrıca, hücre içi glukoz seviyesinin artmasını, protein kinaz C enzimi de aktive etmektedir. PKC yolağının aktivasyonu sonucu hücre fonksiyonlarında değişiklikler meydana gelmektedir (King vd. 2005).

2.2.2.1 Diyabetik retinopati ve katarakt

Retinal dokuları besleyen kan damarlarının hasar görmesi sonucu diyabetik retinopati gelişmektedir. Bu hasarların daha da ilerlemesi durumunda körlük oluşabilmektedir (Chibber vd. 2007). Diyabetik retinopati, periferel retina ve makulayı etkilemesi sonucu oluşan bir mikrovasküler hastalıktır (Cade 2008). Ayrıca, yükselen Glukoz nedeniyle aktivitesi artan aldoz redüktaz enzimi lens dokusunda opaklaşmaya neden olarak diyabetik katarak oluşumunda önemli rol oynamaktadır (Kubo vd. 2004, Kyselova vd. 2004).

Diyabetik retinopatinin erken dönemlerinde saptanan en önemli morfolojik değişiklik, mikrovasküler endotel hücrelerin dış yüzeyini örten damarların kasılıp gevşemesine neden olan retinal perisitlerin kaybıdır (Miwa vd. 2003). Diyabetik retinopatinin gelişiminin temelinde kapiller tıkanma, sızıntı ve yeni kan damarların oluşumu yer almaktadır. Buna göre diyabetik retinopati, non-proliferative diyabetik retinopati (NPDR) ve proliferative diyabetik retinopati (PDR) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Bhatwadekar ve Stitt 2007, Yam ve Kwok 2007). NPDR evresinde; kan-retinal bariyer fonksiyonunun kaybına neden olan kapiller geçirgenliğin artması, kapiller bazal membran kalınlaşması ve perisitlerin kaybı görülmektedir. PDR evresinde ise iskemi ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) artışı nedeniyle yeni kan damarlarının oluşumu ardından bu damarların fonksiyon kaybı ve makular ödem sonucu görüş kaybı yer almaktadır (Bhatwadekar ve Stitt 2007).

Diyabetik retinopatinin gelişimi ve diğer mikrovasküler komplikasyonların oluşumunda hipergliseminin şiddeti ve süresi önemli rol oynamaktadır (Fowler 2008). Hiperglisemi nedeniyle bazal membran kalınlaşması, perisit kaybı ve retinal kapiller geçirgenliğinde değişiklikler olmaktadır (Cai vd. 2002, Yamagishi vd. 2005). Bununla beraber, kanda glikoz düzeyinin yükselmesi, kapiller tıkanmaya katkısı olan fibronektin, kollajen tip I, II, IV ve V gibi bazal membran bileşiklerinin artışına neden olmaktadır. Deneysel diyabetik sıçanların retinalarında, hipergliseminin, fibronektin ve kollajen tip-IV sentezini arttırdığı gösterilmiştir (Cai vd. 2002).

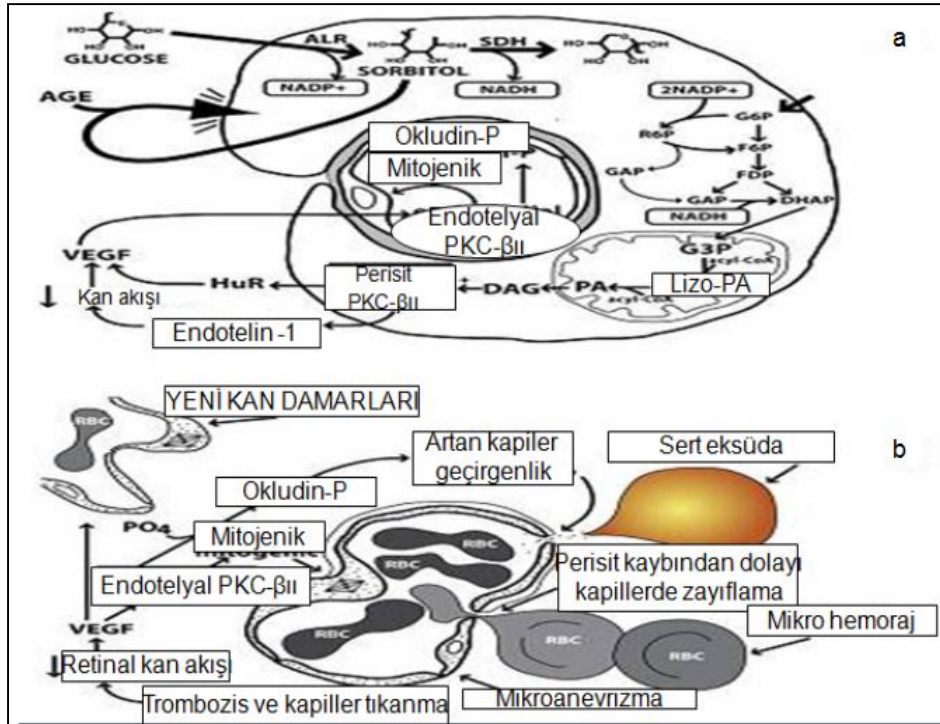
Ayrıca, VEGF, TGF- β gibi büyüme faktörlerinin diyabetik retinopati gelişiminde önemli rollerinin olduğu kabul edilmektedir. VEGF sentezinin baskılandığı hayvan modellerinde retinopati gelişiminin yavaşladığı gösterilmiştir (Fowler 2008).

Retinal kapillerin bozulmasında poliyol yolağının etkili olduğu bilinmektedir. Poliyol yolağı, perisit ve endotel fonksiyonlarında bozukluklara neden olmaktadır. Hiperglisemide, perisit fazında aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz, glikozu sırasıyla sorbitole ve fruktoza çevirmektedir (Olmos vd. 2009). Oluşan sorbitol, hidrofobik özelliktedir, hücre zarından kolayca diffüze olamaz. Bu nedenle hücre içinde

birikerek osmotik stres oluşturmaktadır. Aldoz redüktaz enziminin, retinal ganglion hücreler, müller glial hücreler, vasküler perisitler ve endotelyal hücrelerde bulunması ve poliyol yolağı sonucu oluşan osmotik stres, bu hücrelerde hasarlara neden olmaktadır (Lorenzi 2007).

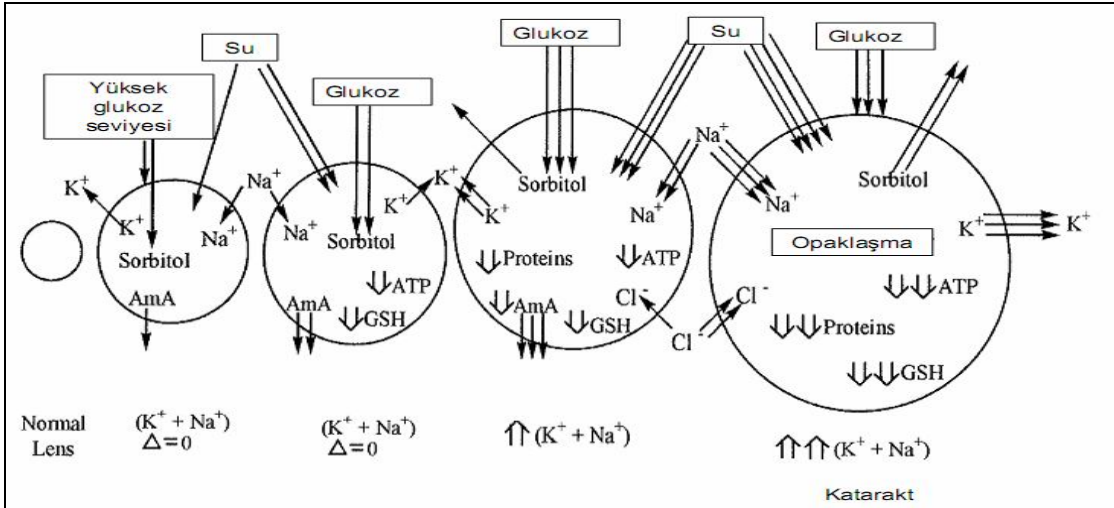
Bununla birlikte sorbitol birikimi, mikroanevrizmaların (kapillerde meydana gelen kese şeklindeki genişleme) oluşumu, bazal membran kalınlaşması ve perisit kaybıyla yakından ilişkilidir (Fong vd. 2004, Fowler 2008). Ayrıca yüksek glikoz konsantrasyonu, enzimatik olmayan glikasyon yolağını da aktive etmektedir (Fowler 2008). Bu yolla oluşan ileri glikasyon ürünlerinin de mikroanevrizma oluşumuna ve perisit kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Fowler 2008).

Bununla beraber perisit fazında poliyol yolağında oluşan NADP ve NADH kofaktörleri, glikolizi diaçilgliserolün *de novo* sentezine doğru kaydırmaktadır. Diaçilgliserol tarafından aktive edilen perisit-PKC- β_{II} ise retinal kan akışını azaltan endotelin-1 molekülünün ifadesini arttırmaktadır. Bununla beraber, VEGF'nin sentezi de artmaktadır. Aynı zamanda hem sorbitolün, hem de ileri glikasyon ürünlerinin birikimi, perisitlerde toksik etki yaratarak kaybına neden olmaktadır (Şekil 2.4.a). Endotelin fazında ise, retinal kapiller duvarda perisitlerin fonksiyon kaybı nedeniyle meydana gelen harabiyet, kapillerlerin yan kısmında, küçük baloncuklar oluşturmaktadır. Bu durum, pıhtılaşma oluşumuna katkıda bulunarak retinal iskeminin daha da ilerlemesine sebep olmaktadır. Oluşan bu iskemik durum, endotelyal PKC- β_{II} 'yi aktive eden VEGF'in sentezini uyarmaktadır. VEGF ise, oldukça hassas yapıda olan yeni kan damarlarının oluşumunu sağlamaktadır ve vitreous içine giren bu damarlar kırılarak kanlanmaya neden olmaktadır (Şekil 2.4.b) (Chan vd. 2007, Olmos vd. 2009). Ayrıca VEGF, endotelyal hücre büyümesinde, kan-retinal bariyerin bozulmasında ve retinal ödem oluşumunda oldukça etkilidir (Zhang vd. 2009).



Poliyol yolağının ilk enzimi olan AR'ın aktivasyonu sonucu, hücre içinde biriken sorbitol, osmolariteyi arttırarak lens içine su akışının artmasına neden olmaktadır. Bununla beraber, hücrenin zar geçirgenliği ve sodyum miktarı artmakta ve potasyum seviyesi azalmaktadır. Bu durum, katarakt oluşumuna neden olan (Şekil 2.5) glutatyon, miyoinositol ve amino asitlerin kaybına ve aynı zamanda, lensin elektrolit dengesinin bozulmasına sebep olmaktadır (Burg ve Kador 1988, O'Donnell ve Efron 1998, Kyselova vd. 2004, Mansour 2007). Transgenik farelerin lenslerinde, AR ın sentezinin artması, enzimin katarakt oluşumunda önemli rol oynadığını doğrulamaktadır (Murata vd. 2001).

Poliyol yolağının aktivasyonu sonucu, hücrede NADPH konsantrasyonunun azalması, glutatyon redüktaz enziminin aktivitesini azalmakta ve bu nedenle antioksidan savunma sistemi baskılanarak lens dokusunda oksidatif stres meydana gelmektedir (Kubo vd. 1999). Epitel hücrelerinde meydana gelen oksidatif stres ve peroksidasyon sonucu oluşan toksik aldehytler, lens proteinlerinin zarar görmesine ve opaklaşmaya neden olmaktadır. Bir AR inhibitörü olan genisteinin, hücresel GSH düzeyini arttırarak bu durumu düzelttiği bildirilmiştir (Kim vd. 2008).



Şekil 2.5 Katarakt oluşumu (Kyselova vd. 2004)

AmA: Amino asit, GSH: İndirgenmiş glutatyon, Δ : K ve Na toplamındaki net değişim, $\uparrow$: Normal artış, $\uparrow\uparrow$: Aşırı artış, $\downarrow$: normal azalma, $\downarrow\downarrow$: Aşırı azalma.

2.2.2.2 Diyabetik nefropati

Diyabetik nefropati, böbreği besleyen mikrovasküler damar sisteminde meydana gelen hasarlar sonucu oluşmaktadır. Bu hasarların ilerlemesi durumunda böbrek yetmezliği gelişmektedir (Dunlop 2000, Lehmann ve Schleicher 2000).

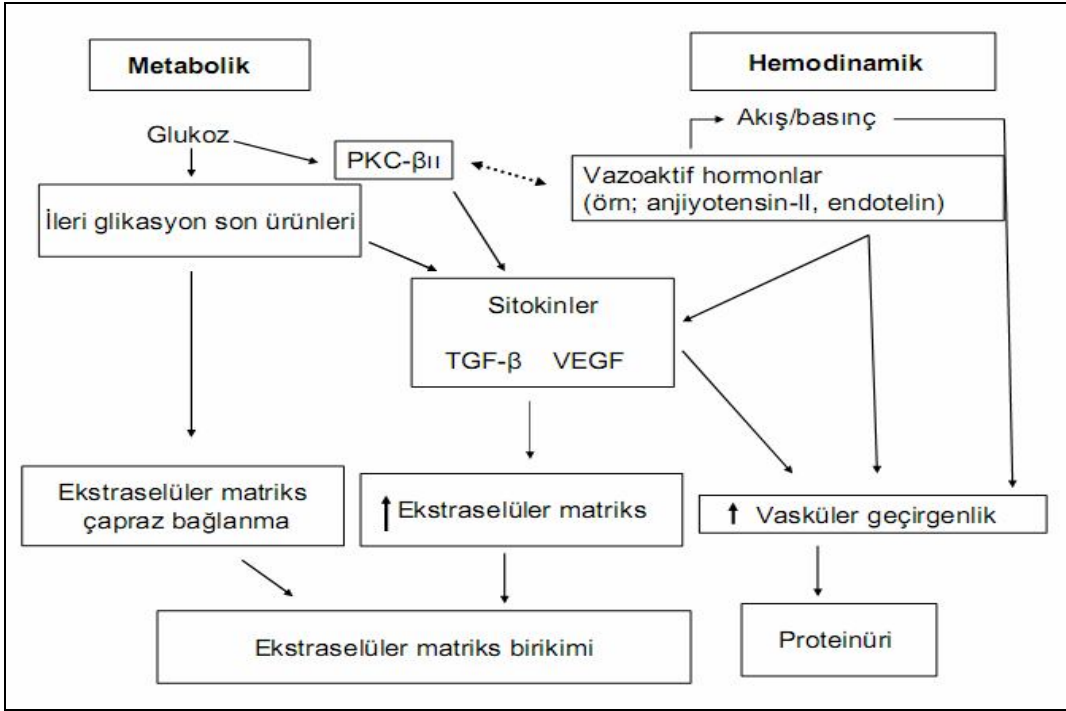
Morfolojik açıdan diyabetik nefropatinin gelişimi, glomerüler fonksiyonla ilişkisi olan mezanjial matriks genişlemesi ve glomerular bazal membran kalınlaşmasıyla karakterize edilmektedir (Lehmann ve Schleicher 2000).

Bu değişiklikler glomerüler filtrasyon hızında (GFH) azalmaya ve proteinüri de artışa neden olmaktadır (Wiwanitkit 2007a, Doi vd. 2008).

Diyabetik nefropatinin gelişmesi ve ilerlemesinde, hiperglisemi aracılığıyla aktive edilen poliyol yolağı, PKC yolağı, enzimatik olmayan glikasyon ve oksidatif stres yolları etkili olmaktadır (Kikkawa vd. 2003). Bunlar, glomerular kapillerde ve Bowman kapsülünde bazal membran kalınlaşmasına ve ECM sentezine neden olmaktadır. Bu durumda, glomerüller kapillere düşen mezanjial hücrelerin hacmi artar, kapiller yüzey alanı azalır ve sonunda GFH azalarak glomerüloskleroz oluşturur. Ayrıca, filtrasyon alanında ve nefron kitlesindeki azalma, geri kalan nefronlarda kapiller akımı arttırarak kapiller geçirgenliği yükseltmektedir. Bunların sonucunda, proteinüri ve albuminüri görülmekte ve son dönem böbrek yetmezliği (end-stage renal disease) geliştirmektedir (Kurt vd. 2004).

Hiperglisemi, ileri glikasyon yolağını aktive ederek AGE ürünlerinin oluşumuna, böbreklerde birikmesine ve renal fonksiyonların bozulmasına sebep olmaktadır (Cooper 1998). Bu ürünler vasküler geçirgenliği artmasını, büyüme faktörlerin ve sitokinlerin sentezlenmesini sağlamaktadır (Lehmann and Schleicher 2000). Bununla beraber, AGE oluşumu, kollajen IV ve laminin gibi önemli matriks bileşenlerinin fonksiyonel özelliklerini de değiştirmektedir (Agardh vd. 2002). *In vitro* ortamda glukoz tarafından

uyarılan prosklerotik sitokin olan TGF- β , AGE oluşumu ve hemodinamik faktörlerden anjiyotensin II ve endotelin gibi vazoaaktif hormonlar diyabetik nefropatinin gelişiminde rol oynamaktadırlar. TGF- β , diyabetik böbreklerde hemodinamik ve metabolik faktörler tarafından uyarılarak ekstraselüler matriks birikimine neden olduğu bilinmektedir (Şekil 2.6), (Cooper 1998).



Şekil 2.6 Diyabetik nefropati gelişiminde metabolik ve hemodinamik faktörler arasında etkileşim (Cooper 1998)

Bu çalışmalarda, anjiyotensin II ve AGE oluşumunu engelleyen bileşiklerin, TGF- β ve kollajen IV gibi matriks proteinlerinin sentezini azalttığı, renal ve vasküler yaralanmaları da en aza indirdiği gösterilmektedir. Bir AGE inhibitörü olan aminogüadinin, böbreklerde AGE ürünlerinin birikimini azaltmakla beraber albuminüri ve mezanjial genişlemenin gelişimini geciktirmektedir (Cooper 1998, Cooper vd. 1998).

Artan glukoz konsantrasyonu mezanjial hücrelerde PKC yolağını aktive etmektedir. PKC, TGF- β 1'nin sentezini arttırarak ECM birikimine yol açan kollajen miktarının artmasına neden olmaktadır (Lehmann ve Schleicher 2000). Hiperglisemi nedeniyle

renal mezanjial ve proksimal tübül hücrelerinde biriken sorbitol hücre içi miyoinositol seviyesini değiştirmekte ve Na/K ATPaz aktivitesini azaltmaktadır (Dunlop 2000).

Bir aldoz redüktaz inhibitörü olan epalrestatin, sorbitol birikimini engellediği gibi AGE ürünlerinin oluşumuna da azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, PKC- β_2 'nin izoformlarını inhibe eden LY333531 isimli bileşiğin hiperfiltrasyon ve albuminüri gibi renal fonksiyonların gelişimini engellediği gösterilmiştir (Cooper vd. 1998).

Heksozamin yolağının aşırı aktivasyonu, PAI-1 ve TGF- β aracılığıyla ekstrasellüler matriks çoğalmasına neden olmaktadır. Ayrıca, kültüre edilmiş mezanjial hücrelerde O-GlcNAc artışı, hücrelerin aşırı büyümesine neden olmaktadır (Degrell vd. 2009).

2.2.2.3 Diyabetik nöropati

Diyabetik nöropatinin tanımı için, başka bir rahatsızlığı olmayan diyabetli hastalarda periferik fonksiyon sinir kaybına ait belirtilerin ve/ veya semptomların görülmesi yeterli olmaktadır (Fowler 2008).

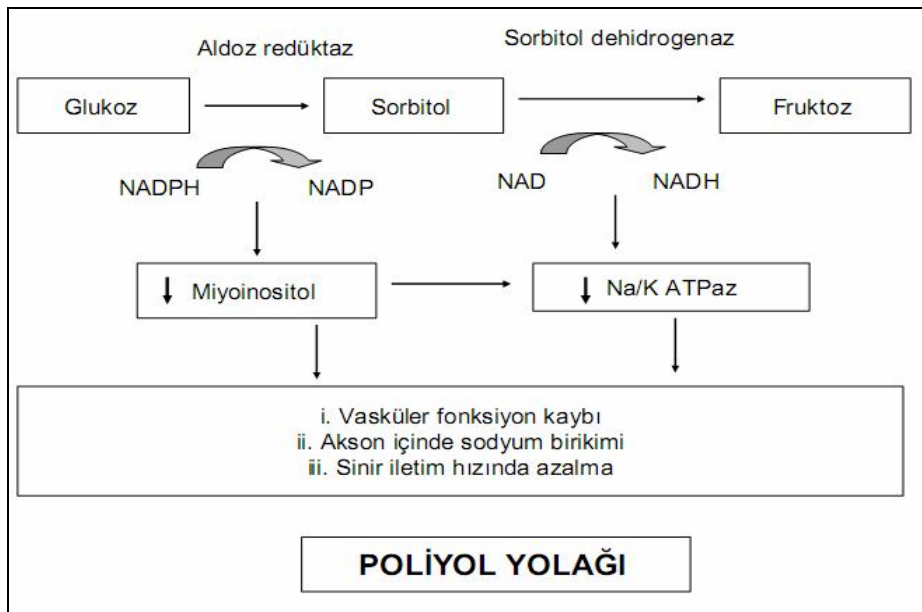
Bu hastalığın patolojisi, ağrı, duyu kaybı, hastalıklara duyarlılık gibi klinik belirtiler veren sinir kayıpları ile karakterize edilmektedir (Yagihashi vd. 2007). Bununla birlikte diyabetik nöropati, ayak ülseri ve gangrenine ve ani ölümlere neden olabilmektedir (Hotta vd. 2001).

Hiperglisemi, diyabetik nöropatinin gelişimi ve ilerlemesinde, diğer mikrovasküler hastalıklarda olduğu gibi anahtar rol oynamaktadır. Biyokimyasal yolların, hücrenin metabolik ve/ veya redoks durumu ile yakından ilişkili olduğu bilinmektedir. Buna göre, daha önce de belirtildiği gibi nöropatinin gelişmesinde de poliyol, heksozamin, PKC izoformlarının aktivasyonu ve enzimatik olmayan glikasyon yolları önemli rol oynamaktadır. Diyabetik nöropatinin gelişimine, hiperglisemi nedeniyle hem sinir hücrelerinde meydana gelen hasarlar, hem de bu sinirleri besleyen damarlardaki kan

akışında ortaya çıkan azalmalar sonucu oluşan nöral iskeminin yol açtığı düşünülmektedir (Edwards vd. 2008).

Hipergliseminin seviyesi ve süresi, mikrovasküler bir hastalık olan diyabetik nöropatinin gelişiminde önemli bir faktördür (Tesfaye vd. 2005). Bu durumda, sinirleri besleyen kan damarlarında hasarlar oluşmakta, sinir yenilenmesinde bozulma, shwann hücrelerinde anormallikler ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi görülmektedir (Lincoln ve Shotton 2008).

Artan glukoz konsantrasyonu nedeniyle aktive olan poliyol yolağı, hücre içinde fruktoz ve sorbitol birikimine yol açmaktadır. Bu durum, sodyum ile beraber hücre içine taşınan miyoinozitolün hücredeki konsantrasyonunu azaltmaktadır (Şekil 2.7). Böylece, miyoinozitolün metaboliti olan fosfoinozid seviyesindeki azalma sinyal yolağının bozulmasına neden olur. Ayrıca, Na/ K ATPaz aktivitesi azalır ve sinir hücrelerinde iletim hızı yavaşlar (Podwall ve Gooch 2004). Bunlara ilaveten, poliyol yolağındaki NADPH miktarındaki azalma, bir vazodilatör olan NO konsantrasyonunun düşmesine ve sinirleri besleyen kan akışının bozulmasına yol açmaktadır (Bhadada vd. 2001).



Şekil 2.7 Poliyol yolağının sinir hücresi üzerine etkisi (Bhadada vd. 2001)

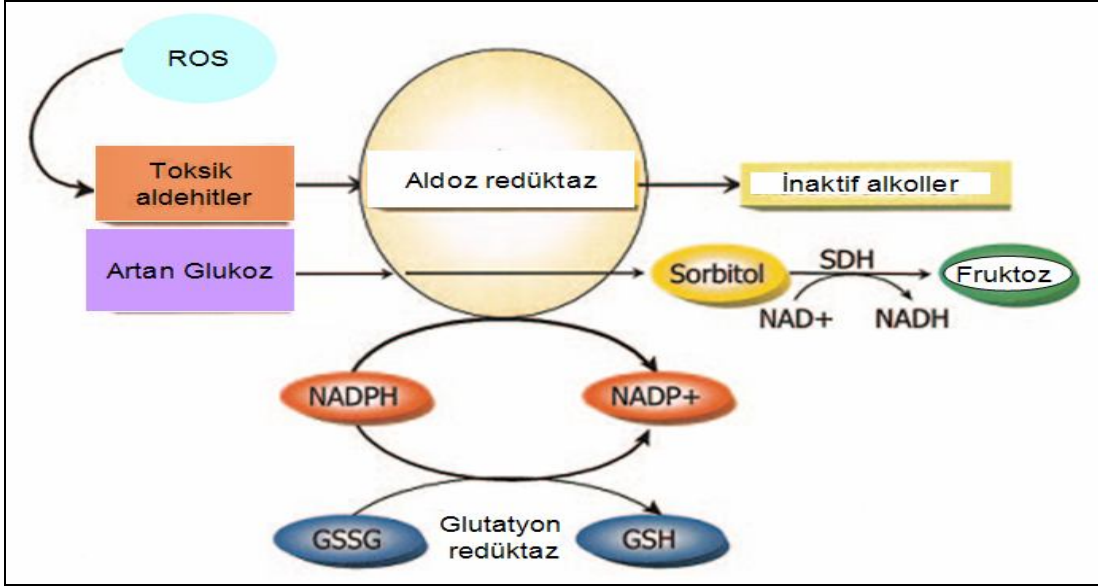
Protein kinaz-C yolağının aktivasyonu, damarların daralmasına ve kapiller geçirgenliğini değiştirerek, hipoksiye (dokularda oksijen oranının azalması), anjiogeneze (yeni kan damarlarının oluşumu), bazal membran kalınlaşmasına ve endotel hücre artışına neden olabilmektedir. Bunlar nörovasküler kan akışındaki değişikliklere yol açmaktadır. Diyabetik nöropatinin PKC yolağı ile olan ilişkisi, deneysel olarak streptozotozin ile diyabet oluşturulan sıçanlarla yapılan çalışma ile desteklenmiştir. Buna göre, PKC inhibisyonu, hem siyatik sinire kan akışını hem de sinir iletim hızını normale döndürmektedir (Edwards vd. 2008).

İleri glikasyon yolağı ile oluşan AGE ürünleri, periferel sinirlerde ve bu sinirlerin çevresinde birikerek aksonal taşınmayı ve diğer önemli fonksiyonları bozabilmektedir. Ayrıca, DCCT (Diabetes Control and Complications Trial)'nin sonuçları, diyabetik nöropatinin engellenmesinde glisemik kontrolün önemini vurgulamaktadır (Siemionow vd. 2007). Bununla beraber, miyelin proteinlerinin glikasyonunun, sinir iletimindeki bozukluklara yol açtığı bildirilmiştir (Bhadada vd. 2001).

2.3 Diyabete Bağlı Hasarların Mekanizmaları

2.3.1 Poliyol yolağı

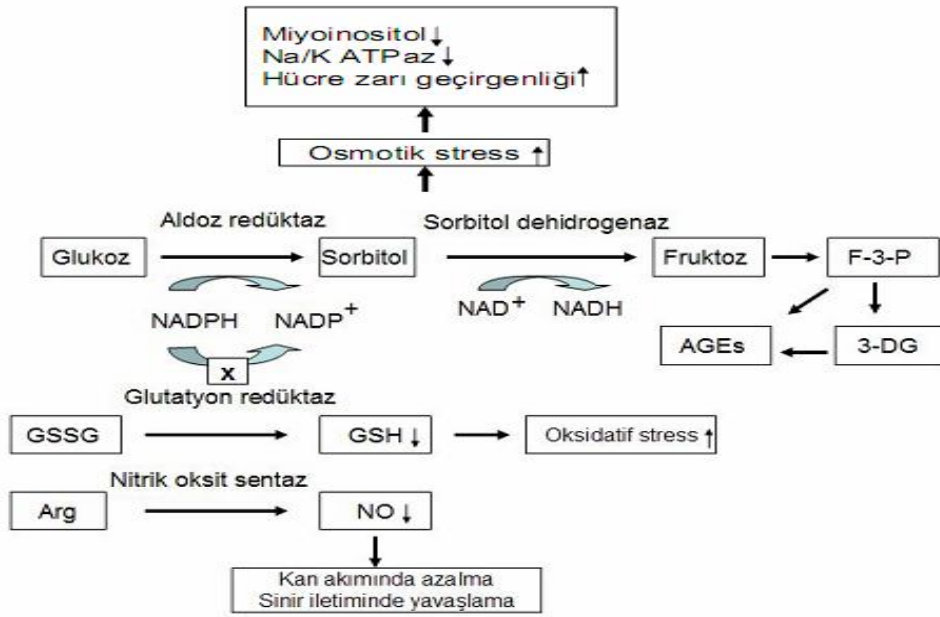
Poliyol yolağı, diyabetik komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Kao vd. 1999). Bu yolağın hız-sınırlayıcı enzimi olan aldoz redüktaz, normalde toksik yapıdaki aldehitleri, inaktif alkollere indirgemektedir (Şekil 2.8) (Brownlee 2005). Normal koşullar altında, glikolitik yolda glukoz molekülü, glukoz için yüksek afiniteye sahip olan heksokinaz enzimi tarafından fosforillenerek glukoz 6-fosfata (G-6-P) metabolize edilmektedir. Bu koşullarda AR enziminin glukoz için afinitesi çok düşük olduğundan, fosforilize olmamış glukozun yaklaşık % 3'ü poliyol yolağına katılarak sorbitole ve fruktoza metabolize olmaktadır. Oluşan sorbitol böbreklerde osmotik regülasyonu, fruktoz ise seminal vezikülerde sperm hücrelerinin enerji ihtiyacını karşılamaktadır (Yabe-Nishimura 1998, Balasubramanyam vd. 2002, Kumar ve Reddy 2007).



Şekil 2.8 Hiperglisemi poliyol yolağının aktivasyonunu arttırmaktadır (Brownlee 2005)

Hiperglisemide, insüliniden bağımsız olan dokulardaki (retina, böbrek, sinir hücreleri, vasküler endotelyal hücreler) yüksek glukoz konsantrasyonu, poliyol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktazın aktivitesini arttırmaktadır (Chan vd. 2000, Gugliucci 2000, Setter vd. 2003). Bu koşullarda, heksokinaz enzimi doygunluğa ulaştığı için toplam glukozun %33'ü poliyol yolağı ile metabolize olmaktadır (Yabe-Nishimura 1998, Balasubramanyam vd. 2002).

