

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET
OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN
DOLAŞIMLARINDAKİ KOLİN DURUMU**

Eser İNCE

Yüksek Lisans Tezi

**STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN
DOLAŞIMLARINDAKİ KOLİN DURUMU**

Vet. Hek. Eser İnce

Yüksek Lisans Tezi

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf Öztürk

Mayıs 2006

Lisansüstü Öğretim Yönetmenliği Uyarınca Eser İnce'nin Yüksek lisans bitirme tezi olarak hazırladığı “STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN DOLAŞIMLARINDAKİ KOLİN DURUMU” başlıklı bu çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

26/05/2006

Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Prof.Dr. Yusuf ÖZTÜRK

.....

Üye : Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS

.....

Üye : Prof.Dr. Süleyman AYDIN

.....

Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

STREPTOZOTOSİN İLE DİYABET OLUŞTURULMUŞ SIÇANLARIN DOLAŞIMLARINDAKİ KOLİN DURUMU

Vet. Hek. Eser İnce

Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yusuf Öztürk

2006

Bu çalışmada, 1, 2 ve 4 haftalık streptozotosin diyabetik sıçanların dolaşımındaki kolin durumu parametre olarak serumda serbest kolin, fosfolipidlere bağlı kolin, fosfokolin, gliserofosfokolin, betain ve homosistein düzeyleri ölçülerek araştırılmıştır. Bu amaçla, 7 haftalık dişi Wistar sıçanların kuyruk venlerinden 60 mg/kg streptozotosin zerk edilmiş ve hayvanların kan glukoz düzeyleri ölçülmüştür.

Bulgularımız deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanların dolaşımındaki serbest kolin ve kolin içeren bileşiklerin düzeylerinin değiştiğini göstermektedir. Serumdaki serbest kolin düzeyi diyabette yükselirken, fosfokolin ve gliserofosfokolin düzeylerinde düşme gözlenmiştir. Kolinin oksidasyonu ile oluşan betainin düzeyleri ise diyabetik sıçanlarda yükselmektedir. Streptozotosin diyabetik sıçanların serum homosistein düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur. Ancak, serum fosfolipidlerine bağlı kolin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düzey değişimi saptanmamıştır.

Diyabetik sıçanlarda dolaşımdaki kolin durumundaki değişimlerin kolin ile bağlantılı temel fonksiyonlara yansıyor yansımadığı ve diyabetik komplikasyonlardaki olası rolleri sonraki çalışmaların konusudur.

Anahtar kelimeler: Kolin durumu, serbest kolin, fosfokolin, gliserofosfokolin, betain, homosistein, diyabet, streptozotosin, sıçan

SUMMARY

Master of Science Thesis

CHOLINE STATUS IN THE CIRCULATION OF RATS WITH STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES

Vet. Hek. Eser İnce

Anadolu University
Institute of Health Sciences
Department of Pharmacology

Supervisor: Prof. Dr. Yusuf Öztürk

2006

In the present study, choline status in the circulation of rats with streptozotocin diabetes 1, 2 and 4 weeks was investigated by measuring serum levels of free choline, phospholipid-bound choline, phosphocholine, glycerophosphocholine, betaine and homocysteine as parameters. For this purpose, 60 mg/kg streptozotocin was injected into the tail vein of female Wistar rats at the age of 7 weeks and then blood glucose levels of the animals were measured.

Our findings were indicated that circulatory levels of free choline and choline containing substances were changed in circulation of rats with experimentally-induced diabetes. It was observed that free choline level was increased, while phosphocholine and glycerophosphocholine levels were decreased in diabetes. The levels of betaine, formed by the oxidation of choline, were increased in diabetic rats. Serum homocystein levels of streptozotocin diabetic rats were found to be decreased significantly. However, no statistically significant change was noticed in serum levels of phospholipid-bound choline.

Further studies are necessary for understanding the impact of these changes in circulating choline status on the basic functions related to choline and their possible roles in the diabetic complications.

Keywords: Choline status, free choline, phosphocholine, glycerophosphocholine, betaine, homocysteine, diabetes, streptozotocin, rat

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi birikiminden yararlandığım, anlayışını ve desteğini bizden esirgemeyen danışmanım Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Yusuf ÖZTÜRK'e, tez çalışmamda bilgisi ve deneyimi ile bana yol gösteren, yönlendiren, bu tezin oluşmasının her basamağında büyük emeği olan ve adeta tez danışmanım gibi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı laboratuvarındaki çalışmalarımın planlanması ve yürütülmesinde eşsiz katkılarda bulunan Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS'a teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalında yapmama ve anabilim dalının tüm imkanlarını kullanmama izin veren, ilk günden itibaren bana yardım etme ve zaman ayırma nezaketini gösteren Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Vahide SAVCI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında deneysel diyabet oluşturulmasında yardımları olan Ecz. Özgür Devrim CAN'a, Ecz. Nurcan BEKTAŞ'a ve Ecz. Ümide DEMİR'e; homosistein ve fosfolipidlere bağlı kolin ölçümleri için Doç. Dr. Yeşim ÖZARDA İLÇÖL'e; HPLC sisteminde betain ölçümleri sırasında teknik ve bilimsel konularda tüm bilgilerini cömertçe benimle paylaşan Kimyager Sami AYDIN'a; HPLC sisteminde serbest kolin, fosfokolin ve gliserofosfokolin ölçümü sırasında özveri ile bana yardımcı olan, bilgisinden faydalandığım, büyük desteğini ve dostluğunu gördüğüm Biyolog Şevket DOĞRUSÖZ'e; glukoz ölçümlerinde yardımlarını esirgemeyen ve bana yalnız olmadığımı hissettiren Dr. Murat GÜRSOY'a ve Dr. Selim BATMAZ'a; grafiklerin çizimindeki yardımları için Dr. Emre HAMURTEKİN'e ve tezimin yazım aşamasında yardımlarına başvurduğum arkadaşım Ali Osman KILINÇASLAN'a en içten teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Bugünlere gelebilmemde en büyük paya sahip olan annem Güleser İNCE ve babam Günay İNCE'ye bütün kalbimle sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | ii |
| TEŞEKKÜR | iii |
| İÇİNDEKİLER | iv |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| TABLolar DİZİNİ | vii |
| KISALTMALAR DİZİNİ | viii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | |
| 2. GENEL BİLGİLER | |
| 2.1. Diabetes mellitus | 3 |
| 2.1.1. Diabetes mellitus'un Kısa Tarihçesi ve Genel Özellikleri | 3 |
| 2.1.2. İnsülin | 4 |
| 2.1.3. Diabetes mellitus'un Sınıflandırılması | 7 |
| 2.1.4. Diabetes mellitus'un Komplikasyonları | 12 |
| 2.2. Kolinin Yapısı, Sentezi ve Genel Özellikleri | 15 |
| 2.2.1. Kolinin Yapısı | 15 |
| 2.2.2. Dolaşımdaki Kolin Kaynağı | 16 |
| 2.2.3. Kolinin Biyosentezi | 16 |
| 2.2.4. Dokulara ve Kolinerjik Nöronlara Kolin Sağlayan Faktörler | 17 |

| | | |
|--------|---|----|
| 2.2.5. | Asetilkolinin Sentezi ve Kolin Uygulamasına Etkileri | 19 |
| 3. | KULLANILAN ANA YÖNTEMLER | |
| 3.1. | DeneySEL Diyabet Oluşturma Yöntemleri Hakkında Bilgiler | 21 |
| 3.2. | HPLC Hakkında Bilgiler | 22 |
| 3.2.1. | HPLC Sistem Türleri | 22 |
| 3.2.2. | HPLC’de Ayırma Teknikleri | 23 |
| 4. | MATARYEL VE METOD | |
| 4.1. | Kullanılan Deney Hayvanları | 24 |
| 4.2. | DeneySEL Diyabet Oluşturulması | 24 |
| 4.3. | DeneySEL İşlemler | 24 |
| 4.4. | Biyokimyasal Ölçümler | 25 |
| 4.5. | İstatistiksel Yöntemler | 26 |
| 5. | BULGULAR | |
| 5.1. | Serum Glukoz Düzeyleri | 27 |
| 5.2. | Serum Serbest Kolin Düzeyleri | 28 |
| 5.3. | Serum Fosfolipidlere Bağlı Kolin Düzeyleri | 29 |
| 5.4. | Serum Fosfokolin Düzeyleri | 30 |
| 5.5. | Serum Gliserofosfoklin Düzeyleri | 31 |
| 5.6. | Serum Betain Düzeyleri | 32 |
| 5.7. | Serum Homosistein Düzeyleri | 33 |
| 6. | TARTIŞMA | |
| 7. | KAYNAKLAR | |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| Şekil 1. İnsülinin hedef hücredeki reseptörü ile etkileşimi | 5 |
| Şekil 2. Tip-2 diyabetin fizyopatolojisi | 12 |
| Şekil 3. Kolinin moleküler yapısı | 16 |
| Şekil 4. Fosfatidilkolinden kolin sentezi | 17 |
| Şekil 5. Kolinin metabolizması | 18 |
| Şekil 6. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum glukoz düzeyi değişimi | 27 |
| Şekil 7. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum serbest kolin düzeyi değişimi | 28 |
| Şekil 8. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum fosfolipidlere bağlı kolin düzeyi değişimi | 29 |
| Şekil 9. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum fosfokolin düzeyi değişimi | 30 |
| Şekil 10. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum gliserofosfokolin düzeyi değişimi | 31 |
| Şekil 11. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum betain düzeyi değişimi | 32 |
| Şekil 12. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum homosistein düzeyi değişimi | 33 |

TABLULAR DİZİNİ

| | | <u>Sayfa</u> |
|----------|--|--------------|
| Tablo 1. | Glukoz taşıyıcıları ve fonksiyonları | 6 |
| Tablo 2. | Diabetes mellitus'un sınıflandırılması | 8 |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---------------------------------|---|
| ADA | Amerikan Diyabet Cemiyeti |
| AP | Alkalen fosfataz |
| BAS | Biyo-Analitik Sistemi |
| C-peptid | Bağlayıcı Peptid |
| CAT | Kolin asetiltransferaz |
| CH ₃ | Metil |
| CK | Kolin kinaz |
| CPT | Kolinfosfotransferaz |
| CT | Sitidiltransferaz |
| DA | Diyot Demeti |
| DAG | Diaçilgliserol |
| EC | Elektro Kimyasal |
| EDRF | Endotele Bağlı Gevşetici Faktör |
| GCPD | Gliserofosfokolin kolinfosfodiesteraz |
| GPD | Gliserofosfokolin fosfodiesteraz |
| GLUT | Glukoz Taşıyıcı |
| H ₂ O | Su |
| HbA1c | Glikozillenmiş Hemoglobin |
| HC-3 | Hemikolinyum-3 |
| HLA | İnsan Lökosit Antijeni |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| IDDM | Ketoza Yatkın Diyabet |
| KH ₂ PO ₄ | Potasyum Dihidrojen Fosfat |
| LPCAT | Lizofosfotidilkolin asetiltransferaz |
| LPL | Lizofosfolipaz |
| MgCl ₂ | Magnezyum Klorür |
| mRNA | mesajcı Ribonükleik Asit |

| | |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | Sodyum Fosfat |
| NDDG | Ulusal Diyabet Veri Toplama Grubu |
| NIDDM | Ketoza Rezistan Diyabet |
| NO | Nitrik Oksit |
| PLA ₂ | Fosfolipaz A ₂ |
| PLC | Fosfolipaz C |
| PLD | Fosfolipaz D |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| STZ | Streptozotosin |
| WHO | Dünya Sağlık Örgütü |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (şeker hastalığı) endokrin pankreasta oluşan önemli bir hastalıktır. Ortaya çıkan en önemli rahatsızlıkları metabolizma bozuklukları ve hiperglisemidir (1). İnsülin salınımı veya insülin fonksiyonlarında bozulma veya azalma ile karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmalarında bozulmalar ile karakterize edilmektedir. Bu bozulmalar ile akut (güçsüzlük, poliüri, polidipsi vb.) veya kronik (retinopati, nöropati, nefropati, kalp hastalıkları, periferik damar hastalıkları vb.) hastalıklarda ve komplikasyonlarda artma olmaktadır (2).

Diyabet için yeni ilaçlar ile ilaç uygulama şekilleri, a d a c ı k transplantasyonu gibi yeni teknikler geliştirilmiş ve diyabetten korunmak için insülin genleri bulunmaya çalışılmış olmasına rağmen (3,4), şeker hastalarında kronik olarak ortaya çıkan ve yaşam kalitesini düşüren komplikasyonların niteliği tam olarak tespit edilememiştir. Uzun vadeli diyabetik komplikasyonlar bir çok doku, organ ve sistemin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir.

Dünyada diabetes mellitus'un etkisinde olan milyonlarca insan vardır. Diabetes mellitus'un komplikasyonları nedeniyle bir çok ülkede ölümler meydana gelmektedir. Örneğin, Amerika Birleşik Devletleri diyabet ölüm nedenleri sıralamasında yedinci durumdadır ve 15 milyondan fazla diyabetli bulunmaktadır (5). Komplikasyonları, akut ve kronik dönemde görülmektedir ve her biri hastaların morbidite ve mortalitesini arttırmaktadır. Bundan da anlaşıldığı gibi diabetes mellitus tek metabolik bir hastalık değil değişik etiyolojilere sahip olan bir grup hastalığa verilen isimdir (6). Dünya nüfusunun yaklaşık %10'luk bir bölümü gizli ya da tanısı konmamış diyabetli olarak yaşamını sürdürmektedir (7). İnsülin ve oral antidiyabetik ilaçların tedaviye girmesiyle (8), akut dönemde oluşan komplikasyonların oranı azalmış, kronik d ö n e m d e oluşan komplikasyonların oranı ise artmıştır ve bu nedenle diyabetli kişinin yaşam kalitesi düşmektedir. Ayrıca uzun süreli oluşan bu komplikasyonların tedavisi ülke ekonomileri için yüksek maliyetler meydana getirirler. Örneğin, 1992 yılı istatistiklerine göre Amerika Birleşik Devletleri'nde yıllık diyabetin direkt ve indirekt harcaması 92.6 milyar dolar olarak belirlenmiştir (9,10). Ayrıca, her üç diyabetliden birinin de gizli diyabetik olduğu sanılmaktadır. Gizli diyabet teşhis

edilememesi ve teşhis edildiğinde ilerleyen komplikasyonlar nedeniyle oldukça ciddi bir durumdur (11).

Amerikan Diyabet Cemiyeti'ne (ADA) göre diyabet açısından risk taşıyan grup 45 yaş üzerindeki kişiler, vücut kitle indeksi 25 kg/m^2 üzerinde saptananlar, ailede diyabet hikayesi bulunanlar, sedanter yaşam sürenler, riskli etnik kökenden gelenler, bozulmuş glukoz toleransı olanlar, gestasyonel diyabet ya da makrozomik bebek doğurma öyküsü olanlar, hipertansif bireyler, hiperlipidemikler, polikistik over sendromu vakaları ve vasküler hastalık öyküsü olanlardır (12).

Kolin, nörotransmitter asetilkolinin ve membran fosfolipidleri; fosfatidilkolin, sfingomyelin ve plazmalojenlerin ön maddesidir (13-17). Ayrıca, betaine dönüşerek metil grubu metabolizmasında ve lipid transportunda rol oynamaktadır (13-17).

Kolinin periferik (intravenöz veya subkutan; i.v. veya s.k.) ve santral (intraserebroventriküler; i.s.v.) yollarla verilmesini takiben çeşitli farmakolojik etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. Bu etkiler kolinin kan basıncını arttırdığı (18), hipotansiyonu geri döndürdüğü (19,20), çeşitli endokrin etkiler yarattığı (21,22) ve hipotermik etki meydana getirdiği olarak rapor edilmiştir. Hipotermik etki başlıca muskarinik reseptörlerle meydana gelmektedir (23). Ayrıca kolinin intraserebroventriküler (i.s.v.) yolla verilmesi kan glukoz seviyelerinde bir artışa (24), intraperitoneal (i.p.) yolla verilmesi serum insulin, glukoz ve kolin seviyelerinde artışa (25) neden olmaktadır. Kolinin serum glukoz üzerine etkisini sadece nikotinik reseptörler meydana getirirken, kolinin serum insulin üzerine etkisini hem muskarinik hem de nikotinik reseptörler meydana getirmektedir (26).

Birçok metabolik değişime bağlı olarak vücutta çeşitli komplikasyonlar oluşturan diabetes mellitus'un dolaşımdaki kolin ve kolin metabolitleri üzerindeki etkileri model olarak streptozotosin (STZ) diyabetik sıçanlar kullanılarak bu tez kapsamında araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes mellitus

2.1.1. Diabetes mellitus'un Kısa Tarihçesi ve Genel Özellikleri

Milattan önce 1500 yıllarında yazılmış Eber Papirüsleri, diyabetin belirtilerini ilk kez ortaya koyan tarihsel doküman olarak bilinmektedir. “Diabetes” kelimesini de ilk kullanan Kapadokyalı Aretaeus’dur (MS 150). Eski Yunanca da “diabetes” geçip giden anlamına gelmektedir, çünkü sıvılar vücutta durmamaktadır. 1750 yılında ise William Cullen, Yunanca’da bal benzeri anlamına gelen “mellitus” kelimesini eklemiştir (27). Daha sonra 1869 yılında Paul Langerhans, ilk kez pankreasta küçük adacık şeklindeki hücreleri keşfetmiş olmasına rağmen onların fonksiyonlarını tam olarak gösterememiştir (28). Bu arada Oscar Minkowski köpeklere pankreatektomi uygulamış ve bu deneyle pankreas ile diyabet arasındaki ilişkiyi açığa kavuşturmuştur (29).

