

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**NORMAL VE HİPERKOLESTEROLEMİK TAVŞANLARA  
VİTAMİN D İLAVESİNİN TAS, TOS, MDA VE PARAOKSONAZ  
DÜZEYLERİNE ETKİLERİ**

RAHİM KOCABAŞ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof.Dr.MEHMET AKÖZ

KONYA - 2016

## BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 07/04/2016

Öğrenci: **RAHİM KOCABAS**

İmzası



## TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **RAHİM KOCABAŞ**'ın “**Normal ve Hiperkolesterolemik Tavşanlara Vitamin D İlavesinin TAS, TOS, MDA ve Paraoksonaz Düzeylerine Etkileri**” başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.  
Konya 07.04.2016

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mehmet AKÖZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyokimya AD.

İmzası



Jüri Üyesi

Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU

Gazi Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya

A.D.

İmzası



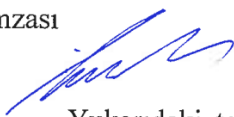
Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr. İbrahim KILINÇ

N.E.Ü.Meram Tıp Fak. Tıbbi

Biyokimya A.D.

İmzası



Jüri Üyesi

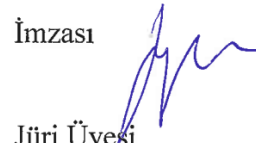
Doç.Dr.F.Hümeyra YERLİKAYA

AYDEMİR

N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Tıbbi

Biyokimya A.D.

İmzası



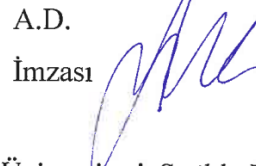
Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr.Seher TANIDIK

Karatay Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya

A.D.

İmzası



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05.05.2016 ve 10/01 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

## APPROVAL

We certify that we have read this dissertation and that in our opinion it is fully adequate, in scope and qualify, as dissertation for the degree Doctor of Philosophy.

Konya 07.04. 2016

Principal Advisor

Prof. Dr. Mehmet AKÖZ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Biyokimya AD.

Signature

Examination Committee Member  
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU  
Gazi Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya A.D.

Examination Committee Member  
Doç.Dr.F.Hümeyra YERLİKAYA  
AYDEMİR

Examination Committee Member  
N.E.Ü. Meram Tıp Fak. Tıbbi  
Biyokimya A.D.  
Yrd.Doç.Dr. İbrahim KILINÇ  
N.E.Ü.Meram Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya  
A.D.

Examination Committee Member  
Yrd.Doç.Dr.Seher TANIDIK  
Karatay Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya  
A.D.

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan institute of Health Sciences.

Prof.Dr.K.Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

## TEŞEKKÜR

Biyokimya;

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim dalında (A.D.) doktora eğitimim süresince bizlere desteğini esirgemeyen Biyokimya A.D.'deki tüm öğretim üyeleri hocalarıma ve tüm biyokimya çalışanlarına teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Yrd.Doç.Dr.İbrahim KILINÇ' hocama, A.D. başkanımız Prof.Dr.Mehmet GÜRBİLEK hocama ve her zaman yanımda olan, beni maddi ve manevi olarak destekleyen danışmanım Prof.Dr.Mehmet AKÖZ hocama teşekkür ederim.

Ailem;

Doktora eğitimime başladıktan kısa bir süre sonra kansere yakalanan ve üç yıl sonra aramızdan ayrılan sevgili ablama, yine ablamın acısına dayanamayıp aramızdan ayrılan sevgili babama, her zaman yanımda olan anneme, eşime ve kızlarıma teşekkür ederim.

Rahim KOCABAŞ

Bu tez çalışması; NEÜ - BAP - 2013 - 131418001 nolu proje ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri komisyonu başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

<i>Beyanat</i> .....	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfasi</i> .....	<i>ii</i>
<i>Approval</i> .....	<i>iii</i>
<i>Teşekkür</i> .....	<i>iv</i>
<i>İçindekiler</i> .....	<i>v</i>
<i>Şekiller Listesi</i> .....	<i>x</i>
<i>Tablolar Listesi</i> .....	<i>xi</i>
<i>Özet</i> .....	<i>xii</i>
<i>Abstract</i> .....	<i>xiv</i>
<b>1. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Kolesterol</i> .....	3
2.1.1. <i>Kolesterol, Steroitler ve İzoprenoitlerin Biyosentezi</i> .....	3
2.1.2. <i>Kolesterol Asetil-KoA'dan Dört Aşamada Sentezlenir</i> .....	4
2.1.3. <i>Steroid Hormonların Yan Zincir Kırılması ve Kolesterol Oksidasyonuyla Oluşumu</i> .....	22
2.1.4. <i>Kolesterol Biyosentezindeki Ara Ürünlerin Akıbetleri</i> .....	24
2.2. <i>D Vitamini</i> .....	26
2.2.1. <i>D vitamininin Görevleri</i> .....	32
2.2.2. <i>Güncel Yönleriyle D vitamininin Hastalıklarla İlişkisi</i> .....	38
2.3. <i>Serbest Radikaller</i> .....	39
2.3.1. <i>Reaktif Oksijen Türleri</i> .....	41
2.3.2. <i>Serbest Radikallerin Etkileri</i> .....	43
2.3.4. <i>Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları</i> .....	45