Poliyol yolağı, hız-sınırlayıcı bir enzim olan aldoz redüktaz ve sorbitol dehidrogenaz (SDH) enzimlerinden oluşmaktadır (Gleissner vd. 2007). İnsüliniden bağımsız olan dokulardaki glukoz konsantrasyonunun artmasıyla aktive olan poliyol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktaz, NADPH dan aldığı elektronları glukozu aktararak, glukozun sorbitole indirgenmesini sağlamaktadır. Sorbitol ise, SDH aracılığı ile, (NAD kofaktörünün indirgenmesiyle) fruktoza okside olmaktadır (Şekil 2.9). Bir alkol ürünü olan ve hidrofilik özellik taşıyan sorbitol, hücre zarından kolayca geçemediği için hücre içinde birikerek osmotik strese neden olmaktadır (Lorenzi 2007).



Şekil 2.9 Poliylol yolağının aktivasyonu

Bu durum, renal mezanjial ve proksimal tübül hücrelerinde, miyoinozitol seviyesini değiştirmekte ve Na/K ATPaz aktivitesini azaltmaktadır (Dunlop 2000). Öte yandan, poliylol birikimi, oküler lenslerde hiperosmotik şişmeye ve katarak oluşumuna neden olan aminoasit, glutasyon ve miyoinozitolun hücre içerisine geçişini kolaylaştıran hücre zarı deformasyonlarına yol açmaktadır (Yabe-Nishimura 1998).

Poliylol yolağının ikinci ürünü olan fruktoz, 3-fosfofruktoza ve sonra da 3-deoksiglukozona yıkılmaktadır. Her iki bileşik de, ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumunda görev alırlar (Lorenzi 2007).

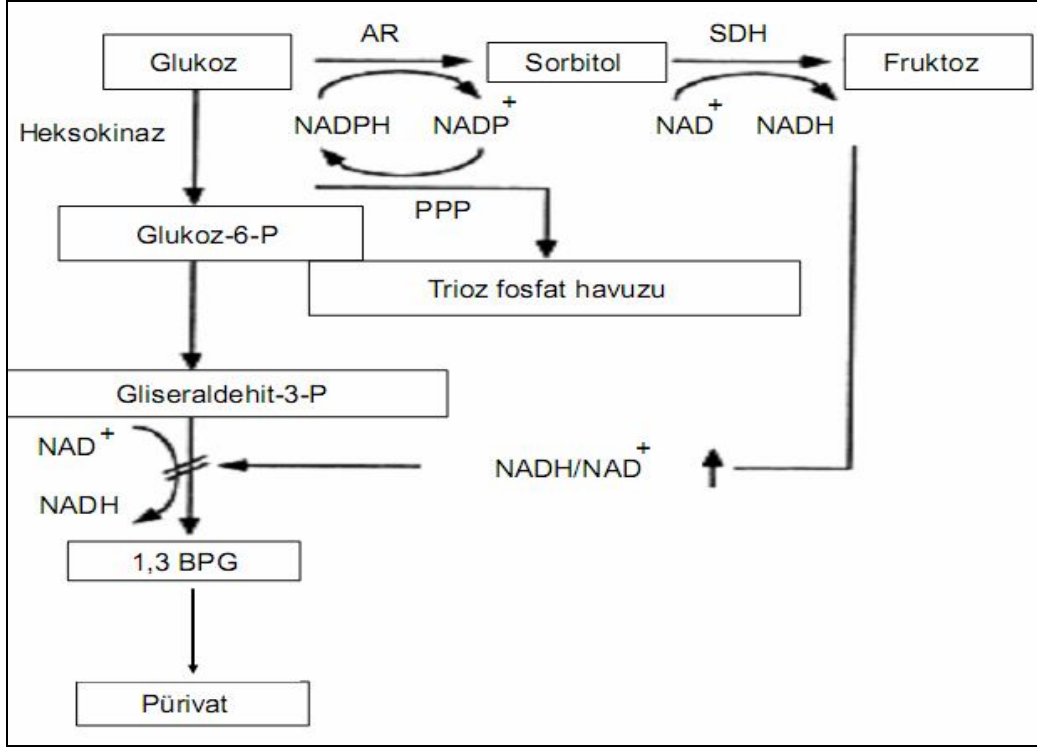
Sorbitol dehidrogenaz enzimi tarafından oluşturulan fruktoz, *in vitro* ortamda enzimatik reaksiyonlarla 3-fosfofruktoza dönüştürüldükten sonra, bu molekülün hidroliziyle yeniden 3-deoksiglukozona (3-DG) çevrilmektedir. Bu sonuç, 3-deoksiglukozonun poliylol yolağı ile oluşabildiğini göstermektedir (Tsukushi vd. 1999). Glukozun, sorbitole indirgenmesi sırasında proton vericisi olarak görev alan NADPH'ın kullanılması, NADPH/NADP⁺ oranının azalmasına neden olmaktadır (Morrissey vd. 1999).

Antioksidan savunma sisteminde görev yapan glutatyonun (GSH) indirgenmesini sağlayan glutatyon redüktaz (GR) NADPH'e ihtiyaç duymaktadır. Diğer yandan, poliyol yolağında da NADPH'in kullanılması, glutatyon redüktaz aktivitesinin azalmasına ve hücrede oksidatif stresin birikmesine neden olmaktadır (Bravi vd. 1997, Yabe-Nishimura 1998).

NADPH'in bir diğer görevi ise, arjininden nitrik oksit sentaz enzimi (NOS) aracılığı ile nitrik oksit oluşumunda indirgen ajan olarak kullanılmasıdır. Yukarıda sözünü ettiğimiz etkenler nedeni ile hücrenin NADPH havuzunun boşalması, bir vazodilatör olan NO sentezini azalttığı için damarlarda kan akışının azalmasına ve sinirlerde iletim hızının yavaşlamasına neden olmaktadır (Yabe-Nishimura 1998, Chan vd. 2000, Gugliucci 2000).

Sorbitolün fruktoza oksidasyonu sırasında oluşan NADH ise diyabetik dokularda yalancı hipoksiye neden olmaktadır (Dunlop 2000). Bununla beraber artan NADH, hücre içi oksidan türlerinin artmasına neden olan NADH oksidaz enzimi tarafından substrat olarak kullanılmaktadır (Lorenzi 2007). Ayrıca, hücre içindeki NADH/NAD⁺ oranındaki artış, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enziminin de aktivitesini inhibe ederek gliseraldehit-3-P konsantrasyonunu arttırdığı gibi NADP miktarındaki artış ise pentoz fosfat yolağını aktive etmektedir (Şekil 2.10) ve böylece hücrede trioz fosfatların seviyesi artmaktadır (Dunlop 2000, Setter vd. 2003). Konsantrasyonu artan trioz fosfatlar ise bir AGE öncülü olan metilglioksal ve PKC aktivasyonunu sağlayan DAG oluşumunu arttırmaktadır (Dunlop 2000, Setter vd. 2003).

Köpekler ile yapılan çalışmalar, AR inhibisyonunun diyabetik retinopati veya retinadaki ve böbreklerdeki kapiller bazal membran kalınlaşmasını engellediğini göstermektedir. Ayrıca, AR inhibitörü olan zenarestat sinir iletim hızını olumlu yönde etkilemektedir (Setter vd. 2003).

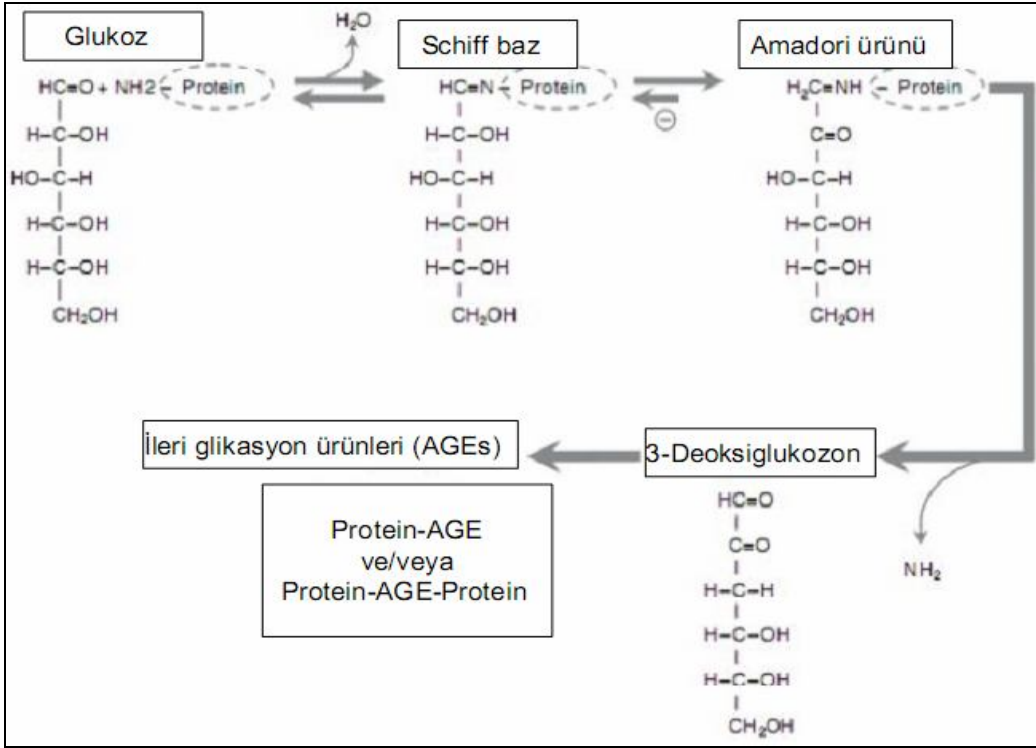


Şekil 2.10 Poliyol yolağının pentoz fosfat ve glikoliz yolağına olan etkisi (Dunlop 2000)

2.3.2 İleri glikasyon son ürünlerinin oluşumu (AGEs)

Enzimatik olmayan glikasyon yolağı sonucu oluşan ürünler proteinlere zarar vererek hücresel fonksiyonların kaybına neden olmaktadır (Szwergold vd. 2002). Proteinler, lipitler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin serbest amino grupları ile indirgenmiş şekerlerin karbonil grupları arasında enzimatik olmayan reaksiyon sonucu schiff bazları oluşmaktadır (Peppas vd. 2003). Stabil olmayan bu bazlar, kendi kendilerine yeniden düzenlenerek ketoamin ve fruktozamin gibi amadori ürünlerini meydana (Şekil 2.11) getirmektedirler (Dawnay ve Millar 1996). En iyi tanımlanmış amadori ürünü, HbA1c molekülüdür (Magalhães vd. 2008).

Bu ürünler daha sonra dehidrasyon ve yeniden düzenlenme tepkimeleri ile 3-DG gibi reaktif dikarbonil bileşiklerini oluştururlar (Tsukushi vd. 1999).



Şekil 2.11 İleri glikasyon son ürünlerinin (AGEs) oluşumu (Magalhães vd. 2008)

Oluşan 3-DG, proteinler ile tekrar reaksiyona girerek imidazolon, pirlalin, insanlarda kimyasal açıdan en iyi şekilde karakterize edilen pentozidin ve N-karboksimetillizin (CML) gibi ileri glikasyon son ürünlerini oluştururlar (Tsukushi vd. 1999, Goh ve Cooper 2008). CML, RAGE bağlanabilen bir AGE ürünü olup, güçlü bir vasküler hücre adezyon molekül (VCAM-1) uyarıcısıdır (Wautier ve Guillausseau 2001). Bununla beraber, reaktif yapıda olan 3-DG, glioksal ve metilglioksal gibi dikarbonil bileşikler, proteinlerin amino gruplarıyla reaksiyona girerek AGEs ürünlerinin oluşuma neden olmaktadır (Gleissner vd. 2007).

Hiperglisemi ve değişen glukoz metabolizması, metilglioksal gibi reaktif aldehytlerin aşırı miktarda oluşmasına neden olmaktadır. Yüksek derecede elektrofilik özellikte olan bu aldehytler, proteinlerin lizin, arjinin ve sistein amino asitlerinin sülfhidril (-SH) veya amino (-NH₂) gruplarıyla enzimatik olmayan reaksiyon sonucu AGEs ürünlerini meydana getirmektedirler (Han vd. 2009).

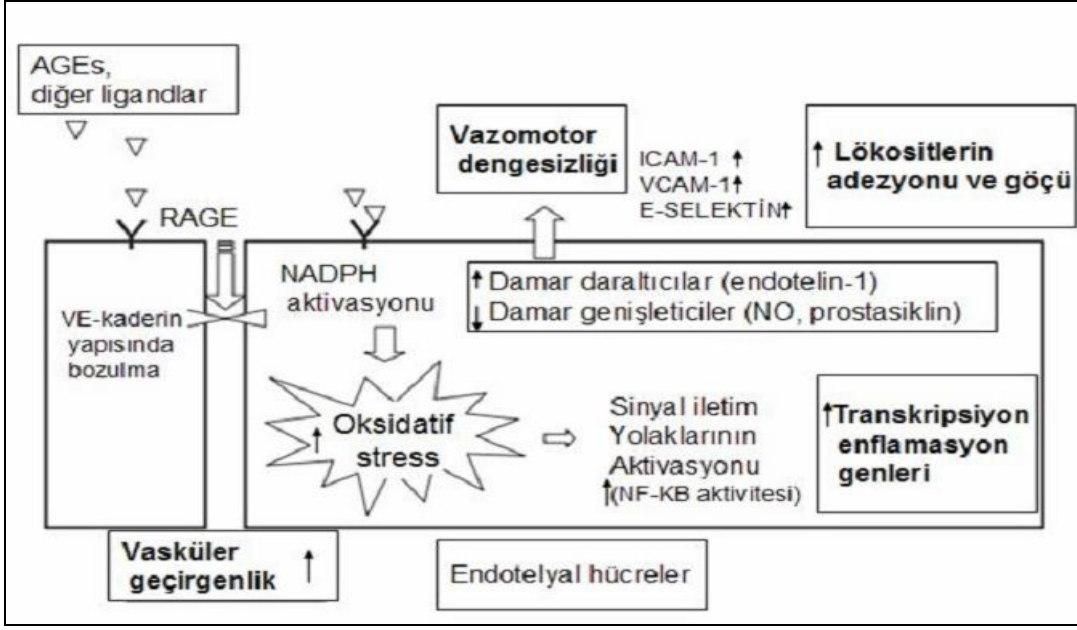
Ayrıca, AGEs ürünleri, diyetle alınan reaktif AGE öncülleri aracılığıyla da artmaktadır. Örneğin, yüksek ısıda pişirilen yemekler (ızgara, kızartma) bu ürünlerin miktarını arttırırken, düşük ısıda ve kısa süreli pişirilen yemeklerde ise AGEs ürünlerinin çok az miktarda oluştuğu bildirilmiştir (Huebschmann vd. 2006).

AGEs öncüllerinin hücre içindeki oluşumları üç genel mekanizma ile hedef hücrelere zarar vermektedir;

- 1- Hücre içindeki protein glikasyonu proteinlerin fonksiyonunu değiştirmektedir.
- 2- Bu öncüller tarafından değişikliğe uğratılan ECM'de fonksiyon kayıpları meydana gelmektedir.
- 3- AGEs öncüllerinin tarafından değişikliğe uğratılan plazma proteinleri makrofaj, endotelial, mezanjial, düz kas, lenfosit, monosit ve nöron hücreleri gibi AGE reseptörü taşıyan hücrelere bağlanmaktadır. Bu şekilde aktive edilen reaktif oksijen türleri (ROS) NF- κ B'nin, sitokinlerin ve hormonların sentezini sağlayan ilgili genlerin ifade edilmesini sağlamaktadır (Nishikawa vd. 2000, Setter vd. 2003).

AGE-RAGE bağlanması, hücrelerde NF- κ B'nin aktivasyonunu sağlayarak endotelin-1, hücre içi adezyon molekülü (ICAM), VCAM, TNF- α , interleokinler (ILs) ve E-selektin gibi farklı proteinlerin transkripsiyonunun artmasına, NO ve prostasiklin gibi damar gevşetici bileşiklerin azalmasına neden olmaktadır (Şekil 2.12). RAGE uyarımı, NADPH oksidaz enzimini aktive ederek oksidatif stresi arttırmaktadır (Rojas ve Morales 2004, Meerwaldt vd. 2009).

In vitro ve *in vivo* çalışmalar, AGEs ürünlerinin, tip-IV kollajen, laminin, fibronectin gibi yapısal matriks proteinleriyle geri dönüşümsüz çapraz bağlar yaptığını göstermektedir (Wautier ve Guillausseau 2001).



Şekil 2.12 RAGE-AGEs ilişkisinin endotelial hücreler üzerine etkisi (Rojas ve Morales 2004)

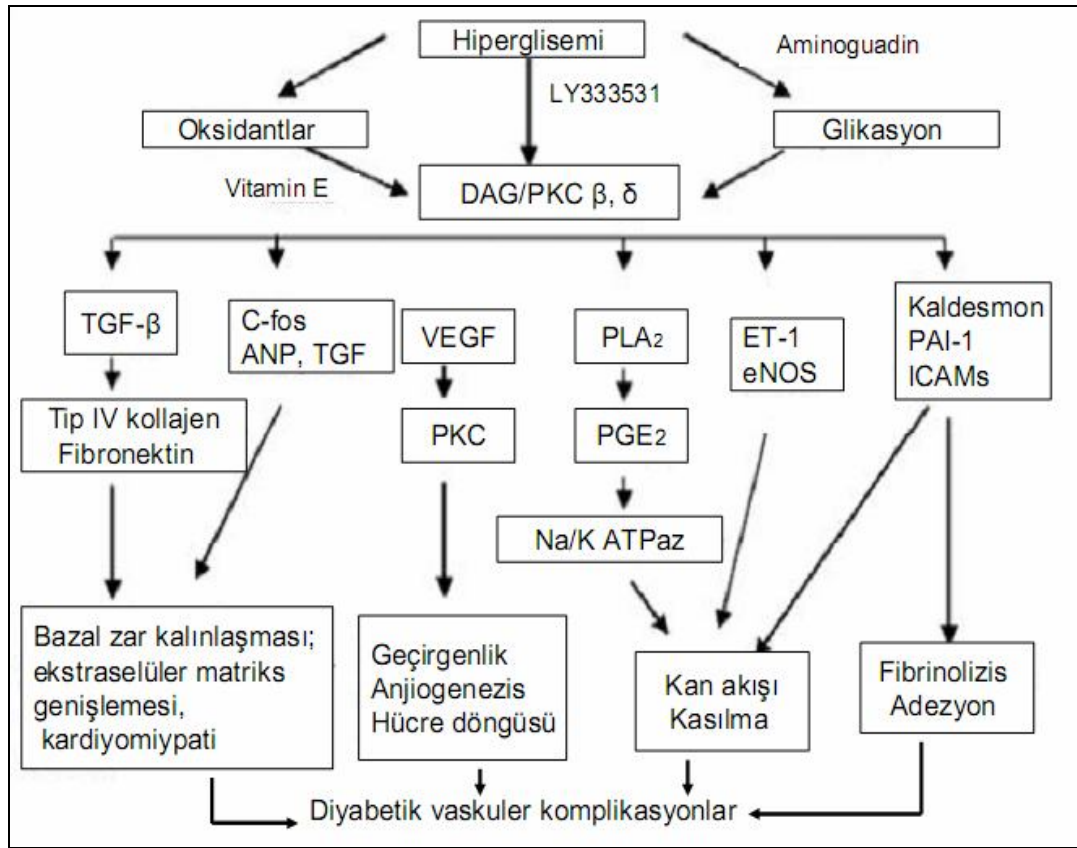
Proteinler üzerindeki bu yapısal değişimler bazal membran kalınlaşmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, proteoglikanların ileri glikasyonu, elektronegatif yüklerde değişiklikler oluşturarak bazal membranın seçici filtrasyon özelliklerini değiştirmektedir (Wautier ve Guillausseau 2001). Ayrıca, tip-I ve IV kollajen, matriks proteinleri, düşük yoğunluklu lipoproteinler, fibrin ve kristalin gibi proteinler ile AGE ürünlerinin etkileşimi, diyabetik nöropati, retinopati, nefropati, katarakt ve Alzheimer gibi hastalıklara neden olabilmektedir (Molnar 2006).

Ekstrasellüler matriks üzerindeki AGEs oluşumu sadece matriks-matriks arasındaki etkileşimi değil, aynı zamanda matriks-hücre arasındaki etkileşime de zarar vermektedir. AGE ürünlerinin tip-IV kollajene bağlanması endotelial hücre adezyonunu azaltırken, laminin proteinine bağlanması, aksonların gelişimini engellemektedir (Brownlee 2001). Tip-1 kollajen ve elastin ile AGEs ürünlerinin çapraz bağ yapması kan damarlarının sertleşmesine neden olmaktadır (Goh ve Cooper 2008). Bu ürünlerin inhibisyonunu sağlayan aminoguanidin, diyabetik sıçanlarda retinopati ve nefropatinin düzelmesini, damar esnekliğinin ise yeniden kazanılmasını sağlamaktadır (Huebschmann vd. 2006). Vitamin B6 türevli pridoksamin, protein-amadori ara

ürünlerinin protein-AGE kompleksine dönüşümünü engellemektedir (Goh ve Cooper 2008).

2.3.3 Protein kinaz-C yolağı

Protein kinaz C nin aktivasyonu, hiperglisemi ile ilişkili olan vasküler hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Skljarevski vd. 2007). PKC aktivasyonu ile kan akımındaki değişiklikler, bazal membran kalınlaşması, ECM genişlemesi, vasküler geçirgenlik, anjiyogenezis, hücre büyümesi ve Na/KATPaz, cPLA₂, MAPK gibi enzimlerin aktivitesindeki artış, (Şekil 2.13) diyabetik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Daş-Evcimen ve King 2007).



Şekil 2.13 PKC aktivasyonu ve diyabetik vasküler komplikasyonlar arasındaki ilişki (Daş-Evcimen ve King 2007)

Protein kinaz C ailesi 12 izoformdan oluşmaktadır. Bunlar, kalsiyum veya DAG bağlayan bölgelerinin varlığına göre üç farklı alt aileye ayrılmaktadır (Carpenter vd. 2004, McGettrick vd. 2006, Noh ve King 2007, Timmers vd. 2008, Roffey vd. 2009).

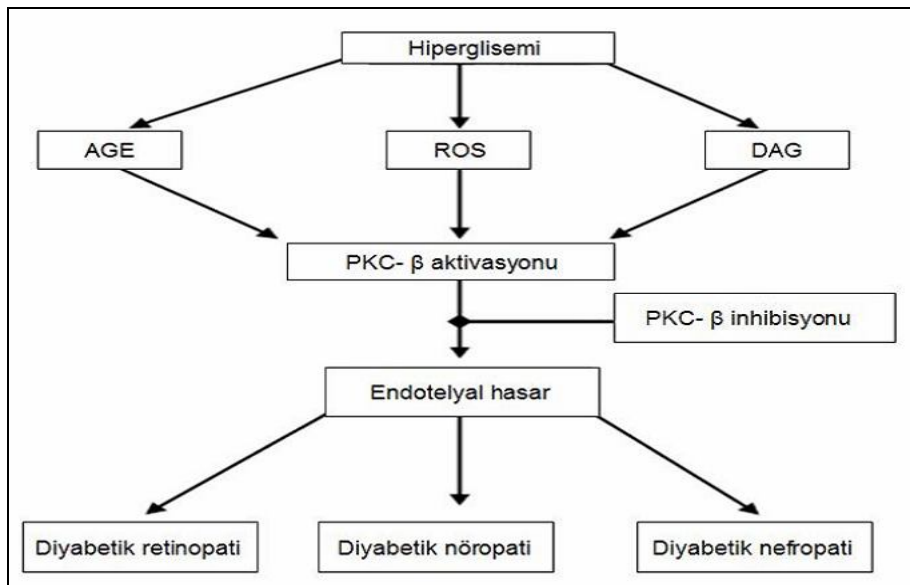
1- Geleneksel (klasik) PKC (α , β , γ): Kalsiyum ve DAG'a ihtiyaç duyarlar.

2- Yeni PKC (δ , ϵ , η ve θ): Kalsiyumdan bağımsız olup, DAG tarafından düzenlenmektedirler.

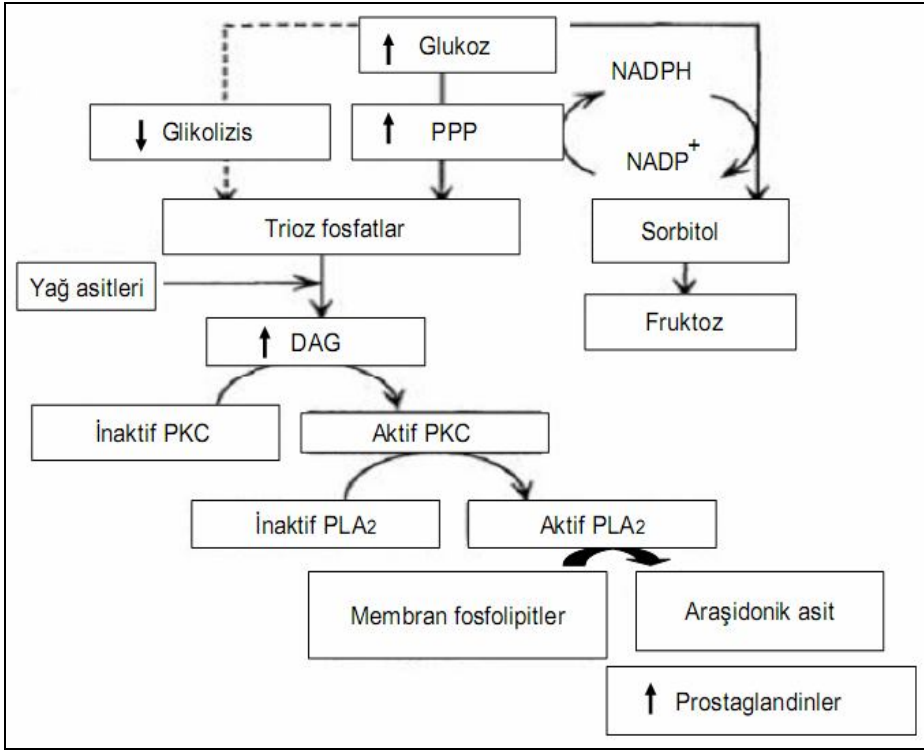
3- Tipik olmayan PKC (ζ , ι ve λ): Kalsiyum ve DAG tarafından aktive olmazlar.

DAG, çeşitli protein kinaz-C izoformlarının aktivitesinde anahtar rol oynamaktadır. Diyabetik hayvanların ve diyabetli insanların retina, kalp, glomerül, karaciğer ve aort gibi dokularında DAG aktivitesinin arttığı görülmektedir (Setter vd. 2003).

Bununla beraber, PKC- β izoformunun DAG seviyesindeki değişikliklere duyarlı olduğu bilinmektedir. Hiperglisemide, PKC- β izoformları çeşitli vasküler dokularda (retina, aort, kalp, böbrek, beyin) artmaktadır (Şekil 2.14). Bu nedenle PKC- β , diyabetik mikrovasküler hastalıkların tedavisinde inhibe edilmektedir (Setter vd. 2003).



Şekil 2.14 PKC- β ve diyabetik komplikasyonlar (Setter vd. 2003)



Şekil 2.15 DAG ve prostaglandin arasındaki ilişki (Keogh vd. 1997)

2.3.4 Heksozamin yolağı

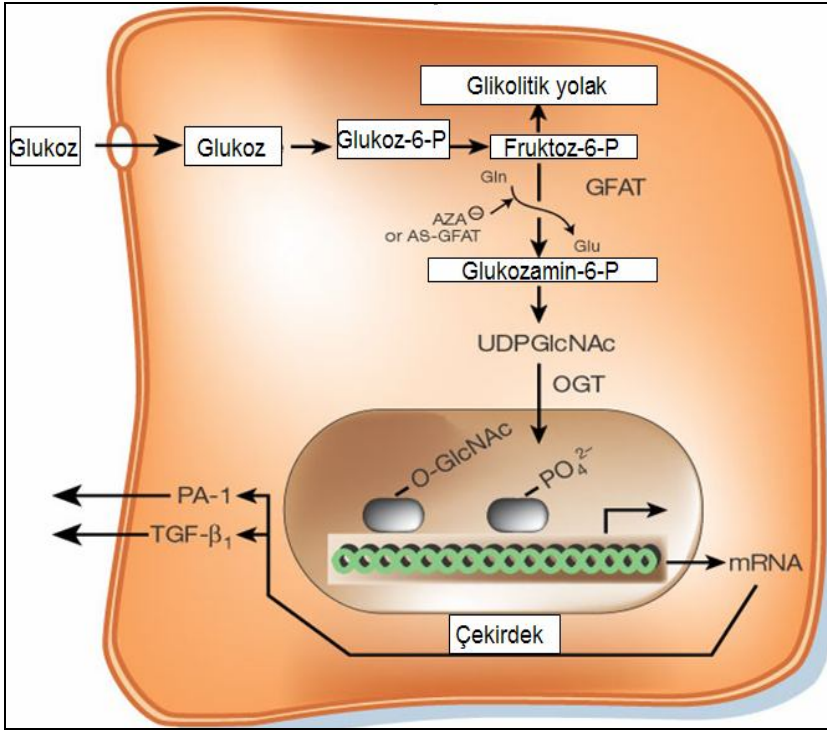
Yüksek seviyedeki glukoz miktarının, hücre metabolizması üzerindeki yan etkileri heksoz amin yolağı ile de oluşmaktadır (Singh vd. 2001). Daha önce de belirtildiği gibi, normal fizyolojik koşullar altında glukozun yaklaşık %3 kadarı heksoz amin yolağına katılmaktadır (Balasubramanyam vd. 2002). Bu yolağın ilk ve hız-sınırlayıcı enzimi olan glutamin: fruktoz-6-fosfat aminotransferaz (GFAT), glutaminden F-6-P'a amido grubunu transfer ederek, glukozamin-6-P (GlcN-6-P) oluşmaktadır. GlcN-6-P ise daha sonra bir seri enzimatik reaksiyon ile uridin-5'-difosfat-N-asetilglukozamine (UDP-GlcNAc) çevrilmiştir. Bu molekül, O-N-asetilglukozamintransferaz (O-GlcNAc transferaz) enzimi tarafından, hücre içindeki proteinlerin serin ve threonin kalıntılarına bir şeker verici olarak kullanılmaktadır (Yki-Jarvinen vd. 1997, Andreezzi vd. 2004). Yani, UDP-GlcNAc molekülü proteoglikanların, glikolipitlerin sentezi ve ekstraselüler matriks proteinlerin N- ve O- uçundan glikazilasyonu için uygun bir substrattır (Goldberg vd. 2002).

Glukoz konsantrasyonunun artması nedeniyle heksozamin yolağının aşırı aktive olması, iskelet kaslarındaki IRS-1 ve IRS-2 proteinlerinin O-glikazilasyonu artmaktadır. Bu durumda, IRS proteinlerindeki tirozin kalıntılarının fosforilasyonunu azaltması sonucu glukoz taşıyıcıları için insülin direnci oluşturmaktadır (Patti vd. 1999, Andreozzi vd. 2004).

GFAT'nın aşırı sentezi, omurgalılarda glukoz taşıyıcıların translokasyonunu ve transkripsiyonunu etkileyerek insülin direnci gibi pek çok fizyolojik özellikleri değiştirmektedir (Hanover 2001). GFAT enzimi karaciğer, adipoz doku, düz kas hücreleri, iskelet kası, böbrek ve endotelial hücrelerde bulunmaktadır. Heksozamin biyosentezindeki artış, insuline duyarlı dokularda (iskelet kası, adipoz doku) glukoz kullanımını bozmaktadır (Wu vd. 2001).