İnsülin henüz keşfedilmemesine rağmen 1909 yılında Belçikalı araştırmacı Jean de Meyer pankreastaki bir madde için “insülin” kelimesini kullanmış, sonunda John James Richard Macleod başkanlığında Charles Best, Frederick Banting ve James Collip bir seri deneyden sonra 1921 yılında insülini saflaştırmayı başarmışlar ve 1922 yılında da bunu yayınlayarak aynı yıl başarı ile hastalar üzerinde tedaviyi başlatmışlar (28,29). Macleod ve Banting 1923 yılında bu keşifleri nedeniyle Nobel Ödülü kazanmışlardır (30). Diabetes mellitus; insülin sekresyonu, etkinliği ya da ikisinde birden meydana gelen fonksiyon bozukluklarına bağlı gelişen hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Alınan besinlerin büyük bir çoğunluğu, dijestif enzimler tarafından glukoz gibi daha küçük kimyasallara dönüştürülür. Bu dönüşüm sonrasında dolaşıma katılan glukoz, hücrelerin enerji gereksinimlerinin karşılanmasında kullanılır. Sistemik dolaşımdaki ve ekstraselüler sıvıdaki glukoz ancak insülin varlığında hücre içine girebilir. Besin alındığında pankreastan hücrelerin glukozu kullanabilmelerine yetecek ölçüde insülin salgılanır. Ancak, diyabetik hastaların pankreasından insülin ya hiç salgılanmaz ya çok az salgılanır ya da bu hastaların hücrelerinin salgılanan insüline yanıt verme yeteneği düşüktür. Bu yüzden kandaki yüksek

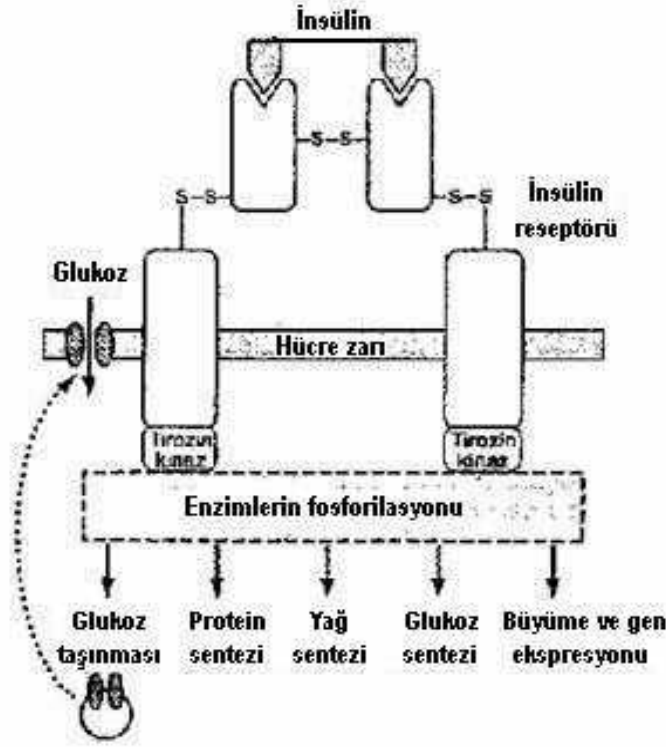
glukoz derişimlerine karşın hücreler enerji için gerekli olan temel maddelerden yoksun kalmış olur (31).

Pankreas %98 ekzokrin %2 endokrin hücrelerden oluşan bir organdır. Pankreasta ekzokrin bezlerin asinusları arasına yayılmış yüz binlerce Langerhans adacıkları bulunur. Memelilerin Langerhans adacıklarında 4 tip hücre bulunmaktadır. Bunlar, α hücreleri (glukagon üreten), β hücreleri (insülin üreten), δ hücreleri (somatostatin üreten) ve PP hücreleridir (pankreatik polipeptid üreten) (2).

2.1.2. İnsülin

İnsülin bir hormondur ve temel görevlerinden biri vücudun enerji kaynağı glukozun utilizasyonundan sorumlu olmasıdır. İnsülinin bulunmaması ve/veya işlevini yapamaması sonucu diyabet hastalığı oluşmaktadır. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları sonucu yaşam kalitesi bozulmaktadır. İnsan insülini molekül ağırlığı 5808 olan bir proteindir. Birbirine disülfür köprüleri ile bağlanmış iki amino asit zincirinden oluşur. Endoplazmik retikuluma tutunmuş ribozomlarda insülin RNA'sının translasyonu ile insülin preprohormonu oluşur. İki preprohormon, proinsülini oluşturmak üzere endoplazmik retikulumda parçalanır. Daha sonra proinsülin C-peptidi segmentini kaybederek insüline dönüşür (32,33). Plazmadaki yarı ömrü sadece 5 dakikadır. Hedef dokularda reseptöre bağlanmış bölümü hariç geri kalan insülin, insülin proteaz enzimi ile karaciğerde ve küçük miktarda böbrekler, kas ve diğer dokularda parçalanır (34).

İnsülin hedef hücredeki etkilerini, 300.000 molekül ağırlıklı bir membran reseptör proteinine bağlanarak oluşturur. İnsülin reseptörü de birbirine disülfür köprüleriyle bağlanmış 2 alfa, 2 beta olmak üzere 4 alt birimden oluşur. İki beta alt birim hücre zarı içine hücre sitoplazmasına doğru kabarmıştır. İnsülin, alfa alt birimlerine bağlanır ve beta alt birimleri otofosforilasyona uğrar ve tirozin kinaza dönüşür. Bu enzim de daha sonra hücre içi enzimlerin fosforilasyonuna neden olur (33,35).



Şekil 1: İnsülinin hedef hücredeki reseptörü ile etkileşimi (33)

İnsülinin salınımında en etkin faktör kan glukoz düzeyinde artıştır. Glukoz düzeyi artınca insülin düzeyi 2 fazda yükselir. İlk fazda insülin düzeyinde hızlı yükselme olur ve yaklaşık 5-10 dakika sürer, ikinci faz ise birinci fazdan yaklaşık 10 dakika sonra başlar ve daha uzun sürer. İlkinde depolanmış insülin kullanılırken, ikincisinde hem depolanmış hem de sentezlenen insülin kullanılır, çünkü protein sentezinin inhibisyonu birinci fazda etkili değildir. İnsülin salgısı direkt kan glukoz konsantrasyonuna bağlıdır.

İnsülinin karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması ile büyüme üzerine etkileri vardır. İnsülin, glukozun dokularca hızla yakalanması, depolanması ve kullanılması için gereklidir. Glukoz taşıyıcıları GLUT 1'den GLUT 5'e kadar adlandırılır (Tablo 1).

Pankreatik β hücrelerindeki GLUT 2'de oluşan bir defekt insülin salınmasındaki bozukluğa sebep olabilir ve bu olay tip-2 diyabet oluşumuna neden olmaktadır (1). İnsülin, yemekten hemen sonra absorbe edilen glukozun büyük bölümünün karaciğerde glikojen halinde depolanmasını sağlamaktadır.

Bunu hem glukozu hücre içine iterek hem de glikojen sentaz enzimini aktive ederek yapmaktadır. Karaciğer glikojeni glukozu parçalayan ana enzim fosforilazdır ve insülin bu enzimi de inaktive eder. Ayrıca insülin, miktarı fazla gelen glukozun yağ asitlerine dönüşümünü hızlandırır ve glukoneojenezi de inhibe eder. İnsülin yağ hücrelerinde yağın depolanmasını, lipazın etkisini inhibe ederek ve glukozun hücre membranından yağ hücreleri içine taşınmasını hızlandırarak yapar. İnsülin eksikliğinde de plazma kolesterol ve fosfolipid konsantrasyonu artmaktadır. Eksiklikte yağların aşırı kullanımında ketoz ve asidoza neden olur. Ayrıca insülin ve büyüme hormonunun büyüme hızlandırıcı sinerjistik etkisi vardır (33).

Tablo 1: Glukoz taşıyıcıları ve fonksiyonları

| Taşıyıcılar | Dokular | Fonksiyonları |
|--------------------|---|--|
| GLUT 1 | Tüm dokular özellikle beyin ve kırmızı kan hücreler | Kan beyin bariyerini geçmesi ve glukozun bazal membrana alınması |
| GLUT 2 | Pankreas β hücreleri, karaciğer, böbrek, bağırsak | Glukoz homeostazi ve insülin salınımının ayarlanması |
| GLUT 3 | Beyin, plasenta, böbrek ve diğer dokular | Glukozun nöronlara ve diğer dokulara alınması |
| GLUT 4 | Kas ve yağ dokusu | İnsülin ile stimüle edilen glukoz alımının ayarlanması |
| GLUT 5 | Bağırsak ve böbrek | Fruktozun ince bağırsaktan alınması |

2.1.3. Diabetes mellitus'un Sınıflandırılması

Diabetes mellitus'un sınıflandırılması tarihte uzun yıllar almıştır. İngiliz hekim Harley, 1866 yılında en az iki tip diyabetin olduğunu ve tedavilerinin de ona göre yapılması gerektiğini öne sürmüştür. Fransız doktor Lancereaux'da diyabetin "şişman" ve "zayıf" diyabet olarak ayrılması gerektiğini savunmuştur. Ancak insülinin keşfinden sonra, Falta ve diğer araştırmacılar insülinin diyabet hastasındaki cevabına göre, insüline duyarlı ve rezistans formu olarak iki diyabet tipi olduğunu savunmuşlardır. 1940 yıllarında Sheldon diyabetin kesin tiplerini onları karakterize ederek ortaya koymuştur. Ancak bu konuda kesin kanıt ise 1951 yılında juvenil tip diyabet gösterilmiştir. Otopsi ile alınan pankreasta insülin miktarı ölçülmüş ve non-diyabetik pankreasa göre 20 yaşın altındaki diyabetik hastaların pankreasında neredeyse yok denecek kadar az insülin bulunmuştur (36).

Günümüzde diabetes mellitus klinik olarak birkaç ana grup ile sınıflandırılmaktadır (37):

- Tip-1 diyabet, insüline bağımlı diyabet, gençlikte/çocuklukta başlayan diyabet (juvenil diyabet) veya ketoza yatkın diyabet (IDDM)
- Tip-2 diyabet, insüline bağımlı olmayan diyabet, erişkinlikte başlayan diyabet veya ketoza rezistan diyabet (NIDDM)
- Gestasyonel diyabet, gebelik diyabeti
- Diğer spesifik diyabet türleri

Diyabetin geniş çapta ilk sınıflandırılması 1979 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde NDDG (Ulusal Diyabet Veri Toplama Grubu) yapmıştır (38). Daha sonra WHO (Dünya Sağlık Örgütü) bu sınıflandırmadan da yararlanarak günümüzdeki sınıflandırmayı yapmıştır (Tablo 2).

Tip-1 diyabet, pankreastaki insülin salgılayan beta hücrelerinin harap olmasıyla ve insülinin hemen hemen hiç bulunmamasıyla karakterizedir. Bir çok hasta, hastalığın daha ilk aşamasında ketoasidoz ile karşılaşır. İnsülin hayatta kalmak için zorunludur yoksa koma, ketoasidoz ve ölüm oluşmaktadır (39). Tip-1 diyabet, otoimmün bir hastalıktır. Adacık hücreleri otoantikörleri ve/veya insülin

otoantikörleri ve glutamikasit dekarboksilaz otoantikörleri aracılığıyla immün tahribat, tip-1 diyabetin oluşmasında %85-90 oranında rol oynamaktadır. Tip-1 diyabetin bu formu çocuklarda ve büyüme çağındakilerde pik yapmaktadır. Bazı durumlarda, tip-1 diyabetin otoimmün olduğuna dair hiçbir klinik kanıt yoktur ve bu durum idiyopatik tip-1 diyabet olarak adlandırılır. İdiyopatik tip-1 diyabet hastalarında insülin tedavisi değişkenlik gösterir ve hastalarda sıklıkla ketoasidoz gelişebilir (39). Tip-1 diyabet, her ne kadar tip-2 diyabete göre az yaygın olsa da dünyada tip-1 diyabetin görülme oranı her yıl yaklaşık %3 artmaktadır (6,38). Bu hastalarda obezite genellikle görülmemektedir. Genetik faktörlerin tip-2 diyabetin oluşumuna katkısı çok yüksek değildir. Tek yumurta ikizlerinin insüline bağımlı diyabet olma oranı neredeyse %100 iken, insüline bağımlı olmayan diyabet olma oranı yaklaşık %50'dir. Ancak tip-1 ve tip-2 diyabetin olma olasılığı sadece genetik faktörlere bağlı değildir. Örneğin yapılan çalışmalara göre, viral enfeksiyonlar da tip-1 diyabetin nedeni olarak gözükmektedir. Ayrıca immün hastalıklar da rol oynamaktadır (40).

Tablo 2: Diabetes mellitus'un sınıflandırılması (39)

Tip-1 diyabet (insüline bağımlı diyabet, gençlikte/çocuklukta başlayan diyabet, ketoza yakın diyabet)

a.Otoimmün

b.İdiyopatik

Tip-2 diyabet (insüline bağımlı olmayan diyabet, erişkinlikte başlayan diyabet, ketoza rezistan diyabet)

Gestasyonel diyabet (gebelik diyabeti)

Tablo 2 (Devam): Diabetes mellitus'un sınıflandırılması

Diğer spesifik tipler

a. Beta hücrelerinde genetik harabiyet

- *Kromozom 20, HNF-4 α (MODY1)*
- *Kromozom 7, glukokinaz (MODY2)*
- *Kromozom 12, HNF-1 α (MODY3)*
- *Kromozom 13, IPF-1 (MODY4)*
- *Kromozom 17, HNF-1 β (MODY5)*
- *Kromozom 2, NeruoD1 (MODY6)*
- *Mitokondriyal DNA 3243 mutasyon*
- *Diğerleri*

b. İnsülin aktivasyonunda genetik harabiyet

- *Tip A insülin rezistansı*
- *Leprechaunism*
- *Rabson-Mendenhall sendromu*
- *Lipoatrofik diyabet*
- *Diğerleri*

c. Ekzokrin pankreas hastalıkları

- *Pankreatit*
- *Travma/pankreotektomi*
- *Neoplazi*
- *Kistik fibroz*
- *Hemokromatoz*
- *Fibrokalkülöz pankreatopati*
- *Diğerleri*

d. Endokrinopatiler

- *Cushing sendromu*
- *Akromegali*
- *Feokromasitoma*
- *Aldostreonoma*
- *Glukagonoma*
- *Hipertirodizm*
- *Somatostatinoma*
- *Diğerleri*

Tablo 2 (Devam): Diabetes mellitus'un sınıflandırılması

e.İlaç veya kimyasal madde alımı

- *Nikotirik asit*
- *Glukokortikoid*
- *α -adrenerjik agonist*
- *β -adrenerjik agonist*
- *Tiroid hormonu*
- *Diazoksit*
- *Tiyazidler*
- *Dilantin*
- *Pentamidin*
- *Vacor*
- *İnterferon-Alfa Tedavi*
- *Diğerleri*

f.Enfeksiyon

- *Konjenital rubella*
- *Sitomegalovirus*
- *Diğerleri*

g.Yaygın olmayan immün aracılıklı diyabet

- *İnsülin otoimmün sendrom*
- *Anti-insülin reseptör antikoları*
- *"stiff man" sendromu*
- *Diğerleri*

h.Diğer genetik sendromlar

- *Down sendromu*
- *Friedreich ataksisi*
- *Huntington koresi*
- *Klinefelter sendromu*
- *Laurence-Moon-Biedl sendromu*
- *Miyotonik distrofi*
- *Porfiri*
- *Prader-Willi sendromu*
- *Turner sendromu*
- *Wolfram sendromu*
- *Diğerleri*

Tip-2 diyabette sıklıkla insülin aktivasyonuna karşı rezistans gelişir. Hasta yaşamının sürmesi için insülin tedavisi zorunlu değildir. Tip-2 diyabet uzun zaman teşhis edilemez, çünkü başta hiperglisemi diyabetin belirgin sendromlarının ortaya çıkması için yeterli şiddette değildir. Ketoasidoz bu tip diyabette sıklıkla görülmez. İnsülin seviyesi normal veya yüksek olabilir. Beta hücre fonksiyonu normal olan bu hastalarda yüksek insülin seviyesine rağmen insüline duyarlılık azalmış olabilir (39). İnsüline bağımlı olmayan diyabet ile bir kısım HLA faktörleri arasında bir ilişki yoktur. Genetik faktörler açıkça bu hastalığın oluşmasında ve devam etmesinde rol oynar (40).

İnsüline bağımlı olmayan diyabet, diyabetin yaygın ve önemli bir formudur. Örneğin Avrupa ve Kuzey Amerika'da diyabetlilerin yaklaşık %80'i tip-2 diyabettir. Oral antidiyabetik ilaçlar (sülfonilüreler, biguanidler gibi) bu hastalıkta tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, diyet ilk başta uygulanması gereken tedavi yoludur (41). Tip-2 diyabetin, fizyopatolojisinde insülin rezistansı önem kazanan, hipergliseminin yıllarca sürmesiyle gelişen makrovasküler olaylar ve intraabdominal obezite ile karakterize kronik bir hastalıktır. Hem periferde insülin rezistansı hem de glukoz etkisinde azalma tip-2 diyabette hiperglisemiye katkıda bulunmaktadır (42). Tip-2 diyabet hastalarının %80'inde obezite görülmektedir. İnsülin rezistansı ile obezite ilerlemektedir. Şekil 2'de özetlendiği gibi tip-2 diyabetin ortaya çıkması için iki genetik harabiyet gerekmektedir. Biri iskelet kasında glikojen formasyonunun, diğeri de beta hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasına sebep olmaktadır (42).