2.4. Antioksidan Sistem .....	46
2.4.1. Hücre İçi Enzimatik Antioksidan Savunma .....	46
2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar.....	48
2.4.2.1. Metabolik Antioksidanlar, .....	48
2.4.2.2. Besinsel Antioksidanlar .....	50
2.5. Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye ve OSI Hesabı .....	51
2.6. Paraoksonaz .....	52
<b>3. GEREÇ YÖNTEM .....</b>	<b>56</b>
3.1. Deney Hayvanlarının ve Yemlerinin Hazırlanması.....	56
3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması.....	56
3.1.2. Hiperkolesterolemi Modeli.....	58
3.1.3. Tavşan Standart Pelet Yemi ve Kolesterolü Yemin Hazırlanması .....	58
3.2. Ölçümler ve Yöntem .....	59
3.2.1. Kullanılan Ekipmanlar .....	59
3.2.2. Doku Homojenatlarının Hazırlanması.....	59
3.2.3. Total Antioksidan Seviye (TAS).....	59
3.2.4. Total Oksidan Seviye (TOS) .....	60
3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) .....	61
3.2.6. Malondialdehid Ölçümü (MDA) .....	61
3.2.7. Paraoksonaz I(PON-1).....	62
3.2.8. D Vitamini Ölçümü.....	63
3.2.9. Total Kolesterol, HDL-C, LDL-C, Trigliserit, Kalsiyum Ölçümü.....	65
3.3. İstatistik Değerlendirme .....	65
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>66</b>
4.1. Çalışma Süresince Takipleri Yapılan Parametrelerin Grafikleri. ....	75
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>78</b>
5.1. Vücut Ağırlıkları Değerleri .....	78
5.2. Lipid Paneli Değerleri.....	78
5.3. D Vitamini ve Kalsiyum Değerleri .....	87
5.4. TAS, TOS, OSI ve MDA Değerleri .....	89
5.5. PON- 1 Değerleri .....	95

<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>99</b>
<b>7. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>107</b>



## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

**A.D.** : Anabilim dalı.

**ABC** (*ATP-binding cassette*): ATP bağlayıcı kaset.

**ABCA1** (*ATP-binding cassette transporter A1*): ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı A1.

**ABCG1** (*ATP-binding cassette transporter G1*): ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G1.

**ABCG5** (*ATP-binding cassette transporter G5*): ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G5.

**ABCG8** (*ATP-binding cassette transporter G8*): ATP bağlayıcı kaset taşıyıcı G8.

**ACAT** (*Acyl-CoA cholesterol acyl transferase*): Açıl-KoA-kolesterol açıl transferaz.

**AGEs** (*Advanced glycation end products*): İleri glikasyon son ürünleri.

**ARE** (*Arilesterase*): Arilesteraz.

**C** (Cysteine): Sistein.

**CAT**(*Catalase*): Katalaz.

**CYP3A** (*Cytochrome P450, family 3, subfamily A*): Sitokrom P450, 3, alt A.

**ER** (*Endoplasmic reticulum*): Endoplazmik retikulum.

**ESI** (*Elektrosray ionization*): Elektrosray iyonizasyonu.

**G** (*Glutamine*): Glutamin.

**HC** (*High cholesterol*): % 0.5'lik kolesterol grubu.

**HC+VitD** (*High cholesterol and vitamin D*): % 0.5'lik Kolesterol ve D vitamini grubu.

**HDL-C** (*HDL-cholesterol*): HDL-kolesterol.

**HMG-KoA** ( *$\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaril-CoA*):  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilglutaril-KoA.

**hs-CRP** (*High sensitive C-reaktive protein*): Yüksek duyarlılık C-reaktif protein.

**IU** (*International unit*): İnternasyonal ünite.

**L** (*Leucine*): Lösin.

**LCA** (*Lithocholic acid*): Litokolik asit.

**LCAT** (*Lecithin cholesterol acyl transferase*): Lesitin kolesterol açıl transferaz.

**LC-MS/MS** (*Liquid chromatography - Mass spectrometry / Mass spectrometry*): Sıvı Kromatografisi - Kütle spektrometresi / Kütle spektrometresi.