Transkripsiyon faktörlerinin O-glikazilasyonu, genlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (James vd. 2002). Heksozamin yolağı aracılığıyla Sp-1 gibi transkripsiyonel faktörlerin artan modifikasyonu sonucu TGF- β_1 ve PAI-1 ifadesinde artışa neden olmaktadır (Şekil 2.16). Mezanjial hücrelerde meydana gelen bu durum, matriks proteinlerinin artmasına sebep olmaktadır (Singh vd. 2004, Brownlee 2005).

Transgenik farelerin iskelet kası ve yağ dokularındaki GFAT enziminin yüksek oranda sentezlenmesi, bu hayvanlarda insülin direncini geliştirdiği bildirilmiştir (Singh ve Crook 2000). Hiperglisemi ile uyarılan GFAT enziminin aktivitesi sığır aortik endotelial hücrelerde, PAI-1 ve TGF- β_1 transkripsiyonu ile yakından ilişkilidir ve bu etki bir GFAT inhibitörü olan azoserin ile inhibe olmaktadır (Gleissner vd. 2007).



Şekil 2.16 Hiperglisemi artan heksoz amin yolağı (Brownlee 2005)

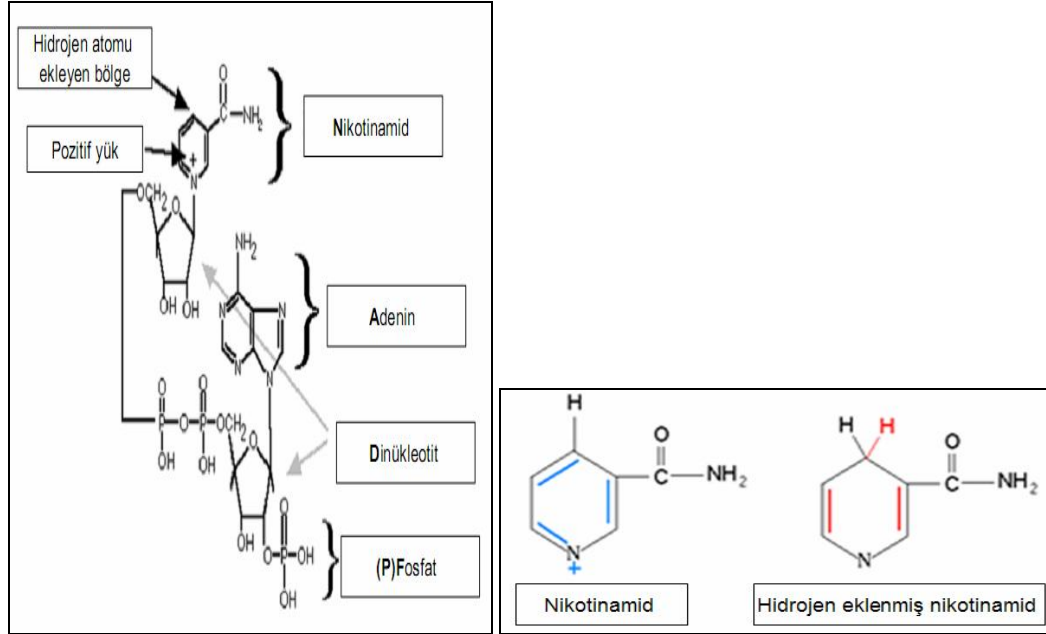
2.4 Aldoz Redüktaz Enziminin Tanımı ve Sınıflandırılması

2.4.1 Enzimin yapısı ve işlevi

Enzim komisyonu tarafından E.C. 1.1.1.21 kodu verilen aldoz redüktaz enzimi, aldo-keto redüktaz süper ailesinin bir üyesi olarak, indirgenmiş formdaki NADPH'ı kullanarak alifatik ve aromatik yapıdaki aldehytleri, monosakkaritleri, streoidleri, polisiklik aromatik hidrokarbonları ve isoflavonoidleri katalize etmektedir. AR, yaklaşık 36 kDa ağırlığında olup, 315 aminoasit dizisinden oluşan, hücre sitozolünde yer alan monomerik yapıda bir enzimdir (Kumar ve Reddy 2007).

Aldoz redüktaz enziminin kofaktör olarak kullandığı NADP, iki nükleotitin bir fosfoanhidrit bağıyla birleşmesi sonucu oluşmaktadır. Bu nükleotitlerden birisine bağlı bulunan nikotinamit halkası dördüncü karbonundaki hidrojen atomunu substrata

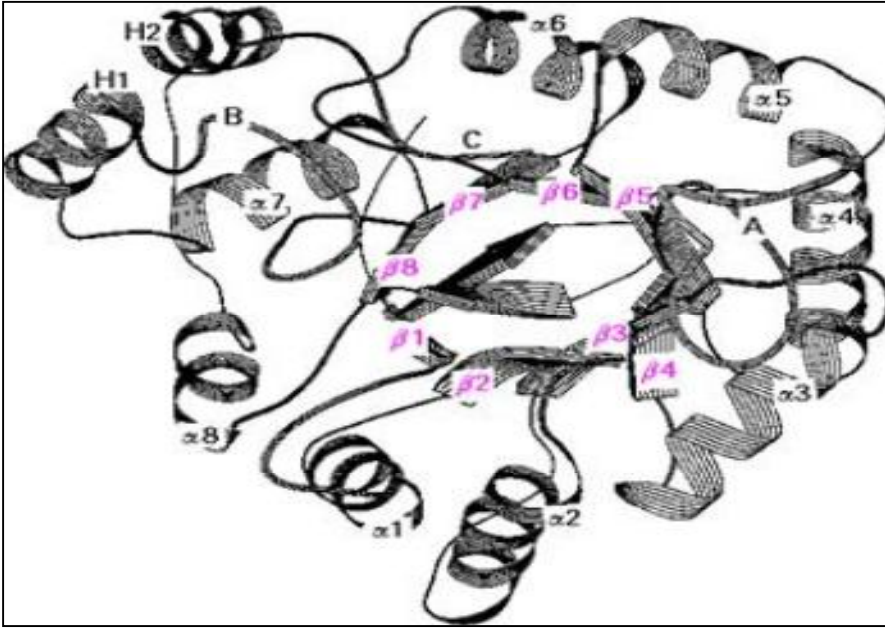
vermesiyle kofaktör okside forma geçerken, tekrar kendi üzerine almasıyla indirgen forma geçmektedir (Şekil 2.17), (Nelson ve Cox 2005).



Şekil 2.17 Kofaktörün yapısı ve nikotinamid halkası
(www.bio.davidson.edu/Courses/Bio111/NADPH.html 2009)

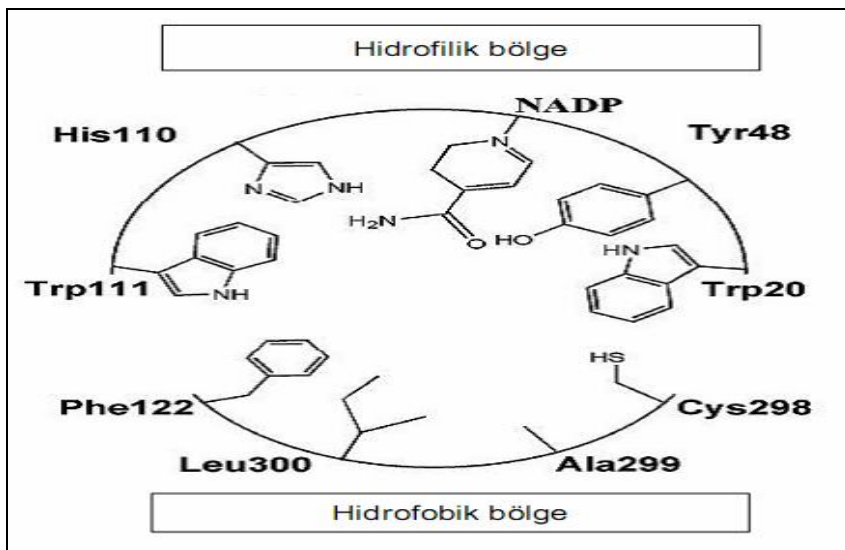
Tüm aldo-keto redüktaz süper ailesi gibi bu enzim de α/β fiçı modelindedir. Bu modelin merkezinde uc uca eklenmiş olan sekiz beta zincirinin etrafını, sekiz alfa heliksin sarmasıyla $(\alpha/\beta)_8$ fiçı yapısı oluşmaktadır. Ayrıca, H1- α -helix, H2- α -helix, ilmek A, B (esnek, flexible) ve C yapıları da modele eşlik etmektedir (Şekil 2.18), (Jez vd. 1997, Bohren vd. 2005). AR işlevinde, H2- α -heliks, ilmek B ve C yapılarının önemli rolleri vardır. H2- α -heliks, C₃₀₃₋₃₀₅ ilmeğini sabitlerken, C ilmeği substratın aktif merkeze en uygun şekilde yerleşmesini ve enzimin optimum aktiviteyi göstermesini sağlamaktadır. B ilmeği ise, yaklaşık 17 Å kadar hareket ederek nükleotitin üzerine kapanır ve kofaktörün enzim içindeki kararlılığını arttırmaktadır (Bohren vd. 2005).

Enzimin beta fiçı yapısının karboksi-terminal ucunda yer alan 60Å genişliğinde ve 15Å derinliğinde olan aktif bölgesi, hidrofilik ve hidrofobik olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (Bohren vd. 1992, Kim vd. 2006).



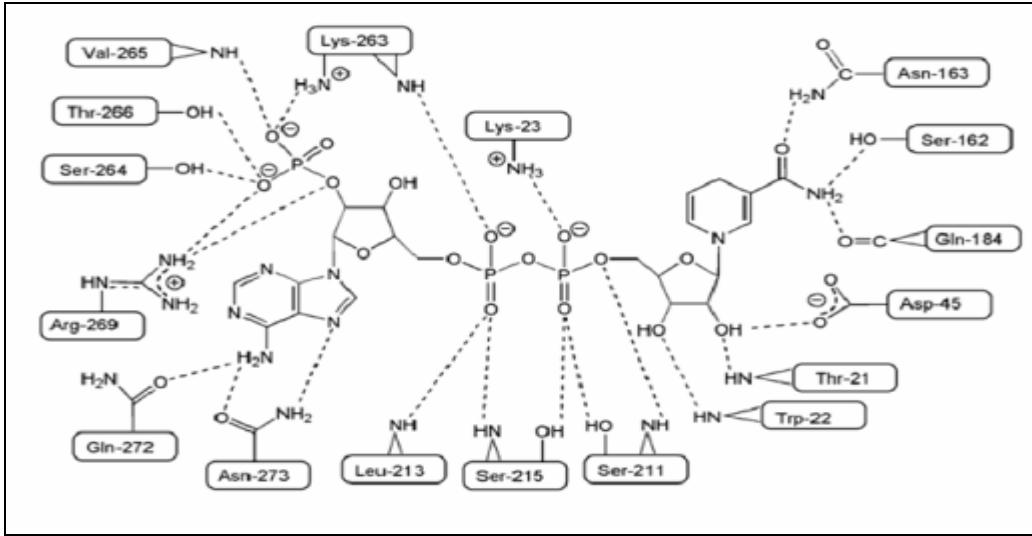
Şekil 2.18 Enzimin $(\alpha/\beta)_8$ fiçı modeli (Jez vd. 1997)

Hidrofilik kısımda, NADPH'in nikotinamit halkasının 4-pro-R hidrojeni ve 3 proton verici (Tyr, His, Trp) amino asitin yan grupları yer almaktadır. Hidrofobik kısımda ise, inhibitör ve/veya substratın aromatik halka yan gruplarıyla etkileşime girebilen Phe, Trp, Cys, Leu, Ala aminoasitlerinin yan grupları bulunmaktadır (Şekil 2.19), (Kim vd. 2006).



Şekil 2.19 Aldoz redüktaz enziminin aktif merkezi (Kim vd. 2006)

NADPH'in nikotinamit halkası aktif merkeze yerleşirken Gln184, Asn163, Ser162 kalıntılarının yan gruplarıyla hidrojen bağı kurar. Enzim ayrıca, adenzin-2'pifofsfat kısmı sayesinde Lys 263 ve Arg 269 (268) kalıntılarının yan gruplarıyla tuz köprüsü kurarak aktif merkezde kararlılığını arttırmaktadır (Şekil 2.20). Fosfat grubunun kurmuş olduğu bu tuz köprüleri, enzimin NADH yerine NADPH seçtiğini de açıklamaktadır (El-Kabbani vd. 1998).

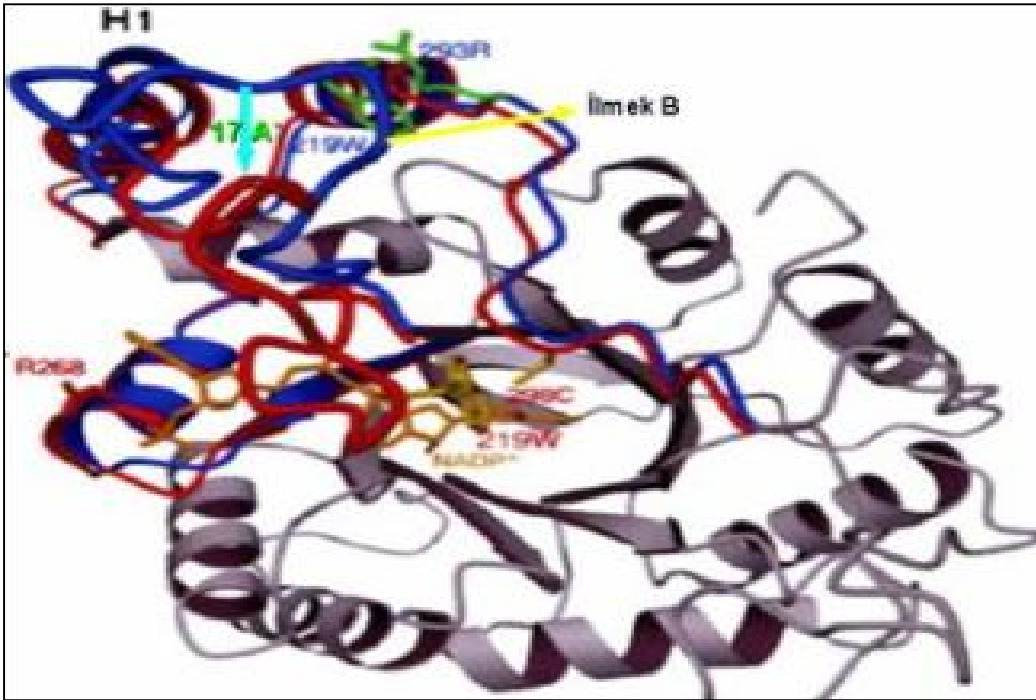


Şekil 2.20 Kofaktörün enzimin aktif merkeze yerleşmesi (El-Kabbani vd. 1998).

Kofaktörün bu şekilde aktif merkeze bağlanmasıyla, yedinci beta zinciri ile H1 α helix arasında yer alan B ilmeği katı bir formda yaklaşık 17A° kadar yer değiştirerek kofaktörün üzerine katlanır ve bu hareketi ile açık konformasyondan kapalı konformasyona geçer. İlmeğin katı formdaki hareketini,ilmek üzerinde yer alan Gln213, Ser214 ve Ser226 kalıntılarının psi ve phi açılarındaki değişiklikler sağlamaktadır (Bohren vd. 2005).

Ayrıca, bu kalıntılar birer menteşe görevi görerek ilmeğin yer değiştirmesine de izin vermektedirler (Bohren vd. 2005). Bu konformasyonel değişiklik, ilmeğin açık konformasyonunda yer alan Trp219 ile Arg 293 kalıntıları ve Cys298 (sülfür) ile Trp20 (aromatik halka) arasındaki hidojen bağlarının yıkılıp, kapalı konformasyonda Trp219 (aromatik halka) ile Cys298 (sülfür) arasındaki hidrojen bağlarının yeniden

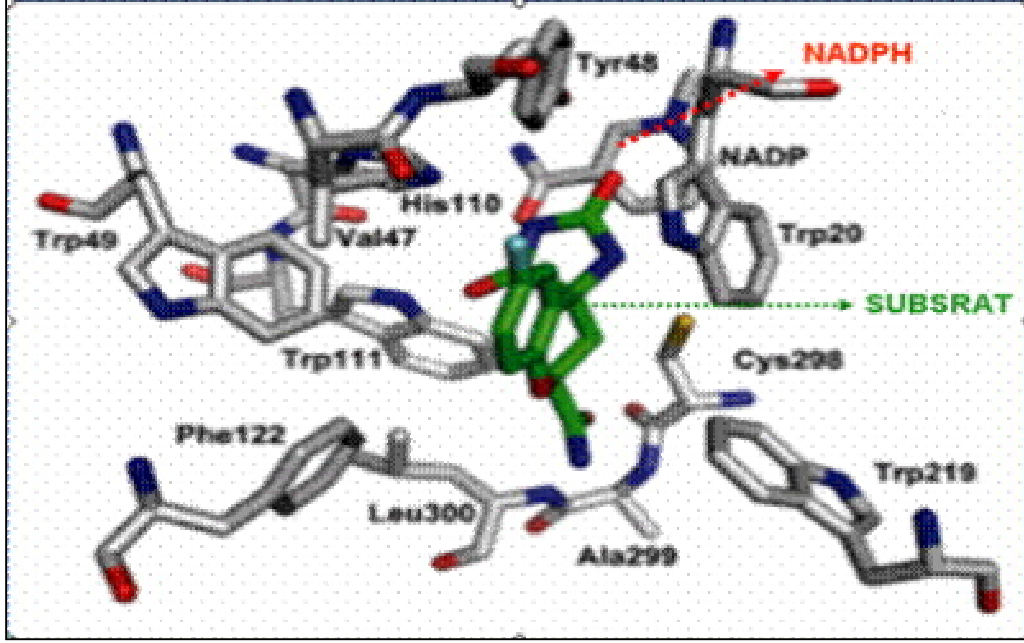
düzenlenmesini sağlamaktadır. İlmek B üzerinde bulunan Ser210 ve Ser214 kalıntıları nükleotitin pirofosforil kısmı ile hidrojen bağı kurarak kapalı konformasyonun kararlılığını arttırmaktadırlar (Şekil 2.21). Trp 219, Arg293, Cys298, Gln213, Arg 269, Ser214, Ser226 kalıntılarında, ilmeğin 214-219 kalıntıları ve C ilmeği üzerinde yapılan mutasyon çalışmaları, nükleotit kofaktörünün üzerine kapanan B ilmeğinin ve diğer kalıntıların optimum enzim aktivitesinde ne kadar önemli olduklarını göstermiştir (Bohren vd. 2005).



Şekil 2.21 İlmek B yapısının açık konformasyondan kapalı konformasyona geçişi (Bohren vd. 2005’den değiştirilerek alınmıştır)

Aldoz redüktazın aktif bölgesinde bulunan His113 aracılığıyla, substratın karbonil grubunun karbonuna kofaktörün nikotinamit halkasında yer alan 4-pro-R hidrojen transferi gerçekleşirken, nikotinamitin dördüncü karbonu ile Van der Waals etkileşimi kuran Tyr50’nin hidroksil grubundan substratın karbonil oksijenine proton transferi olmaktadır (Şekil 2.22). Bu transfer, Asp45 ile tuz köprüsü kuran Lys80’nin amonyum yan zinciri ile Tyr50’nin hidroksil grubu arasında hidrojen bağı oluşumu tarafından kolaylaştırılmaktadır (Bohren vd. 1994, El-Kabbani vd. 1998).

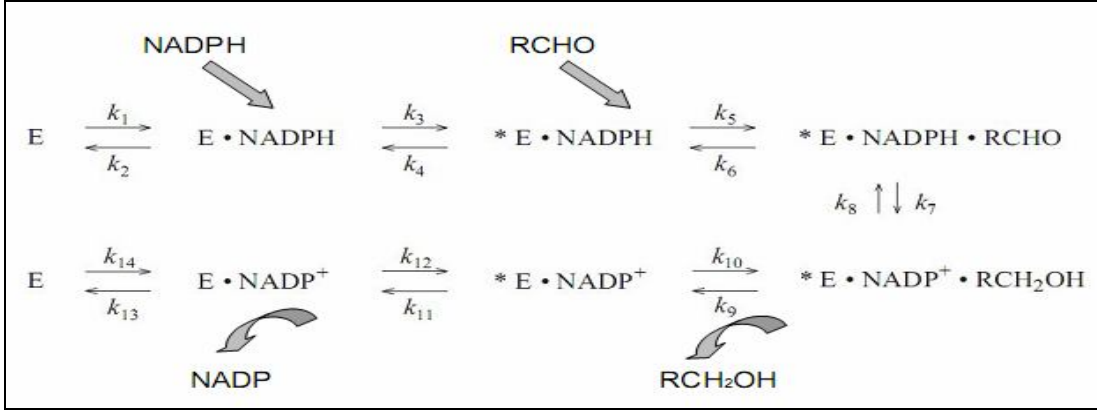
Bu şekilde aldehit yapıda bulunan substrat alkole çevrilirken, NADPH okside forma geçer. İlmeğin açık konformasyona geçmesiyle önce oluşan ürün, sonra koenzim yapıdan ayrılır.



Şekil 2.22 Substratın aktif merkeze yerleşmesi (Kim vd. 2006)

Kısaca, kofaktörün nikotinamit halkası ve adenosin-2'pirofosfat kısmıyla, enzimin aktif merkezine bağlanıp, ilmek B yapısının da kofaktör üzerine kapanmasıyla enzim-kofaktör ikili yapısı oluşmaktadır. Daha sonra bu yapıya substrat molekülü eklenir ve substratın karbonil grubunun karbonuna ve karbonil oksijenine sırasıyla nikotinamitin dördüncü karbonundan hidrojen transferi, tirozin amino asitinin de hidroksil grubundan proton transferi gerçekleşmektedir.

Böylece, aldehit yapıda bulunan substrat alkole indirgenirken, indirgen formdaki NADPH'da okside forma NADP geçmektedir. En son olarak ilmek B yapısının tekrar açık konformasyona geçişiyle yapıdan önce oluşan ürün sonra da okside formdaki kofaktör ayrılmaktadır (Şekil 2.23).



Şekil 2.23 Substratın alkole indirgenmesi, kofaktörün okside hale geçişi (Bohren vd. 2005'den değiştirilerek alındı)

2.4.2 Enzimin dokulardaki konsantrasyonu

Antijen-antikor etkileşmesine dayanan bir analiz yöntemi kullanılarak, insanın çeşitli dokularından izole edilen sitozolik aldoz redüktaz enzim konsantrasyonları, Çizelge 2.4'de yer almaktadır. Buna göre, enzim konsantrasyonunun en fazla böbrek medullasında, siyatik sinirlerde ve lensde olduğu gösterilmiştir (Tanimoto vd. 1998).

Enzim düzeylerinin, diyabetik komplikasyonların hedef dokularında daha yüksek olması, bu komplikasyonların oluşumundan aldoz redüktazın sorumlu olduğunu göstermektedir (Tanimoto vd. 1998).

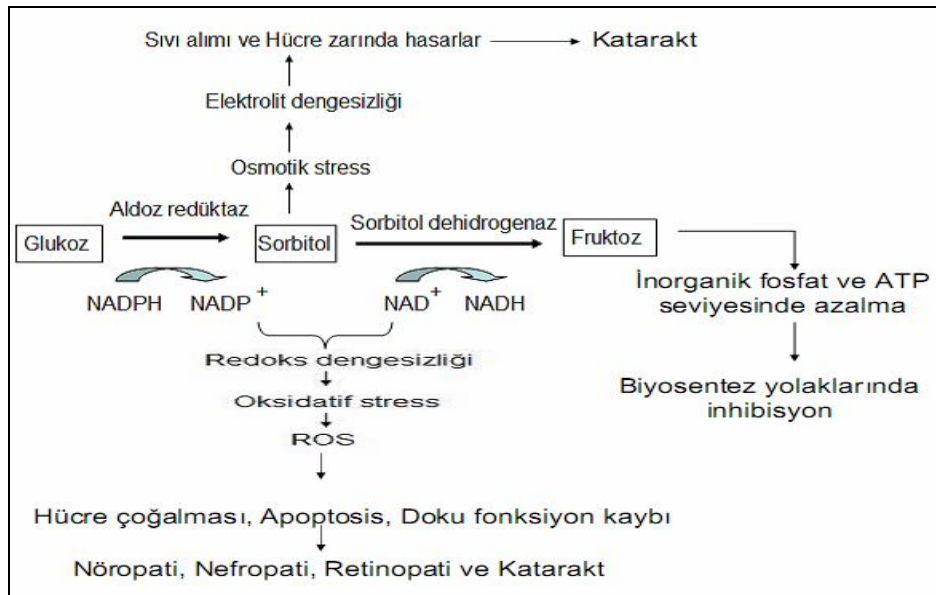
Çizelge 2.4 Enzimin insana ait dokulardaki konsantrasyonu (Tanimoto vd. 1998)

İnsan dokusu	Aldoz redüktaz	İnsan dokusu	Aldoz redüktaz
Organlar	(µg/mg protein)	Organlar	(µg/mg protein)
Böbrek medullası	29.3	Böbrek korteksi	0.7
Siyatik sinirler	5.1	Mide	0.7
Lens	2.8	Dalak	0.7
Testis	1.9	Akciğer	0.5
Kalp	1.7	İnce bağırsak	0.4
Kornea	1.4	Kolon	0.4
Karaciğer	0.8		

2.4.3 Aldoz redüktaz enziminin diyabetik komplikasyon oluşumuna etkileri

Glukozun, aldoz redüktaz enzimi tarafından artan kullanımı, diyabetik hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Chandra vd. 2002). Bu enzim glukozu, hücre zarından geçirgenliği düşük olan sorbitole çevirmektedir ve böylece sorbitol hücre içinde birikerek insüliniden bağımsız olan periferel sinir hücrelerine, retina ve böbrek dokusuna zarar vererek diyabetik komplikasyonların oluşumuna neden olmaktadır (Tanimoto vd. 1998, Nakano vd. 2003).

Artan AR aktivasyonu, hücre içinde belirli koenzimlerin (NADPH ve NADH) miktarını değiştirerek antioksidan savunma sistemine ait enzimlerin gen ifadesini engellemektedir. Bu durum hücrede oksidatif strese neden olmaktadır (Larkins ve Dunlop 1992, Hodgkinson vd. 2003). Bununla beraber, hücrede biriken sorbitol osmotik strese neden olarak doku hasarına yol açabildiği (Şekil 2.24) gibi, miyo-inositol miktarını da düşürerek fosfoinozitid sinyallerinin oluşumunu azaltmaktadır. Böylece sinir hücrelerinde iletim hızı yavaşlamakta ve diyabetik nöropati gibi diğer mikrovasküler komplikasyonlara da yol açabilmektedir (Larkins ve Dunlop 1992, Podwall ve Gooch 2004).



Şekil 2.24 Aldoz redüktazın diyabetik komplikasyonların oluşuma etkisi (Srivastava vd. 2005)

Hücre içinde artan glukoz, miyoinositolün hem glomerular hem de nöral sentezinin inhibisyonuna neden olmaktadır. Miyoinositol seviyesindeki bu azalma fosfoinositid metabolizmasını baskılayarak Na/K-ATPaz aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Clark ve Lee 1995). Ayrıca, AR aktivitesi belirgin bir şekilde diyabetik sıçanların böbreklerinde artmaktadır ve bir AR inhibitörü olan ponalrestat böbreklerdeki AR aktivitesini düşürmektedir (Soulis-Liparota vd. 1995).

Hiperglisemide artan sorbitol, hücre içinde birikerek osmotik stresse neden olmakta ve diyabetik kataraktın ilerlemesinde önemli rol oynamaktadır (Jedziniak vd. 1981, Kubo vd. 2004). Bununla beraber, artan sorbitol NADH/NAD oranını değiştirerek DAG üretimini arttırmakta ve PKC yolağını tetiklemektedir. Sonuçta, endotelial hücre geçirgenliğinin ve ECM protein üretiminin artmasına neden olmaktadır. (Morrisey vd. 1999, Khan ve Chakrabarti 2007).

Hiperglisemi ile diyabetik nöropatinin arasındaki ilişki AR'ın aşırı derecede aktif olmasından kaynaklanmaktadır (Kuzumoto vd. 2006). Bu enziminin aktivasyonu NADPH kullanımındaki artış antioksidan savunma sistemine ait olan indirgenmiş glutatyonun oluşumunu engellediği için oksidatif stressin artmasına neden olmaktadır (Dunlop 2000). Ayrıca, nitrik oksit sentezi azaldığı için vazokonstriksiyon (damar daralması) sonucu iskemi ve sinir iletiminde yavaşlama meydana gelmektedir (Stevens vd. 1994).

Yüksek glukoz, vasküler düz kas hücrelerinde NF- κ B'nin aktivasyonuna neden olan bir AR-PKC-NADPH oksidaz bağımlı yolak aracılığıyla TNF- α üretimini arttırmaktadır (Ramana vd. 2007). Ayrıca, vasküler endotelial hücrelerdeki TNF- α sentezi de NF- κ B ve ICAM-1 artışına neden olmaktadır (Chandra vd. 2003).

2.4.4 Aldoz redüktaz enziminin diğer hastalıklarla olan ilişkisi

Aldoz redüktaz enziminin fazla miktarda ifadenmesi, pek çok kanser hücresinde görülmektedir (Kang vd. 2005). Kolon kanserinin temel özelliklerinden biri, iCOX-2

enziminin aşırı ekspresyonudur. Bu enzim, araşidonik asitten kolon epitel hücrelerinin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasını sağlayan prostaglandinlerin sentezini gerçekleştirmektedir. Bu hücrelerde, COX-2 nin transkripsiyonel düzenlenmesi çeşitli büyüme faktörleri (TGF, IGF, VEGF, FGF) ve sitokinler (TNF- α) tarafından sağlanmaktadır. Bununla beraber, büyüme faktörleri ve sitokinler AR enziminde transkripsiyonunu aktive etmektedir (Tammali vd. 2006). TNF- α gibi sitokinler de kolon kanserine yakalanma riskini arttırmaktadır. AR inhibisyonu, TNF- α uyarımlı PKC ve NF- κ B'nin aktivasyonunu engellemektedir ve böylece COX-2 enzimi ifade edilememektedir. Bu durum AR enziminin, NF- κ B'nin aktivasyonu için gerekli olduğunu göstermektedir (Tammali vd. 2006, Tammali vd. 2007).

Tümör promoter ajan (TPA) A549 adı verilen insan akciğer adenokarsinoma hücrelerinde, NF- κ B aracılığıyla AR geninin ifadesini arttırdığı bilinmektedir. TPA uyarımı ile artan AR geninin promoter aktivesinin, bir PKC inhibitörü ile azalması, TPA aracılı AR ifadesinde PKC aktivasyonunun gerekli olduğunu göstermektedir (Kang vd. 2005).

Ayrıca, HepG2 ve HeLa hücreleri gibi bazı kanser hücrelerinde ve insan karaciğer kanser hücrelerinde AR ve AR benzeri protein-1 (ARL-1)'in aşırı miktarda sentezlendiği bilinmektedir. ARL-1, AR ile benzer enzimatik aktivasyon göstermektedir. Bununla beraber, göğüs, servikal, ovaryum ve rektal tümörlerde (Çizelge 2.5) de aldoz redüktaz yüksek düzeyde ifadelanmaktadır (Saraswat vd. 2006).