Gestasyonel diyabet (gebelik diyabeti), ilk kez hamilelik sırasında başlayan ve insülin duyarlılığının azalması sonucu oluşan geçici bir diyabettir. Gestasyonel diyabet ikinci 3 aylık dönemde genellikle ortaya çıkar. Gestasyonel diyabetli bir çok kadın obezdir ve bir sonraki hamilelikte tekrar ortaya çıkmasına eğilimlidir. Hastaların yaklaşık %80'inde hamilelikten sonra kalıcı diyabet gelişip devam edebilir. Eğer kan glukoz seviyesi normal tutulmazsa, gestasyonel diyabetin fetusa yan etkileri makrozomi, distozi ve ölü doğum oranında artma olabilmektedir. Hastalar insülin ile tedavi edilmelidir (43).

kusma, dehidroksi, asidotik nefes, hipotermi işaretleriyle eşlik eden abdominal ağrıyla karakterizedir. Hiperosmolar non-ketoasidotik durum, genellikle insüline bağımlı olmayan diyabette görülür; glukozu fazla içecekler, diüretik tedavisi ve enfeksiyon bu durumun oluşmasını hızlandırmaktadır (43,44).

Kronik dönemin komplikasyonları ise bir çok sistemi etkilemektedir. Bunları kısaca özetlersek; sinir sistemi komplikasyonları, kardiyovasküler sistem komplikasyonları, sindirim sistemi komplikasyonları, boşaltım sistemi komplikasyonları, solunum sistemi komplikasyonları, oftalmik komplikasyonlar, üreme sistemi komplikasyonları, biyokimyasal komplikasyonlar, hematolojik komplikasyonlar ve farmakokinetik ile ilaç metabolizmasına ilişkin komplikasyonlardır (45).

Diyabetik nöropati, kronik dönemde en sık görülen komplikasyonlardan biridir. Diyabetik nöropati, mononöropati ve polinöropati olarak sınıflandırılmaktadır. Mononöropati tek veya çoklu sinirin etkilenmesiyle sebep olabilmektedir. Bu nöropati periferik ve kranial sinirleri etkilemektedir. Polinöropati ise duyu, motor ve otonom sinir sistemini etkilemektedir (2). Ayrıca diyabetik otonomik nöropati gelişimi, kardiyovasküler, gastrointestinal ve ürogenital komplikasyonların oluşumunu hızlandırması nedeniyle son derece önemli bir klinik tablodur (46,47). Simetrik polinöropati diyabetik ayak ülserinin sebeplerinin başında gelmektedir ve diyabette ayak ülserinin oranı %75-90 kadardır (48).

Kardiyovasküler komplikasyonlar diyabette en ciddi gelişen komplikasyonlardan biridir. Diyabetik hastalarda kardiyak hastalıkların ve ölümün artmasının en önemli nedeni kardiyopatinin meydana gelmesidir (49). Yapılan bazı deneysel çalışmalarda; alloksan ve streptozotosin diyabetik sıçanlarda miyokardın β -adrenerjik agonistlere verdiği yanıtı azaltmıştır (50-52). Bu yanıt azalmasının nedeni, kalpteki β -adrenerjik reseptör sayısının deneysel diyabete bağlı olarak azalmasıdır (51,53,54). Kalpteki β -adrenerjik yanıtlardaki bu azalma deneysel tip-2 diyabetik sıçanlarda da görülmektedir (55). İnsülin tedavisi her iki tip deneysel diyabete bağlı olarak kalpte gözükken bu değişimleri normalize etmektedir (52,55). Aynı şekilde gliburid tedavisi kalpteki β -adrenerjik yanıt

azalmasını önlemektedir (54). İnsülinin bu etkisine büyük olasılıkla tiroid hormonları aracılık etmektedir, çünkü insülin tedavili hayvanlara uygulanan tirodektomi β -adrenerjik yanıt azalmasını önlemektedir (52) ve *in vitro* insülin tedavisi deneysel diyabete bağlı β -adrenerjik yanıt azalmasını düzeltememektedir (56). Vanadat tedavisi de deneysel diyabete bağlı kardiyak β -adrenerjik yanıt azalmasını normalize etmektedir (57). Miyokardın kalsiyuma verdiği inotropik yanıtlar da azalmaktadır. Buna neden olarak, kalp kası hücresi sarkoplazmik retikulumunun kalsiyumu yeterince alamaması ileri sürülmektedir (50,58). Ayrıca diyabetik sıçan atriyumunun α_1 -adrenerjik cevapları kontrole göre artmaktadır ve adenosin yanıtları da değişmektedir (59-61). Bu değişimler klinikte gözlenen kardiyopatinin nedeni olması kuvvetle muhtemeldir.

Bunun dışında endotel fonksiyon bozukluklarının diyabetik damar hastalıklarının patogenezinde anahtar rol oynadığı ve bunun bir çok nedeni olabileceği bildirilmiştir; EDRF (nitrik oksit; NO)'nin yıkımında artma, damar düz kasında EDRF'nin duyarlılığının azalması veya EDRF'nin salınmasında problemler gibi (62). Bir başka çalışmada diyabetin serebral arteriyollerin ve baziler arterlerin genişlemesini zayıflattığı gösterilmiştir. Muskarinik reseptörlerin aktivasyonuna bağlı olarak serebral kan akımındaki artış da diyabet ile zayıflamaktadır. Bazı deneysel çalışmalarda ise NO üretiminin diyabette normal olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalarda da hipergliseminin endotelial NO mRNA seviyesini, protein ve enzim aktivitesini değiştirmedeği bildirilmiştir. Bu durumda belki endotele bağlı gevşeticilerin etkisi reaktif oksijen türlerinin fazla oluşmasıyla zayıflamaktadır (63).

Diyabet çok önceden keşfedilmesine rağmen, diyabetik retinopati ancak 1955 yılında Jager tarafından ortaya konmuştur. Retinopatinin gelişmesinde de en önemli ve öncelikli faktör diyabettir. Diğer faktörler ise zayıf kan akımı, hipertansiyon, hamilelik, renal hastalıklar ile sigara veya alkol kullanımıdır. Ancak iyi kontrol altında tutulmuş diyabet ve insülin tedavisi, retinopatinin oluşması veya ilerlemesini geciktirmektedir. Ayrıca diyabetik nefropati de, proliferatif retinopatinin oluşmasına neden olabilmektedir (2,64).

Diyabetik hastalarda, hastalığın uzun süreli devamında kronik renal bozukluklar olabilmektedir. Bu etkileme hem idrar kesesi hem de böbreklerde ortaya çıkmaktadır. Streptozotosin diyabetik sıçanlarda renal fonksiyonda ve yapısındaki değişiklikler renal hemodinamik değişiklikler, glomerüler yapı değişiklikleri ve tubüler yapı değişiklikleri şeklinde gözükmektedir (2). Ayrıca diyabetik sıçanlarda diyabete bağlı olarak alınan sıvı miktarı, miksiyon sıklığı ve her miksiyonda çıkan idrar volümünde artışlar gözlenmiştir (65).

Sindirim sistemi organ ve dokuları da diyabetten etkilenmektedir. Diyabetik diyare yemeklerden sonra ve/veya geceleri belirginleşip hastaya sıkıntı vermektedir. Bu diyare genellikle aralıklarla, bazen de konstipasyon dönemlerinin ardından görülmektedir (66,67). Diyabetik diyarede artmış peristaltik aktivite, bağırsaklardan hızlı geçiş ve azalmış intestinal tonus gözlenmişken başka bir çalışmada ileumdan yavaşlamış geçiş ve diğer bazı çalışmalarda da intestinal tonusda değişim olmadığı gözlenmiştir (68-72). Alloksan diyabetik sıçanlarda yapılan deneysel çalışmalarda, diyabete bağlı olarak hem bazal hem de histamin ile oluşturulan gastrik asid sekresyonlarının azaldığı saptanmıştır (73). Uygulanan gelişmiş biyoistatistik yöntemler sayesinde, histamin ile sıçanlarda oluşan gastrik asid salınımının direkt etki ve vagal refleks olmak üzere iki komponentin de diyabete bağlı olarak azaldığı saptanmıştır (74,75).

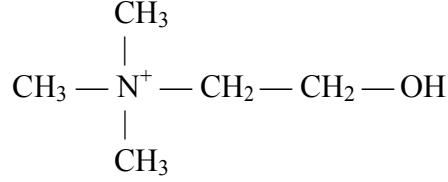
Özetle, diyabetin uzun süreli komplikasyonlarında, görmenin potansiyel kaybıyla retinopati, renal yetersiz ile nefropati, ayak ülserleri, periferik nöropati, seksüel disfonksiyon, gastrointestina ve kardiyovasküler sendromlar ile otonomik nöropati görülmektedir (38). Tüm bu komplikasyonlar ancak çok iyi glisemik kontrol, sıkı takip ve tedavi ile biraz olsun önlenmektedir.

2.2.Kolinin Yapısı, Sentezi ve Genel Özellikleri

2.2.1. Kolinin Yapısı:

Kolin (2-hidroksi-N,N,N-trimetiletanolamin), önemli işlevi bulunan kolinerjik nörotransmitter asitilkolinin önmaddesidir. Kolin pozitif yüklü kuarternar bir bazdır. Ayrıca tüm hücre membranlarında fosfatidilkolin, sfingomyelin ve plazmalojenlerin polar alt birimini oluşturur. Hidrofilik bir

molekül olması nedeniyle baz hali sıvıdır. Aynı zamanda klorür ve tartarat tuzu şeklinde ticari formları bulunmaktadır. Molekül ağırlığı 105 gr'dır (Şekil 3).



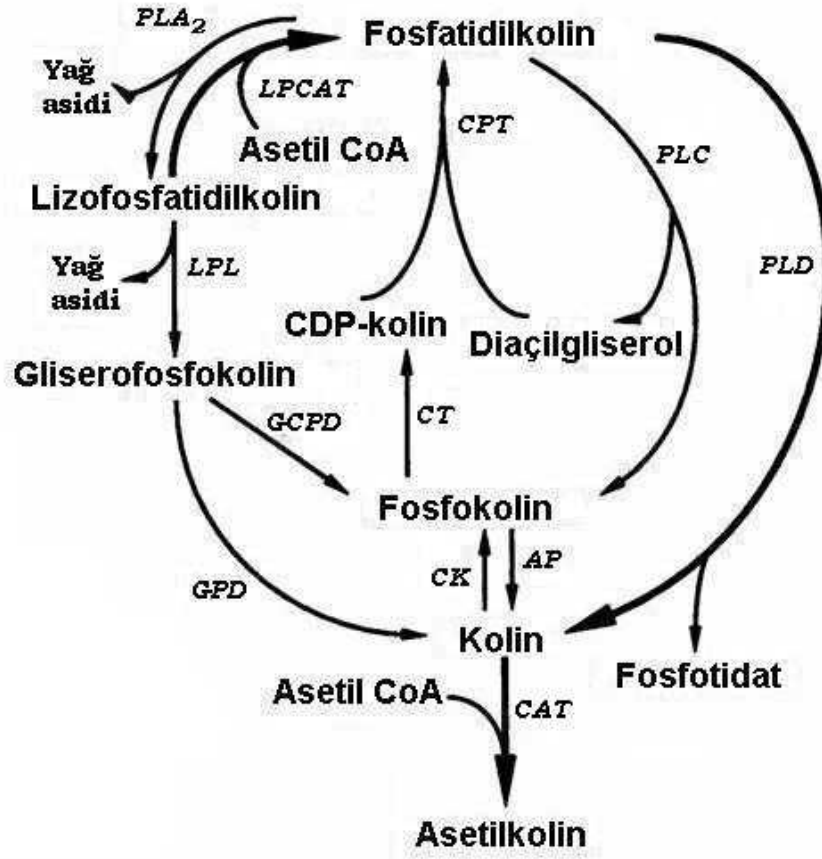
Şekil 3: Kolinin moleküler yapısı

2.2.2. Dolaşımdaki Kolin Kaynağı:

Dolaşımdaki kolinin başlıca kaynağı gıdalardır. Gıdalarda kolin serbest kolin ya da kolin içeren bileşikler şeklinde bulunur. Yumurta sarısı, etli besinler ve soya fasulyesi gibi besinler kolin bakımından özellikle zengindir. Ayrıca kolin membran fosfolipidlerinin yıkılmasından ve sinaptik aralığa salınan asetilkolinin hidrolize olmasından da oluşabilir (13-17).

2.2.3. Kolinin Biyosentezi:

Kolinin vücuttaki başlıca sentez yeri karaciğer ve böbreklerdir. Kolin sınırlı bir şekilde beyin nöronları tarafından da sentezlenir (16). Kolin hücre membranında bulunan fosfatidilkolinden enzimatik yollarla oluşur. Şekil 4'te görüldüğü üzere fosfatidilkolinden serbest kolin oluşumu birkaç yolla olur. Bunlardan birincisi, fosfolipaz D enzimi etkisi ile kolinin fosfatidilkolinden serbestleşmesi yoludur. İkinci yolda, fosfatidilkolinden fosfolipaz A₂ etkisiyle önce lizofosfatidilkolin oluşur. Takiben lizofosfolipaz etkisi ile lizofosfatidilkolin gliserofosfokoline ve gliserofosfokolin fosfodiesteraz etkisi ile de serbest kolin dönüşür. Üçüncü yolda ise, fosfolipaz C etkisi ile önce fosfokolin ve takiben de alkalin fosfataz etkisi ile serbest kolin oluşmasıdır.

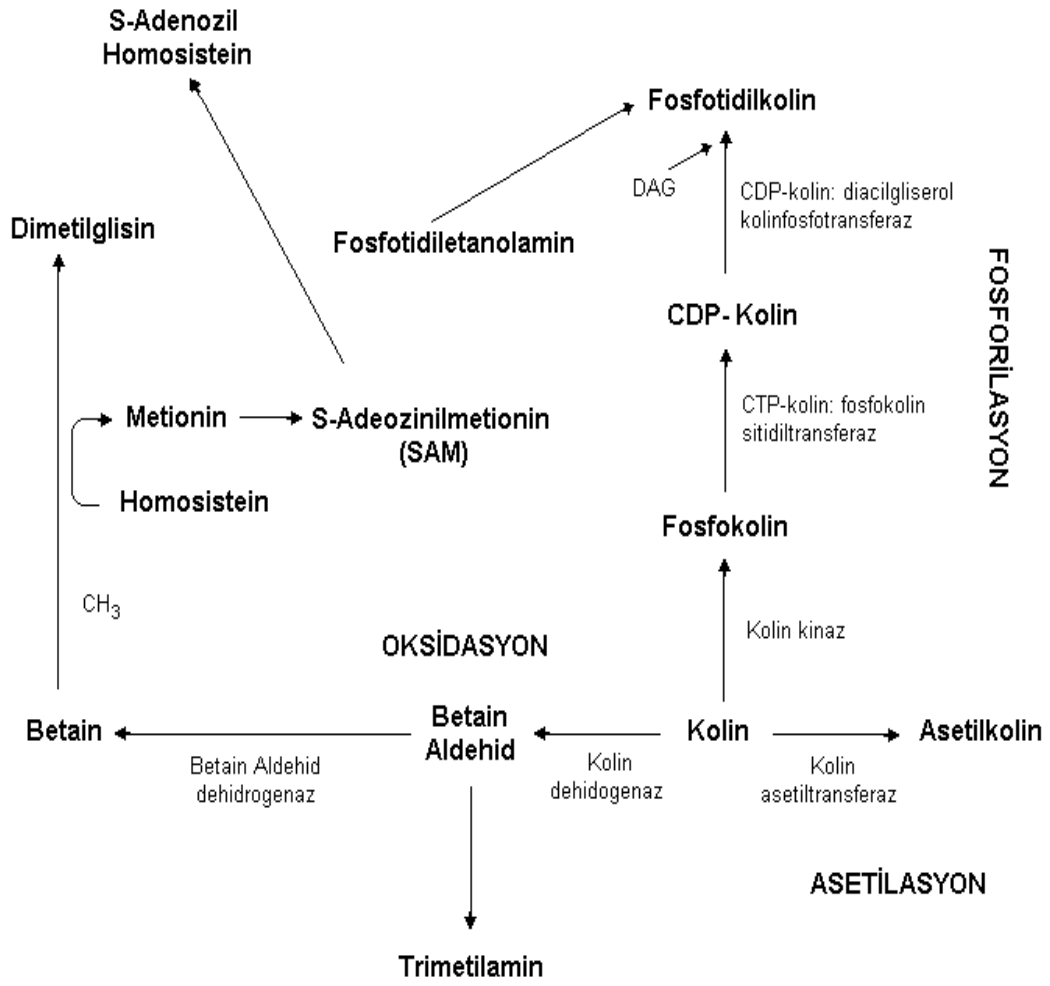


Şekil 4: Fosfatidilkolinden kolin sentezi. PLA₂: Fosfolipaz A₂, LPCAT: Lizofosfatidilkolin asetiltransferaz, LPL: Lizofosfolipaz, GPD: Gliserofosfokolin fosfodiesteraz, GCPD: Gliserofosfokolin kolin fosfodiesteraz, PLC: Fosfolipaz C, PLD: Fosfolipaz D, CPT: Kolin fosfotransferaz, CT: Sitidiltransferaz, CK: Kolin kinaz, AP: Alkalen fosfataz, CAT: Kolin asetiltransferaz.