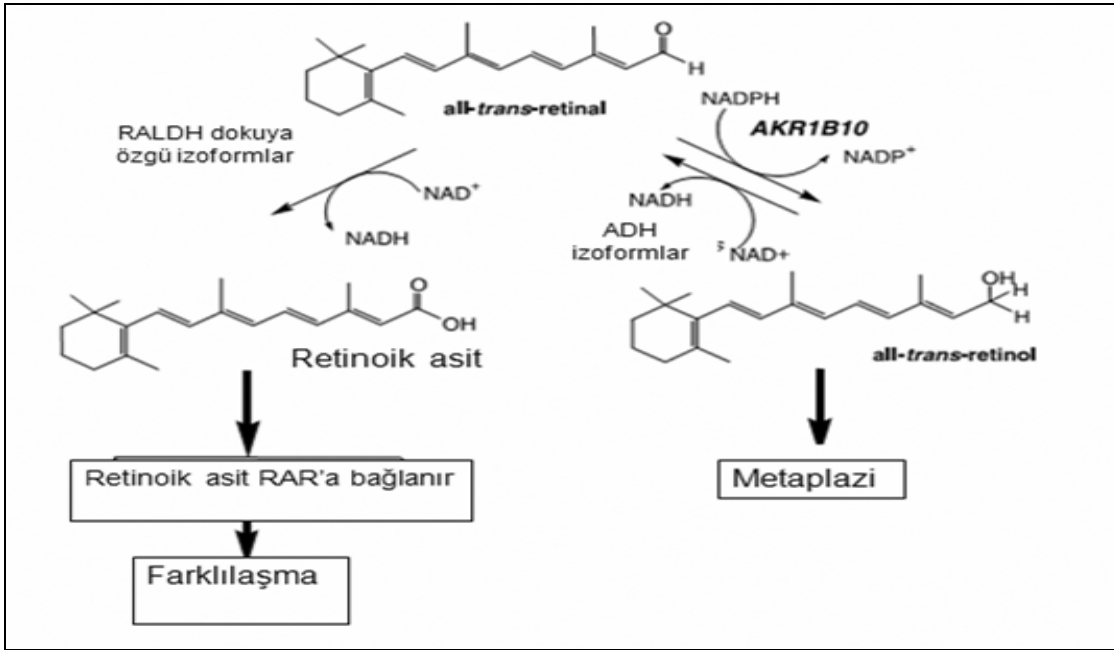
AKR1B enzimiyle yaklaşık %71 benzerlik gösteren ve AR ailesinin bir üyesi olan AKR1B10, çoğu dokuda ifade olmazken, ilk defa ince barsak ve kolon hücrelerinde saptanmış ve karaciğer hücrelerinde de çok az miktarda ifadelendiği bildirilmiştir (Penning 2005).

AKR1B10, sigara kullanımına bağlı olarak çoğu adenokarsinomada olduğu gibi, insan karaciğer kanser hücrelerinde ve uterus kanserinde aşırı sentezlenmektedir (Fukumoto vd. 2005, Balendiran vd. 2009).

Çizelge 2.5 Kanser dokuların tümörlü ve tümörsüz bölgelerindeki aldoz redüktaz aktivitesi (Saraswat vd. 2006)

Tümör	Göğüs(5)	Serviks(4)	Yumurtalık (4)	Rektum (4)
Tümörsüz bölge	12.7±3.19	13.3±3.07	14.7±3.61	10.7±4.49
Tümörlü bölge	26.1±5.29	25.4±2.58	26.5±2.37	32.2±7.06

Ayrıca, bu enzim all-trans-retinal molekülünü, all-trans-retinole çevirirken, retinoik asit sinyal oluşumunu (Şekil 2.25) engellemektedir. Squamous (yassı hücre) metaplasisinde (doku değişimi) bu enzimin aşırı miktarda ifadelendiği bilinmektedir. Bu durum, yassı hücre karsinomanın gelişimine yol açmaktadır (Penning 2005).



Şekil 2. 25 AKR1B10'nun akciğer hücrelerindeki retinoik asit sinyali üzerine etkisi, RALDH:Retinaldehit dehidrogenaz, ADH:Alkol dehidrogenaz (Penning 2005)

2.5 Aldoz Redüktaz Enziminin İnhibitörleri

Hiperglisemide, daha önce de belirtildiği gibi AR aktivitesi artmaktadır. Aktivitesi artan AR, osmotik dengenin, iyon taşınımının ve redoks dengenin değişimine yol açarak,

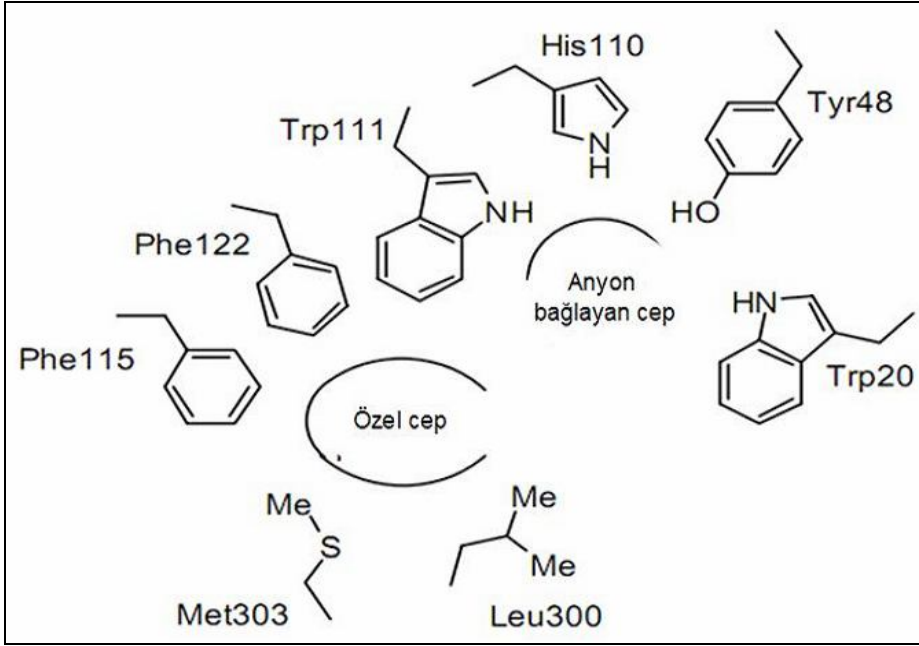
diyabetik retinopati, nefropati, nöropati ve katarakt gibi diyabetik hastalıkların oluşmasına neden olmaktadır (Rakowitz vd. 2006a, Brownlee vd. 2006, Djoubissie vd. 2006). Bu yüzden, AR inhibitörleri, diyabetik komplikasyonların ilerlemesinin geciktirilmesi veya başlamasının engellenmesi için tedavi edici ajan olarak oldukça geniş bir yelpazede araştırılmaktadır (El-Kabbani vd. 2004, Sun vd. 2004, Wang vd. 2009).

Ancak, son yirmi yılı aşkın sürede, AR inhibitörlerine ait bazı klinik denemeler ve araştırmalar ya tasarımdaki yetersizlikten, ya da sentezlenen inhibitörün poliyol yolağına yetersiz şekilde etki etmesi nedeniyle tatmin edici sonuçlar oluşturamamıştır (Obrosova vd. 2002). Bununla beraber, insan klinik deneme safhasına ulaşan sorbinil ve ponalrestat gibi diğer tüm ARI leri, hem etkilerinin yetersiz olması hem de yan etkilerinden dolayı piyasadan geri çekilmiştir. Görülen yan etkilerin oluşmasına, AR enzimi ile aynı süperaileden olan ve yapısal olarak birbirlerine çok benzeyen aldehit redüktazların da inhibe edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu nedenle, sadece aldoz redüktaz enzimine bağlanabilen inhibitörler tasarlanmaya çalışılmaktadır (El-Kabbani vd. 2004). Buna karşın, 1989 yılında piyasaya sürülen tolrestat, 1996 yılında düşük etkinliği ve karaciğer toksisitesi nedeniyle geri çekilmiştir. Aynı şekilde zopolrestat, ranirestat ve zenarestat bileşiklerinin de klinik denemeleri iptal edilmiştir. Şu anda Japonya’da, Ono tarafından 1992 yılında geliştirilen epalrestat kullanılmaktadır (Asano vd. 2002, Miyamoto 2002, Sturm vd. 2006).

AR enziminin anyonik bölgesi Tyr48, His110 ve NADP dan oluşmaktadır. Özgül cep ise, anyonik bağlanma bölgesi ile yan yana olup Trp111, Phe122, Leu300 ve Ser302 den oluşmaktadır. Özgül cep ayrıca hAR ve hALR1 arasında en az korunmuş kalıntılara sahip olduğu için bu bölge seçicilik için avantaj sağlamaktadır (Zandt vd. 2009).

Bununla birlikte, spirofluorene-9,50'-imidazolidine-2',4'-dione, 9-fluoreneacetic acid, AL1576, 2,7-difluoro-9-fluoreneacetic acid, FK366 ve Epalrestat gibi altı farklı AR inhibitörü ile yapılan çalışmalar, inhibitörlerin aktif bölgedeki Trp20, Trp111 ve Phe122 kalıntılarının yan zincirleri ile aromatik etkileşimler (Şekil 2.26) kurarken, bu

inhibitörlerin ya karboksilat grupları ya da spirohydantion grupları Tyr48, His110 ve Trp111 kalıntılarının yan zincirleri ile hidrojen bağı kurduğunu göstermektedir. Ayrıca; hidrojen bağları ve aromatik-aromatik etkileşimlerin kombinasyonu, AR inhibitörlerinin artan bağlanma afinitesinde önemli bir oynamaktadır (Lee vd. 1998).



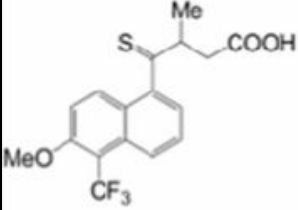
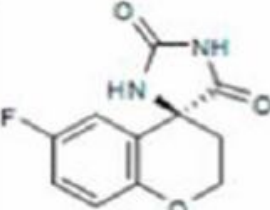
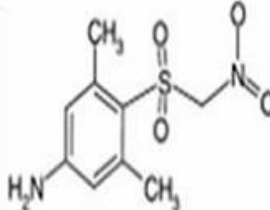
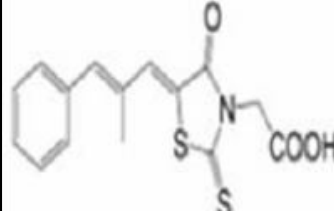
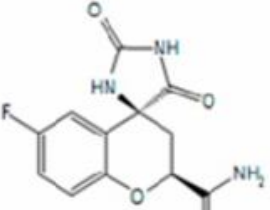
Şekil 2.26 AR enzimine ait olan anyonik ve özgül cepler (Miyamoto 2002)

Aldoz redüktaz inhibitörleri yapısal olarak başlıca üç sınıfa (Şekil 2.27) ayrılmaktadırlar (Rogniaux vd. 1999, Miyamoto 2002, Rakowitz 2006b).

- Karboksilik asit grubu taşıyanlar (Epalrestat, Tolrestat ve Zopolrestat)
- Spirohydantion (siklik imid) grubu taşıyanlar (Fidarestat, Sorbinil)
- Sülfonil Nitrometan türevleri (ICI215918 ve AminoSNM)

Karboksilik asit ve siklik imid sınıfında yer alan AR inhibitörlerindeki asidik grupların (karboksilat ve siklik imid) varlığı enzimin inhibisyonunda çok önemlidir. Enzim-inhibitör yapısında negatif yüklü bu iki grup enzimin Tyr 48, His110 ve Trp 111 kalıntıları ile hidrojen bağı kurmaktadır (Rastelli vd. 2000).

Ayrıca, bu gruplar NADP'ın pozitif yüklü nikotinamid halkasıyla güçlü elektrostatik etkileşimler de kurmaktadır. Enzimin inhibisyonunda asidik grupların fonksiyonu önemli olmasına rağmen inhibitörlerin pKa değerlerine bağlı daha iyi farmokokinetik özelliklere sahip yeni ARI'nin fazla asidik özellik taşıması da istenmektedir (Rastelli vd. 2000).

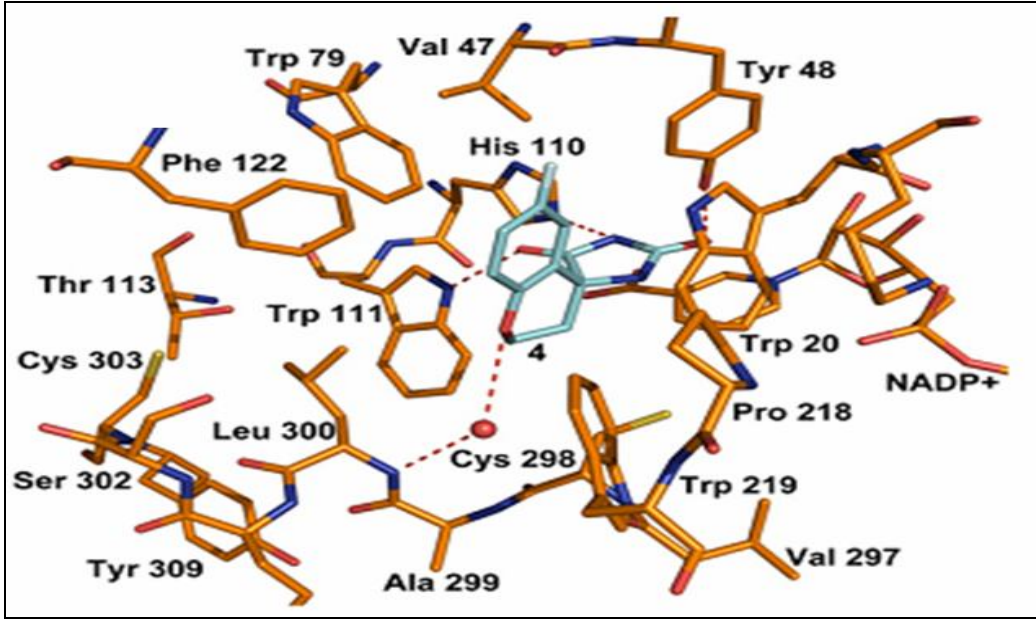
Karboksilik asit sınıfı	Spirohydantion sınıfı	SülfonilNitrometan sınıfı
 Tolrestat	 Sorbinil	 AminoSNM
 Epalrestat	 Fidarestat	

Şekil 2.27 Karboksilik asit ve spirohydantion grupları taşıyan bazı AR İnhibitörleri (Rogniaux vd. 1999, Wang vd. 2009).

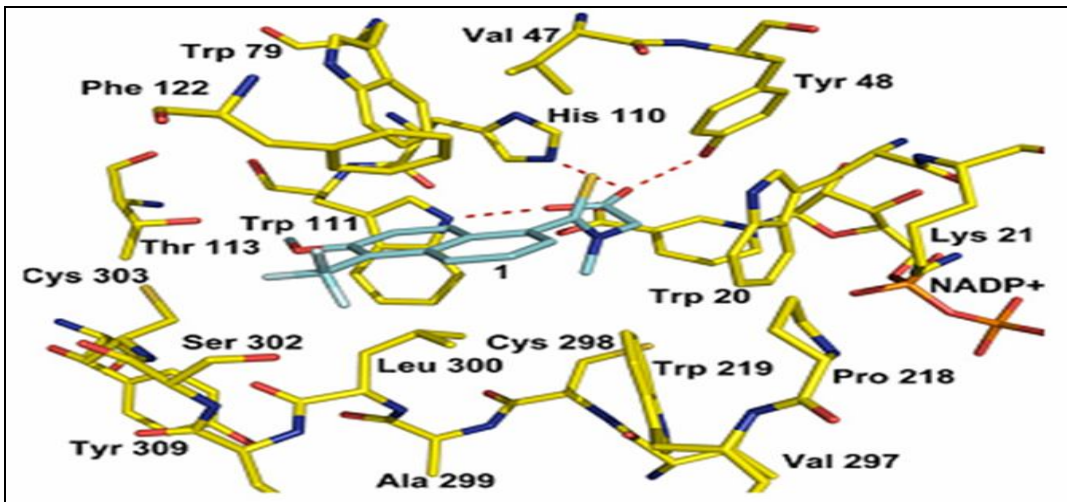
Hydantion sınıfına ait olan sorbinil (Şekil 2.28) katalitik bölgenin kalıntıları (Tyr48, His110 ve Trp111) ve kendi polar başları arasında hidrojen bağları kurmaktadır. Bu bileşik küçük bir boyuta sahip olduğu için, hidrofobik cep kapalı durumdayken enzime bağlanmaktadır. Ayrıca, kısa van der waals bağları Trp111'in yan zincirleri ile Leu300'ün yan zincirleri arasında oluşmaktadır (Steuber vd. 2007).

Karboksilik asit sınıfına ait olan tolrestat (Şekil 2.29) ise karboksilat grubu ile katalitik bölgenin kalıntıları arasına benzer etkileşimleri, hidrofobik cep açık durumdayken kurmaktadır (Steuber vd. 2007).

AR enziminin aktif bölgesine karboksilik asit veya spirohydantion taşıyan yüklü inhibitörlerin bağlanmasında His110 amino asitin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Bu bulgu; kristallografik çalışmalar ile AR'nın His 110 amino asitinin, zopolrestat bileşiğinin karboksilat kısmı ile bir tuz-köprüsü oluşturmasıyla desteklenmektedir (Sugiyama vd. 2000).



Şekil 2.28 AR-Sorbinil kompleksi: Kapalı konformasyondaki enzimin, özgül cebine bağlı olan sorbinil (Steuber vd. 2007)



Şekil 2.29 AR-Tolrestat kompleksi: Leu300 kalıntısı dirsek pozisyonu olarak özgül cebin açık konformasyona geçmesini sağlamaktadır (Steuber vd. 2007)

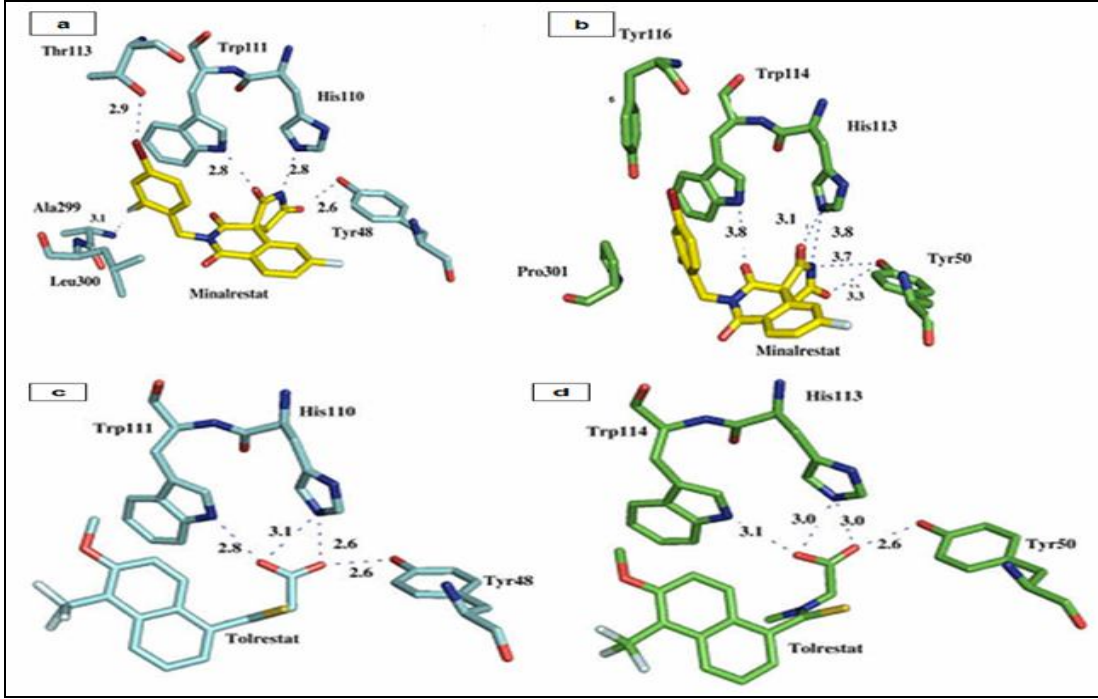
Bununla beraber, AR deki Leu300'e karşılık gelen ALR deki prolin, fidarestatın aldoz redüktaz için yüksek seçiciliğinin en büyük nedenlerinden biridir. Çünkü fidarestatdaki karbamoil grubunun oksijen atomu AR enzimindeki Leu300 ün nitrojen atomu ile hidrojen bağı oluşturabilirken, ALR deki prolin ile bu bağ oluşmamaktadır (Oka ve Kato 2001).

Diyabetik sıçanlara uygulanan fidarestat, sinir kan akışını ve sinir hücrelerinde biriken sorbitol seviyesini normal düzeyine getirmektedir. Ayrıca, fidarestatın herhangi bir yan etkisi de görülmemektedir (örn. deri kızarması vb.). Bu sonuçlar, fidarestatın diyabetik nöropatinin tedavisi ve engellenmesi için uygun bir ilaç olabileceğini göstermektedir (Asano vd. 2002).

Biyokimyasal, moleküler modelleme ve kristallografik çalışmalar (Şekil 2.30), AR inhibitörlerinin (Minalrestat ve Tolrestat) her iki enzimin (AR ve Aldehit redüktaz) aktif bölgesinde yer alan Tyr, His ve Trp kalıntılarını, ALR1 (AKR-aldehit redüktaz) inhibe ettiklerini göstermektedir (Carbone vd. 2009).

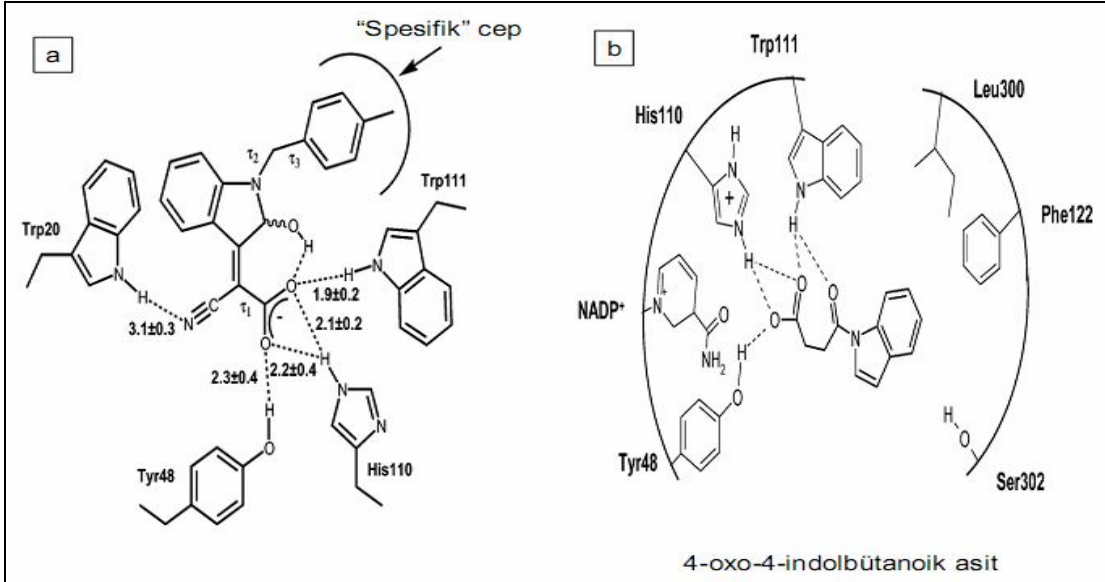
İndol halkası taşıyan AR inhibitörleri bu komplikasyonların tedavisinde umut verici olarak görülmektedir (Süzen vd. 2007). Iwata ve arkadaşları, 3D kimyasal database programı kullanarak ARI olarak indole-3-asetik asit analoglarını bulmuşlardır (Sun vd. 2003). Ayrıca, 4-oxo-4-indolebutanoik asidin (Şekil 2.31) güçlü bir ARI olduğu da gösterilmişlerdir. Bu bileşiğin indol kısmı, Phe122 ve Leu300 kalıntılarının arasına girmektedir ve böylece π - π etkileşimi ile aktif bölgede afinite artışında önemli bir rol oynamaktadır (Sun vd. 2003).

Ayrıca, son zamanlarda yeni selektif TBI ([1,2,4]triazino[4,3-a]benzimidazole)'nın asetik asit türevleri ARI olarak tanımlanmaktadır ve 10-benzil TBI türevi yüksek derecede inhibitor aktivite göstermektedir (IC₅₀: 0,36mM) ve katarakt gelişiminin engellenmesinde etkili olduğu bildirilmektedir (Da Settimo vd. 2003).



Şekil 2.30 Enzimlerin anyonik bağlanma bölgeleri (Tyr, His ve Trp) ile ARI arasında bağlanma modelleri (Carbone vd. 2009)

a. AR-Minalrestat, b. Aldehit redüktaz-Minalrestat, c. AR-Tolrestat ve d. Aldehit redüktaz-Tolrestat. Mavi renkli kesik kesik çizgiler hidrojen bağlarını göstermektedir.



Şekil 2. 31 a. İndol türevi olan bileşiklerin AR enzime genel olarak bağlanma özelliklerini ve tüm önemli polar etkileşimleri (Da Settimo vd. 2003), b. ARI (4-oxo-4-indolebutanoik asidin) enzime bağlanması ve kesik kesik noktalar hidrojen bağlarını göstermektedir (Sun vd. 2003)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihazlar

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

3.1.1 Kullanılan kimyasal maddeler

(NH₄)₂SO₄ (Sigma), NaCl (Merck), NADPH (Sigma), DL-gliseraldehit (Sigma), KH₂PO₄ (Sigma), K₂HPO₄ (Sigma), DMF (Merck) , Bio-Rad Reagent (BIO-RAD), metanol (Reidel-de Haën), BSA (Sigma) firmalarından temin edilmiştir. Aldoz redüktaz enzimi üzerine inhibitör etkisi olabileceği düşünülen bazı yeni indol türevleri, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı tarafından sentezlenmiştir.

3.1.2 Denekler

Deney için normal diyetle beslenmiş 40 adet 600-800 kg ağırlığındaki sığırlardan elde edilen lensler kullanılmıştır. Haymana mezbahasında kesilen sığırlardan alınan gözler

bekletilmeden buz kutularına alındıktan sonra -80°C’de saklanmıştır. Daha sonra, lensler donmuş göz dokusundan çıkarılarak homojenize edilmiştir. Elde edilen sığır lens homojenatlarından AR enzimi saflaştırılmıştır. Saflaştırılan enzim aktivitesi üzerine inhibitör olarak kullanılan 16 adet indol türevinin etkisi incelenmiştir. Yapılan tüm deneyler üçer defa tekrarlanmıştır. Hayvanların bakımları ilgili ulusal ve uluslararası kanun ve yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Yöntem

3.2.1 Aldoz redüktaz enziminin izolasyonu

Deneylerde her seferinde 40 adet olmak üzere, sığırlardan alınan lens dokuları kullanılmıştır. Lens dokularından AR enzimi izole edilmiş (Das ve Srivastava 1985) ve aktivite tayinleri yapılmıştır.

İzolasyon işlemi için, -80°C’de saklanmış sığır gözlerinden alınan lensler, ağırlıklarının (gr) 3 katı distile su ile homojenize edilmiştir. Daha sonra elde edilen homojenat, +4°C’de 10.000g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen bu ilk süpernatant üzerine, % 40 doygunluk oluşturabilmek amacı ile doymuş amonyum sülfat çözeltisi eklenmiş ve bu süspansiyon 15 dakika karıştırılarak +4°C, 10.000g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Bu şekilde ilk süpernatandaki inert proteinler ayrıldıktan sonra elde edilen ikinci süpernatana, % 50 satürasyon için tekrar doymuş amonyum sülfat ilave edilip 15 dakika karıştırılmış ve tekrar +4°C, 10.000g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. % 50 doygunluktaki bu üçüncü süpernatana amonyum sülfat eklenerek % 75 doygunluk sağlanmış ve son kez +4°C, 10.000g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda elde edilen pellet, 5 ml 0,05 M NaCl içerisinde çözülerek aktivite tayinlerinde kullanılmıştır.

3.2.2 Aldoz redüktaz aktivite tayini

Kullanılan çözeltiler:

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

Sığır lenslerinden elde ettiğimiz AR enziminin aktivitesi, 340 nm dalga boyunda UV-1700 spektrofotometre kullanılarak tayin edilmiştir. Enzim aktivitesi bu dalga boyunda, NADPH konsantrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmektedir (Cerelli vd. 1986).

Reaksiyon ortamı, 0,2 ml fosfat tamponu, 0,1 ml NADPH (2×10^{-5} M final konsantrasyon), 0,1 ml inhibitör madde çözeltisi ve 2,3 ml distile su içeren inkübasyon ortamına 0,2 ml izole edilen enzim eklenerek hacim 2,9 ml'ye tamamlanarak hazırlanmaktadır. Reaksiyon, yukarıda hazırlanan küvete 0,1 ml DL-gliseraldehit (5×10^{-4} M final konsantrasyon) ilavesi ile başlatılmaktadır. 340 nm'de ve 37°C'de NADPH konsantrasyonundaki azalma 20 dakika süresince takip edilmektedir. Daha sonra absorbans değerleri lineer olan aralıklar tespit edilip, eğim hesapları yapılmıştır. Eğim değerleri, aşağıdaki formüle uygulanarak inhibitör madde olmadan enzimin aktivitesi U/L cinsinden hesaplanmıştır. Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiştir. Daha sonra, inkübasyon ortamına inhibitör maddenin eklenmesiyle elde edilen lineer grafikten hesaplanan enzim aktiviteleri, inhibisyon olmadan elde edilen aktivitelere oranlanarak % aktivite oranları hesaplanmıştır.

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

ΔA = Test tüpündeki absorbans farkı

Δt = Zaman (Dakika)

$\Delta A/\Delta t$ = Eğim

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

d = Işık Yolu (10 mm)

$V(L)$ = Total Hacim

$v(L)$ = Enzim Hacmi

3.2.3 Protein miktar tayini

Kullanılan çözeltiler:

1. Sığır serum albumin çözeltisi (BSA): 2 mg/ml
2. BIO-RAD Reagent

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

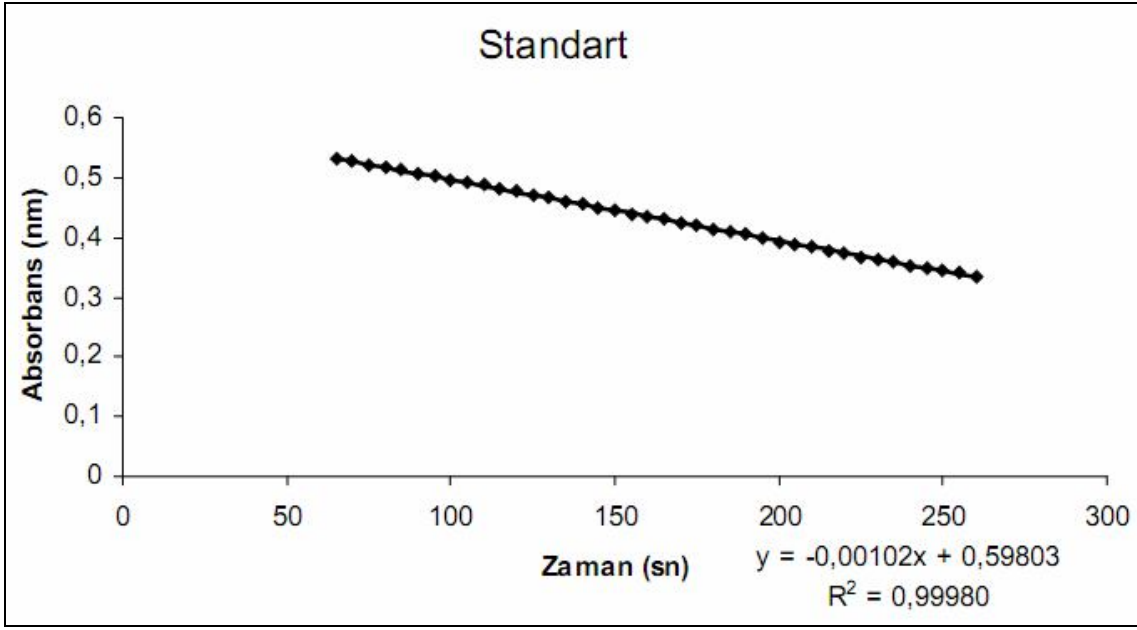
Organik boya olarak kullandığımız BIO-RAD Reagent, 1/5 oranında seyreltildikten sonra Whatman no. 1 filtre kağıdı aracılığıyla süzölmüştür. Deney tüplerine; stok BSA çözeltisinden hazırlanan standart çözeltilerden 0,1 ml alınarak üzerlerine hazırlanmış olan organik boyadan 5'er ml eklenmiştir. 1 ml'lik küvetlere hazırlanan bu çözeltilerden 1ml çekilerek spektrofotometrede 595 nm'de ölçümler yapılmıştır. Protein miktar tayininde daha hassas sonuç elde etmek için enzim, 1/40 oranında seyreltilmiştir. Standartlarda olduğu gibi 0,1 ml enzime 5 ml organik boya eklendikten sonra spektrofotometrik ölçümü yapılmış ve standart grafikten protein miktarı mg/ml cinsinden hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

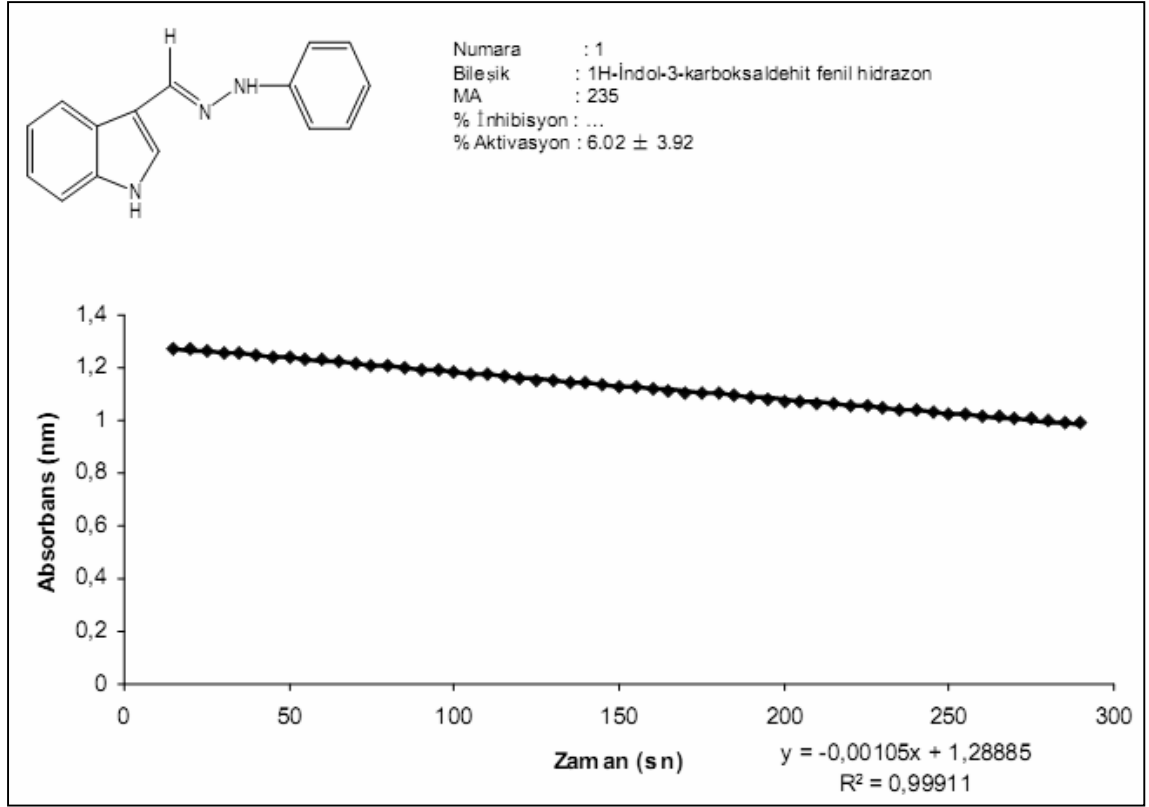
Sığır lenslerinden elde edilen aldoz redüktazın protein miktarını ölçmek için Bradford yöntemi kullanılmıştır (Bradford 1976). Bu yöntemle göre, stok BSA çözeltisinden hazırlanan 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 mg/dl olan standartların 595 nm’de spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışmanın ardından 1/40 oranında seyreltilen 0.1 ml’lik enzime 5 ml BIO-RAD çözeltisi eklenerek seyreltilen enzimin protein miktarı 595 nm’de ölçülmüştür ve standart grafiğe göre protein miktarı **35.33 ± 0.97 mg/ml** olarak hesaplanmıştır.

Sığır lenslerinden elde ettiğimiz aldoz redüktaz enziminin enzim aktivitesi 340 nm’de NADPH kontrasyonundaki azalmaya bağlı olarak ölçülmüştür. İzolasyon sonunda elde edilen aldoz redüktazın aktivitesi elde edilen eğim değeri üzerinden **4.51x10⁻³ U/L** olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1). Bu değer % 100 enzim aktivitesi olarak kabul edilmiş ve inhibitör maddelerin enzim aktivitesi üzerine etkileri bu değere oranlanarak hesaplanmıştır.

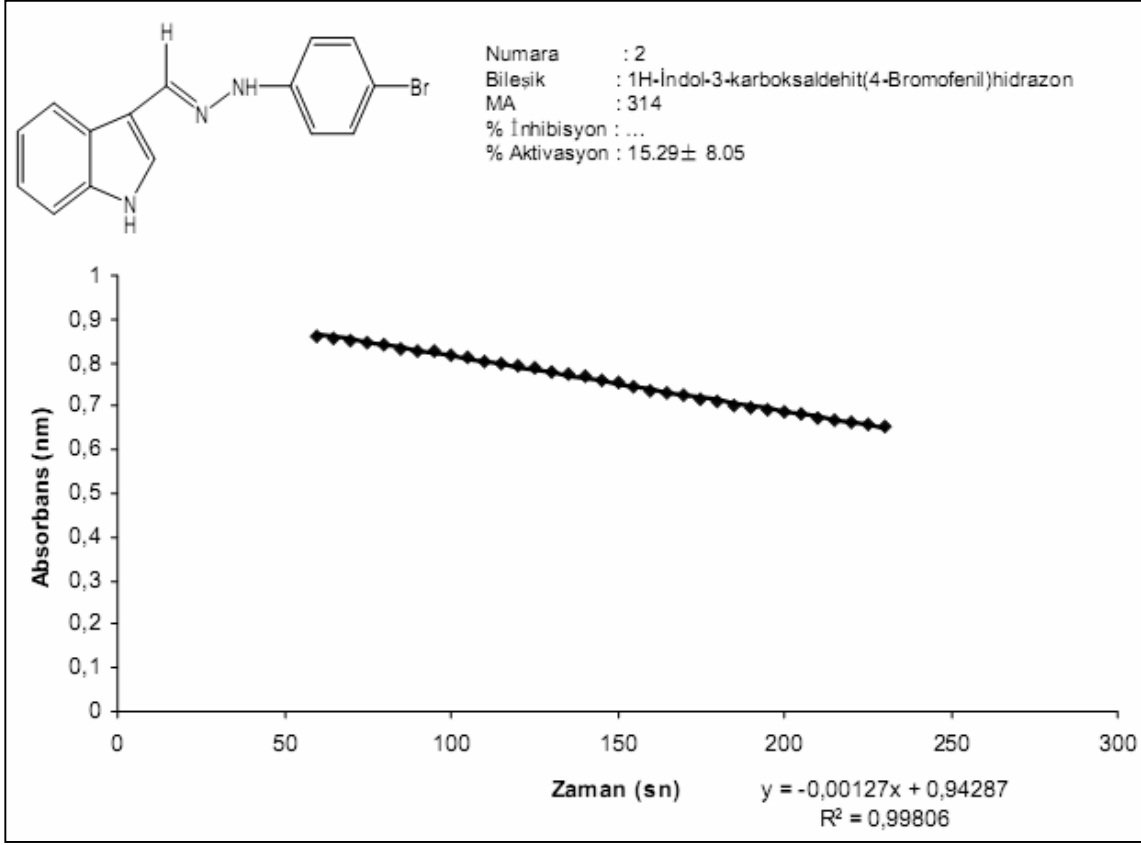
Aldoz redüktaz enziminin aktivitesi hesaplandıktan sonra, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya A.B.D’ nda Prof. Dr. Sibel Süzen’in laboratuvarında sentezlenen ve her biri 10⁻⁴ M konsantrasyonda 16 adet yeni indol türevlerinden 0,1’er ml kullanılmıştır. Sentezlenen bu inhibitörlerin enzim aktivitesi üzerine etkileri çalışılmıştır. Her inhibitör maddeye karşı enzim aktivitesi yeniden ölçülmüş ve aktivite değerleri U/L cinsinden hesaplanmıştır. Ölçülen bu değer %100 enzim aktivitesi olarak kabul edilen U/L değeri ile oranlanarak enzimin inhibisyon veya aktivasyon %’leri hesaplanmıştır. İnhibitör maddelerin formülleri, moleküler ağırlıkları (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafikleri ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri şekil 4.2-4.17 arasında gösterilmiştir. Şekil 4.18; 16 inhibitör maddenin hepsinin inhibisyon veya aktivasyon %’lerine yer vermektedir. Çizelge 4.1 ise inhibitör maddelerin yer aldığı çizelgelerin numaralarını ve bu çizelgelere ait sayfa numaralarını göstermektedir.



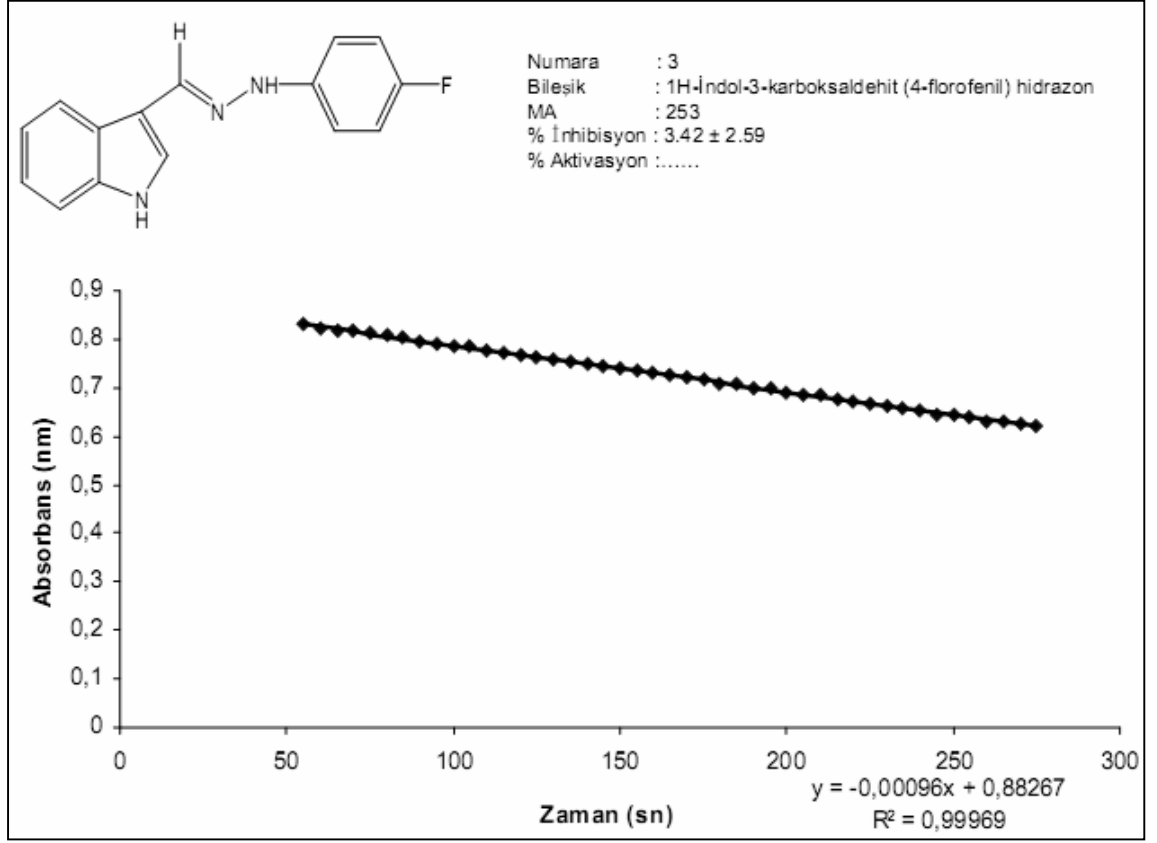
Şekil 4.1 İnhibitör madde eklenmeden enzime ait absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı eğim grafiği



Şekil 4.2 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

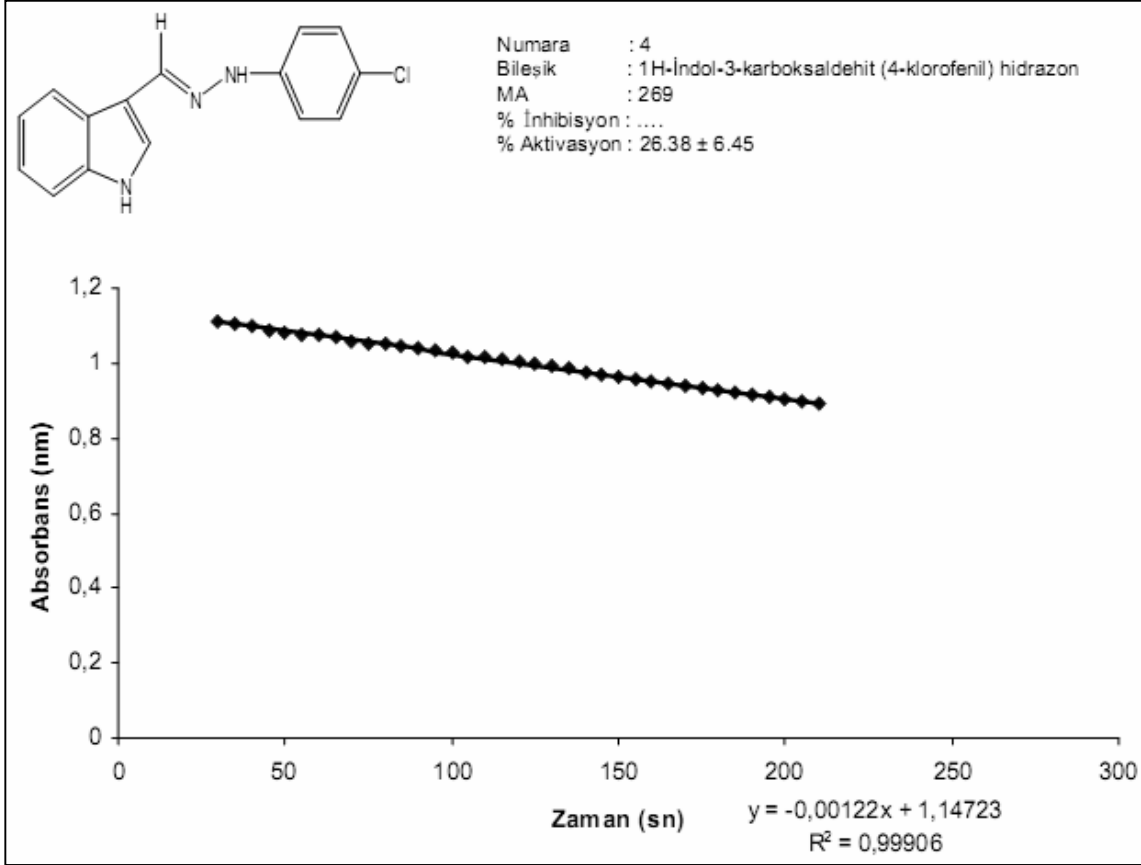


Şekil 4.3 1H-İndol-3-karboxaldehit(4-Bromofenil)hidrazon isimli inhibitor maddenin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

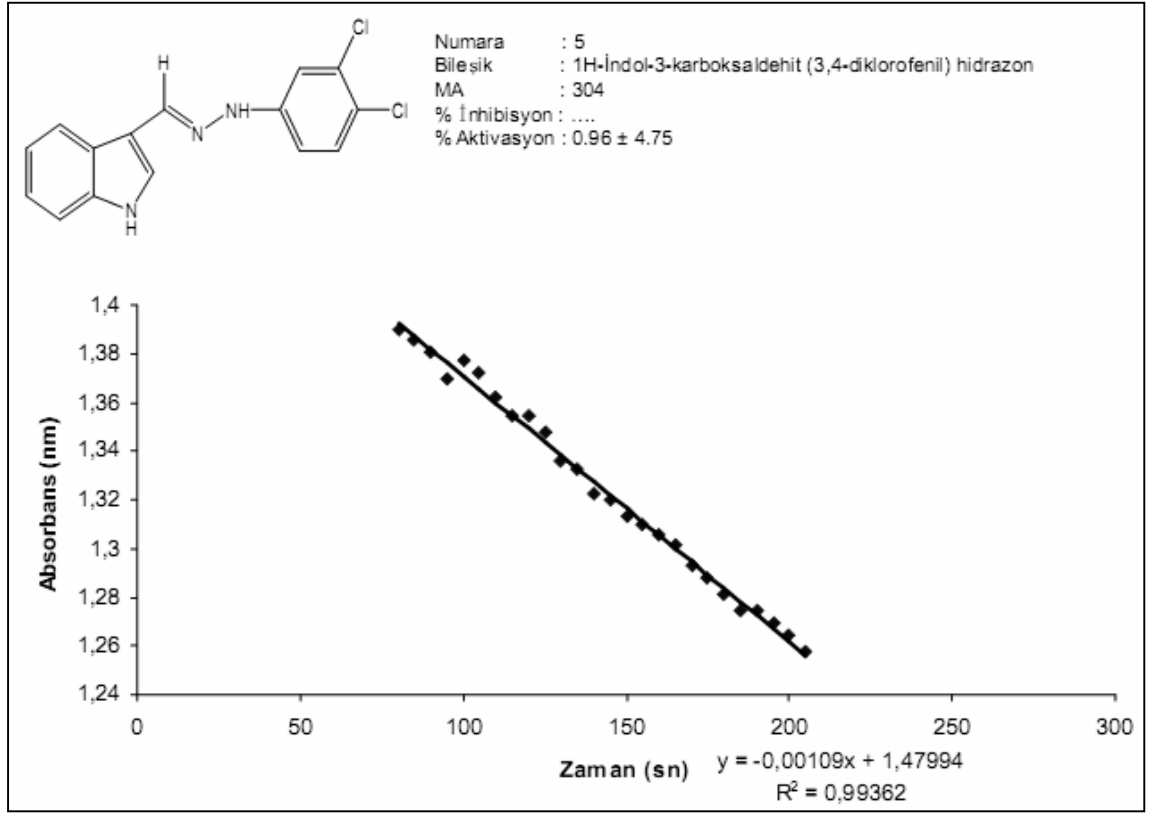


Şekil 4.4 1H-İndol-3-karboksaldehit(4-florofenil)hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

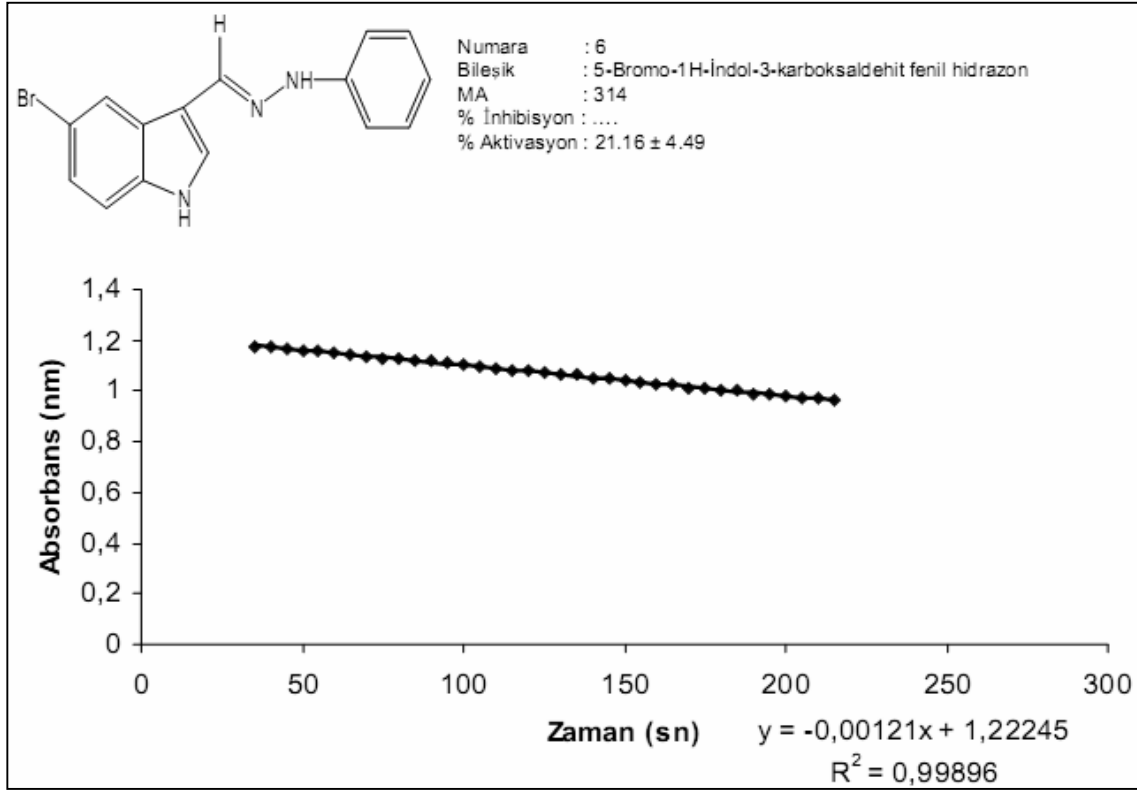
1H-İndol-3-karboksaldehit(4-florofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün fenil halkasına flor atomunun bağlanması % 3.42 oranında inhibisyona neden olmaktadır.



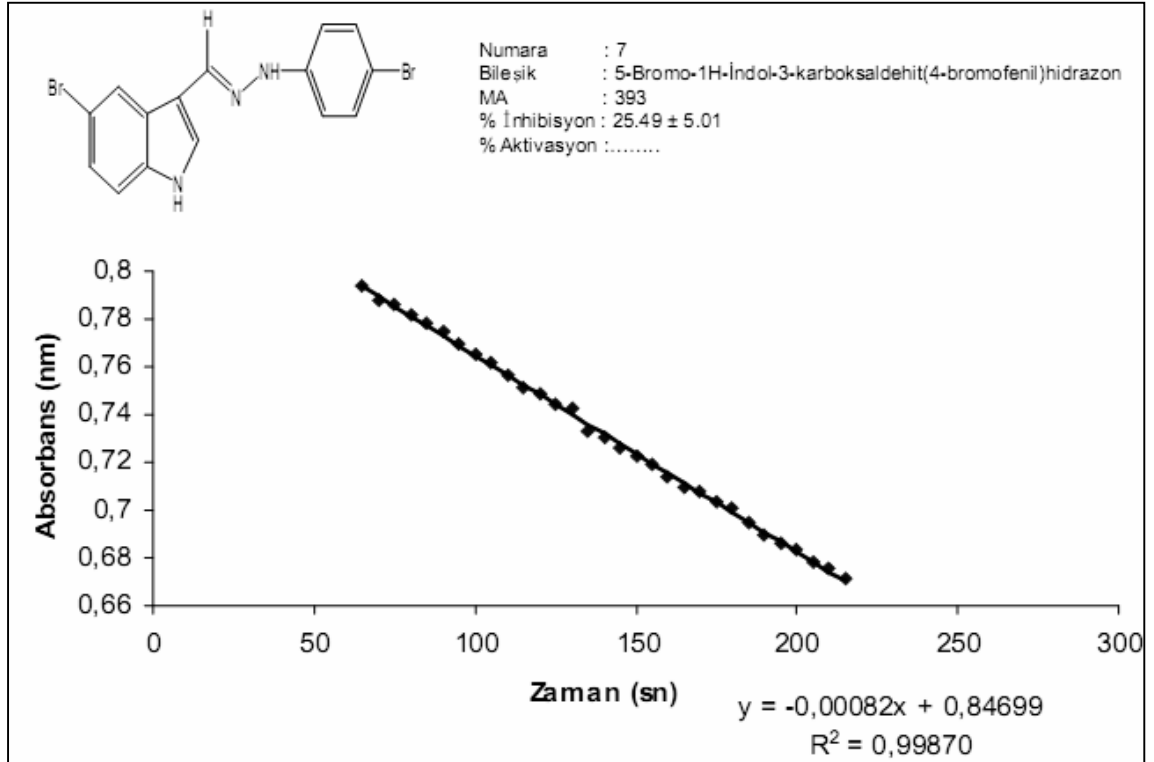
Şekil 4.5 1H-İndol-3-karboksaldehit(4-klorofenil)hidrazon isimli aldoz redüktazın inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri



Şekil 4.6 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4-diklorofenil) hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

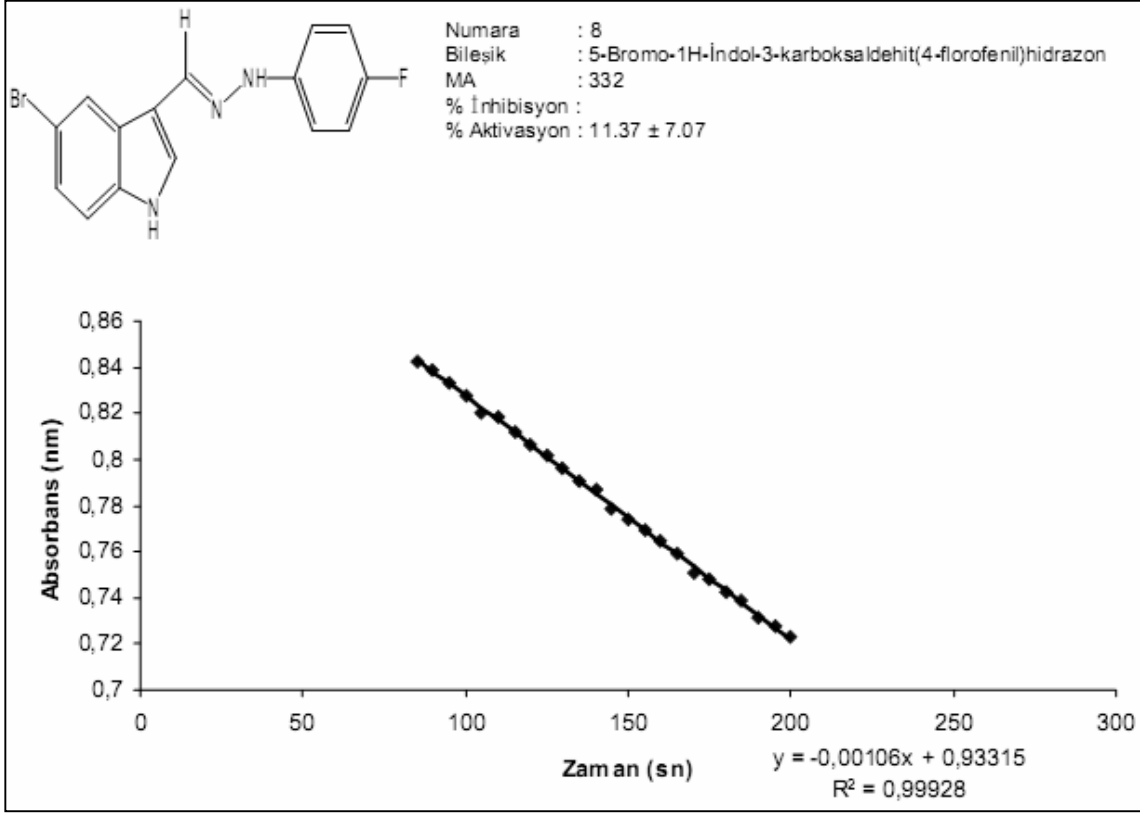


Şekil 4.7 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazonun formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

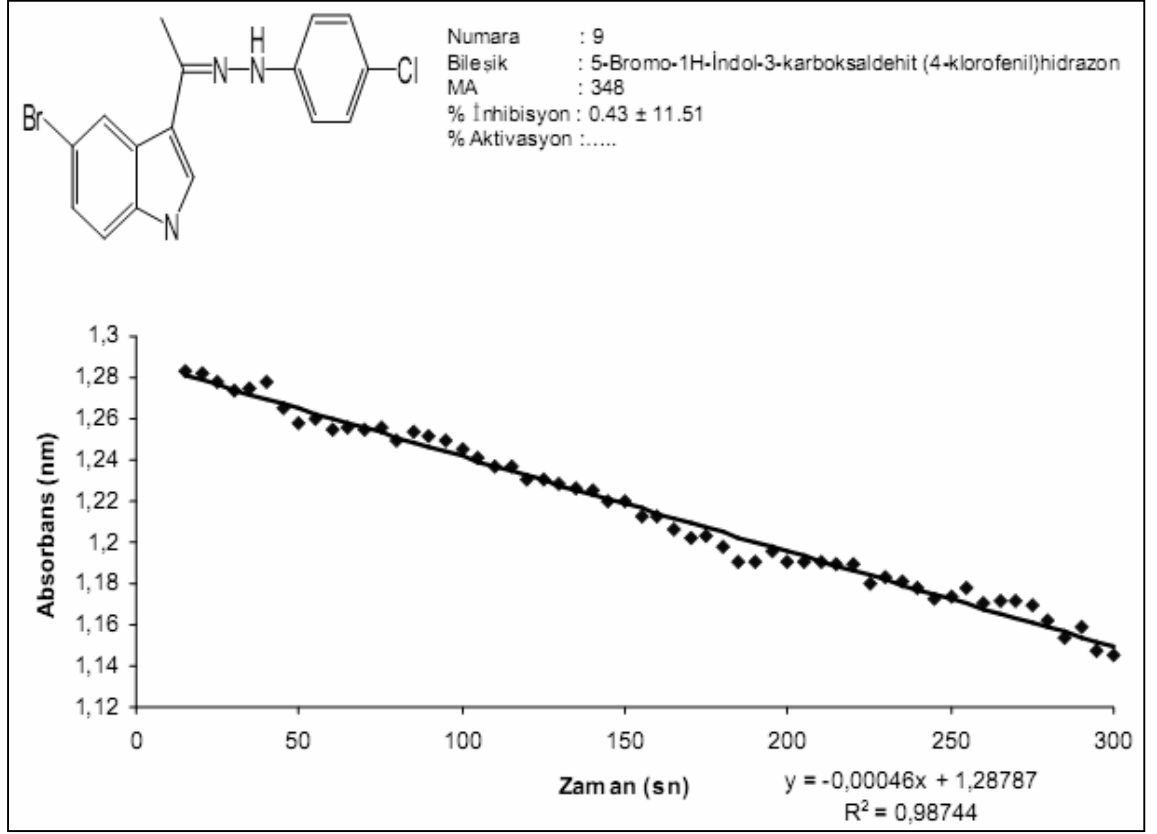


Şekil 4.8 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-bromofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-bromofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün indol ve fenil halkalarına brom atomunun bağlanması % 25.49 oranında inhibisyona sebep olmaktadır.