Ayrıca, beyinde sınırlı olmakla beraber “baz değişimi” adı verilen bir reaksiyonla fosfatidilkolinden kolin sentezi gerçekleşir.

2.2.4. Dokulara ve Kolinerjik Nöronlara Kolin Sağlayan Faktörler

Dokular dolaşımdaki kolini ya aktif transportla ya da diffuzyonla alınırlar (13,14,16). Dokulara alınan kolin başlıca 3 yolla (oksidasyon, fosforilasyon ve asetilasyon) metabolize olur.



Şekil 5: Kolinin metabolizması

Dolaşımdaki kolin kan beyin bariyerini rahatlıkla geçer ve beyin hücrelerine girer. Bu geçiş muhtemelen kapiller endotelde yerleşik iki yönlü bir transport sistemi ile gerçekleşir. Transport sistemi normal koşullarda plazmadaki kolin tarafından doyurulmamıştır ve plazma kolin konsantrasyonu dışarıdan kolin verilmesi ile arttırılmadıkça net kolin akışının yönü beyinden venöz dolaşıma doğrudur (16). Dolaşımdaki kolin konsantrasyonlarının arttırılması beyin kolin konsantrasyonlarında yükselmeye neden olmaktadır (76,77). Dolaşımdaki kolin konsantrasyonlarının yükselmesi beraberinde beyin ekstrasellüler aralığına geçen kolin miktarını arttırmaktadır. Ekstrasellüler aralıktaki kolinin nörona alınması başlıca iki transport sistemi aracılığı ile olmaktadır.

1) *Yüksek afiniteli transport sistemi*: Sodyum iyonuna bağımlı olup kolinerjik nöron terminalerinde bulunur. Fizyolojik plazma ve beyin kolin konsantrasyonlarında bu sistem doyurulmuştur. Yüksek afiniteli transport sistemi ile kolinerjik nöronlara kolin alınması asetilkolin sentezinde önemli bir basamağı oluşturur (78). Kolinin kolinerjik nöronlara yüksek afiniteli transport sistemi ile geri alınması hemikolinyum-3 (HC-3) ile bloke edilir (78,79). Bu sistem asetilkolinin hidrolize olması ile ortaya çıkan kolinin yeniden kullanılmasında önemlidir.

2) *Düşük afiniteli transport sistemi*: Sodyum iyonuna bağımlı olmayıp kolinerjik nöron gövdelerinde yerleşik durumda bulunur ve normal şartlarda doyurulmamıştır (80). Bu sistemin esas olarak fosfatidilkolin ve diğer fosfolipidler için gerekli olan kolin desteğini sağlar (81).

2.2.5. Asetilkolinin Sentezi ve Kolin Uygulamasına Etkileri

Kolin, nörotransmitter asetilkolinin hem yıkım ürünü hem de biyosentetik ön maddesidir. Asetilkolin, kolin ve asetil CoA'nın birleşmesi ile oluşur. Reaksiyonu kolin asetiltransferaz enzimi gerçekleştirir. Kolinin normal koşullarda dolaşımdaki ve dokulardaki konsantrasyonları genel olarak enzimi doyurmak için gereken konsantrasyonların çok altında kalır. Bu nedenle beyin kolin ya da asetil CoA konsantrasyonlarını arttıran tedaviler kolinerjik nöronların asetilkolin sentez hızını etkileyebilir. Dolaşımda kolin düzeyini arttıran tedaviler dokularda kolin (76,77,82) ve asetilkolin sentezi (82,83) ile asetilkolin salıverilmesini (77,83,84) arttırır. Bu sayede kolinerjik iletide de bir artış gözlenir (85,86). Kolinerjik iletinin bu yolla artışı kolinerjik nöronların aktivasyonuna neden olan durumlarda da belirgindir (87,88).

Kolinerjik nöronlar, asetilkolin sentezi için kullandığı kolini genel olarak şu yollarla temin eder. Birinci yol diyet ile alınan ve karaciğerde fosfolipidlerden sentezlenen kolin, dolaşımdan beyin ekstrasellular aralığına geçer ve uptake mekanizmaları ile nöronlara alınarak asetilkolin sentezinde kullanılır. İkinci yol dolaşımdan sağlanan fosfatidilkolinin nöronlara alınması ve burada fosfatidilkolinin yıkımı sonucu ortaya çıkan kolindir. Üçüncü yol sinaptik aralığa

salınmış olan asetilkolinin, asetilkolinesteraz enzimi ile yıkılması sonucu oluşan kolindir ve bu yoldan temin edilen kolin ilk yoldaki gibi uptake sistemi ile nörona alınır. Dördüncü yol ise beyinde endojen olarak sentezlenen kolindir.

Kolinerjik nöronlar kolini iki metabolik yolda kullanır. Bunlar fosforilasyon yolağı ile fosfolipidlerin sentezi ve asetilasyon yolağı ile asetilkolin sentezidir (16,89). Nöronlar fizyolojik olarak aktifken asetilasyon yolağı ön plandadır ve kullanılabilir kolin asetilkolin sentezine yönlendirilir (17). Eğer herhangi bir şekilde kolin kaybı ya da atılımı olursa membran fosfolipidleri özellikle fosfatidilkolin bir kolin kaynağı oluşturmak için yıkıma uğrar. Sıçan striatal dilimlerinde asetilkolin salımının stimülasyonu fosfatidilkolini de içeren membran fosfolipidlerinde bir azalmaya neden olmuştur (90). Bu azalma inkübasyon ortamına kolin eklenmesi ile önlemiştir (90). Bu da, kolinerjik nöronlar aktive edildiğinde asetilkolin sentezlemek için daha fazla koline ihtiyaç duyduklarını ve bu artış gereksinimi için kullanılabilir kolin kaynağının sınırlı olduğu durumlarda gereken kolinin membran fosfolipidlerinin yıkımı ile sağlandığını düşündürmektedir (90). Beyin dilimlerinde *in vitro* koşullarda yapılan çalışmalar, uyarılma koşullarında eğer yeterli kolin sağlanırsa hem kolinerjik nöronların daha fazla asetilkolin sentez edip salgılayabildiklerini hem de membran fosfolipid yıkımının önlendiğini ortaya koymaktadır (90). Kolin eksikliğinin, membranda fosfatidilkolin ve sfingomiyelin kaybına neden olduğu ayrıca apoptozisin indüklenmesine yol açtığı *in vitro* olarak gösterilmiştir (91). Bütün bu bulgular, kolinin dışarıdan verilmesinin fosfatidilkolin hidrolizini ve kolinerjik nöronlardaki, membran kaybını azaltabileceğini göstermektedir. Bir kolin vericisi olan CDP-kolinin çeşitli nöron hasarı ile seyreden çeşitli hastalıklarda, bir taraftan kolinerjik aktiviteyi artırırken bir taraftan da membran yıkımını azaltıp onarımını arttırmak için klinik kullanım yeri bulmuştur (17).

3. KULLANILAN ANA YÖNTEMLER

3.1. Deneysel Diyabet Oluşturma Yöntemleri Hakkında Bilgiler

Birçok hastalık gibi diabetes mellitus için de çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir. Her ne kadar grup hiçbir model tam olarak insanlarda oluşan diabetes mellitus ile tıpatıp aynı olmasa da bu modeller deney hayvanlarında diyabeti araştırmak için son derece kullanışlı deney ortamlarını bize sunmaktadır. Beş farklı diyabet modelinden söz edebilir (7,45):

1)*Cerrahi diyabet modelleri*: En eski deneysel diyabet modeli olmasına karşın günümüzde kullanımı azalmıştır, çünkü pankreasın diffüz bir organ olması nedeniyle pankreatektomi ancak köpek gibi büyük hayvanlarda uygun biçimde yapılabilmektedir. Zahmetli ve pahalı olması yöntemin günümüzdeki uygulama alanını kısıtlamaktadır (45,92).

2)*Kimyasal diyabet modelleri*: Günümüzde en yaygın kullanılan deneysel diyabet modellerinden birisidir. Bazı ilaç ve kimyasal maddelerin kan şekerinde yükselme yaptığı ötedenberi bilinmektedir. Örneğin, siproheptadin ve lityum tuzları kullanıldığı süre içinde diyabet benzeri bir tablo oluşturabilmektedir, ancak bunların kullanımı bittiğinde kan şekeri normalize olmaktadır (93). Tek doz kullanım ile kalıcı diyabet yaptığı ilk saptanan kimyasal madde alloksandır (94). Daha sonra streptozotosin bulunmuştur. Bu iki madde günümüzde en çok kullanılan deneysel diyabet modellerini oluşturmaktadır. Bu iki kimyasaldan birinin neonatal hayvanlara tek doz verilmesi iyi bir tip-2 (insüline bağımlı olmayan) diyabet modeli ortaya çıkarmaktadır (95,96).

3)*Genetik diyabetik modeller*: Günümüzde yaygın biçimde kullanılan diğer bir deneysel diyabet modelidir. Özellikle BB sıçanlar vücutlarında hiç insülin taşımadıklarından ideale yakın bir tip-1 (insüline bağımlı) diyabet modeli oluştururlar (97). ob/ob Fareler ise obez diyabetik bir model oluştururlar (98).

4)*Viral diyabetik modeller*: "Eppstein-Barr" virüsü gibi bazı virüsler deney hayvanlarında diyabet oluşturmaktadır. Ancak, bu diyabet araştırmaları için rutin bir uygulama olmaktan uzak olup model olarak kullanımı çok sınırlıdır (99).

5)*Yardımcı diğer modeller*: Diabetes mellitus ve diyabetik komplikasyonlar ile bunlar üzerine etkili ilaç adaylarının araştırılması için

yardımcı başka modeller de bulunmaktadır. Bunlar arasında glukoz tolerans testi (şeker yükleme testi) ve glukoz dispozal kinetiği deneyleri de yer almaktadır. Özellikle tip-2 diyabette ortaya çıkan hiperinsülinemi ve insülin rezistansının etkilerini araştırmak içinde fruktoz diyet modelleri geliştirilmiştir. Yine diyabetik katarkat için bir model olarak galaktoz diyet modelleri geliştirilmiştir (100).

3.2. HPLC Hakkında Bilgiler

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir kromatografi şeklidir. Kromatografik prosesler, mobil faz ve durgun faz arasındaki kütle transferinden faydalanarak yapılan ayırma teknikleri olarak tanımlanabilir. HPLC’de bir karışımın bileşenlerini birbirinden ayırmak için sıvı bir mobil faz kullanılır. Bu bileşenler öncelikle bir çözücüde çözünür, daha sonra yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçmeye zorlanır. Kolon içinde karışım bileşenlerine ayrışır, bu ayrışma miktarı önemlidir. Ayrışma miktarı, durgun faz ile çözünen bileşenler arasındaki etkileşimin büyüklüğüne bağlıdır.

Durgun faz kolon içine doldurulmuş olan hareketsiz faz olarak tanımlanır. Çözünenlerin mobil faz ve durgun faz etkileşimleri, çok farklı fazlar seçilerek değiştirilebilir. Bu sebeple HPLC diğer kromatografik sistemlerde bulamayacağımız bir kullanışlık gösterir ve bu özelliklerinden dolayı kimyasal karışımları ayırmak için çok geniş bir uygulama alanı bulmaktadır. Standart HPLC donanımı temel olarak 4 bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler sırasıyla pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve dedektördür (101).

3.2.1 HPLC Sistem Türleri

- 1) İzokratik sistem
- 2) Yüksek basınçlı gradient sistem

3.2.2 HPLC'de Ayırma Teknikleri

1)Normal faz (Normal phase-NP) (ilk geliştirilen teknik, kolon polar, mobil faz apolardır, kullanılan kolonlar silica gel, cyano, amino, diol veya nitro kolonlardır)

2)Ters faz (Reverse phase-RP) (en sık kullanılan teknik, kolon apolar, mobil faz polardır, kullanılan kolonlar C18, C8, C4, phenyl, TMS, Cyano'dur)

3)Ters faz iyon çifti (Reverse phase ion pairing-IP)

4)İyon değişim (Ion exchange-IC)

5)Büyükükçe ayırma (Size exclusion-SEC) (GPC/GFC)

6)Kiral ayırım (Chiral separation)

4. MATERYAL VE METOD

4.1 Kullanılan Deney Hayvanları

Çalışmalarda Wistar türü 7 haftalık dişi sıçanlar (U.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi, Bursa) kullanıldı. Sıçanlar çalışmadan önce laboratuvarındaki bakım merkezine alınarak sıcaklığı (18-24°C) ve ışığı (12 saat karanlık/12 saat aydınlık) ayarlanmış odada 4-6 kadarı bir kafeste olacak şekilde su ve yem alımları serbest bırakılarak tutuldular.

4.2 Deneysel Diyabet Oluşturulması

Diyabet oluşturulacak 51 adet dişi Wistar türü deney hayvanlarının kuyruk venleri yoluyla 0.1 ml sitrat tamponu (pH=4.5, 0.1 M) içinde hazırlanmış tek doz (60 mg/kg) streptozotosin zerk edildi. Takiben enjeksiyondan 3 gün sonra alınan kan örneklerinden Glukotrend® ile kan glukozu ölçülerek bakıldı. Kan glukoz düzeyi 270 mg/dl ve üstünde olanlar sıçanlar diyabetik olarak değerlendirildi.

4.3 Deneysel İşlemler

Kontrol ve diyabetik sıçanlar üç gruba ayrıldılar. 1. grup sıçanlar bir hafta sonra 2. grup sıçanlar iki hafta sonra ve 3. grup sıçanlar ise dört hafta sonra öldürüldü. Öldürme günü sabah saat 9.00'da yemleri ile suları alındı ve öğleden sonra saat 15.00'te başları giyotinle kesilerek kanları sitratlı tüplerde toplandı. Toplanan kanlar 3000 g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Biyokimyasal analizler için serumdan 3 set örnek (her biri 1 ml kadar) ayrıldı. Ayrıca serbest kolin ve kolinin suda erir bileşikleri için serum örneklerinden ekstraksiyon yapıldı. Kısaca; 50 µl serum üzerine, 3 ml metanol + kloroform karışımından (1/2:v/v) eklendi. Takiben bu karışım üzerine 950 µl distile su eklendi ve kuvvetle vortekslendi. Karışım 3-5 saat kadar soğuk odada tutuldu. Takiben örnekler 2000 g'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edilerek iki faz ayrılması sağlandı. Üst fazdan (sulu fazdan) 3 set 400 µl örnek (serbest kolin, fosfokolin ve gliserofosfokolin düzeyleri ölçümümü için) alındı ve vakum santrifüjunda kurutuldu.

4.4 Biyokimyasal Ölçümler

- **Serum Glukoz Ölçümü :**

Bir set serum örneğinden herhangi bir ön işlem yapılmadan glukoz ölçümü Abbott Aeroset otoanalizöründe Abbott firması tarafından üretilen ticari kitler (Abbott 7D66-20 30-3085/R3) kullanılarak yapıldı.

- **Serum Serbest Kolin Ölçümü :**

Serbest kolin ölçümü için ekstrakte edilen ve kurutulan örnekler 100 µl distile su içinde çözüldü. Takiben 10 µl direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilerek [HPLC sistemi; Kit = BAS (Bioanalytical systems) firmasının Acetylcholine Choline Assay kiti, Dedektör = EC, Oksidasyon potansiyeli V = 0.3 volt, Tampon = 0.05 M Na₂HPO₄ (Sodyum Fosfat), pH = 8.5, Akış hızı = 1 ml/dak.] daha önce tarif edildiği gibi (77) ölçüm yapıldı.

- **Serum Fosfolipidlere Bağlı Kolin Ölçümü :**

Fosfolipidlere bağlı kolin herhangi bir ön işlem uygulanmadan doğrudan 10 µl serumda enzimatik olarak mevcut ticari kit (Wako phospholipid; B, Wako Chemicals Gmbtl, Neuss, Almanya) kullanılarak ölçüm daha önce tarif edildiği gibi (102) yapıldı.

- **Serum Fosfokolin Ölçümü :**

Serumdan ekstrakte edilen ve kurutulan örnekler üzerine 50 µl enzim kokteyli [50 mM Tris-HCL buffer (pH = 8) + MgCl₂ (1 mM) + 5 U alkalin fosfataz] eklendi ve tüpler 37°C sıcak suda 60 dakika bekletilerek fosfokolin ile kolinin serbestleşmesi sağlandı (102-104). 60 dakikalık süre sonunda su banyosundaki suyun sıcaklığını 60-70°C ye çıkartıldı. Daha sonra her tüpe 50 µl kaynatılmış H₂O eklendi. Bu karışımdan 10 µl direkt olarak yukarıda serbest kolin ölçümü için bahsedilen HPLC sistemine enjekte edilerek toplam serbest kolin ölçümü yapıldı. Her örnekteki toplam serbest kolin miktarından enzimatik reaksiyon yapılmadan bulunan serbest kolin miktarı çıkartılarak fosfokolinden gelen serbest kolin miktarı daha önce tarif edildiği gibi (102) hesaplandı.

- **Serum Gliserofosfokolin Ölçümü :**

Serumdan ekstrakte edilen ve kurutulan örnekler üzerine 50 µl enzim kokteyli [50 mM Tris-HCL buffer (pH = 8) + MgCl₂ (1 mM) + 2 U gliserofosfokolin fosfodiesteraz] eklendi ve tüpler 37°C sıcak suda 60 dakika inkube edildi ve gliserofosfokolinden enzimatik olarak kolinin serbestleşmesi sağlandı (102-104). Sürenin sonunda su banyosundaki suyun sıcaklığını 60-70°C'ye çıkartıldı ve örnekler üzerine 50 µl kaynatılmış H₂O eklenip enzimatik reaksiyonu durduruldu. Bu karışımdan 10 µl direkt olarak kolin ölçümü için yukarıda serbest kolin ölçümü için bahsedilen HPLC sistemine enjekte edilerek toplam serbest kolin ölçüm yapıldı. Her örnekteki toplam serbest kolin miktarından toplam serbest kolinden enzimatik reaksiyon yapılmadan önceki bulunan serbest kolin miktarı çıkartılarak gliserofosfokolinden gelen serbest kolin daha önce belirtildiği gibi (102) hesaplandı.

- **Serum Betain Ölçümü :**

Betain ölçümü için ayrılan serumdan 50 µl alındı ve üzerine 50 µl 100 mmol/L KH₂PO₄ sonra 900 µl Derivatizing solusyon (100 ml Asetonitril içinde 2.5 mmol 18-crown-6 ve 50 mmol 4-bromofenaçil bromür) eklendi vortekslendi. Sonra 80°C'lik küvette 90 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında soğutuldu vortekslendi. Vortekslendikten sonra 2500 g'de 25°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan üst fazdan 20 µl direkt olarak HPLC sistemine enjekte edilerek (HPLC sistemi; Kolon = Alltech firmasının Adsorbosphere SCX 5 µm, 25cm x 4.6cm, Dedektör = DA, λ = 264 nm, Tampon = 22 mmol/L Kolin 900 ml/L Asetonitril 100 ml/L Distile su, Akış hızı = 1 ml/dak.) ölçüm yapıldı.

- **Serum Homosistein Ölçümü :**

Serum homosistein ölçümü Abbott Axsym otoanalizöründe Abbott firması tarafından üretilen ticari kitler (Abbott 5F51-20 34-3084/R5) kullanılarak ölçüldü.

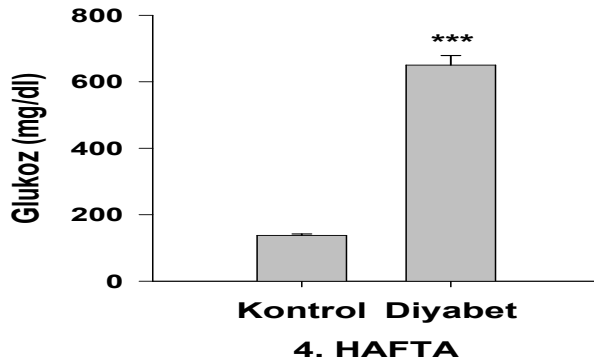
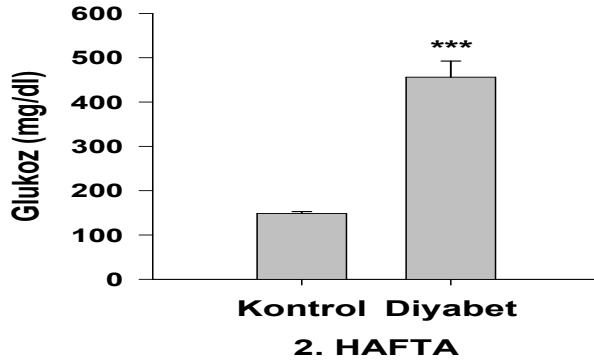
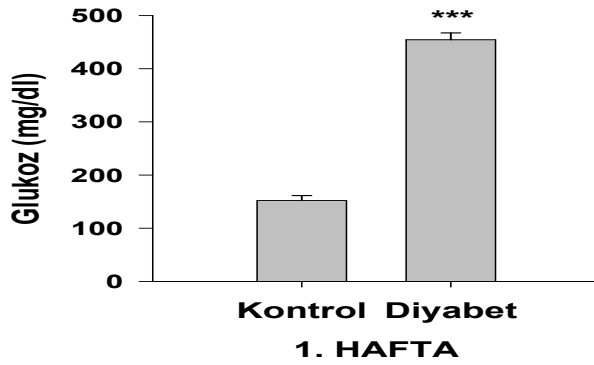
4.5 İstatistiksel Yöntemler

Sonuçlar ortalama ± SEM olarak verilmiştir. İstatistiki karşılaştırmalarda Student'in t-testi kullanılmıştır. Anlamlı fark için p<0.05 koşulu arandı.

5.BULGULAR

5.1 Serum Glukoz Düzeyleri

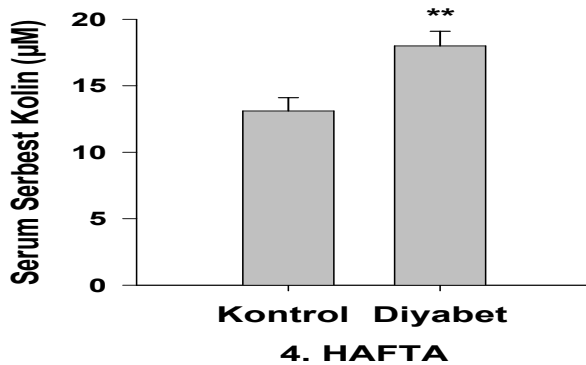
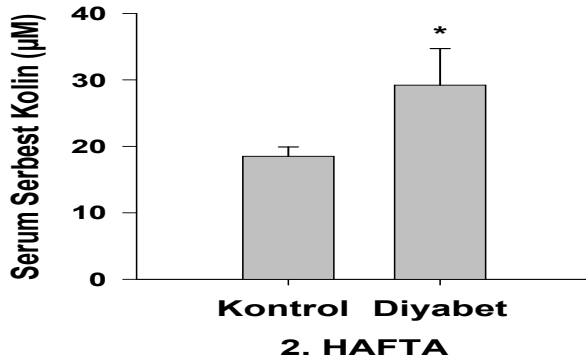
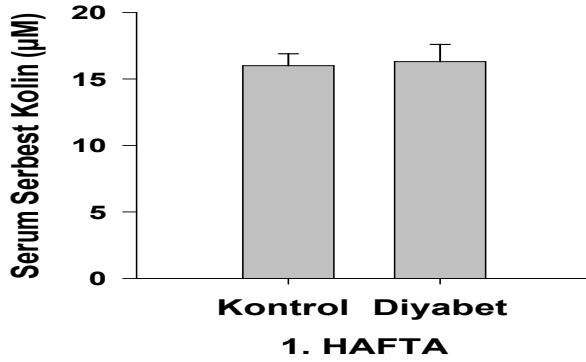
Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda 4 haftalık deney süresince serum glukoz düzeyleri değişimi şekil 6'da gösterilmektedir. Kontrol grubu sıçanlarda 120-180 mg/dl olan serum glukoz düzeyleri, beklenildiği üzere, diyabetik sıçanlarda 400 mg/dl üzerinde bulundu.



*Şekil 6: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum glukoz düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde glukoz düzeyleri ölçüldü. *** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.*

5.2 Serum Serbest Kolin Düzeyleri

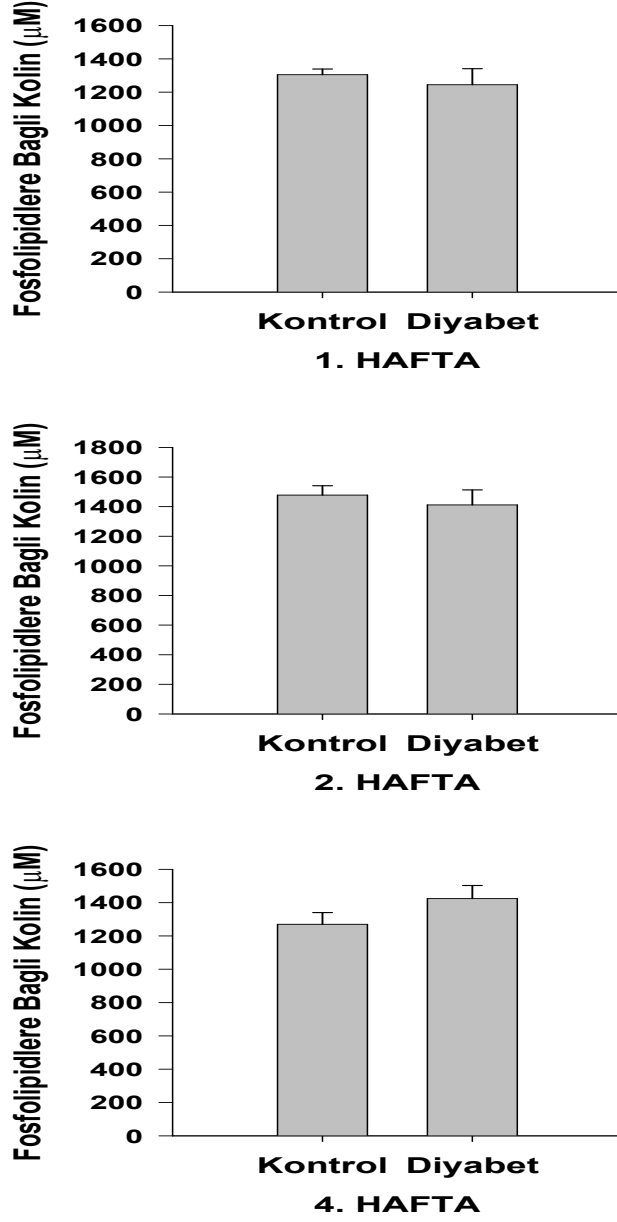
Diyabetik sıçanlarda serum serbest kolin düzeyi değişiklikleri şekil 7’de görülmektedir. İlk hafta serum serbest kolin düzeyleri diyabetli sıçanlarda ($16.3 \pm 1.2 \mu\text{mol/L}$) kontrollere ($15.9 \pm 0.8 \mu\text{mol/L}$) benzerken, 2. haftada diyabetli sıçanlarda ($29.1 \pm 5.5 \mu\text{mol/L}$) kontrol grubuna göre %58, 4. hafta ise %38 oranında daha yüksekti (Şekil 7).



Şekil 7: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum serbest kolin düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde serbest kolin düzeyleri ölçüldü. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.

5.3 Serum Fosfolipidlere Bağlı Kolin Düzeyleri

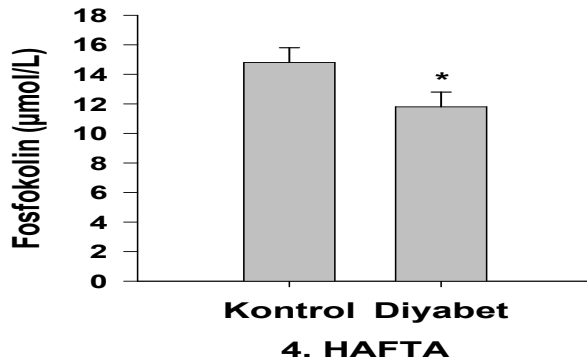
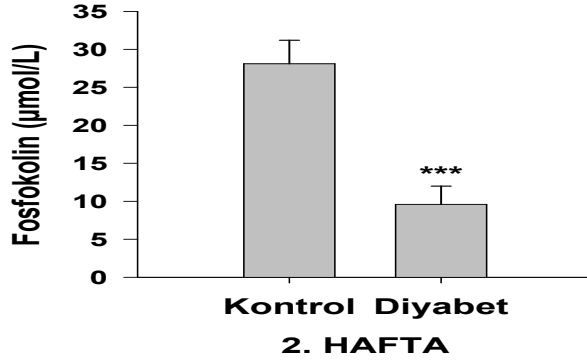
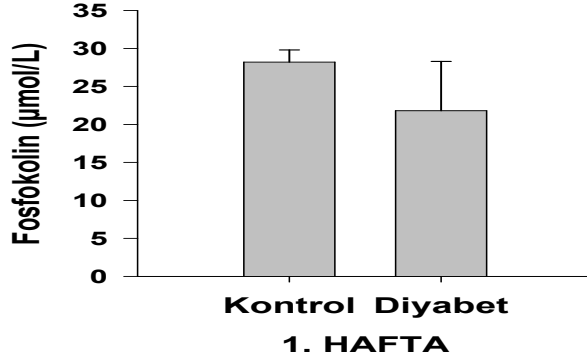
Serum fosfolipidlere bağlı kolin düzeyleri diyabet ile anlamlı değişim göstermedi (Şekil 8).



Şekil 8: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum fosfolipidlere bağlı kolin düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde fosfolipidlere bağlı kolin düzeyleri ölçüldü.

5.4 Serum Fosfokolin Düzeyleri

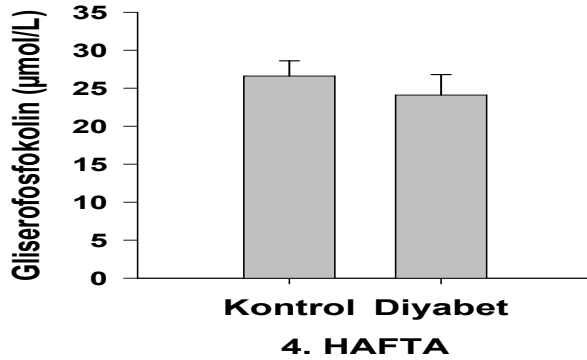
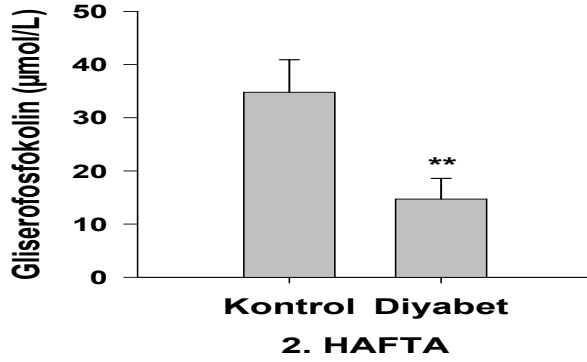
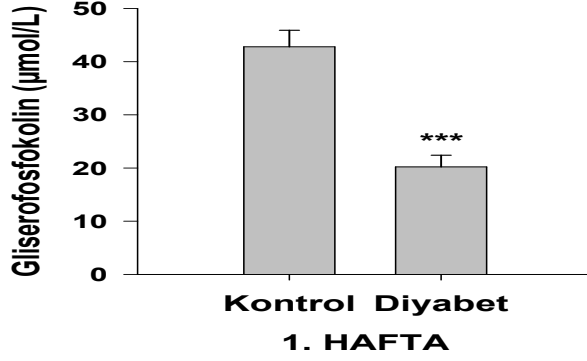
Serum fosfokolin seviyeleri diyabetik sıçanlar ile kontrollerde şekil 9’da görüldüğü gibi değişim göstermiştir. Serum fosfokolin düzeyleri diyabetli sıçanlarda 2. ve 4. hafta kontrollerden daha (%20-65 oranında) düşük bulunmuştur (Şekil 9).



Şekil 9: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum fosfokolin düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde fosfokolin düzeyleri ölçüldü. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.

5.5 Serum Gliserofosfokolin Düzeyleri

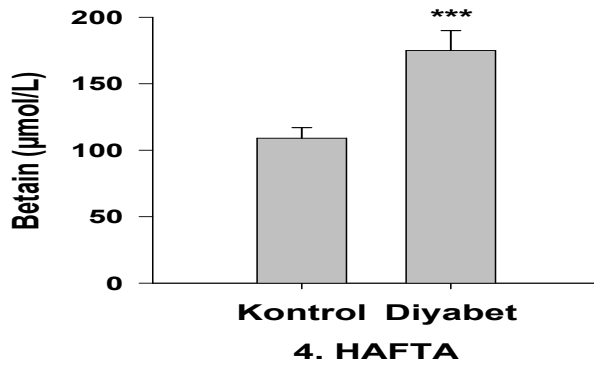
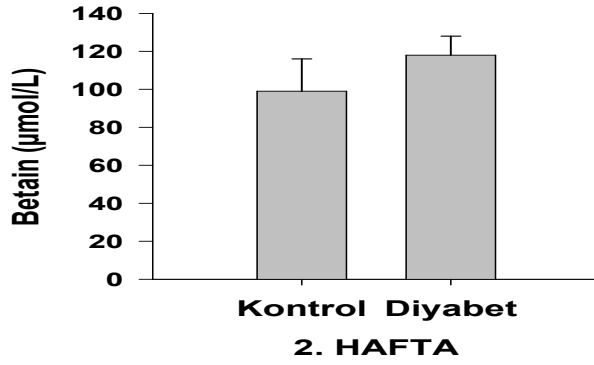
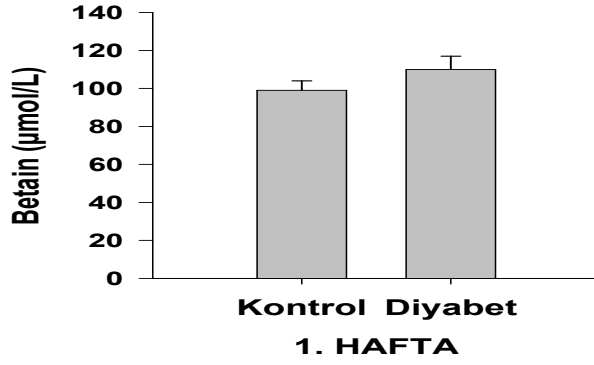
Serum gliserofosfokolin seviyelerinin diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre değişimi şekil 10'daki gibidir. Serum gliserofosfokolin düzeyleri 1. ve 2. hafta %53 ve %58 oranında düşük bulunmuştur. Dördüncü haftada ise, serum gliserofosfokolin düzeyleri kontrollere benzer bulunmuştur (Şekil 10).