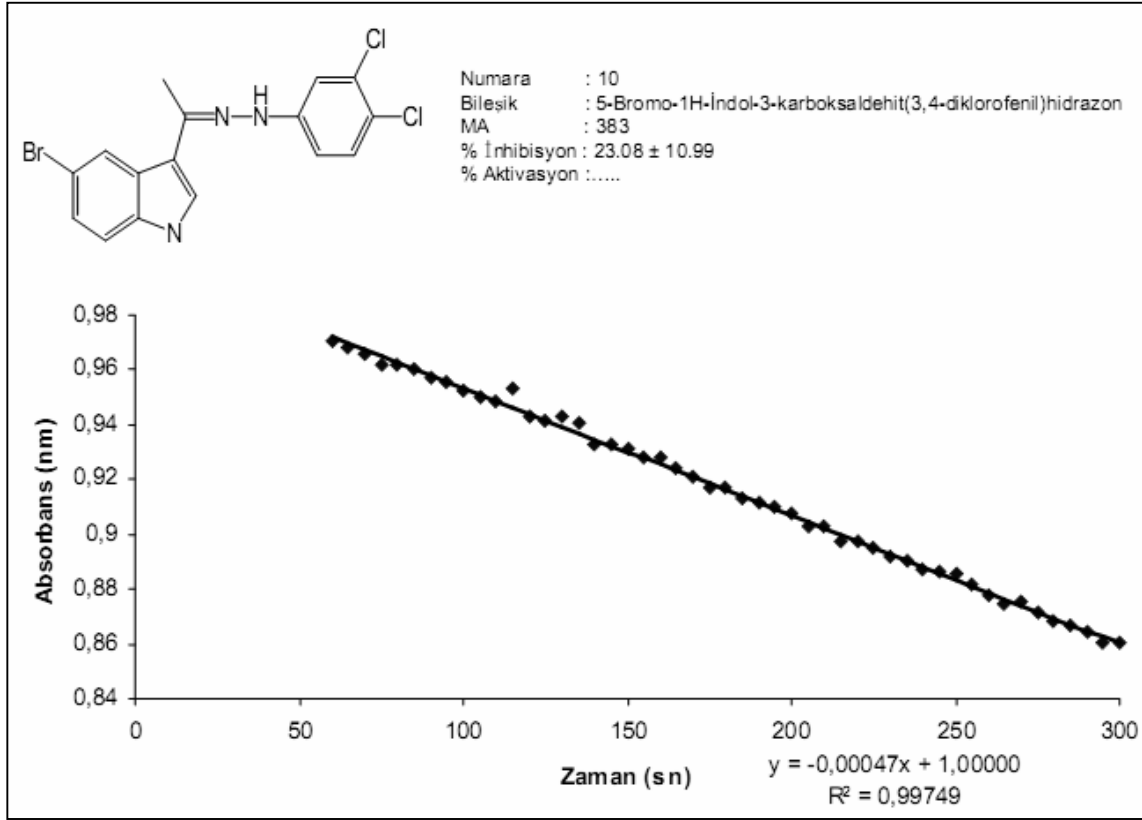


Şekil 4.9 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-florofenil)hidrazon isimli bileşiğin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri



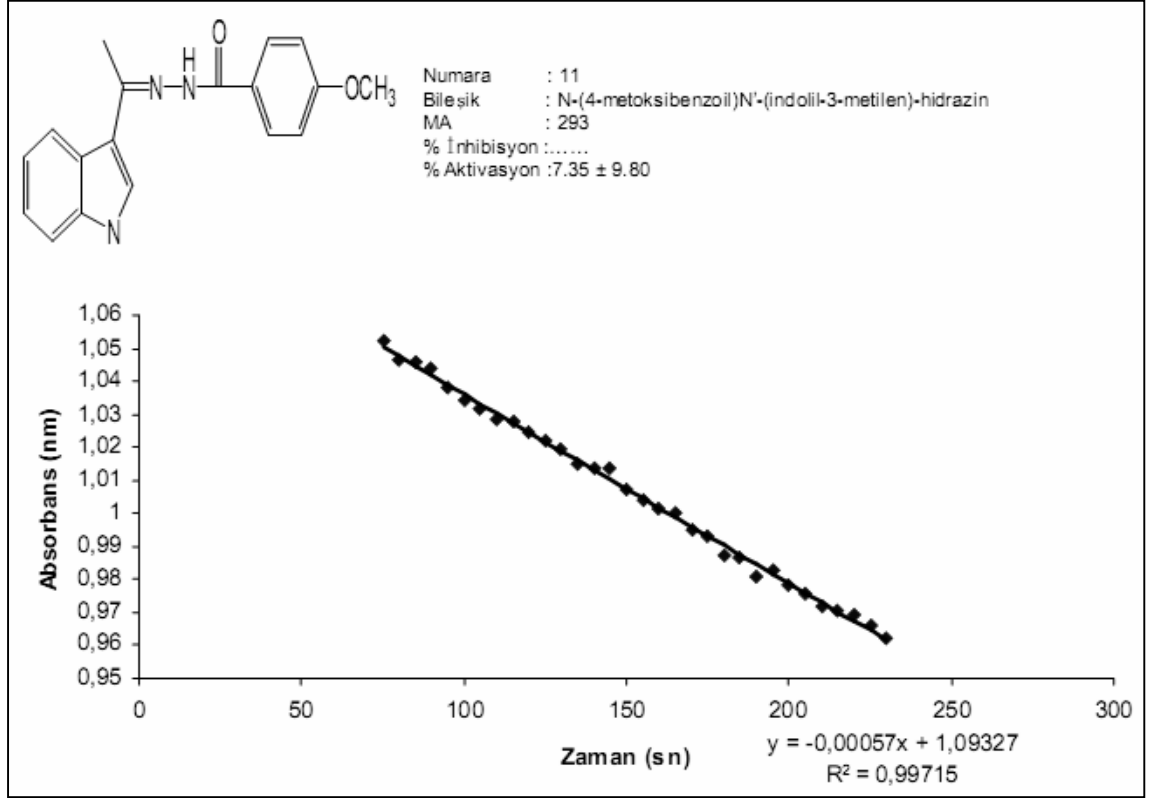
Şekil 4.10 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-klorofenil)hidrazon isimli inhibitör maddenin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

İndol türevi olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-klorofenil)hidrazon isimli inhibitör maddenin sırasıyla indol ve fenil halkalarına brom ve klor atomlarının bağlanması % 0.43 oranında inhibisyona neden olmaktadır.

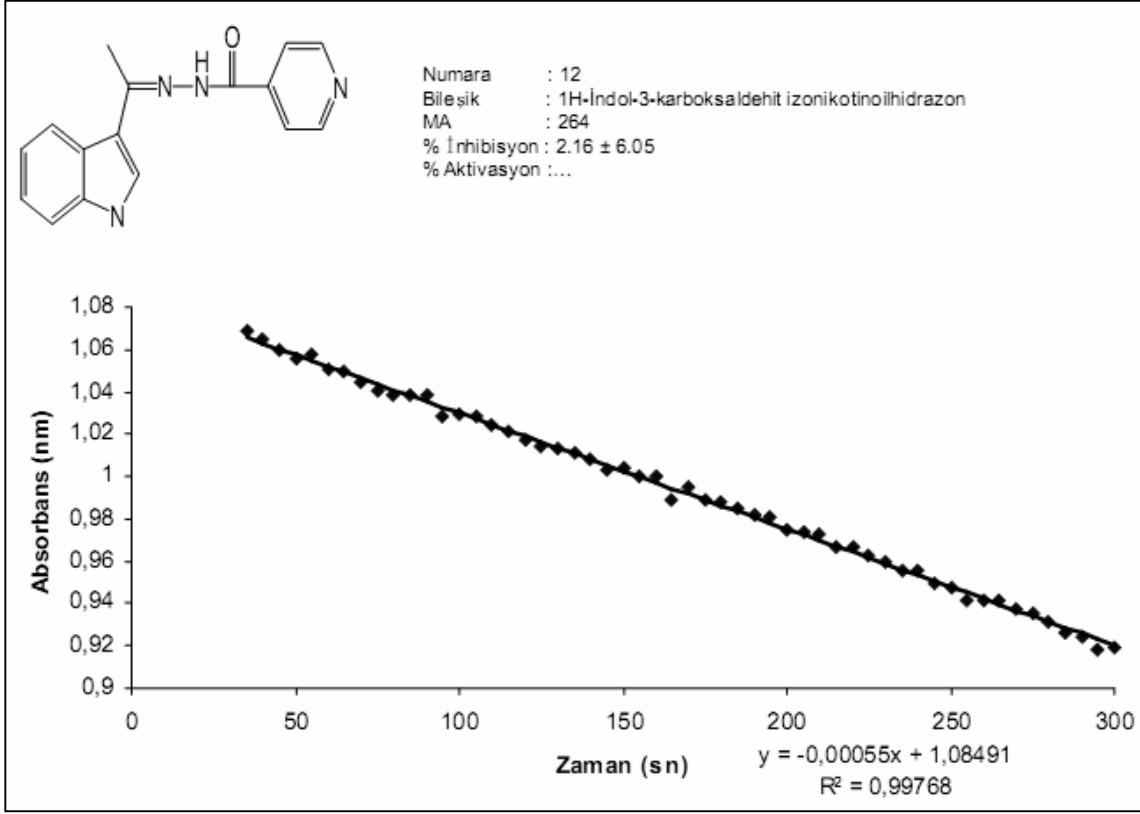


Şekil 4.11 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4-diklorofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

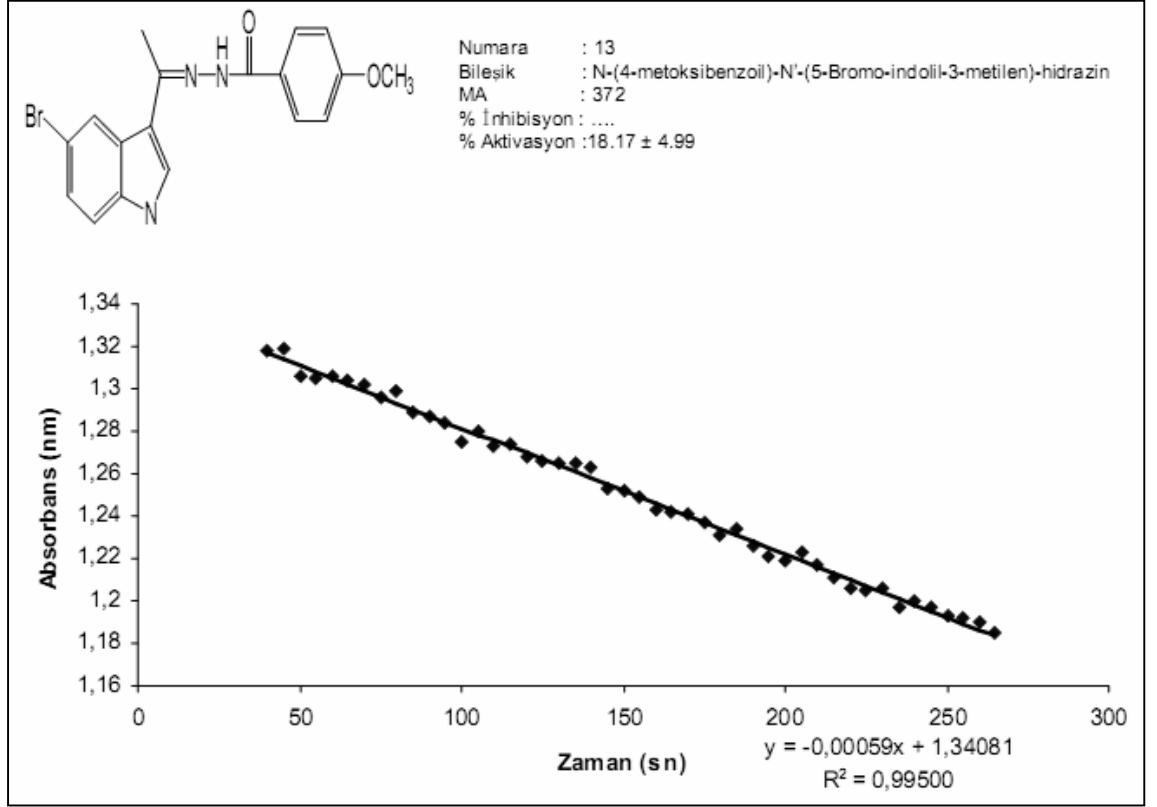
İndol türevi olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4-diklorofenil)hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün indol halkasına brom atomu ve fenil halkasına da iki tane klor atomunun bağlanması % 23.08 oranında inhibisyona sebep olmaktadır.



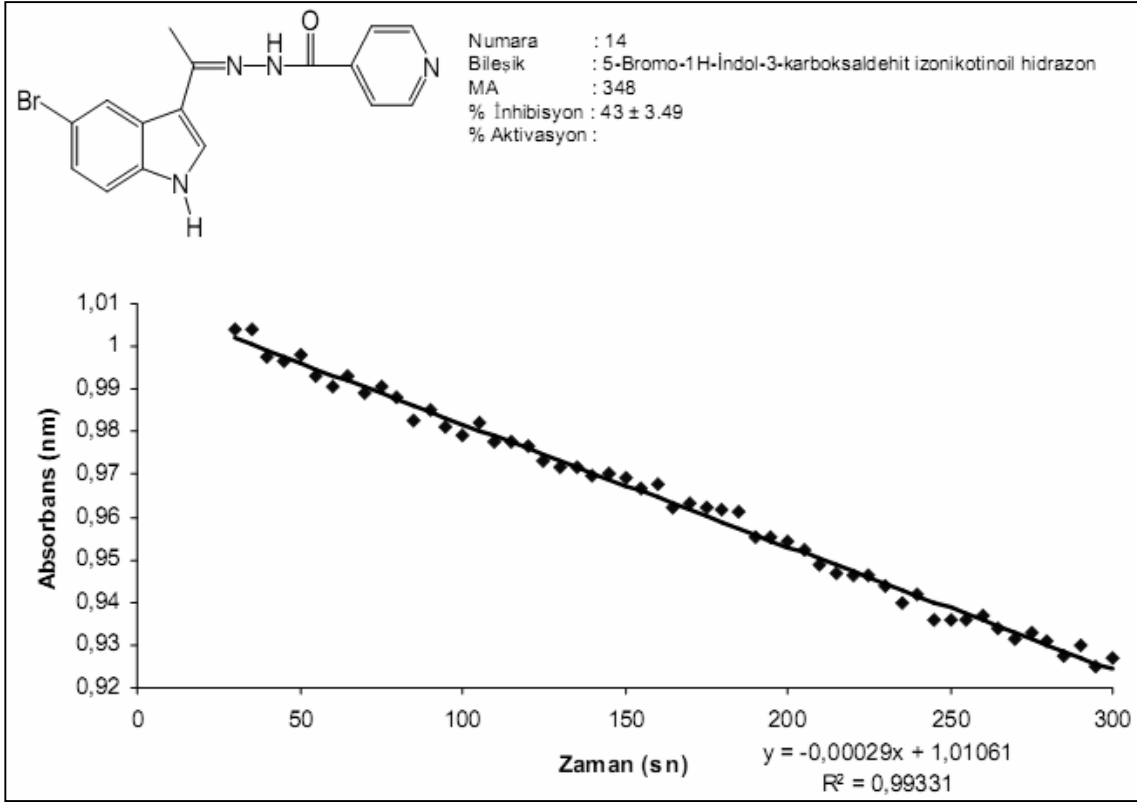
Şekil 4.12 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N-(4-metoksibenzoil)N'-(indolil-3-metilen)-hidrazinin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri



Şekil 4.13 Aldoz redüktaz inhibitörü olan 1H-indol-3-karboksaldehit izonikotinoilhidrazonun , formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

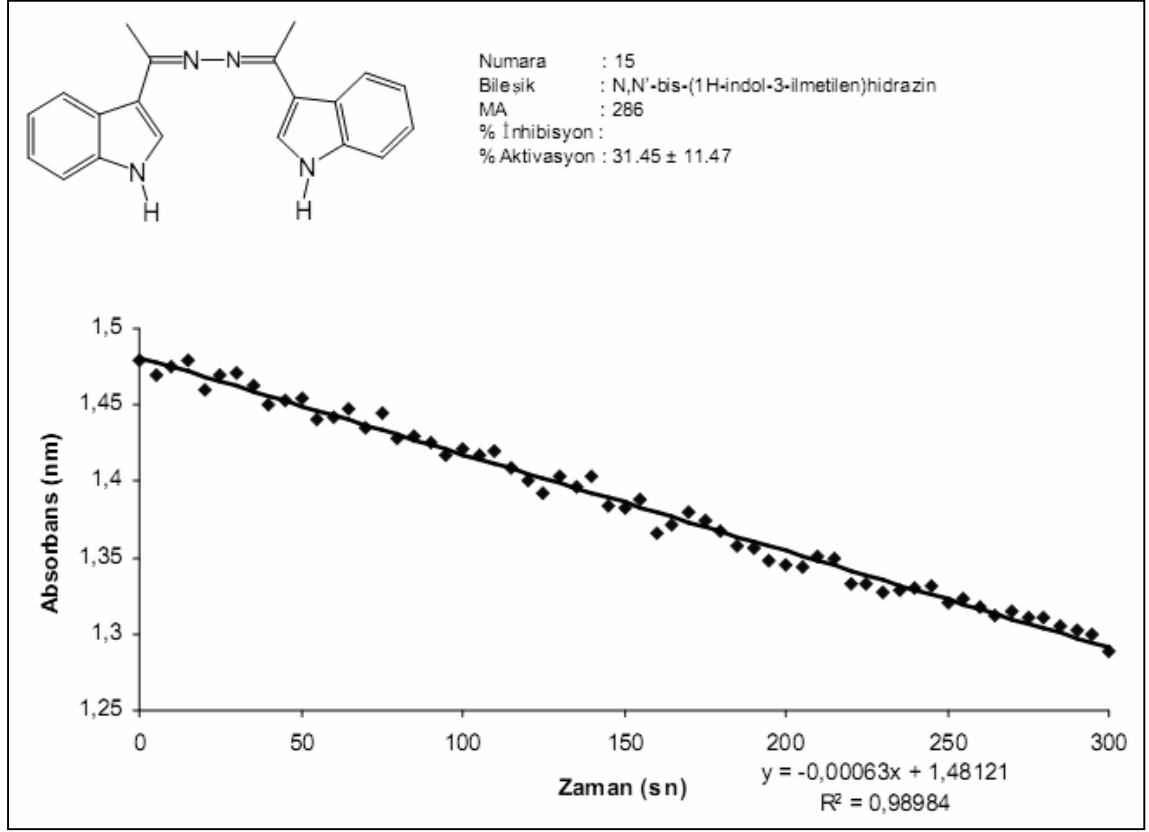


Şekil 4.14 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N-(4-metoksibenzoil)N'-(5-Bromo-indolil-3-metilen)-hidrazinin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

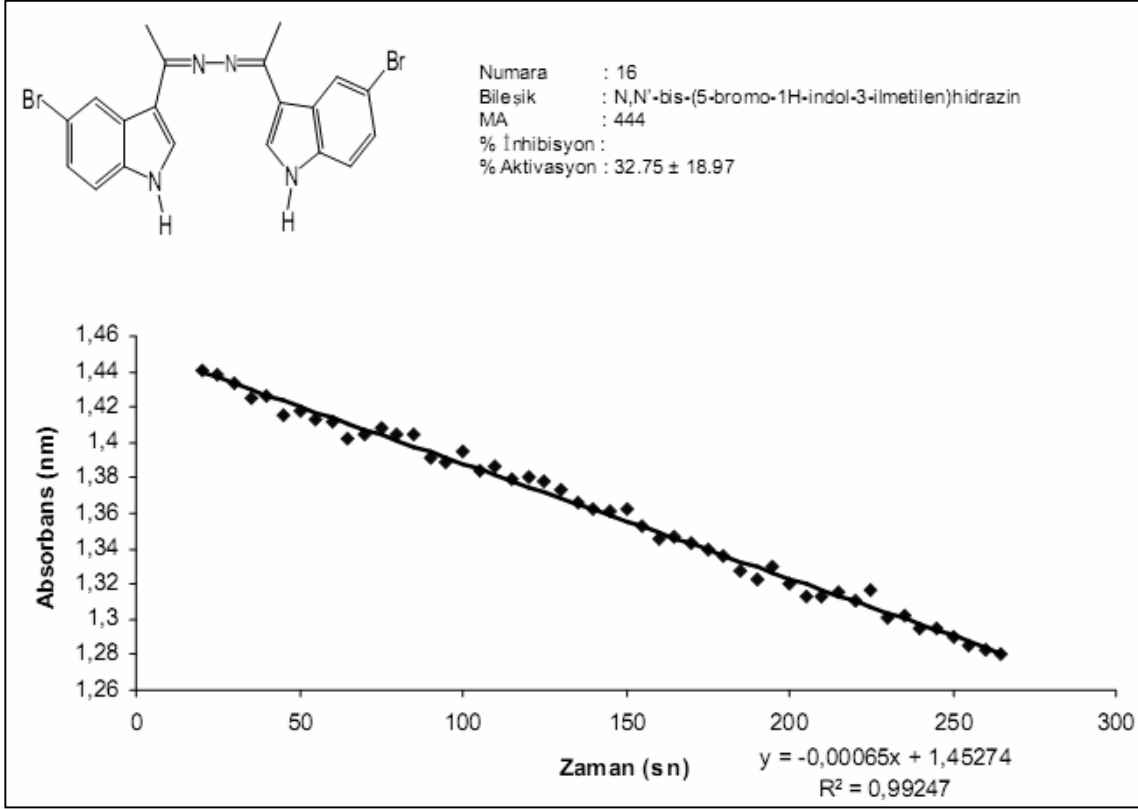


Şekil 4.15 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri

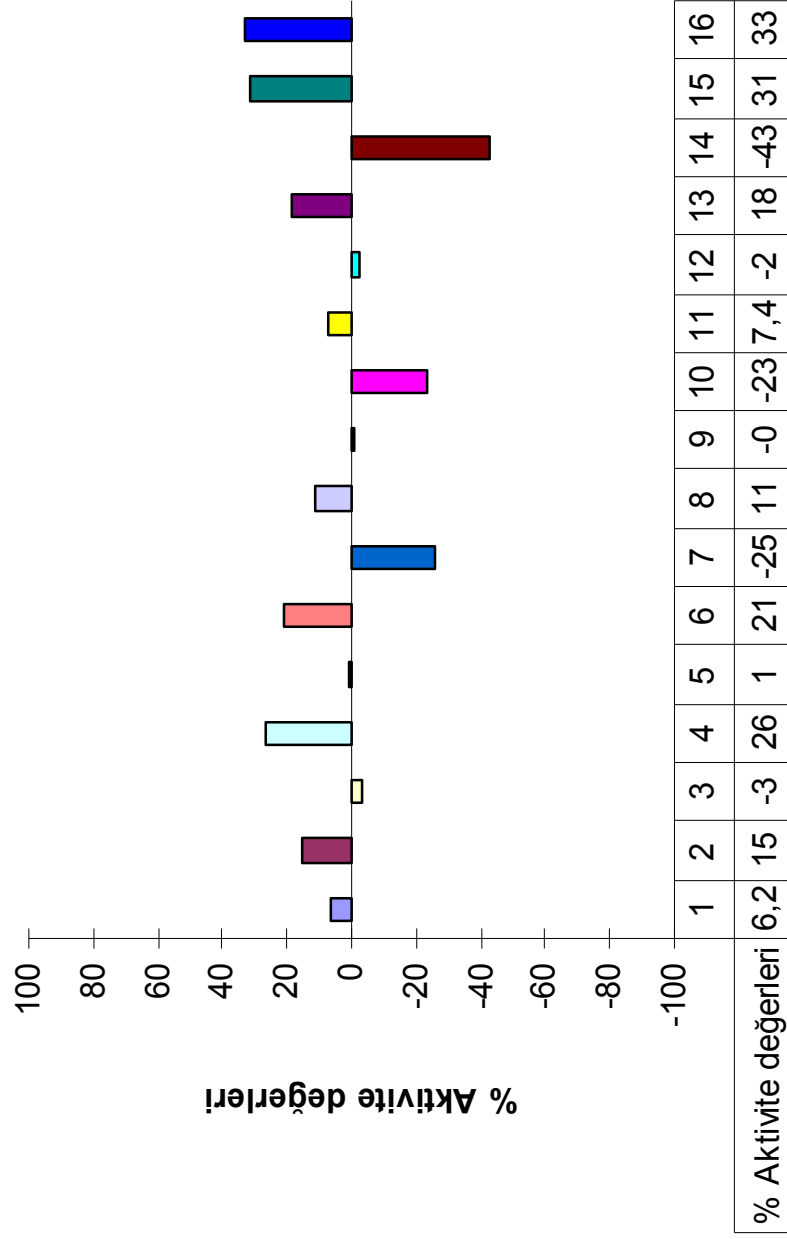
Bir indol türevi olan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon isimli inhibitör maddenin indol halkasına brom atomunun bağlanması ve yapıda izonikotinoil grubunun yer alması % 43 oranında inhibisyona neden olmaktadır.



Şekil 4.16 Aldoz redüktaz inhibitörü olan N,N'-bis-(1H-indol-3-ilmetlen)hidrazin isimli bileşiğin formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri



Şekil 4.17 N,N'-bis-(5-bromo-1H-indol-3-ylmethyl)hidrazin isimli aldoz redüktaz inhibitörünün formülü, molekül ağırlığı (MA), absorbans (nm) ve zamana (sn) bağlı olarak çizilen eğim grafiği ve % inhibisyon ve % aktivasyon değerleri



İnhibitör maddeler

Şekil 4.18 Yeni sentezlenmiş indol türevinin aldoz redüktaz enzimi üzerine % inhibisyon ve aktivasyon değerleri

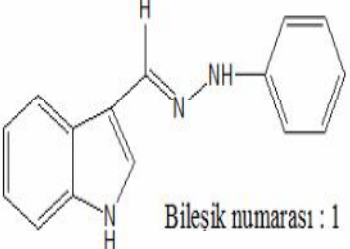
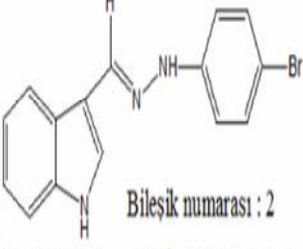
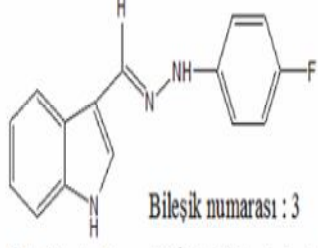
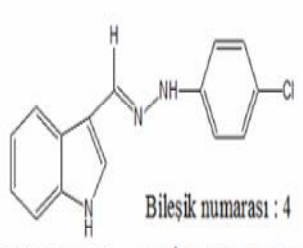
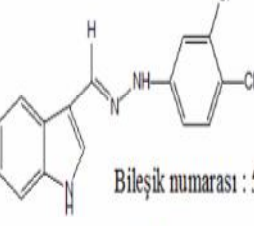
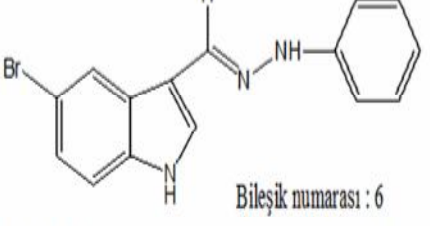
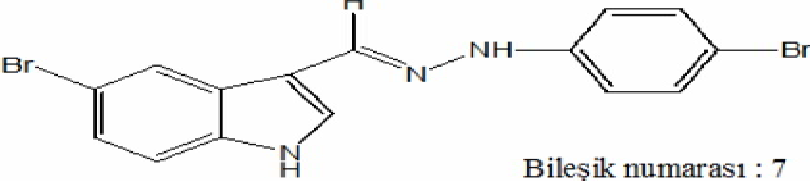
Çizelge 4.1 İnhibitör maddelerin isimleri, yer aldıkları şekillerin şekil ve sayfa numaraları

No	İnhibitör Maddenin İsmi	Şekil Numarası	Şeklin Yer Aldığı Sayfa Numarası
1	1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazon	4.2	59
2	1H-İndol-3-karboksaldehit(4-Bromofenil)hidrazon	4.3	60
3	1H-İndol-3-karboksaldehit (4-florofenil) hidrazon	4.4	61
4	1H-İndol-3-karboksaldehit (4-klorofenil) hidrazon	4.5	62
5	1H-İndol-3-karboksaldehit (3,4-diklorofenil) hidrazon	4.6	63
6	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazon	4.7	64
7	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-bromofenil) hidrazon	4.8	65
8	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-florofenil) hidrazon	4.9	66
9	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-klorofenil) hidrazon	4.10	67
10	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (3,4-dikloro fenil) hidrazon	4.11	68
11	N-(4-metoksibenzoi)N'-(indolil-3-metilen)-hidrazin	4.12	69
12	1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoilhidrazon	4.13	70
13	N-(4-metoksibenzoi)-N'-(5-Bromo-indolil-3-metilen)-hidrazin	4.14	71
14	5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon	4.15	72
15	N,N'-bis-(1H-indol-3-ilmetilen) hidrazin	4.16	73
16	N,N'-bis-(5-bromo-1H-indol-3-ilmetilen) hidrazin	4.17	74

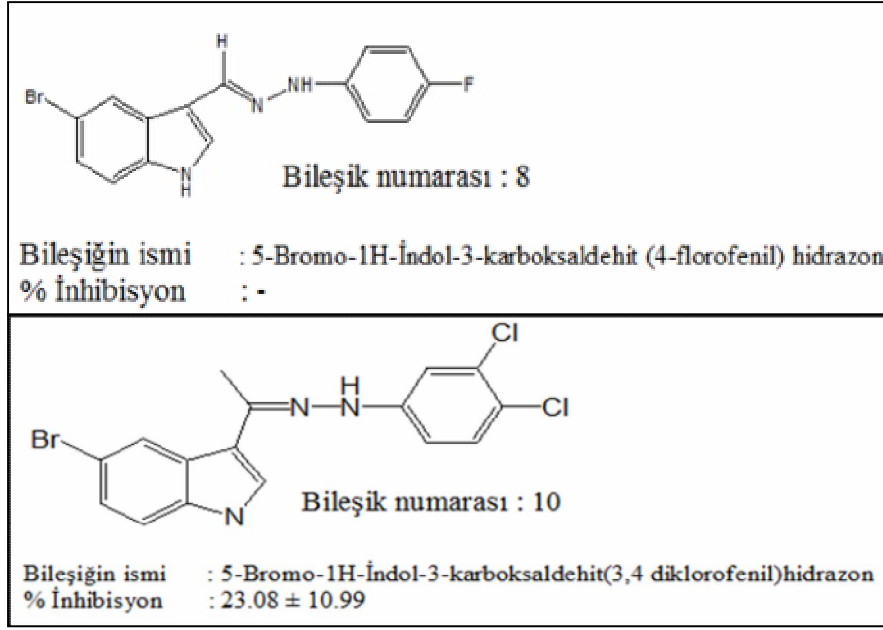
5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda kullandığımız 1 nolu 1H-indol-3-karboksaldehit fenil hidrazon isimli inhibitör madde inhibitör etki göstermediği gibi bu maddenin fenil grubuna birer tane brom, klor, flor atomları ve yine fenil grubuna iki tane klor atomunun bağlanmasıyla elde edilen sırasıyla 2, 3, 4 ve 5 nolu bileşikler de herhangi bir inhibitör etki oluşturmazken, 1 nolu bileşiğin hem fenil hem de indol grubuna bromun atomunun bağlanmasıyla elde edilen 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-bromofenil) hidrazon isimli inhibitör madde % 25.49 ± 5.01 oranında inhibisyona neden olmaktadır (Şekil 5.1). Ayrıca, 1 nolu bileşiğin indol halkasına brom atomunun eklenmesiyle oluşturulan 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazonun isimli 6 numaralı inhibitör maddenin inhibisyona neden olmaması, indol halkasına bağlanmış olan brom atomunun inhibisyon için tek başına yeterli olmadığını göstermektedir. 2, 6 ve 7 nolu bileşikler karşılaştırıldığında, 7 numaralı bileşiğin indol halkasındaki 5. konumun ve fenil halkasındaki 4. konumun etki açısından birinci derecede önemli oldukları görülmektedir. Çünkü 2 ve 6 nolu bileşikler bu konumlarda H atomu taşıırken inhibitör özellik göstermezlerken, Br varlığında hem kazandıkları apolar karakter, hem de elektronca zengin yeni yapılarıyla aldoz redüktaz enzimi ile etkileşim gösterebilmişlerdir.