*Şekil 10: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum gliserofosfokolin düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde gliserofosfokolin düzeyleri ölçüldü. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.*

5.6 Serum Betain Düzeyleri

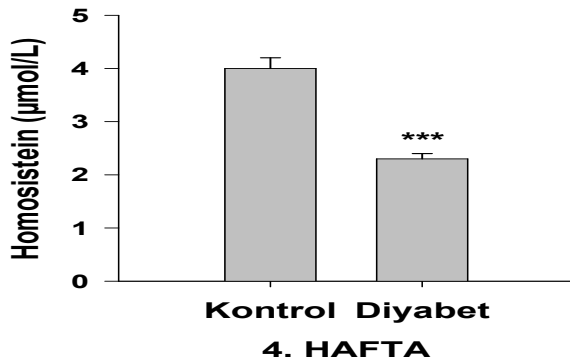
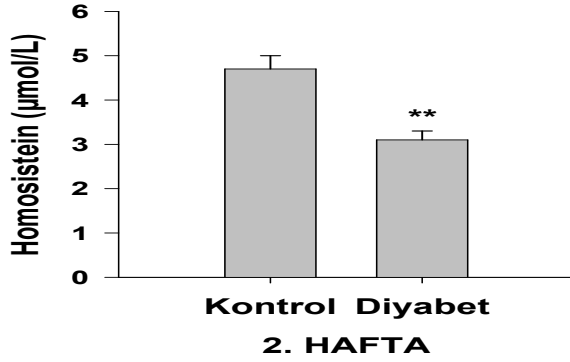
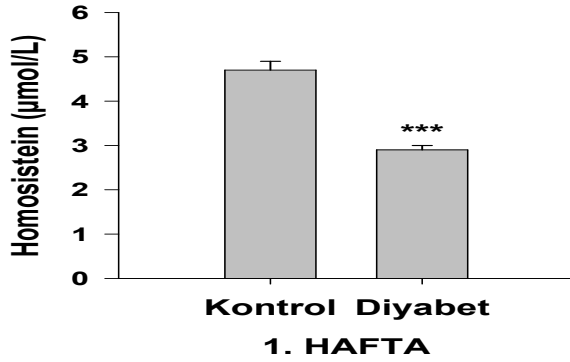
Şekil 11’de görüldüğü gibi diyabetli sıçanlarda serum betain düzeyleri tedrici bir yükselme göstermiş ve 4. hafta kontrollere göre %61 oranlarda anlamlı ($p<0.001$) ölçüde yükselmiştir (Şekil 11).



*Şekil 11: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum betain düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde betain düzeyleri ölçüldü. *** $p<0.001$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.*

5.7 Serum Homosistein Düzeyleri

Serum homosistein düzeyleri şekil 12’de görüldüğü üzere diyabetik sıçanlarda kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde düştü. Bu düşüş 1. hafta diyabetli sıçanlarda kontrol grubuna göre %38, ikinci hafta diyabetli sıçanlarda kontrol grubuna göre %34, dördüncü haftada ise diyabetli sıçanlarda kontrol grubuna göre %43 oranında gerçekleşti (Şekil 12).



Şekil 12: Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlarda serum homosistein düzeyi değişimi. Diyabetik ve kontrol grubu sıçanlar 1., 2. ve 4. hafta öldürüldüler ve serum örneklerinde homosistein düzeyleri ölçüldü. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$ kendi kontrolleri ile karşılaştırıldığında.

6.TARTIŞMA

Bu bulgular streptozosin ile deneysel diyabet oluşturulmuş sıçanlarda dolaşımdaki serbest kolin ve kolin içeren bileşiklerinin değiştiğini göstermektedir. Serumdaki serbest kolin düzeyi diyabette yükselirken, fosfokolin ve gliserofosfokolin düzeylerinde düşme gözlenmiştir. Kolinin oksidasyonu ile oluşan betain ise diyabetik sıçanlarda yükselmektedir. Serum homosistein düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu bulunmuştur. Ancak, serum fosfolipidlerine bağlı kolin düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir düzey değişimi saptanmamıştır.

Bu bulgular deneysel diyabet sırasında periferik ve merkezi sinir sisteminde kolinerjik sistemlerle ilgili bazı parametrelerde gözlenen değişikliklerle genel anlamda uygun olup bu bağlamdaki çalışmaları genişletir niteliktedir. Periferik sinir sistemi dikkate alındığında motor sinirler, pre-ganglionik otonomik sinirler ve post-ganglionik parasempatik sinirler sinaptik aşırımda nörotransmitter asetilkolini kullanır ve bu nedenle “kolinerjik” sinirlerdir. Önceki çalışmalarda diyabetik sıçanlarda periferik motor sinirler (105-110), otonomik parasempatik (111-121) ve sempatik (122) sinir sistemi ile sinaptik olaylarda ve fonsiyonlarda çeşitli değişiklikler gözlenmiştir. Streptozosine bağlı deneysel diyabette motor sinirlerde uyarı ile salıverilen asetilkolin “quant” sayısında yarıya yakın (%43 gibi) azalma (106), pre-sinaptik bölgede vezikül sayısında ileri derece kayıp (107,109), post-sinaptik asetilkolin reseptörlerinde azalma (110) ve sinir bölgesi arteriollerinde asetilkoline bağlı genişlemede zayıflama (108) gösterilmiştir. Streptozosine bağlı deneysel diyabette kalp (105,123,124), pankreas (111,114), miyenterik pleksus (121), mide (122), ileum (115,117,118,120), trakea (113,115) ve mesane (116,119) gibi çok çeşitli otonomik-parasempatik bölgelerde ve sempatik (122) kolinerjik fonksiyonlarda bazı ciddi değişimler olduğu bildirilmiştir (105,111-124).

Streptozosin ile deneysel diyabet oluşturulmasını takiben merkezi kolinerjik sistem fonksiyonlarında da değişiklikler bildirilmiştir (125-134). Diyabetik sıçanlarda kan beyin bariyerinden beyine kolin taşınması azalır (126). Streptozosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda birinci ve ikinci haftalarda

striatal ve hipotalamik asetilkolin düzeyleri sınırlı ve geçici şekilde yükselirken (125), striatal beyin dilimlerinden *in vitro* koşullarda potasyumla (25 mM) uyarılmış asetilkolin salıverilmesi baskılanır (127). *In vivo* beyin mikrodializ çalışmaları streptozotosin ile hipotalamik bölgede atropinle uyarılmış asetilkolin salıverilmesinin azaldığını göstermiştir (128). Streptozotosin verilmiş sıçanlarda hipokampusta kolin asetiltransferaz enzim aktivitesi azalırken (130) medulla spinalisteki muskarinik reseptörlerde artar (132). Streptozotosin ile diyabet oluşturulması sonrası merkezi kolinerjik sistemin bellek (134) ve bilişsel işlevlere etkisi zayıflar (130), kan basıncını düzenleyici etkisi güçsüzleşir (125) ve antinosisepsiyona etkisi şiddetlenir (129,131-133).

Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, dolaşımdaki serbest kolin düzeylerinin yükseldiğini göstermektedir. Dolaşımdaki kolin düzeyi dolaşıma devamlı olarak giren ve çıkan kolin miktarına bağlı olarak değişir. Bu nedenle diyabetli sıçanlarda artmış kolin düzeyi dolaşıma giren kolin düzeyindeki yükselme ya da dolaşımdan uzaklaştırılan kolin de düşme ile bağlantılı olabilir. Dolaşımdaki kolinin bilinen başlıca kaynakları, gıdalar, karaciğerde sentezlenen kolin bileşikleri, asetilkolin ya da membran fosfolipidlerinden hidrolize olmuş kolindir. Bizim çalışmalarımızda sıçanların gece gıda alımları serbest tutulmuş ve sabah saat 09.00 sıralarında gıdaları alınarak 6 saat kadar gıdadan uzak tutulduktan sonra öldürülmüşlerdir. Öğleden sonraki kan kolin düzeylerinde gıdalardan gelen kolinin hala etkisi devam ediyor olabilir. Açlıkta kan kolin düzeyi erişkin sıçanlarda 10 μ M civarında tutulmaktadır (135-137). Dolayısıyla 6 saatlik gıdasız bırakılmış olma tam açlık düzeyine geri dönüşü henüz tam sağlamamış olabilir. Nitekim bizim çalışmamızda kontrol sıçanlarda serbest kolin düzeyleri 12-18 saatlik açlık sonrası gözlenen (10 μ M kadar) düzeyden biraz daha yüksektir (Şekil 7). Diyabetli sıçanlarda daha da yüksek bulunuşu bu sıçanların yemleri alınmadan önce kontrollere göre daha fazla yem almış olmalarının bir yansıması olabilir. Ancak serbest kolin düzeylerinin yükselmesi, ne fosfolipidlere bağlı kolin düzeylerinde, ne de fosfokolin düzeylerinde bir artış ile beraber seyretmiştir. Eğer gıdalarla alım fazlalığından bir etki olmuş olsaydı gıdalarla daha çok kolin bağlı kolin halinde, fosfolipid olarak, alındığı için serbest kolin artışının fosfolipid artışı ile beraber olması beklenirdi. Ayrıca oral yolla alınan

serbest kolinin hızla fosfokoline dönüştüğü ve kolin verilmesini takiben dolaşımda serbest kolinle beraber (85) fosfokolinin de arttığı gösterilmiştir (138-141). Dolayısıyla eğer artmış kolinin tek kaynağı diyabetli sıçanların daha fazla yem yemiş olmaları ile bağlantılı ise serbest kolin ile beraber fosfokolinin de artmış olması beklenirdi. Oysa çalışmamızda serbest kolin artışı (Şekil 7) genel olarak fosfokolin düzeyinde bir artma ile değil tersine azalma ile beraber seyretmiştir (Şekil 9). Bu bulgulardan dolayı diyabetli sıçanlarda gözlenen yüksek serbest kolin düzeyi tek başına daha fazla gıda alımı ile açıklanamaz.

Dolaşımda diyabetli sıçanlarda gözlenen serbest kolin artışı kolin içeren fosfolipidlerin, (fosfatidilkolin, sfingomyelin ve lizofosfatidilkolin gibi) yıkımının artması ile olmuş olabilir. Ancak bu olasılıkta pek geçerli gibi görünmemektedir. Her şeyden önce serum fosfolipidlere bağlı kolin düzeylerinde bir azalma yoktur. Ayrıca fosfolipid yıkımı ile oluşan diğer bir kolin içeren ara bileşik α -gliserofosfokolindir. Eğer serbest kolinin yükselmesi kolin içeren serum fosfolipidlerinin yıkımının artması sonucu gerçekleşmiş ise, yıkım ürünü α -gliserofosfokolinin de serbest kolin ile beraber biraz yükselmesi beklenir. Oysa çalışmamızda serum α -gliserofosfokolin düzeyi artmamış, tersine azalmış ya da azalma eğilimi göstermiştir (Şekil 10).

Dolaşımdaki kolin karaciğer ve böbrekler tarafından metabolize edilir ve dokularca alınarak membran fosfolipidlerine, nörotransmitter asetilkoline ve betaine dönüştürülür. Dolayısıyla diyabetli sıçanlarda gözlenen yüksek serbest kolin, metabolizmanın yavaşlamasından ve dokularca kolinin dolaşımdan alınmasının azalmasından olabilir. Kolinin oksidasyon ile betaine dönüşmesi ve fosforilasyon ile fosfokoline dönüşmesi büyük oranda karaciğer ve böbreklerde gerçekleşir. Diyabete bağlı karaciğer ve böbreklerde sınırlı fonksiyon bozulması kolin metabolizmasına yansımış olabilir. Nitekim dolaşımda serbest kolin düzeylerinin yükselmesi ile beraber fosfokolin (Şekil 9) düzeylerinde gözlenen düşüşler kolinin karaciğerde fosforilasyon ile fosfokoline dönüşmesinin yavaşladığını işaret etmektedir. Dolaşımdaki betain düzeylerinin değişmemesi (1. ve 2. haftalarda) ya da yükselmiş olması (4. hafta) ise, tersine kolinin oksidasyonla betaine dönüşmesinin azalmadığını göstermektedir.

Deneysel olarak streptozotosin ile diyabetik yapılmış sıçanlarda plazma betain düzeyleri ile ilgili, bizim bilgilerimize göre, daha önce yapılmış bir çalışma yoktur. İnsanlarda yapılmış çalışmalarda ise, idrarla betain atılmasında artma olduğu (142,143) ama plazma düzeylerinin diyabetle değişmediği bildirilmiştir (142,143). İnsanlardaki çalışmalarda idrarla atılmanın hiperglisemi ve HbA1c ile ilişkili olduğu ileri sürülmüş ise de (143) koyunlarda yapılan bir çalışmada idrarla atılma ile hiperglisemi arasında ilişki bulunamamıştır (144). Biz bu tez çalışmamızda streptozotosin verilmiş sıçanlarda serum betain düzeyinde 4. haftada ileri derece ve anlamlı bir yükselme gözledik (Şekil 11). Dolaşımdaki betainin kaynağı gıdalardır ve insanlarda gıda ile alınan miktara göre kandaki betain düzeyleri değişmektedir (145,146). Bu nedenle diyabetli sıçanlarda fazla gıda alınmasına bağlı olarak kandaki betain düzeyleri yükselmiş olabilir. Betain serbest kolinin iki basamaklı oksidasyonu ile oluşur. İlk basamakta kolin, kolin oksidaz ile betain aldehite takibinde 2. basamakta betaine dönüşür (147). Sıçanlarda serbest kolin artışına bağlı olarak bu yolla oluşan betain de artmış ve bu serum betain düzeyine yükselme ile yansımış olabilir. Dolaşımdaki betain çeşitli dokular tarafından aktif olarak alınır (147). Betain ayrıca metil metabolizmasına girer ve betaine-homosistein *S*-metiltransferaz enzimi etkisi ile homosistenin metionine dönüşmesinde metil verici olarak davranır (147). Betain tedavisi dolaşımdaki homosistenin düzeyini düşürür. Sıçanlarda betainin bu yolla kullanılması azalmış ve betain yükselmiş olabilir. Ancak bizim çalışmamızda serum homosistein düzeyleri de düşmüş olduğundan gözlenen betain yükselmesinin bu metabolizma yolunun yavaşlamasından kaynaklandığını söylemek mümkün değildir. Bu görüşle uyumlu olarak yakın zaman önce betaine-homosistein *S*-metiltransferaz enzimi aktivitesinin streptozotosin verilmiş sıçanlarda 3-4 kat yükseldiği gösterilmiştir (148). Bu bulgular beraberce ele alındığında idrarla atılmanın ve metil verici olarak kullanımın yükselmesine karşın serum betain düzeyinde yükselme görülmesi, serbest kolinin betaine dönüşümü ya da gıdalarla betain alımının artmış olması ile açıklanabilir.

Diyabetik sıçanlarda serum homosistein düzeyinde gözlenen düşüş (Şekil 12) önceki çalışmalarla (148-151) uyumludur. Homosistein düzeyindeki streptozotosin ile gözlenen düşüşün insulin tedavisi ile düzeldiği gösterilmiştir

(149,151). Homosistein düzeylerindeki düşüşler karaciğerde sistationin β -sentaz ve sistationin γ -lizaz aktivitelerinde artışlarla beraber bulunmuş (148,149) ve homosistein düşüşünün karaciğerde transsülfürasyon yolu ile homosisteinin sistationin ve sisteine dönüşmesinin hızlanmasına bağlı olabileceği telkin edilmiştir (148,149). Önceki bazı çalışmalarda gösterilememiş olmakla beraber (149,152), son zamanda yapılan bu çalışmalarda streptozotosin verilmiş sıçanlarda karaciğerde betaine-homosistein *S*-metiltransferaz aktivitesinin de arttığı (149,153,154) ve betainden metil gurubu aktarımı ile homosisteinin metionine dönüşüm yolunun hızlandığı bildirilmiştir (148). Bizim çalışmamızda da betaine-homosistein *S*-metiltransferaz yolu için gerekli betainin dolaşımdaki düzeyi yüksek bulunmuştur (Şekil 11). Önceki çalışmalarla beraberce ele alındığında serum homosistein düşüşünün bu aminoasitin re-metilasyonla metionine ve transsülfürasyon yolu ile sistationin ve sisteine dönüşmesinin hızlanmasına bağlı olabileceği ileri sürülebilir.

Diyabetik sıçanlarda serum serbest kolin düzeylerindeki artışın etkileri neler olabilir? 30 yıla yakındır yapılmış çalışmalardan biriken deliller kolin elde edilebilirliğinin kolinerjik nöronlarda (motor sinirler, parasempatik kolinerjik nöronlar, sempatik pre-ganglionik nöronlarda ve merkez sinir sistemindeki) nörotransmitter asetilkolin sentez ve salıverilmesini uyardığını (25,76,77,82,83,90) ve kolinerjik sinapslarda kolinerjik aşırımı arttırdığını göstermektedir (84,88). Bu tez çalışmasında kolinerjik sistemle ilgili fonksiyonel sonuçlar incelenmemiş olmakla beraber, dolaşımda serbest kolin artışının periferik ve merkezi kolinerjik sinirlerde asetilkolin sentez ve salıverilmesini ve kolinerjik transmisyonu arttırması beklenir. Ancak periferik motor ve otonomik kolinerjik sinapslarda pre-sinaptik bölgede asetilkolin depolayan vezikül sayısında ileri derece kayıp (107,109), post-sinaptik asetilkolin reseptörlerinde sayısal azalma (110) ya da fonksiyonel bozulmalar (105,111-124), dolaşımda kolin artışının yol açabileceği etkileri önlemiş ya da maskeleymiş olabilir. Merkez sinir sisteminde koline bağlı etkiler için de bu olasılık geçerlidir. Bilinmektedir ki dolaşımdan beyine ve beyinden sistemik dolaşıma kolin geçişi arteryel kandaki serbest kolin düzeyi ile çok yakından ilişkilidir. Dolaşımdaki serbest kolin düzeyi 14-16 μ M kadar olduğunda iki yöne doğru (beyine doğru ve beyinden sistemik

dolaşıma doğru) kolin hareketi dengede olup, bu konsantrasyonun altındaki düzeylerde beyinden kolin kaybı arttarken üstündeki düzeylerde beyine net kolin girişi olmaktadır (136,137). Bizim çalışmamızda belirlenen kolin düzeyleri ile diyabetik sıçanlarda beyine kolin girişinin artmış olması beklenir. Ancak streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda kan beyin bariyerinden kolin geçişinin azaldığı bilinmektedir (126). Bu nedenle serumdaki düzey yükselmesine karşın, yine de beyine net kolin geçişi azalmış olabilir. Diyabetik sıçanlardaki merkezi kolinerjik sistem fonksiyonlarında belirlenen bozulmalar [asetilkolin salıverilmesinin azalması (127,128), bellek (134) ve bilişsel fonksiyon azalması (130), kan basıncı (125) ve ağrı algılanmasına etkinin zayıflaması (129,131-133) gibi] bu olasılığı desteklemektedir.

Özet olarak; bu tez çalışmasında ilk defa olarak dolaşımdaki kolin durumu serbest kolin, çeşitli kolin bileşikleri (kolin içeren fosfolipidler, gliserofosfokolin ve fosfokolin) ve kolin metabolizması ile bağlantılı betain ve homosistein düzeyleri ölçümü yoluyla sıçanlarda belirlenmiştir. Bulgularımız dolaşımdaki kolin bileşiklerin deneysel diyabette değiştiğini göstermektedir. Bu değişikliklerin kolin ile bağlantılı temel fonksiyonlara yansıyor yansımadığı ve diyabet komplikasyonlarındaki olası rolleri sonraki çalışmaların konusudur.

KAYNAKLAR

- 1- Katzung B.G.: Pancreatic hormones and antidiabetic drugs. In: Basic and Clinical Pharmacology. 7th Ed., Stanford, Connecticut, p. 684-685, 1998.
- 2- Rodrigues B., Poucheret P., Battell M.L., McNeill J.H.: Streptozocin-induced diabetes : induction, mechanish(s) and dose dependency. In: Experimental Models of Diabetes. Ed. McNeill J.H. CRC Press LLC, Boca Raton., Flo., p.3-4, 1999.
- 3- Bailey C.J.: Potential new treatment for type-2 diabetes. *Trends Pharmacol Sci.*, **21(7)**:259-265, 2000.
- 4- Corbett J.A.: K cells: a novel target for insülin gene therapy for the prevention of diabetes. *Trends Endpcrinol Metab.*, **12(4)**:140-142, 2001.
- 5- Accili D.: New perspectives in diabetes research and treatment. *Trends Endocrinol Metab.*, **11(9)**:349-350, 2000.
- 6- Greenberg R.A., Sacks D.B.: Screening for diabetes: is it warranted? *Clin Chim Acta.*, **315(1-2)**:61-69, 2002.
- 7- Öztürk Y.: Neden şeker hastalığı? Neden deneysel diyabet modelleri? *TFD Bülteni*, **55**:18-19, 1999.
- 8- Mirouze J.: Insulin treatment: a non-stop revolution. *Diabetologia.*, **25(3)**: 209-221, 1983.

- 9- Björk S.: The cost of diabetes and diabetes care. *Diabetes Res Clin Pract.*, **54 Suppl 1**:13-18, 2001.
- 10- Javitt JC, Chiang YP.: Economic impact of diabetes. In: Diabetes in America. Ed. National Diabetes Data Group, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, NIH Publication No. 95-1468, 2nd Ed., Bethesda, MD, p. 601-611, 1995.
- 11- Pal S.: "Silent" diabetes affects 5.4 million, *US Pharmacist.*, **25(11)**, 2000.
<URL <http://www.uspharmacist.com> >
- 12- American Diabetes Association (A.D.A.): Screening for type-2 diabetes. *Diabetes Care.*, **27 Suppl. 1**:11-14, 2004.
- 13- Blusztajn J.K.: Choline, a vital amine. *Science.*, **281**:794-795, 1998.
- 14- Loffelholz K., Klein J., Koppen A.: Choline, a precursor of acetylcholine and phospholipids in the brain. *Prog Brain Res.*, **98**:197-200, 1993.
- 15- Fischer L.M., Scearce J.A., Mar M.H., Patel J.R., Blanchard R.T., Macintosh B.A., Busby M.G., Zeisel S.H.: Ad libitum choline intake in healthy individuals meets or exceeds the proposed adequate intake level. *J Nutr.*, **135(4)**:826-9, 2005.
- 16- Blusztajn J.K., Wurtman R.J.: Choline and cholinergic neurons. *Science.*, **221(4611)**:614-620, 1983.

- 17- Wurtman R.J.:Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *Trends Neurosci.*, **15(4)**:117-122, 1992.
- 18- Arslan B.Y., Ulus I.H., Savci V., Kiran B.K.: Effects of intracerebroventricular injected choline on cardiovascular functions and sympathoadrenal activity. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **17(5)**:814-821, 1991.
- 19- Ulus I.H., Arslan B.Y., Savci V., Kiran B.K.: Restoration of blood pressure by choline treatment in rats made hypotensive by hemorrhage. *Br J Pharmacol.*, **116(2)**:1911-1917, 1995.
- 20- Gurun M.S., Savci V., Ulus I.H.: Intracerebroventricular choline reverses hypotension induced by acute chemical sympathectomy. *J Auton Pharmacol.*, **17(3)**:155-163, 1997.
- 21- Savci V., Gurun M.S., Ulus I.H., Kiran B.K.: Intracerebroventricular injection choline increases plasma oxytocin levels in conscious rats. *Brain Res.*, **709(1)**:97-102, 1996.
- 22- Savci V., Goktalay G., Ulus I.H.: Intracerebroventricular choline increases plasma vasopressin and augments plasma vasopressin response to osmotic stimulation and hemorrhage. *Brain Res.*, **942(1-2)**:58-70, 2002.
- 23- Unal C.B., Demiral Y., Ulus I.H.: The effects of choline on body temperature in conscious rats. *Eur J Pharmacol.*, **363(2-3)**:121-126, 1998.

- 24- Gurun M.S., Ilcol Y.O., Taga Y., Ulus I.H.: Hyperglycemia induced by intracerebroventricular choline: involvement of the sympatho-adrenal system. *Eur J Pharmacol.*, **438(3)**:197-205, 2002.
- 25- Ilcol Y.O., Gurun M.S., Taga Y., Ulus I.H.: Choline increases serum insulin in rat when injected intraperitoneally and augments basal and stimulated acetylcholine release from the rat minced pancreas in vitro. *Eur J Biochem.*, **270(5)**:991-999, 2002.
- 26- Ilcol Y.O., Gurun M.S., Taga Y., Ulus I.H.: Intraperitoneal administration of choline increases serum glucose in rat: involvement of the sympathoadrenal system. *Horm Metab Res.*, **34(6)**:341-347, 2002.
- 27- Williams G., Pickup J.C.: Handbook of diabetes. 2nd Ed. Blackwell Science, Oxford, p.6-7, 1999
- 28- Manchester K.L.: Before insulin. *Trends Endocrinol Metab.*, **8**:295-298, 1997.
- 29- Luft R.: Oscar minkowski: discovery of the pancreatic origin of diabetes, 1889. *Diabetologia.*, **32(7)**:399-401, 1989.
- 30- Anonymous (2000). The nobel prize in physiology or medicine 1923. <URL <http://www.nobel.se/medicine/laureates/1923/>>
- 31- Altan V.M., Yıldızoğlu-Arı N., Öztürk Y.: İnsülin, oral hipoglisemik ilaçlar, glukagon ve somatostatin. farmakoloji ders kitabı. Ed. Bökesoy T.A., Çakıcı İ., Melli M. Gazi Kitapevi, Ankara, s. 366, 2000

- 32- Orci L., Vassalli J.D., Perrelet A.: The insulin factory. *Sci Amer.*, **259(3)**:85-94, 1988.
- 33- Guyton A.C., Hall, J.E.: İnsülin, glukagon ve diabetes mellitus. İn: Textbook of Medical Physiology (Tıbbi Fizyoloji), Çev. Çavuşoğlu H., Yeğen B.Ç., Aydın Z., Alican İ., 10th Ed., Nobel Tıp Kitapevi, s. 884-897, 2000.
- 34- Ganong W.F.: Endocrine function of the pancreas and regulation of carbohydrate metabolism. In: Review Of Medical Phisiology. 19th Ed., Appleton and Lange, Stanford, Connecticut, s. 318-340, 1999.
- 35- Flier J.S.: İnsülin receptors and insulin resistance. *Annu Rev Med.*, **34**:145-60, 1983.
- 36- Gale E.A.: The discovery of type-1 diabetes. *Diabetes.*, **50(2)**:217-226, 2001.
- 37- American Diabetes Association (A.D.A.): Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. *Diabetes Care.*, **25**:213-229, 2002.
- 38- American Diabetes Association (A.D.A.): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.*, **23 Suppl. 1**: 4-19, 2000.
- 39- WHO Study Group: Diabetes mellitus, Technical Report Series 727. Geneva: World Health Organization, 1985.
- 40- Salans L.B.: Diabetes mellitus, a disease that is coming into focus. *JAMA.*, **247(5)**:590-594, 1982.

- 41- Williams G.: Management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet.*, **343(8889)**:95-100, 1994.
- 42- Beck-Nielsen H., Henriksen JE, Vaag A, Hother-Nielsen O.: Pathophysiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Res Clin Pract.*, **28Suppl. 1**:13-25, 1995.
- 43- Scobie I.N.: Acute complications of diabetes an atlas of diabetes mellitus, The Parthenon publishing, Newyork, p.22-29, 1998.
- 44- Bienia R.: Ripoll I. diabetic ketoacidosis. *JAMA.*, **241(5)**:510-511, 1979.
- 45- Öztürk Y., Altan V.M., Yıldızoğlu-Arı N.: Effect of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.*, **48(1)**:69-112, 1996.
- 46- Ward J.D.: Diabetic neuropathy. *Br Med Bull.*, **45(1)**:111-126, 1989.
- 47- Mc Culloch D.K., Young R.J., Prescott R. J., Campbell I.W., Clarke B.F.: The natural history of impotence in diabetic men. *Diabetologia.*, **26(6)**:437-440, 1984.
- 48- Feingold K.R., Funk J.L.: Disorders of the endocrine pancreas. In: Pathophysiology of Disease. An Introduction to Clinical Medicine. Ed. McPhee S.J., Lingappa V.R., Ganong W.F., Lange J.D., Appleton and Lange, New York. 3rd Ed., p.454, 2000.

- 49- Irlbeck M., Zimmer H.G.: Functional responses of the left and right heart of diabetic rats to α - and β - adrenergic receptor stimulation. *Diabetes Res Clin Pract.*, **31 Suppl. 1**: 79-86, 1996.
- 50- Ramanadham S., Tenner T.E.: Chronic effects of streptozotocin diabetes on myocardial sensitivity in the rat. *Diabetologia.*, **29(10)**:741-748, 1986.
- 51- Savarese J.J., Berkowitz B.A.: β -adrenergic receptor decrease in diabetic rat hearts. *Life Sci.*, **25(24-25)**: 2075-2078, 1979.
- 52- Karasu Ç., Öztürk Y., Altan N., Yıldızoğlu-Arı N., İkizler C., Altan V.M.: Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol.*, **21(5)**:735-740, 1990.
- 53- Williams R.S., Schaible T.F., Scheuer J., Kennedy R.: Effects of experimental diabetes on adrenergic and cholinergic receptors of rat myocardium. *Diabetes.*, **32(10)**:881-886, 1983.
- 54- Sundaresan P.R., Sharma V.K., Gingold S.I., Banerjee S.P.: Decreased β -adrenargic receptor in rat heart in streptozotocin-induced diabetes: role of thyroid hormones. *Endocrinology.*, **114(4)**:1358-1363, 1984.
- 55- Özüarı A., Öztürk Y., Yıldızoğlu-Arı N., Özçelikay A.T., Altan V.M.: The effects of glyburide and insulin on the cardiac performance in rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Gen Pharmacol.*, **24(1)**:165-169, 1993.

- 56- Öztürk Y., Yıldızoğlu-Arı N., Altan V.M., Özçelikay A.T.: Effect of insulin on the decreased β -adrenergic responses of duodenum and atrium isolated from streptozotocin diabetic rat. *Gen Pharmacol.*, **24(1)**:217-223, 1993.
- 57- Özçelikay A.T., Yıldızoğlu-Arı N., Özüarı A., Öztürk Y., Altan V.M.: Effect of vanadate on alloxan-diabetic rat atria. *Diabetes Res Clin Pract.*, **19(3)**:189-194, 1993.
- 58- McNeil J.H., Tahiliani A.G.: Diabetes-induced cardiac changes. *Trends Pharmacol Sci.*, **7**:364-367, 1986.
- 59- Lafçı-Erol D., Altan V.M., Öztürk Y.: Increase α -adrenergic responsiveness of alloxan diabetic rat atria: effects insulin therapy and thyroidectomy. *Gen Pharmacol.*, **25(3)**:559-564, 1994.
- 60- Gür S., Öztürk Y.: The negative inotropic effect of adenosine in left atria of insulin-dependent diabetic, non-insulin-dependent diabetic and hypothyroid rats. *Drug Dev Res.*, **31**:275, 1994.
- 61- Gür S., Ari N., Öztürk Y.: Increased responses to adenosine in isolated left atria from streptozocin-diabetic rats: evidence for the involvement of hypothyroidism. *J Cardiovasc Pharmacol.*, **29**:174-179, 1997.
- 62- De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Van De Voorde J., Lameire N.H., Vanhoutte P.M.: Endothelial dysfunction in diabetes. *Br J Pharmacol.*, **130(5)**:963-974, 2000.

- 63- Faraci, F.M., Heistad D.D.: Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev.*, **78(1)**:53-97, 1998.
- 64- Kostraba J.N., Klein R., Dorman J.S., Becker D.J., Drash A.L., Maser R.E., Orchard T.J.: The epidemiology of diabetes complications study. IV. correlates of diabetic background and proliferative retinopathy. *Am J Epidemiol.*, **133(4)**:381-391, 1991.
- 65- Longhurst P.A., Kauer J., Levin R.M.: The ability of insulin treatment to reverse or prevent the changes in urinary bladder function caused by streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Gen Pharmacol.*, **22(1)**:305-311, 1991.
- 66- Barger J.A., Bollman J.L., Kepler E.J.: The "diarrhea of diabetes" and steatorrhea of pancreatic insufficiency. *Proc Mayo Clin.*, **11**:737-742, 1936.
- 67- Sheridan E.P., Bailey C.C.: Diabetic nocturnal diarrhea. *J Am Med Assoc.*, **130**:632-634, 1946.
- 68- Malins J.M., French J.M.: diabetic diarrhoea. *Q J Med.*, **26(104)**:467-480, 1957.
- 69- Mc Nally E.F., Reinhard A. E., Schwartz P. E.: Small bowel motility in diabetics. *Am J Dig Dis.*, **14(3)**:163-169, 1969.
- 70- Scarpello J.H., Hague R.V., Cullen D.R., Sladen G.E.: The ¹⁴C-glycocholate test in diabetic diarrhea. *Br Med J.*, **2(6037)**:673-675, 1976.

- 71- Whalen G.E., Soergel K.H., Geenen J.E.: Diabetic diarrhea: A clinical and pathophysiological study. *Gastroenterology*, **56(6)**:1021-1032, 1969.
- 72- Keshavarzian A., Iber F.L.: Intestinal transit in insulin-requiring diabetics. *Am J Gastroenterol.*, **81(4)**:257-260, 1986.
- 73- Özçelikay A.T., Altan V.M., Yıldızoğlu-Arı N., Altinkurt O. Onur F., Öztürk Y.: Basal and histamine-induced gastric acid secretion in alloxan diabetic rats. *Gen Pharmacol.*, **24(1)**:121-126, 1993.
- 74- Özçelikay A.T., Altinkurt O., Öztürk Y., Yıldızoğlu-Arı N., Altan V.M.: Biostatistical modeling of the effect of intravenous histamine-infusion on the rat gastric acid secretion. *J Pharmacol Methods.*, **24(3)**:241-250, 1990.
- 75- Öztürk Y., Özçelikay A.T., Altan V.M., Altinkurt O.: Linear modeling of the effect of intravenous histamine infusion on rat gastric acid secretion: a biostatistical evaluation by splitting the time-effect curves. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.*, **13(7)**:463-469, 1991.
- 76- Cohen E.L., Wurtman R.J.: (1975) Brain acetylcholine: increase after systemic choline administration. *Life Sci.*, **16(7)**:1095-1102, 1975.
- 77- Büyükuysal R.L., Ulus I.H., Aydın S., Kıran B.K.: 3,4-Diaminopyridine and choline increase in vivo acetylcholine release in rat striatum. *Eur J Pharmacol.*, **281(2)**:179-185, 1995.
- 78- Okuda T., Haga T.: Functional characterization of the human high-affinity choline transporter. *FEBS Lett.*, **484(2)**:92-97, 2000.