Bununla birlikte, 1H-indol-3-karboksaldehit fenil hidrazon isimli 1 nolu bileşiğin indol halkasına brom ve fenil grubuna flor bağlanmasıyla oluşturulan 8 nolu bileşik inhibisyona neden olmazken (Şekil 5.2), fenil halkasına iki klor atomu ve indol grubuna brom atomunun bağlanması sonucu elde edilen 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (3,4-dikloro fenil) hidrazon isimli 10 numaralı bileşik ise % 23.08 ± 10.99 oranında inhibisyon oluşturduğu görülmüştür. İndol halkasının 5. konumunun aktivitede öneminin yanı sıra, indol halkasına bağlı fenil yapısındaki sübstitüentlerinde önemli olduğu saptanmıştır. Fenil üzerinde iki klor atomu aktivitenin artışına neden olmuştur. Yüksek elektronegativiteye sahip F atomu Cl atomlarının gösterdiği aktivite artışını gösterememiştir

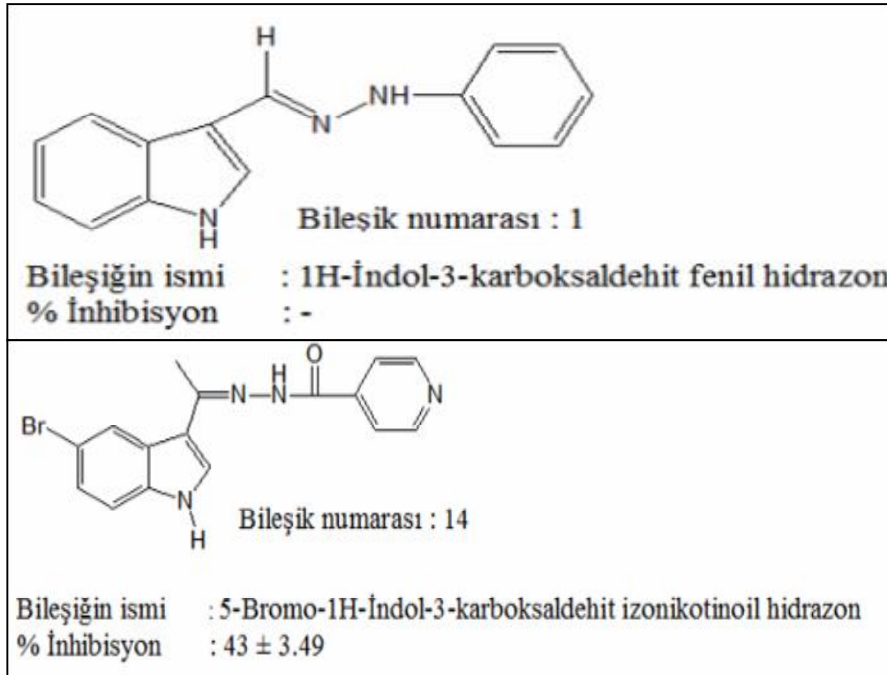
 Bileşik numarası : 1 Bileşğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazon % İnhibisyon : -	 Bileşik numarası : 2 Bileşğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit(4-Bromofenil)hidrazon % İnhibisyon : -
 Bileşik numarası : 3 Bileşğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit (4-florofenil) hidrazon % İnhibisyon : -	 Bileşik numarası : 4 Bileşğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit (4-klorofenil) hidrazon % İnhibisyon : -
 Bileşik numarası : 5 Bileşğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit (3,4-diklorofenil) hidrazon % İnhibisyon : -	 Bileşik numarası : 6 Bileşğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit fenil hidrazon % İnhibisyon : -
 Bileşik numarası : 7 Bileşğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-bromofenil) hidrazon % İnhibisyon : -	

Şekil 5.1 Bileşiklerin (1, 2, 3, 4,5, 6 ve 7 numaralı) inhibisyon açısından kendi aralarında karşılaştırılması



Şekil 5.2 8 ve 10 numaralı bileşiklerin karşılaştırılması

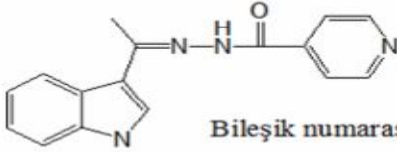
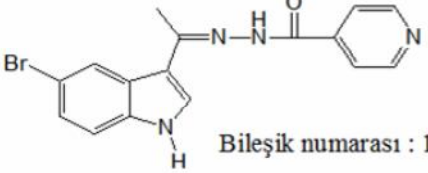
Tez çalışmamızda kullandığımız 1H-indol-3-karboksaldehit fenil hidrazon isimli inhibitörün, fenil grubunun yerine izonikotinoil grubunun geçirilmesi ve indol halkasına da brom atomunun bağlanmasıyla elde edilen 5-bromo-1H-indol-3 karboksialdehit izonikotinoil hidrazon isimli 14 numaralı inhibitör madde % 43 ± 3.49 oranında inhibisyon oluşmasını sağlamıştır. Bununla birlikte çalışmamızda elde ettiğimiz en yüksek orandaki inhibisyon bu bileşik tarafından sağlanmıştır (Şekil 5.3). Bu molekül yapısal olarak incelendiğinde yine indol halkasının 5. Konumunda Br atomu olduğunu görmekteyiz. Bu da bize aktivite artışından sorumlu en önemli bölgenin bu bölge olduğunu göstermektedir. İzonikotinoil halkasının yapısı incelendiğinde hidrazonlardan farklı olarak fenil halkası ile hidrazin azotları arasında bir karbonil grubunun varlığı dikkati çekmektedir. Bu grup elektronik yapısı nedeniyle enzimin aktif yöresindeki gruplarla etkileşime girebilir (Hidrojen bağı vb.). Fenil halkasında bir halojen bulunmamaktadır ancak halka içinde bulunan azot hetero atomu halkanın elektron zenginliğini artırır. Ayrıca azot atomunun üzerinde taşıdığı serbest elektronlar dışarıya açık konumdadır ve enzim ile etkileşecek bağlar oluşturabilir. Bu özelliği nedeniyle Cl lu türevler gibi hatta daha fazla aktivite göstermiştir.



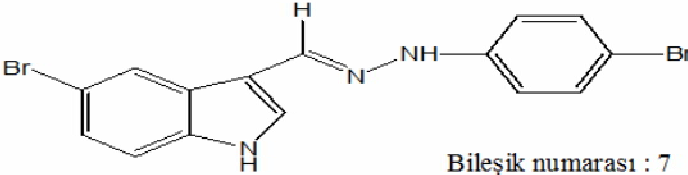
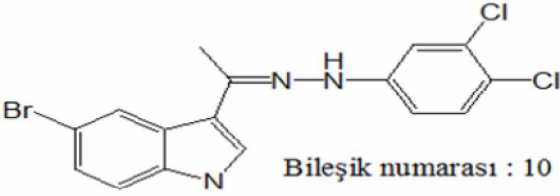
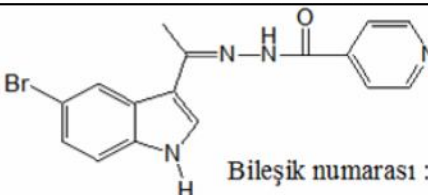
Şekil 5.3 1 ve 14 numaralı inhibitör maddelerin karşılaştırılması

Bununla birlikte 5-bromo-1H-indol-3 karboksialdehit izonikotinoil hidrazon isimli 14 numaralı inhibitör madde 43 ± 3.49 oranında inhibisyona neden olurken indol halkasındaki bromun (Şekil 5.4) yapıdan ayrılması ile oluşan 1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoilhidrazon isimli 12 numaralı bileşikte inhibisyon 2.16 ± 6.05 düşmektedir. Bu durum, Brom atomunun indol halkasındaki konumunun inhibisyon için ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

16 adet bazı yeni indol türevleri arasında en yüksek oranlarda inhibitör etki gösteren 7, 10 ve 14 numaralı bileşiklerin (Şekil 5.5) sırasıyla taşıdıkları brom, klor atomlarının ve izonikotinoil halkasının karbonil grubu ve halka içindeki azot atomu bileşiklere elektronegatif özellik kazandırmaktadır. Bu durum ise enzimin aktif bölgesinde bulunan Tyr, His ve Trp amino asitlerinin yan gruplarıyla hidrojen bağlarının kurulmasıyla ve inhibitör maddelerin sahip oldukları aromatik yan grupların (indol ve fenil halkaları) aktif merkezdeki amino asitlerin aromatik yan gruplarıyla aromatik-aromatik etkileşime girmeleriyle bu bileşiklerin inhibisyona neden olabileceklerini söyleyebiliriz.

	Bileşik numarası : 12 Bileşiğin ismi : 1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoilhidrazon % İnhibisyon : % 2.16 ± 6.05
	Bileşik numarası : 14 Bileşiğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon % İnhibisyon : 43 ± 3.49

Şekil 5.4 12 ve 14 numaralı bileşiklerin karşılaştırılması

	Bileşik numarası : 7 Bileşiğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit (4-bromofenil) hidrazon % İnhibisyon : -
	Bileşik numarası : 10 Bileşiğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4 diklorofenil)hidrazon % İnhibisyon : 23.08 ± 10.99
	Bileşik numarası : 14 Bileşiğin ismi : 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon % İnhibisyon : 43 ± 3.49

Şekil 5.5 Yüksek oranda inhibitör etki gösteren indol türevleri

Hiperglisemi ile karakterize edilen Diabetes mellitus hastalığında, insülin bağımsız olan hücrelere (böbrekler, siyatik sinirler, lens vb.) fazla miktarda glukoz akışı nedeniyle poliyol yolağının ilk enzimi olan aldoz redüktazın aktivesinin arttığı daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Cheatham ve Kahn 1995, Ho vd. 2000, Sato vd. 2003, Cousen vd. 2007). Bu durum hücrelerde sorbitol birikimine ve redoks dengesinin bozulmasına bağlı olarak fonksiyon kaybına neden olmaktadır (Sato vd. 2003). Böylece, diyabetik nefropati, diyabetik nöropati, diyabetik retinopati ve katarakt gibi diyabete bağlı olarak gelişen ikincil komplikasyonlar ortaya çıkmaktadır (Srivastava vd. 2005). Aldoz redüktaz enzimini inhibe edebilen inhibitörlerin sentezlenmesi ve geliştirilmesi ile bu komplikasyonların engellenebileceği düşünülmektedir (Kotani vd. 1997). Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalarda, aldoz redüktaz inhibitörlerinin sadece daha önce bahsedilen rolleri değil, aynı zamanda karaciğer, göğüs, ovaryum, serviks ve kolon kanseri gibi çeşitli kanserlerin tedavisinde de iyileştirici bir ajan olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Alexiou vd. 2009). Bu nedenle aldoz redüktaz inhibitörlerinin önemi gittikçe artmaktadır.

Aldoz redüktaz inhibitörleri karboksilik asit grubu taşıyanlar, siklik imid grubu taşıyanlar ve sülfonil nitrometan türevleri olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar (Rogniaux vd. 1999, Wang vd. 2007). İnhibitörlerin polar başları ile aktif bölge kalıntıları arasındaki etkileşimler enzim-inhibitör kompleksinin kararlılığında önemli rol oynamaktadır. Siklik imid sınıfına dahil olan minalrestatin flor atomunun ve fidarestatin karbamoil grubunun karboksilat fonksiyonel grubu ile yerdeğiştirmesi sonucu enzim-inhibitor kompleksinin net bağlanma enerjisi artmaktadır (Darmanin vd. 2004).

Karboksilik asit sınıfından olan ponarestatin ise, klinik açıdan önemli bir yan etki oluşturmadığı ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin de bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca, yine aynı sınıftan olan NZ-314 isimli ARI'nün motor sinir iletim hızını ve siyatik sinirlerdeki kan akışını arttırdığı bilinmektedir (Miyamoto 2002). Bununla beraber, diğer bir aldoz redüktaz inhibitörü olan fidarestat ile yapılan çalışmalar sinir kan akışını ve sinir hücrelerinde biriken sorbitol seviyesini normal düzeye getirdiği bilinmektedir (Asano vd. 2002).

Bir diğ er AR inhibitörü olan genistein, poliyol yolağının neden olduğu oksidatif stresi engelleyerek, GSH düzeyinin artmasına neden olmaktadır. Bu durum lens proteinlerinin zarar görmesini engellediği için katarakt oluşumunu da durdurmaktadır (Kim vd. 2008).

Sıçan karaciğer tümör h celeri ile yapılan bir çalışmada, aldoz redüktazın, karbonil metabolitlerinin (3-DG, gliserlaldehit) işlevini engelleyerek hücrede kontrolsüz bölünmenin devamını sağladığı gösterilmiştir. Bu nedenle karaciğer tümör oluşumunda (hepatokarsinogenez) aldoz redüktazın ifadenmesindeki artışın, kanser hücrelerinin ölümsüzlüğü ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (Jin vd. 2006). Bu bağlamda da aldoz redüktaz inhibitörlerinin önemi açıktır.

Kolon kanserinin temel özelliklerinden birisi, araşidonik asitten, kolon epitelyum hücrelerin kontols z çoğalmasına neden olan prostaglandinlerin sentezini sağlayan iCOX-2 enzimindeki aşırı artıştır. Oksidatif stres ve enflamasyon ile ilişkili en önemli sinyal yolağı büyüme faktörleri (bFGF, PDGF) veya enflamatuvar sitokinler (TNF- ) tarafından NF- B'nin aktivasyonudur. Caco-2 (insan kolon kanser hücreleri) hücrelerinde aldoz redüktazın sorbinil ile inhibisyonu büyüme faktör uyarımlı NF- B'nin aktivasyonunu engellediği g r lm ştir (Tammali 2006). Çeşitli kanser dokularında oksidatif stresin arttığı ve AR aktivitesinin de bu koşullarda arttığı bilinmektedir. Ayrıca, göğüs, serviks, yumurtalık ve rektum kanser dokularıyla yapılan çalışmalarda AR'ın bu dokularda aşırı ifadenmekte olduğu gösterilmiştir (Saraswat vd. 2006).

Kanserli hücrelerin tedavisinde kullanılan anti-kanser ilaçlar (doxorubicin ve cis-platin) ERK sinyal yolağını uyararak kanser hücrelerini apoptosise yönlendirmektedir. Ancak, aldoz redüktaz hücrelerdeki bu aktiviteyi baskıladığı için kanser hücreleri anti-kanser ilaçlara direnç göstermektedir. Aldo  redüktaz inhibe edildiğinde ise, ERK sinyal yolağının aktivitesi artmakta ve böylece kanser hücrelerinin apoptosise yönlendiği görülmektedir (Alexiou vd. 2009). Yani, kanser tedavisinde aldo  redüktaz inhibitörlerinin de kullanılması, daha düşük dozlarda anti-kanser ilaçların

kullanılmasına sağlayarak normal hücrelere anti-kanser ilaçların verdiği zararı azalacaktır. Bu da aldoz redüktaz inhibitörlerinin kanser tedavisindeki önemini açık bir şekilde vurgulamaktadır (Alexiou vd. 2009).

Ayrıca, aldoz redüktaz enzimi ile %71 oranında benzerlik gösteren ve onun gibi 316 amino asit dizisinden oluşan aldoz-redüktaz benzeri-1 protein (ARL-1 veya AKR1B10), sigara kullanan bireylerde görülen squamous karsinoma (SCC) ve adenokarsinoma dokularında arttığı bilinmektedir. Bu enzim, retinali, retinole çevirdiği için hücrede retinoik asit miktarının azalmasına neden olmaktadır. Böylece hücrede öncül kanser lezyonu olan metaplasti meydana gelmektedir. Bununla beraber, aldoz redüktaz enziminin de aynı etkilere neden olduğu bilinmektedir. ARI'leri (tolrestat) ile yapılan hayvan tedavi çalışmaları AR ve ALR-1 enzimlerini inhibe etmektedir. Bu veriler, diyabet tedavisinde yan etkilere sahip olan AR inhibitörlerinin, bu olumlu etkilerinin de gözden kaçırılmaması gerektiğini göstermektedir (Crosas vd. 2003, Penning 2005, Alexiou vd. 2009).

Lipopolisakkaritler tarafından uyarılan sıçan üveitik lenslerinde çeşitli enflamatuvar sitokinler ve kemokinler (TNF- α , interlökin-6 ve interferon- γ) miktarı artmaktadır. Bu da reaktif oksijen türlerinin artışına neden olmaktadır. Artan ROS'lar NF- κ B ve AP-1'i aktive ederek iNOS, COX-2 enzimlerine ait genleri ve TNF- α genlerini uyarmaktadır. Böylece, hücrede NO, PGE2, TNF- α düzeyleri artmaktadır. AR inhibisyonu uveitis gibi okular enflamasyon hastalıklarında tedavi edici veya engelleyici bir ajan olarak da görülmektedir (Yadav vd. 2007).

Yapılan çalışmalarda, lipid peroksidasyonunu indol-2-karboksilik asit inhibitörü % 38 oranında, indol-3-karboksilik asit inhibitörü ise % 13 oranında inhibe edebildiği gösterilmiştir (Stitinová vd. 2002).

Ayrıca, melatonin ve karvedilol gibi bazı indol türevlerinin nörolojik hastalıkların tedavisinde veya engellenmesinde etkili olabildiği ve COX-1 ve COX-2 enzimlerinin inhibitörleri için indol halkasının etkili bir iskelet yapı oluşturduğu bilinmektedir (Stolc 1999, Hu vd. 2003).

Bununla birlikte, bu tez çalışmasında kullanılan, melatonin analogu olan indol türevlerinin (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 kodlu inhibitörler) DPPH (Diphenyl-2-picrylhydrazyl), aktivite sonuçları melatonin ile karşılaştırıldığında, anti lipid peroksidasyonu ve süperoksit radikal temizleyicisine göre çok daha etkili antioksidan özellik taşıdıkları bildirilmiştir (Gürkök vd. 2009)

Aldoz redüktaz enziminin yukarıda belirtildiği gibi, hem diyabetik komplikasyonlara hem de, çeşitli kanser oluşumuna neden olması bu enzime ait inhibitör maddelerin gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bununla beraber, karboksilik asit sınıfında yer alan inhibitörler (tolrestat, zopolrestat), düşük pKa değerlerine sahip oldukları için hücre zarından kolayca geçemeyerek *in vivo* ortamda düşük aktivite göstermektedirler. Bu nedenle yüksek pKa değerlerine sahip hydation sınıfı inbitörler (sorbini, fidarestat) geliştirilmiştir. Ancak, bu inhibitörler de istenmeyen yan etkilere neden oldukları için çalışmaların yeni aldoz redüktaz inhibitörlerine yönelmesine neden olmuştur (Alexiou vd. 2009). Bu nedenle sadece aldoz redüktaz enzimlerini inhibe edebilen inhibitörlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamız sonucunda en yüksek inhibisyon değerlerini veren 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(4-bromofenil)hidrazon, 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit(3,4-dikloro fenil) ve 5-Bromo-1H-İndol-3-karboksaldehit izonikotinoil hidrazon isimli bileşikler (sırasıyla 7, 10 ve 14 numaralı bileşikler) aldoz redüktaz enzimini inhibe edecek ilaç geliştirme aşamalarında, üzerinde ayrıntılı çalışmalar devam etmesi gereken yapılardır. Bu yapılar ele alınarak, yeni bileşikler sentezlenerek ileri çalışmalar yapılabilir. Günümüzde aldoz redüktaz inhibitörü olmaya aday, klinik deneyleri ve faz çalışmaları devam eden çok sayıda ilaç adayı molekül vardır ancak piyasada tek bir preparatın (Epalrestat; Aldorin®) bulunduğu düşünülürse enzim inhibitörü molekül taraması çalışmaları son derece önemlidir. Tez çalışmamız bu taramaya moleküller üzerindeki yapı-aktivite ilişkisine de değinerek katkıda bulunmuştur. Daha sonraki basamaklar *invivo* çalışmalarla devam edecektir.

KAYNAKLAR

- Abacı, A., Böber, E. ve Büyükgebiz, A. 2007. Tip-1 Diyabet. Güncel Pediatri, 5; 1-10.
- Agardh, C.D., Stenramb, U., Torffvit, O. and Agardh, E. 2002. Effects of inhibition of glycation and oxidative stress on the development of diabetic nephropathy in rats. Journal of Diabetes and Its Complications 16; 395-400.
- Alexiou, P., Pegklidou, K., Chatzopoulou, I. N. and Demopoulos, V. J. 2009. Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of 21st century. Current Medicinal Chemistry, 16(6); 734-752.
- Anonymous. 1999. World Health Organization. Department of Noncommunicable Disease Surveillance: Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. WHO Publication, Geneva, 1-59.
- Anonymous. 2000. American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescent. Diabetes Care, 23(3); 381-389.
- Anonymous. 2002. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, 25(1); 3-20.
- Anonymous. 2003. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. Diabetes Care 26, 3160-3167.
- Anonymous. 2004a. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, 27(1); 5-10.
- Anonymous. 2004b. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. Diabetes Care, 27(1); 88-90.
- Anonymous. 2007. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care, 30(1); 42-47.
- Ando, H., Takamura, T., Nagai, Y. and Kaneko, S. 2006. Erythrocyte sorbitol level as a predictor of the efficacy of epalrestat treatment for diabetic peripheral polyneuropathy. Journal of Diabetes and Its Complications, 20; 367-370.
- Andreozzi, F., Dalessandris, C., Federici, M., Laratta, E., Guerra, S. D., Prato, S. D., Marchetti, P., Lauro, R., Perticone, F. and Sesti, G. 2004. Activation of the hexosamine pathway leads to phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on Ser³⁰⁷ and Ser⁶¹² and impairs the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt/Mammalian target of rapamycin insulin biosynthetic pathway in RIN pancreatic beta-cells. Endocrinology, 145(6); 2845-2857.

- Asano, T., Saito, Y., Kawakami, M. and Yamada, N. 2002. Fidarestat (SNK-860), a potent aldose reductase inhibitor, normalizes the elevated sorbitol accumulation in erythrocytes of diabetic patients. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 16; 133-138.
- Bakker, W., Eringa, E. C., Sipkema, P. and Hinsbergh V. W. M. van. 2009. Endothelial dysfunction and diabetes: Roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Research*, 335; 165-189.
- Balasubramanyam, M., Rema, M. and Premanand, C. 2002. Biochemical and molecular mechanisms of diabetic retinopath. *Current Science*, 83 (12); 1506-1514.
- Balendiran, G. K., Martin, H. J., El-Hawari, Y. and Maser, E. 2009. Cancer biomarker AKR1B10 and carbonyl metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 178; 134–137.
- Beckman, J. A., Creager, M. A. and Libby, P. 2002. Pathophysiology, and management diabetes and atherosclerosis: Epidemiology. *Journal of the American Medical Association (JAMA)*, 287 (19); 2570-2581.
- Bhadada, S. K., Sahay, R. K., Jyotsna, V. P. and Agrawal, J. K. 2001. Diabetic neuropathy: Current concepts. *Clinical Medicine*, 2(4); 305-318.
- Bhatwadekar, A. and Stitt, A.W. 2007. AGE and RAGE inhibitors in the treatment of diabetic retinopathy. *Expert Review of Ophthalmology*, 2(1); 105-120.
- Bohren, K. M., Grimshaw, C. E., Lai, C-J., Harrison, D. H., Ringe, D., Petsko, G. A. and Gabbay, K. H. 1994. Tyrosine-48 is the proton donor and Histidine-110 directs substrate stereochemical selectivity in the reduction reaction of human aldose reductase: Enzyme kinetics and crystal structure of the Y48H mutant enzyme. *Biochemistry*, 33; 2021-2032.
- Bohren, K. M., Brownlee, J. M., Milne, C. A., Gabbaya, K. H., and Harrison, D. H. T. 2005. The structure of Apo R268A human aldose reductase: Hinges and latches that control the kinetic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 201-212.
- Bohren, K. M., Grimshaw, C. E. and Gabbaya, K. H. 1992. Catalytic effectiveness of human aldose reductase critical role of c-terminal domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 20965-20970.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72; 248-252.
- Bravi, M. C., Pietrangeli, P., Laurenti, O., Basili, S., Cassone-Faldetta, M., Ferri, C. and De Mattia, G. 1997. Polyol pathway activation and glutathione redox status in non-insulin-dependent diabetic patients. *Metabolism*, 46(10); 1194-1198.

- Brownlee, J. M., Carlson, E., Milne, A. C., Pape, E. and Harrison, D. H. T. 2006. Structural and thermodynamic studies of simple aldose reductase-inhibitor complexes. *Bioorganic Chemistry*, 34; 424-444.
- Brownlee, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. 2001. *Nature*, 414; 813-820.
- Brownlee, M. 2005. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes*, 54; 1615-1625.
- Burg, M. B. and Kador, P.F. 1988. Sorbitol, osmoregulation, and the complications of diabetes. *The Journal of Clinical Investigation*, 81; 635-640.
- Cade, W. T. 2008. Diabetes-related microvascular and macrovascular diseases in the physical therapy setting. *Physical Therapy*, 88(11); 1322-1335.
- Cai, J. and Boulton, M. 2002. The pathogenesis of diabetic retinopathy: Old concepts and new questions. *Eye*, 16; 242-260.
- Carbone, V., Zhao, H. T., Chung, R., Endo, S., Hara, A. and El-Kabbani, O. 2009. Correlation of binding constants and molecular modelling of inhibitors in the active sites of aldose reductase and aldehyde reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 17; 1244-1250
- Carpenter, L., Mitchell, C. J., Xu, Z. Z., Poronnik, P., Both, G. W. and Biden, T. J. 2004. PKC- α is activated but not required during glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. *Diabetes*, 53; 53-60.
- Cerelli, K.J., Curtis, D.L., Dunn, J.P., Nelson, P.H., Peak, T.M. and Waterbury, L.D. 1986. Antiinflammatory and aldose reductase inhibitory activity of some tricyclic arylacetic acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 29; 2347-2351
- Chan, N. N., Vallance, P. and Colhoun, H. M. 2000. Nitric oxide and vascular responses in type I diabetes. *Diabetologia*, 43; 137-147.
- Chan, P. S. and Kowluru, R. A. 2007. Role of retinal mitochondria in the development of diabetic retinopathy. *Expert Review of Ophthalmology*, 2(2); 237-247.
- Chandra, D., Jackson, E. B., Ramana, K. V. Kelley, R., Srivastava, S. K. and Bhatnagar, A. 2002. Nitric oxide prevents aldose reductase activation and sorbitol accumulation during diabetes. *Diabetes*, 51; 3095-3101.
- Chandra, D., Ramana, K. V., Friedrich, B., Srivastava, S., Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. 2003. Role of aldose reductase in TNF- α -induced apoptosis of vascular endothelial cells. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144; 605-612.
- Cheatham, B. and Kahn, R. 1995. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrine Society*, 16(2); 117-142.

- Chibber, R., Chibber, S. and Kohner, E. V. 2007. 21st Century treatment of diabetic retinopathy. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 2(5); 623–631.
- Chung, S. S. M., Ho, E. C. M., Lam, K. S. L. and Chung S. K. 2003. Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Journal of the American Society of Nephrology*, 14; 233–236.
- Clark, C. M. and Lee, D. A. 1995. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*, 332(18); 1210–1217.
- Clee, M. S. and Attie, A. D. 2007. The genetic landscape of type 2 diabetes in mice. *Endocrine Reviews*, 28(1); 48–83.
- Cooper, M. E. 1998. Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy. *Lancet*, 352; 213–219.
- Cooper, M. E., Gilbert, R. E. and Epstein, M. 1998. Pathophysiology of diabetic nephropathy. *Metabolism*, 47(12); 3–6.
- Cousen, P., Cackett, P., Bennett, H., Swa, K. and Dhillon, B. 2007. Tear production and corneal sensitivity in diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 21; 371–373.
- Crosas, B., Hyndman, D. J., Gallego, O., Martras, S., Pares, X., Flynn, T. G. and Farres, J. 2003. Human aldose reductase and human small intestine aldose reductase are efficient retinal reductases: consequences for retinoid metabolism. *Biochemical Society*, 373; 973–979.
- Da Settimo, F., Primofiore, G., Da Settimo, A., La Motta, C., Simorini, F., Novellino, E., Greco, G., Lavecchia, A. and Boldrini, E. 2003. Novel, Highly Potent Aldose Reductase Inhibitors: Cyano(2-oxo-2,3-dihydroindol-3-yl)acetic Acid Derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(8); 1419–1428.
- Darmanin, C., Chevreux, G., Potier, N., Dorsselaer, A. V., Hazemann, I., Podjarnyc, A. and El-Kabbani, O. 2004. Probing the ultra-high resolution structure of aldose reductase with molecular modelling and noncovalent mass spectrometry. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 12, 3797–3806.
- Das, B., and Srivastava, S. K. 1985. Purification and properties of aldose reductase and aldehyde reductase II from human erythrocyte. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 238; 670–679.
- Daş-Evcimen, N. and King, G. L. 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacological Research*, 55, 498–510.