- 79- Ruch G.A., Koelle G.B., Sanville U.J.: Autoradiographic demonstration of the sodium-dependent high-affinity choline uptake system. *Proc Natl Acad Sci. USA*, **79(8)**:2714-2716, 1982.
- 80- Lockman P.R., Allen D.D.: The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm.*, **28(7)**:749-771, 2002.
- 81- Allen D.D., Lockman P.R.: The blood-brain barrier choline transporter as a brain drug delivery vector. *Life Sci.*, **73(13)**:1609-1615, 2003.
- 82- Cohen E.L., Wurtman R.J.: Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science.*, **191(4227)**:561-562, 1976.
- 83- Maire J.C.E., Wurtman R.J.: Effects of electrical stimulation and choline availability on the release and contents of acetylcholine and choline in superfused slices from rat striatum. *J Physiol. (Paris)*, **80(3)**:189-195, 1985.
- 84- Ulus I.H., Wurtman R.J.: Choline administration: activation of tyrosine hydroxylase in dopaminergic neurons of rat brain. *Science.*, **194(4269)**:1060-1061, 1976.
- 85- Ulus I.H., Hirsch M.J., Wurtman R.J.: Trans-synaptic induction of adrenomedullary tyrosine hydroxylase activity by choline: evidence that choline administration can increase cholinergic transmission. *Proc Natl Acad Sci. U S A*, **74(2)**:798-800, 1977.

- 86- Scally M.C., Ulus I.H., Wurtman R.J.: Choline administration to the rat increases urinary catecholamines. *J Neural Transm.*, **43(2)**:103-112, 1978.
- 87- Ulus I.H., Wurtman R.J.: Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stimuli. *J Physiol.*, **293**:513-523, 1979.
- 88- Ulus I.H., Scally M.C., Wurtman R.J.: Enhancement by choline of the induction of adrenal tyrosine hydroxylase by phenoxybenzamine, 6-hydroxydopamine, insulin or exposure to cold. *J Pharmacol Exp Ther.*, **204(3)**:676-682, 1978.
- 89- Klein J.: Membrane breakdown in acute and chronic neurodegeneration: focus on choline-containing phospholipids. *J Neural Transm.*, **107(8-9)**:1027-1063, 2000.
- 90- Ulus I.H., Wurtman R.J., Mauron C., Blusztajn J.K.: Choline increases acetylcholine release and protects against the stimulation-induced decrease in phosphatide levels within membranes of rat corpus striatum. *Brain Res.*, **484(1-2)**:217-227, 1989.
- 91- Yen C.E., Mar M.H., Zeisel S.H.: Choline deficiency-induced apoptosis in PC12 cells is associated with diminished membrane phosphatidylcholine and sphingomyelin, accumulation of ceramide and diacylglycerol, and activation of a caspase. *FASEB J.*, **13(1)**:135-142, 1999.
- 92- Sterin-Borda L., Gimeno M., Borda E., Del Castillo E., Gimeno A.L.: Prostacyclin (PGI₂) and U-46619 stimulate coronary arteries from diabetic dogs and their action is influenced by inhibitors of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins.*, **22(2)**:267-278, 1981.

- 93- Lithell H., Berne C.: Diabetogenic drugs. In pharmacology of diabetes: Present Practice and Future Perspectives, *Pharmacology of Diabetes: Present Practice and Future Perspectives*'de (Ed. C.E.Mogansen, E. Standl), Vol.3, s. 57-74, Walter de Gruyter, Berlin, 1991.
- 94- Bailey C.: Alloxan diabetes. *Vitamins & Hormones*, **7**:365-382, 1949.
- 95- Bonner-Weir S., Trent D.F., Honey R.N., Weir G.C.: Responses of neonatal rat islets to streptozotocin: limited B-cell regeneration and hyperglycemia. *Diabetes.*, **30(1)**: 64-69, 1981.
- 96- Altan V.M., Karasu Ç., Özüarı A.: The effects of type-1 and type-2 diabetes on endothelium-dependent relaxation in rat aorta. *Pharmacol Biochem Behav.*, **33(3)**:519-522, 1989.
- 97- Nakhoda A.F., Like A.A., Chappel C.I., Murray F.T., Marliss E.B.: The spontaneously diabetic wistar rat. Metabolic and morphologic studies. *Diabetes.*, **26(2)**:100-112, 1977.
- 98- Hummel K.P., Dickie M.M., Coleman D.L.: Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science.*, **153(740)**:1127-1128, 1966.
- 99- Barrett-Connor E.: Is insulin-dependent diabetes mellitus caused by coxsackievirus B infection? A review of the epidemiologic evidence. *Rev Infect Dis.*, **7(2)**:207-215, 1985.

- 100- Awata T., Sogo S., Yamamoto Y.: Effects of aldose reductase inhibitor, CT-112, on sugar alcohol accumulation in corneal epithelium of galactose-fed rats. *Jpn J Ophthalmol.*, **30(3)**:245-250, 1986.
- 101- Snyder L.R., Glacjch J.L., Kirkland J.J.: Practical HPLC method development, John Wiley & Sons, ISBN 0-471-62782-8, 1-15, 1998.
- 102- Ilcol Y.O., Ozbek R., Hamurtekin E., Ulus I.H.: Choline status in newborns, infants, children, breast-feeding women, breast-fed infants and human breast milk. *J Nutr Biochem.*, **16(8)**:489-99, 2005.
- 103- Murai S., Saito H., Shirato R., Kawaguchi T.: An improved method for assaying phosphocholine and glycerophosphocholine in mouse tissue. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, **46(2)**:103-9, 2001.
- 104- Klein J., Gonzalez R., Koppen A., Loffelholz K.: Free choline and choline metabolites in rat brain and body fluids: sensitive determination and implications for choline supply to the brain. *Neurochem Int.*, **22(3)**:293-300, 1993.
- 105- Vadlamudi R.V., McNeill J.H.: Effect of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart responsiveness to carbachol. *J Pharmacol Exp Ther.*, **225(2)**:410-415, 1983.
- 106- Constantini S., Schiller Y., Cohen A.M., Rahamimoff R.: Pathophysiology of the neuromuscular junction in diabetic rats. *Isr J Med Sci.*, **23(1-2)**:101-106, 1987.

- 107- Fahim M.A., el-Sabban F., Davidson N.: Muscle contractility decrement and correlated morphology during the pathogenesis of streptozotocin-diabetic mice. *Anat Rec.*, **251(2)**:240-244, 1998.
- 108- Terata K., Coppey L.J., Davidson E.P., Dunlap J.A., Gutterman D.D., Yorek M.A.: Acetylcholine-induced arteriolar dilation is reduced in streptozotocin-induced diabetic rats with motor nerve dysfunction. *Br J Pharmacol.*, **128(3)**:837-843, 1999.
- 109- Fahim M.A., Hasan M.Y., Alshuaib W.B.: Early morphological remodeling of neuromuscular junction in a murine model of diabetes. *J Appl Physiol.*, **89(6)**:2235-2240, 2000.
- 110- Marques M.J., Santo Neto H.: Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of non-obese diabetic mice. *Anat Rec.*, **267(2)**:112-119, 2002.
- 111- Ahren B., Stern J.S., Gingerich R.L., Curry D.L., Havel P.J.: Glucagon secretory response to hypoglycaemia, adrenaline and carbachol in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Physiol Scand.*, **155(2)**:215-221, 1995.
- 112- Takahashi T., Kojima Y., Tsunoda Y., Beyer L.A., Kamijo M., Sima A.A., Owyang C.: Impaired intracellular signal transduction in gastric smooth muscle of diabetic BB/W rats. *Am J Physiol.*, **270(3 Pt 1)**:G411-417, 1996.
- 113- Ozdem S.S., Sadan G., Usta C., Tasatargil A.: The effect of experimental diabetes on cholinergic neurotransmission in rat trachea: role of nitric oxide. *Eur J Pharmacol.*, **17;387(3)**:321-327, 2000.

- 114- Adeghate E., Ponery A.S., Pallot D.J., Singh J.: Distribution of neurotransmitters and their effects on glucagon secretion from the in vitro normal and diabetic pancreatic tissues. *Tissue Cell.*, **32(3)**:266-274, 2000.
- 115- Coulson F.R., Jacoby D.B., Fryer A.D.: Increased function of inhibitory neuronal M₂ muscarinic receptors in trachea and ileum of diabetic rats. *Br J Pharmacol.*, **135(6)**:1355-1362, 2002.
- 116- Tong Y.C., Cheng J.T., Wan W.C.: Effects of Ba-Wei-Die-Huang-Wan on the cholinergic function and protein expression of M₂ muscarinic receptor of the urinary bladder in diabetic rats. *Neurosci Lett.*, **330(1)**:21-24, 2002.
- 117- Talubmook C., Forrest A., Parsons M.: Streptozotocin-induced diabetes modulates presynaptic and postsynaptic function in the rat ileum. *Eur J Pharmacol.*, **469(1-3)**:153-158, 2003.
- 118- Unno T., Kwon S.C., Okamoto H., Irie Y., Kato Y., Matsuyama H., Komori S.: Receptor signaling mechanisms underlying muscarinic agonist-evoked contraction in guinea-pig ileal longitudinal smooth muscle. *Br J Pharmacol.*, **139(2)**:337-350, 2003.
- 119- Benko R., Lazar Z., Porszasz R., Somogyi G.T., Bartho L.: Effect of experimental diabetes on cholinergic, purinergic and peptidergic motor responses of the isolated rat bladder to electrical field stimulation or capsaicin. *Eur J Pharmacol.*, **478(1)**:73-80, 2003.
- 120- Coulson F.R., Jacoby D.B., Fryer A.D.: Insulin regulates neuronal M₂ muscarinic receptor function in the ileum of diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, **308(2)**:760-766, 2004.

- 121- LePard K.J.: Choline acetyltransferase and inducible nitric oxide synthase are increased in myenteric plexus of diabetic guinea pig. *Auton Neurosci.*, **118(1-2)**:12-24, 2005.
- 122- Pestell R.G., Kirsner R.L., Best J.D.: Validation and evaluation of test for sympathetic cholinergic function in diabetes mellitus. *Diabetes.*, **40(7)**:867-872, 1991.
- 123- Lund D.D., Subieta A.R., Pardini B.J., Chang K.S.: Alterations in cardiac parasympathetic indices in STZ-induced diabetic rats. *Diabetes.*, **41(2)**:160-166, 1992.
- 124- Rani M.A., Venkataraman B.V., Jaiprakash R., Andrade C.: Effect of felodipine on myocardial function and cholinergic responses in short term streptozotocin diabetes in rats. *Indian J Exp Biol.*, **32(9)**:629-632, 1994.
- 125- Squadrito F., Trimarchi G.R., Lupica S., Magri V., Costa G., Brezenoff H.E., Caputi A.P.: Cerebral cholinergic control of rat arterial blood pressure in streptozotocin-induced diabetes. *Pharmacol Res Commun.*, **18(10)**:951-965, 1986.
- 126- Mooradian A.D.: Blood-brain barrier choline transport is reduced in diabetic rats. *Diabetes.*, **36(10)**:1094-1097, 1987.
- 127- Welsh B., Wecker L.: Effects of streptozotocin-induced diabetes on acetylcholine metabolism in rat brain. *Neurochem Res.*, **16(4)**:453-460, 1991.

- 128- Murzi E., Rada P., Puig de Parada M., Parada M.A., Valecillos B., Tilac C.A., Hernandez L.: Atropine decreases drinking but not feeding and induces less hypothalamic acetylcholine release in diabetic rats. *Brain Res.*, **752(1-2)**:184-188, 1997.
- 129- Bannon A.W., Decker M.W., Kim D.J., Campbell J.E., Arneric S.P.: ABT-594, a novel cholinergic channel modulator, is efficacious in nerve ligation and diabetic neuropathy models of neuropathic pain. *Brain Res.*, **801(1-2)**:158-163, 1998.
- 130- Prickaerts J., Fahrig T., Blokland A.: Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis. *Behav Brain Res.*, **102(1-2)**:73-88, 1999.
- 131- Chen S.R., Khan G.M., Pan H.L.: Antiallodynic effect of intrathecal neostigmine is mediated by spinal nitric oxide in a rat model of diabetic neuropathic pain. *Anesthesiology.*, **95(4)**:1007-1012, 2001.
- 132- Chen S.R., Pan H.L.: Up-regulation of spinal muscarinic receptors and increased antinociceptive effect of intrathecal muscarine in diabetic rats. *J Pharmacol Exp Ther.*, **307(2)**:676-681, 2003.
- 133- Koga K., Honda K., Ando S., Harasawa I., Kamiya H.O., Takano Y.: Intrathecal clonidine inhibits mechanical allodynia via activation of the spinal muscarinic M₁ receptor in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol.*, **505(1-3)**:75-82, 2004.

- 134- Sonkusare S., Srinivasan K., Kaul C., Ramarao P.: Effect of donepezil and lercanidipine on memory impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats. *Life Sci.*, **77(1)**:1-14, 2005.
- 135- Ulus I.H., Millington W.R., Buyukuysal R.L., Kiran B.K.: Choline as an agonist: determination of its agonistic potency on cholinergic receptors. *Biochem Pharmacol.*, **37(14)**:2747-2755, 1988.
- 136- Klein J., Koppen A., Loffelholz K., Schmitthenner J.: Uptake and metabolism of choline by rat brain after acute choline administration. *J Neurochem.*, **58(3)**:870-876, 1992.
- 137- Klein J., Koppen A., Loffelholz K.: Regulation of free choline in rat brain: dietary and pharmacological manipulations. *Neurochem Int.*, **32(5-6)**:479-485, 1998.
- 138- Millington W.R., Wurtman R.J.: Choline administration elevates brain phosphorylcholine concentrations. *J Neurochem.*, **38(6)**:1748-1752, 1982.
- 139- Savci V., Wurtman R.J.: Effect of cytidine on membrane phospholipid synthesis in rat striatal slices. *J Neurochem.*, **64(1)**:378-384, 1995.
- 140- Lopez-Coviella I., Agut J., Savci V., Ortiz J.A., Wurtman R.J.: Evidence that 5'-cytidinediphosphocholine can affect brain phospholipid composition by increasing choline and cytidine plasma levels. *J Neurochem.*, **65(2)**:889-894, 1995.

- 141- Farber S.A., Savci V., Wei A., Slack B.E., Wurtman R.J.: Choline's phosphorylation in rat striatal slices is regulated by the activity of cholinergic neurons. *Brain Res.*, **723(1-2)**:90-99, 1996.
- 142- Lever M., Sizeland P.C., Bason L.M., Hayman C.M., Robson R.A., Chambers S.T.: Abnormal glycine betaine content of the blood and urine of diabetic and renal patients. *Clin Chim Acta.*, **230(1)**:69-79, 1994.
- 143- Dellow W.J., Chambers S.T., Lever M., Lunt H., Robson R.A.: Elevated glycine betaine excretion in diabetes mellitus patients is associated with proximal tubular dysfunction and hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract.*, **43(2)**:91-99, 1999.
- 144- Dellow W.J., Chambers S.T., Barrell G.K., Lever M., Robson R.A.: Glycine betaine excretion is not directly linked to plasma glucose concentrations in hyperglycaemia. *Diabetes Res Clin Pract.*, **52(3)**:165-169, 2001.
- 145- Lever M., Sizeland P.C., Frampton C.M., Chambers S.T.: Short and long-term variation of plasma glycine betaine concentrations in humans. *Clin Biochem.*, **37(3)**:184-190, 2004.
- 146- Zeisel S.H., Mar M.H., Howe J.C., Holden J.M.: Concentrations of choline-containing compounds and betaine in common foods. *J Nutr.*, **133(5)**:1302-1307, 2003.
- 147- Slow S., Lever M., Lee M.B., George P.M., Chambers S.T.: Betaine analogues alter homocysteine metabolism in rats. *Int J Biochem Cell Biol.*, **36(5)**:870-880, 2004.

- 148- Nieman K.M., Rowling M.J., Garrow T.A., Schalinske K.L.: Modulation of methyl group metabolism by streptozotocin-induced diabetes and all-trans-retinoic acid. *J Biol Chem.*, **279(44)**:45708-45712, 2004.
- 149- Jacobs R.L., House J.D., Brosnan M.E., Brosnan J.T.: Effects of streptozotocin-induced diabetes and of insulin treatment on homocysteine metabolism in the rat. *Diabetes.*, **47(12)**:1967-1970, 1998.
- 150- Unlucerci Y., Bekpinar S., Gurdol F., Seferoglu G.: A study on the relationship between homocysteine and diabetic nephropathy in rats. *Pharmacol Res.*, **45(3)**:249-252, 2002.
- 151- Gursu M.F., Baydas G., Cikim G., Canatan H.: Insulin increases homocysteine levels in a dose-dependent manner in diabetic rats. *Arch Med Res.*, **33(3)**:305-307, 2002.
- 152- Jacobs R.L., Stead L.M., Brosnan M.E., Brosnan J.T.: Hyperglucagonemia in rats results in decreased plasma homocysteine and increased flux through the transsulfuration pathway in liver. *J Biol Chem.*, **276(47)**:43740-43747, 2001.
- 153- Ratnam S., Wijekoon E.P., Hall B., Garrow T.A., Brosnan M.E., Brosnan J.T.: Effects of diabetes and insulin on betaine-homocysteine S-methyltransferase expression in rat liver. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, **290(5)**:E933-E939, 2005.
- 154- Wijekoon E.P., Hall B., Ratnam S., Brosnan M.E., Zeisel S.H., Brosnan J.T.: Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats. *Diabetes.*, **54(11)**:3245-3251, 2005.