- Dawnay, A. B. St. J. and Millar, D. J. 1996. Glycation and advanced glycation end-product formation with icodextrin and dextrose. *Peritoneal Dialysis International*, 17; 52-58.
- De Vriese, A. S., Verbeuren, T. J., Van de Voorde, J., Lameire, N. H. and Vanhoutte, P. M. 2000. Endothelial dysfunction in diabetes. *British Journal of Pharmacology*, 130(5); 963-974.
- Degrell, P., Cseh, J., Mohás, M., Molnár, G. A., Pajor, L., Chathamc, J. C., Fülöp, N. and Wittmann, I. 2009. Evidence of O-linked N-acetylglucosamine in diabetic nephropathy. *Life Sciences*, 84; 389–393.
- Devendra, D., Liu, E. and Eisenbarth, G.S. 2004. Type 1 diabetes: recent developments. *British Medical Journal*, 328; 750-754.
- Djoubissie, P. O., Snirc, V., Sotnikova, R., Zurova, J., Kyselova, Z., Skalska, S., Gajdosik, A., Javorkova, V., Vlkovicova, J., Vrbjar, N. and Stefek, M. 2006. *In vitro* inhibition of lens aldose reductase by (2-Benzyl-2,3,4,5-Tetrahydro-1 H-Pyrido[4,3-b] Indole-8-yl)-asetic acid in enzyme preparations isolated from diabetic rats. *General Physiology and Biophysics*, 25; 415-425.
- Doi, T., Mima, A., Matsubara, T., Tominaga, T. and Abe, H.A. 2008. The current clinical problems for early phase of diabetic nephropathy and approach for pathogenesis of diabetic nephropathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82; 21-24.
- Dunlop, M. 2000. Aldose reductase and the role of the polyol pathway in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 58 (77); 3-12.
- Eckel, R. H., Wassef, M., Chait, A., Sobel, B., Barrett, E., King, G., Lopes-Virella, M., Reusch, J., Ruderman, N., Steiner, G. and Vlassara, H. 2002. Prevention conference VI: Diabetes and cardiovascular disease: Writing group II: Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes. *Circulation*, 105; 138-143.
- Edwards, J. L., Vincent, A. M., Cheng, H. T. and Feldman, E. L. 2008. Diabetic neuropathy: Mechanisms to management. *Pharmacology and Therapeutics*, 120; 1-34.
- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, J.M. and Quiocho, F.A. 1998. Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Molecular Vision*, 4; 19.
- El-Kabbani, O., Ruiz, F., Darmanin, C. and Chung, R. P. T. 2004. Aldose reductase structures: implications for mechanism and inhibition. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 61; 750-762.
- Engelgau, M. M. 2004. Diabetes diagnostic criteria and impaired glycemic states: Evolving evidence base. *Clinical Diabetes*, 22(2); 69-70.

- Fong, D. S., Aiello, L. P., Ferris, F. L. and Klein, R. 2004. Diabetic retinopathy. *Diabetes Care*, 27(10); 2540-2553.
- Fowler, M. J. 2008. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes*, 26(2); 77-82.
- Fukumoto, S., Yamauchi, N., Moriguchi, H., Hippo, Y., Watanabe, A., Shibahara, J., Taniguchi, H., Ishikawa, S., Ito, H., Yamamoto, S., Iwanari, H., Hironaka, M., Ishikawa, Y., Niki, T., Sohara, Y., Kodama, T., Nishimura, M., Fukayama, M., Dosaka-Akita, H. and Aburatani, H. 2005. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clinical Cancer Research*, 11; 1776-1785.
- Gleissner, C. A., Galkina, E., Nadler, J. L. and Ley, K. 2007. Mechanisms by which diabetes increases cardiovascular disease. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 4 (3); 131-140.
- Goh, S. Y. and Cooper, M. E. 2008. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 93; 1143-1152.
- Goldberg, H. J., Whiteside, C. I. and Fantus, I. G. 2002. The hexosamine pathway regulates the plasminogen activator inhibitor-1 gene promoter and Sp1 transcriptional activation through protein kinase C- β I and δ . *The Journal of Biological Chemistry*, 277(37); 33833-33841.
- Gugliucci, A. 2000. Glycation as the glucose link to diabetic complications. *Journal of the American Osteopathic Association (JAOA)*, 100 (10); 621-634.
- Gürkök, G., Coban, T. and Süzen, S. 2009. Melatonin analogue new indole hydrazide/hydrazone derivatives with antioxidant behavior: Synthesis and structure-activity relationships. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 24(2); 506-515.
- Han, Y., Randell, E., Vasdev, S., Gill, V., Curran, M., Newhook, L. A., Grant, M., Hagerty, D. and Schneider, C. 2009. Plasma advanced glycation endproduct, methylglyoxal-derived hydroimidazolone is elevated in young, complication-free patients with Type 1 diabetes. *Clinical Biochemistry*, 42(7-8); 562-9.
- Hanover, J. A. 2001. Glycan-dependent signaling: O-linked N-acetylglucosamine. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 15; 1865-1876.
- Ho, H. T. B., Chung, S. K., Law, J. W. S., Ko, B. C. B., Tam, S. C. F., Brooks, H. L., Knepper, M. A. and Chung, S. S. M. 2000. Aldose reductase-deficient mice develop nephrogenic. *Molecular and Cellular Biology*, 20(16); 5840-5846.

- Hodgkinson, A. D., Bartlett, T., Oates, P. J., Millward, B. A. and Demaine, A. G. 2003. The response of antioxidant genes to hyperglycemia is abnormal in patients with type 1 diabetes and diabetic nephropathy. *Diabetes*, 52; 846–851.
- Hoogwerf, B. J., Sfera, J. and Donley, B.G. 2006. Diabetes mellitus-Overview. *Foot Ankle Clinic*, 11; 703-715
- Hotta, N., Toyota, T., Matsuoka, K., Shigeta, Y., Kikkawa, R., Kaneko, T., Takahashi, A., Sugimura, K., Koike, Y., Ishii, J. and Sakamoto, N. 2001. Clinical efficacy of fidarestat, a novel aldose reductase inhibitor, for diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Care*, 24; 1776-1782.
- Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Colditz, G., Liu, S., Solomon, C. G. and Willett, W. C. 2001. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes melitus in women. *The New England Journal of Medicine*, 345; 790-797.
- Hu, W., Guo, Z., Yi, X., Guo, C., Chua, F. and Cheng, G. 2003. Discovery of 2-Phenyl-3-sulfonylphenyl-indole derivatives as a new class of selective COX-2 inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11, 5539–5544.
- Huebschmann, A. G., Regensteiner, J. G., Vlassara, H. and Reusch, J. E. B. 2006. Diabetes and advanced glycoxidation end products. *Diabetes Care*, 29 (6); 1420-1432.
- Iwata, K., Nishinaka, T., Matsuno, K., Kakehi, T., Katsuyama, M., Ibi, M. and Yabe-Nishimura, C. 2007. The activity of aldose reductase is elevated in diabetic mouse heart. *Journal Pharmacological Sciences*, 103; 408-416.
- Jacob, T. J. C. 1999. The relationship between cataract, cell swelling and volume regulation. *Progress in Retinal and Eye Research*, 18(2); 223-233.
- Jain, S. and Saraf, S. 2008. Type 2 diabetes mellitus-its global prevalence and therapeutic strategies. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*,1-14.
- James, L. R., Tang, D., Ingram, A., Ly, H., Thai, K., Cai, L. and Scholey, J. W. 2002. Flux through the hexosamine pathway is a determinant of Nuclear Factor kB–Dependent Promoter Activation. *Diabetes*, 51; 1146–1156.
- Jedziniak, J. A., Chylack, L. T., Cheng, Jr. H. M., Gillis, M. K., Kalustian, A. A. and Tung, W. H. 1981. The sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 20(3); 314-326.
- Jez, M.J., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M. and Penning, T.M. 1997. Comparative anatomy of the aldo–keto reductase süperfamily. *Biochemical Journal*, 326; 625-636.

- Jin, J., Krishack, P. and Cao, D. 2006. Role of aldo-keto reductases in development of prostate and breast cancer. *Frontiers in Bioscience*, 11; 2767-2773.
- Kahn, S. E. 2001. The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 86(9); 4047-4058.
- Kang, E. S., Kim, H. J., Paek, K. S., Jang, H. S., Chang, K. C., Lee, J. H., Nishinaka, T., Yabe-Nishimura, C. and Seo, H. G. 2005. Phorbol ester up-regulates aldose reductase expression in A549 cells: A potential role for aldose reductase in cell cycle modulation. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 62; 1146-1155.
- Kao, Y. L., Donaghue, K., Chan, A., Knight, J. and Silink, M. 1999. An aldose reductase intragenic polymorphism associated with diabetic retinopathy. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 46; 155-160.
- Karel, F., Işıklıçelik, Y. and Takmaz, T. 1997. Lens metabolizması ve katarakt gelişim mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Oftalmoloji*, 6; 50-56.
- Keogh, R. J., Dunlop, M. E. and Larkins, R. G. 1997. Effect of inhibition of aldose reductase on glucose flux, diacylglycerol formation, protein kinase C, and phospholipase A2 activation. *Metabolism*, 46 (1); 41-47.
- Khan, Z. A. and Chakrabarti, S. 2007. Cellular signaling and potential new treatment targets in diabetic retinopathy. *Experimental Diabetes Research*, 1-12.
- Kikkawa, R., Koya, D. and Haneda, M. 2003. Progression of diabetic nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*, 41 (3); 19-21.
- Kim, D., Hong, S. and Lee, D. 2006. Binding of fidarestat stereoisomers with aldose reductase. *International Journal of Molecular Sciences*, 519-536.
- Kim, Y. S., Kim, N. H., Jung, D. H., Jang, D. S., Lee, Y. M., Jong, M. K. and Kim, J. S. 2008. Genistein inhibits aldose reductase activity and high glucose-induced TGF- β_2 expression in human lens epithelial cells. *European Journal of Pharmacology*, 594; 18-25.
- King, K. D., Jones, J. D. and Warthen, J. 2005. Microvascular and macrovascular complications of diabetes mellitus. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 69 (5); 1-10.
- Klip, A., Tsakiridis, T., Marette, A. and Ortiz, P. A. 1994. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: A review of studies *in vivo* and in cell cultures. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 8; 43-53.

- Kotani, T., Nagaki, Y., Ishii, A., Konishi, Y., Yago, H., Suehiro, S., Okukado, N. and Okamoto, K. 1997. Highly selective aldose reductase inhibitors. 3. Structural diversity of 3-(Arylmethyl)-2,4,5-trioximidazolidine-1-acetic acids. *Journal of Medicinal Chemistry*, 40(5); 684-694.
- Kubo, E., Miyoshi, N., Fukuda, M. and Akagi, Y. 1999. Cataract formation through the polyol pathway is associated with free radical production. *Experimental Eye Research*, 68; 457-464.
- Kubo, E., Urakami, T., Fatma, N., Akagi, Y. and Singh, D. P. 2004. Polyol pathway-dependent osmotic and oxidative stresses in aldose reductase-mediated apoptosis in human lens epithelial cells: Role of AOP2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314; 1050–1056.
- Kumar, P. A. and Reddy, G. B. 2007. Focus on molecules: Aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 739-740.
- Kurt, M., Atmaca, A. and Gürlek, A. 2004. Diyabetik nefropati. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 35; 12-17.
- Kuzumoto, Y., Kusunoki, S., Kato, N., Kihara, M. and Low, P. A. 2006. Effect of the aldose reductase inhibitor fidarestat on experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia*, 49; 3085–3093.
- Kyselova, Z., Stefek, M. and Bauer, V. 2004. Pharmacological prevention of diabetic cataract. *Journal of Diabetes and Its Complications* 18; 129-140.
- Larkins, R. G. and Dunlop, M. E. 1992. The link between hyperglycaemia and diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 35; 499-504.
- Lebovitz, H. E. 1999. Type 2 diabetes: An overview. *Clinical Chemistry*, 45(8)(B); 1339–1345.
- Lee, Y. S., Chen, Z. and Kador, P. F. 1998. Molecular modeling studies of the binding modes of aldose reductase inhibitors at the active site of human aldose reductase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 6; 1811-1819.
- Lehmann, R., and Schleicher, E.D. 2000. Molecular mechanism of diabetic nephropathy. *Clinica Chimica Acta*, 297; 135–144.
- Lincoln, J. and Shotton, H.R. 2008. Diabetic autonomic neuropathy. *Tzu Chi Medical Journal*, 20(3); 161-168.
- Lorenzi, M. 2007. The polyol pathway as a mechanism for diabetic retinopathy: Attractive, elusive, and resilient. *Experimental Diabetes Research*, 1-10.
- Magalhães, P. M., Appell, H. J. and Duarte, J. A. 2008. Involvement of advanced glycation end products in the pathogenesis of diabetic complications: the

- protective role of regular physical activity. *European Review of Aging and Physical Activity*, 5; 17–29.
- Mansour, M.A. 2007. Aldose reductase in the retina. *Current Enzyme Inhibition*, 3(1); 1-12.
- Mario, U. D. and Pugliese, G. 2003. Pathogenetic mechanisms of diabetic microangiopathy. *International Congress Series*, 1253; 171-182.
- McGettrick, A. F., Brint, E. K., Palsson-McDermott, E. M., Rowe, D. C., Golenbock, D. T., Gay, N. J., Fitzgerald, K. A. and O'Neill, L. A. J. 2006. Trif-related adapter molecule is phosphorylated by PKC- ϵ during toll-like receptor 4 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)*, 103(24); 9196-9201.
- Meerwaldt, R., Zeebregts, J. C., Navis, G., Hillebrands, J. L., Lefrandt, J. D. and Smit, A. J. 2009. Accumulation of advanced glycation end products and chronic complications in ESRD treated by dialysis. *American Journal of Kidney Diseases*, 53(1); 138-150.
- Metzger, B.E., Buchanan, T.H., Coustan, D.R., De Leiva, A., Dunger, D.B., Hadden, D.R., Hod, M., Kitzmiller, J.L., Oats, J.N., Pettitt, D.J., Sacks, D.A., Zoupas, C. 2007. Summary and recommendations of the fifth international workshop-conference on gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 30; ek 2. 231-260.
- Miwa, K., Nakamura, J., Hamada, Y., Naruse, K., Nakashima, E., Kato, K., Kasuya, Y., Yasuda, Y., Kamiya, H. and Hotta, N. 2003. The role of polyol pathway in glucose-induced apoptosis of cultured retinal pericytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 60; 1-9.
- Miyamoto, S. 2002. Molecular modeling and structure-based drug discovery studies of aldose reductase inhibitors. *Chem-Bio Informatics Journal*, 2(3), 74-85.
- Molnár, G. A. 2006. Pathogenesis of the chronic complications of type2 diabetes mellitus, Chronic kidney disease and ageing. The role of oxidative stress, Endothelial dysfunction and the renin-angiotensin system. Ph. D. theses. University of Pécs, Medical Faculty 2nd Department of Medicine and Nephrological Center Pécs, Hungary, 109.
- Moreno, P. R. and Fuster, V. 2004. New aspects in the pathogenesis of diabetic atherothrombosis. *Journal of the American College of Cardiology*, 44(12); 2293-2300.
- Morrissey, K., Steadman, R., Williams, J. D. and Phillips, A. O. 1999. Renal proximal tubular cell fibronectin accumulation in response to glucose is polyol pathway dependent. *Kidney International*, 55; 160-167.

- Murata, M., Ohta, N., Sakurai, S., Alam, S., Tsai, J. Y., Kador, P. F. and Sato, S. 2001. The role of aldose reductase in sugar cataract formation: aldose reductase plays a key role in lens epithelial cell death (apoptosis). *Chemico-Biological Interactions*, 130-132; 617-625.
- Nakano, I., Tsugawa, T., Shinohara, R., Watanabe, F., Fujita, T., Nagata, M., Kato, T., Himeno, Y., Kobayashi, T., Fujiwara, K., Nagata, M., Itoha, M. and Nagasaka, A. 2003. Urinary sorbitol measurement and the effect of an aldose reductase inhibitor on its concentration in the diabetic state. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 17; 337-342.
- Nelson, D. L. and Cox, M.M. 2005. *Lehninger biokimya ilkeleri*. (Çeviri:Nedret Kılıç), 3.Baskı, Palme Yayıncılık, s.1-1152
- Nishikawa, T., Edelstein, D. and Brownlee, M. 2000. The missing link: A single unifying mechanism for diabetic complications. *Kidney International*, 58 (77); 26-30.
- Noh, H. and King, GL. 2007. The role of protein kinase C activation in diabetic nephropathy. *Kidney International*, 72; 49-53.
- Obrosova, I. G., Huysen, C. V., Fathallah, L., Cao, X., Greene, D. A. and Stevens, M. J. 2002. An aldose reductase inhibitor reverses early diabetes-induced changes in peripheral nerve function, metabolism, and antioxidative defense. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 16; 123-125
- O'Donnell, C. and Efron, N. 1998. Contact lens wear and diabetes mellitus. *Contact Lens and Anterior Eye*, 21(1); 19-26.
- Oka, M. and Kato, N. 2001. Aldose reductase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 16(6); 465-473.
- Olmos, P. R., Vollrath, V. and Irribarra, V. 2009. The “flip-flop” of aldose reductase gene in diabetic retinopathy and nephropathy. *Bioscience Hypotheses*, 1-8.
- Özata, M. 2006. Diyabet hakkında bilmemiz gereken herşey. *Epsilon Yayınevi*, s.172.
- Patti, M. E., Virkamäki, A., Landaker, E. J., Kahn, C. R. and Yki-Järvinen, H. 1999. Activation of the hexosamine pathway by glucosamine *in vivo* induces insulin resistance of early postreceptor insulin signaling events in skeletal muscle. *Diabetes*, 48; 1562–1571.
- Penning, T. M. 2005. AKR1B10: A new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clinical Cancer Research*, 11; 1687–1690.

- Peppa, M., Uribarri, J. and Vlassara, H. 2003. Glucose, advanced glycation end products, and diabetes complications: What is new and what works. *Clinical Diabetes*, 21(4); 186-187
- Pinero-Pilona, A. and Raskin, P. 2001. Idiopathic type 1 diabetes. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 15; 328–335.
- Podwall, D. and Gooch, C. 2004. Diabetic neuropathy: Clinical features, etiology, and therapy. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, 4; 55–61.
- Pratley, E. R. and Weyer, C. 2001. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of Type-II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44; 929-945.
- Radha, V. and Moha, V. 2007. Genetic predisposition to type 2 diabetes among Asian Indians. *Indian Journal of Medical Research*, 125; 259-274.
- Rakowitz, D., Gmeiner, A., Schröder, N. and Matuszczak, B. 2006a. Synthesis of novel phenylacetic acid derivatives with halogenated benzyl subunit and evaluation as aldose reductase inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27; 188-193.
- Rakowitz, D., Maccari, R., Ottana, R. and Vigorita, M. G. 2006b. In vitro aldose reductase inhibitory activity of 5-benzyl-2,4-thiazolidinediones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14; 567-574.
- Ramana, K. V., Tammali, R., Reddy, A. B. M., Bhatnagar, A. and Srivastava, S. K. 2007. Aldose reductase-regulated tumor necrosis factor- α production is essential for high glucose-induced vascular smooth muscle cell growth. *Endocrinology*, 148(9); 4371–4384.
- Rastelli, G., Antolini, L., Benvenuti, S. and Costantino, L. 2000. Structural bases for the inhibition of aldose reductase by phenolic compounds. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8; 1151-1158.
- Riihimaa, P. T. N. 2002. Markers of microvascular complications in adolescents with type 1 diabetes. Department of Paediatrics, Department of Clinical Neurophysiology University of Oulu, Finland, 1-72.
- Roffey, J., Rosse, C., Linch, M., Hibbert, A., McDonald, N. Q. and Parker, P. J. 2009. Protein kinase C intervention-the state of play. *Current Opinion in Cell Biology*, 21; 1-12.
- Rogniaux, H., Dorselaer, A. V., Barth, P., Biellmann, J. F., Barbanton, J., Zandt, M. V., Chevrier, B., Howard, E., Mitschler, A., Potier, N., Urzhumtseva, L., Moras, D. and Podjarny, A. 1999. Binding of aldose reductase inhibitors: Correlation of crystallographic and mass spectrometric studies. *Journal of American Society for Mass Spectrometry*, 10; 635-647.

- Rojas, A. and Morales, M. A. 2004. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. *Life Sciences*, 76; 715–730.
- Sağlam, H. 2004. Diyabet ve enfeksiyonlar. *Güncel Pediatri*, 2; 44-52.
- Saraswat, M., Mrudula, T., Kumar, P. U., Suneetha, A., Rao, T. S., Srinivasulu, M. and Reddy, G. B. 2006. Overexpression of aldose reductase in human cancer tissues. *Medical Science Monitor*, 12(12); 525-529.
- Sato, S., Secchi, E. F., Sakurai, S., Ohta, N., Fukase, S. and Lizak, M. J. 2003. NADPH-dependent reductases and polyol formation in human leukemia cell lines. *Chemico-Biological Interactions*, 143-144; 363-371.
- Setji, T.L., Brown, A. J. and Feinglos, M. N. 2005. Gestational diabetes mellitus. *Clinical Diabetes*, 23(1); 17-24.
- Setter, S. M., Campbell, R. K. and Cahoon, C. J. 2003. Biochemical pathways for microvascular complications of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy*, 37; 1858-1866.
- Siemionow, M., Kūlahci, Y. and Agaoglu, G. 2007. Diabetic neuropathy: Pathogenesis and treatment. *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders* Edited by G. Ali Qureshi and S. Hassan Parvez, 1-794.
- Singh, L. P. and Crook, E. D. 2000. Hexosamine regulation of glucose-mediated laminin synthesis in mesangial cells involves protein kinases A and C. *American Journal Physiology-Renal Physiology*, 279; F646–F654.
- Singh, L. P., Andy, J., Anyamale, V., Greene, K., Alexander, M. and Crook, E. D. 2001. Hexosamine-induced fibronectin protein synthesis in mesangial cells is associated with increases in camp responsive element binding (CREB) phosphorylation and nuclear CREB the involvement of protein kinases A and C. *Diabetes*, 50; 2355–2362.
- Singh, L. P., Green, K., Alexander, M., Bassly, S. and Crook, E. D. 2004. Hexosamines and TGF-beta-1 use similar signaling pathways to mediate matrix protein synthesis in mesangial cells. *American Journal Physiology-Renal Physiology*. 286; F409–F416.
- Skljarevski, V., Ferdinand, S. J. and Kles, K. A. 2007. Role of protein kinase C inhibition in the development of diabetic microvascular complications. *Endocrinology and Metabolism*, 2(3); 321-329.
- Soulis-Liparota, T., Cooper, M. E., Dunlop, M. and Jerums, G. 1995. The relative roles of advanced glycation, oxidation and aldose reductase inhibition in the development of experimental diabetic nephropathy in the Sprague-Dawley rat. *Diabetologia*, 38; 387-394.

- Srivastava, S. K., Ramana, K. V. and Bhatnagar, A. 2005. Role of Aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocrine Reviews*, 26(3); 380–392.
- Steuber, H., Zentgraf, M., Motta, C. L., Sartini, S., Heine, A. and Klebe, G. 2007. Evidence for a novel binding site conformer of aldose reductase in ligand-bound state. *Journal of Molecular Biology*, 369; 186–197.
- Stevens, M. J., Dananberg, J., Feldman, E. L., Lattimer, S. A., Kamijo, M., Thomas, T. P., Shindo, H., Sima, A. A. F. and Greene, D. A. 1994. The linked roles of nitric oxide, aldose reductase and, (Na⁺,K⁺)-ATPase in the slowing of nerve conduction in the streptozotocin diabetic rat. *Journal of clinical investigation*, 94; 853-859.
- Stitinová, V., Smetanová, L., Grossmann, V. and Anzenbacher, P. 2002. *In vitro* and *in vivo* assessment of the antioxidant activity of melatonin and related indole derivatives. *General Physiology and Biophysics*, 21; 153-162.
- Stolc, S. 1999. Indole derivatives as neuroprotectants. *Life Sciences*, 65(18-19); 1943-1950.
- Sturm, K., Levstika, L., Demopoulos, V. J. and Kristl, A. 2006. Permeability characteristics of novel aldose reductase inhibitors using rat jejunum *in vitro*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28; 128-133.
- Sugiyama, K., Chen, Z., Lee, Y. S. and Kador, P. F. 2000. Isolation of a non-covalent aldose reductase–nucleotide–inhibitor complex. *Biochemical Pharmacology*, 59; 329–336.
- Sun, G., Ma, Y., Gao, X., König, S., Fales, H. M. and Kador, P. F. 2004. Method for isolating tight-binding inhibitors of rat lens aldose reductase. *Experimental Eye Research*, 79; 919-926.
- Sun, W. S., Park, Y. S., Yoo, J., Park, K. D., Kim, S. H., Kim, J. H. and Park, H. J. 2003. Rational design of an indolebutanoic acid derivative as a novel aldose reductase inhibitor based on docking and 3D QSAR studies of phenethylamine derivatives. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46; 5619-5627.
- Süzen, S., Das-Evcimen, N., Varol, P. and Sarıkaya, M. 2007. Preliminary evaluation of rat kidney aldose reductase inhibitory activity of 2-phenylindole derivatives: affiliation antioxidant activity. *Medicinal Chemistry Research*, 16; 112–118.
- Szwergold, B. S., Howell, S. K. and Beisswenger, P. J. 2002. Nonenzymatic glycation/enzymatic deglycation: a novel hypothesis on the etiology of diabetic complications. *International Congress Series*, 1245; 143–152.

- Tammali, R., Ramana, K. V., Singhal, S. S., Awasthi, S. and Srivastava, S. K. 2006. Aldose reductase regulates growth factor-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production in human colon cancer cells. *Cancer Research*, 66 (19); 9705-13.
- Tammali, R., Ramana, K. V. and Srivastava, S. K. 2007. Aldose reductase regulates TNF- α -induced PGE₂ production in human colon cancer cells. *Cancer Letters*, 252; 299–306.
- Tanasescu, M., Hu, F. B., Willett, W. C., Stampfer, M. J. and Rimm, E. B. 2001. Alcohol consumption and risk of coronary heart disease among men with type 2 diabetes mellitus. *Journal of the American College of Cardiology*, 38(7); 1836-1842.
- Tanimoto, T., Maekawaa, K., Okadaa, S. and Yabe-Nishimurab, C. 1998. Clinical analysis of aldose reductase for differential diagnosis of the pathogenesis of diabetic complication. *Analytica Chimica Acta*, 365; 285-292.
- Tesfaye, S., Chaturvedi, N., Eaton, S. E. M., Ward, J. D., Manes, C., Ionescu-Tirgoviste, C., Witte, D. R. and Fuller, J. H. 2005. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *The New England Journal of Medicine*, 352; 341-350.
- Timmers, S., Schrauwen, P. and Vogel, J. 2008. Muscular diacylglycerol metabolism and insulin resistance. *Physiology and Behavior*, 94; 242-251.
- Tsukushi, S., Katsuzaki, T., Aoyama, I., Takayama, F., Miyazaki, T., Shimokata, K. and Niwa, T. 1999. Increased erythrocyte 3-DG and AGEs in diabetic hemodialysis patients: Role of the polyol pathway. *Kidney International*, 55; 1970-1976.
- VanEpps, J.S. and Vorp, D. A. 2007. Mechanopathobiology of atherogenesis. *Journal of Surgical Research*, 142; 202–217.
- Wang, S-J., Yan, J-F., Hao, D., Niu, X-W. and Cheng, M-S. 2007. Synthesis and activity of a new series of (Z)-3-Phenyl-2-benzoylpropenoic acid derivatives as aldose reductase inhibitors. *Molecules*, 12, 885-895.
- Wang, Z., Ling, B., Zhang, R., Suo, Y., Liu, Y., Yu, Z. and Liu, C. 2009. Docking and molecular dynamics studies toward the binding of new natural phenolic marine inhibitors and aldose reductase. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 5881; 1-8.
- Wautier, J. L. and Guillausseau, P.J. 2001. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes and Metabolism*, 27; 535-542.
- Wiwanitkit, V. 2007a. Glucosuria and albuminuria in diabetic nephropathy: A consideration at nanolevel. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 21; 164– 165.

- Wiwanitkit, V. 2007b. Endothelin-1 and protein kinase C co-expression in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Journal of Diabetes and Its Complications*, 21; 359-362.
- Wu, G., Haynes, T.E., Yan, W. and Meininger, C.J. 2001. Presence of glutamine: fructose-6-phosphate amidotransferase for glucosamine-6-phosphate synthesis in endothelial cells: effects of hyperglycaemia and glutamine. *Diabetologia*, 44; 196-202.
- Yabe-Nishimura, C. 1998. Aldose reductase in glucose toxicity: A potential target for the prevention of diabetic complications. *Pharmacological Reviews*, 50(1); 21-33.
- Yadav, U.C.S., Srivastava, S.K. and Ramana, K.V. 2007. Aldose reductase inhibition prevents endotoxin-induced uveitis in rats. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48; 4634-4642.
- Yagihashi, S., Yamagishi, S.I. and Wada, R. 2007. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 77; 184-189.
- Yam, J.C.S. and Kwok, A.K.H. 2007. Update on the treatment of diabetic retinopathy. *Hong Kong Medical Journal*, 3; 46-60.
- Yamagishi, S., Nakamura, K. and Imaizumi, T. 2005. Advanced glycation end products (AGEs) and diabetic vascular complications. *Current Diabetes Reviews*, 1(1); 93-106.
- Yan, H., Guo, Y., Zhang, J., Ding, Z., Ha, W. and Harding, J.J. 2008. Effect of carnosine, aminoguanidine, and aspirin drops on the prevention of cataracts in diabetic rat. *Molecular Vision*, 14; 2282-229.
- Yki-Jarvinen, H., Vogt, C., Iozzo, R.A., Pipek, R., Daniels, M.C., Virkamaki, A., Makimattila, S., Mandarino, L., DeFronzo, R.A., McClain, D. and Gottschalk, W.K. 1997. UDP-N-acetylglucosamine transferase and glutamine: Fructose 6-phosphate amidotransferase activities in insulin-sensitive tissues. *Diabetologia*, 40; 76-81.
- Zandt, V. M.C., Doan, B., Sawicki, D.R., Sredy, J. and Podjarny, A.D. 2009. Discovery of [3-(4,5,7-trifluoro-benzothiazol-2-ylmethyl)-pyrrolo [2,3-b]pyridin-1-yl] acetic acids as highly potent and selective inhibitors of aldose reductase for treatment of chronic diabetic complications. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 19; 2006-2008.
- Zhang, P., Liu, Na. and Wang, Y. 2009. Insulin may cause deterioration of proliferative diabetic retinopathy. *Medical Hypotheses*, 72; 306-308.
- Zimmet, P., Alberti, K.G.M.M. and Shaw, J. 2001. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*, 414; 782-787.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Orçun Erdem KURŞUN

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 12.04.1982

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Eryaman Lisesi YDA (Yabancı Dil Ağırlıklı) 2000

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 2007

Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü Şubat
2008-Nisan 2010