**LDL-C** (*LDL-cholesterol*): LDL-kolesterol.

**LXR** (*Liver x receptor*): Karaciğer x reseptörü.

**LXRs** (*Liver x receptors*): Karaciğer x reseptörleri.

**LXR $\alpha$**  (*Liver x receptor  $\alpha$* ): Karaciğer x reseptörü  $\alpha$ .

**LXR $\beta$**  (*Liver x receptor  $\beta$* ): Karaciğer x reseptörü  $\beta$ .

**M** (*Methionine*): Metiyonin.

**MDA** (*Malondialdehyde*): Malondialdehid.

**OSI** (*Oxidative stress index*): Oksidatif stres indeksi.

**OWA** (*One way anova*): Tek yönlü varyans analizi.

**PCR** (*Polymerase chain reaction*): Polimeraz zincir reaksiyonu.

**PON-1** (*Paraoxonase-1*): Paraoksonaz-1.

**PON-2** (*Paraoxonase-2*): Paraoksonaz-2.

**PON-3** (*Paraoxonase-3*): Paraoksonaz-3.

**PTH** (*Parathyroid hormone*): Paratiroid hormonu.

**PUFA** (*Polyunsaturated fatty acids*): Çoklu doymamış yağ asitleri.

**Q** (*Arginine*): Arginin.

**RMA** (*Repeated measures anova*): Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi.

**RNS** (*Reactive nitrogen species*): Reaktif nitrojen türleri.

**ROS** (*Reactive oxygen species*): Reaktif oksijen türleri.

**RXR** (*Retinoid x receptor*): Retinoid x reseptörü.

**SCAP** (*SREBP cleavage activating protein*): SREBP kırılma etkinleştirici proteini.

**SOD** (*Superoxide dismutase*): Süperoksit dismutaz.

**SREBP2** (*Sterol regulatory element binding protein 2*): Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2.

**SREBPs** (*Sterol regulatory element binding proteins*): Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler.

**TAS** (*Total antioxidant status*): Total antioksidan seviye.

**TG** (*Triglyceride*): Trigliserit.

**TOS** (*Total oxidant status*): Total oksidan seviye.

**VDR** (*Vitamin D receptor*): D vitamini reseptörü.

**VitD** (*Vitamin D*): D vitamini grubu.

**VLDL** (*Very low density lipoprotein*): Çok düşük yoğunluklu lipoprotein.

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: İzopren yapısı.....	3
Şekil 2.2: Kolesteroldeki karbonların kaynakları.....	4
Şekil 2.3: Mevalonat ara ürünü oluşumu. ....	4
Şekil 2.4: Kolesterol sentez özeti. ....	6
Şekil 2.5: Mevalonatin aktif izopren birimlerine dönüşümü. ....	6
Şekil 2.6: Skualenin oluşumu.....	7
Şekil 2.7: Kolesterolün birkaç akıbeti vardır. ....	9
Şekil 2.8: Omurgalılarda besinsel lipidlerin sindirimi, emilimi, taşınması, depolanması ve enerji kaynağı olarak kullanılması. ....	10
Şekil 2.9: Kolesteril esterinin sentezi.....	11
Şekil 2.10: D vitamini üretimi ve metabolizması.....	11
Şekil 2.11: Lipoproteinler. ....	12
Şekil 2.12: Bir şilomikronun molekül yapısı. ....	14
Şekil 2.13: Lipoproteinler ve lipid taşınması. ....	15
Şekil 2.14: Lesitin kolesterol açıl transferaz tarafından katalizlenen tepkime.....	16
Şekil 2.15: Kolesterolün reseptör endeksli endositozla hücre içine alınması. ....	18
Şekil 2.16: Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin aktifleşmesi. ....	20
Şekil 2.17: Ökaryotik proteazomun üç boyutlu yapısı.....	20
Şekil 2.18: Diyetle alınan ve sentezle oluşturulan kolesterol arasındaki dengenin düzenlenmesi. ....	21
Şekil 2.19: Kolesterolde türetilen bazı steroid hormonlar. ....	23
Şekil 2.20: Steroid hormonların sentezinde yan zincir kırılması. ....	25
Şekil 2.21: İzoprenoid biyosentezinin genel görünümü.....	26
Şekil 2.22: Glutatyon redoks sistemi. ....	49
Şekil 2.23: Paraoksonaz 1'in yapısı.....	54
Şekil 2.24: HDL-C'nin olgunlaşması ve paraoksonaz ile ilişkisi.....	55

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1: İnsan plazma lipoproteinlerinin ana sınıfları. ....	12
Tablo 2.2: İnsan plazma lipoproteinlerinin apolipoproteinleri. ....	13
Tablo 2.3: Reaktif oksijen ve azot türleri. ....	41
Tablo 3.1: Grupların tablo şeklinde gösterimi. ....	57
Tablo 3.2: Standart tavşan yem içeriği. ....	58
Tablo 4.1: Tüm gruplarda, ağırlık ve lipid paneli parametre bulgularının 0. ile 8.haftaya göre grup içi ve gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	67
Tablo 4.2: Tüm gruplarda, ağırlık ve lipid paneli parametre bulgularının 0. ile 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	68
Tablo 4.3: Tüm gruplarda, serum kalsiyum ve plazma D vitamini bulgularının 0. ile 8.haftaya göre grup içi ve gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	70
Tablo 4.4: Tüm gruplarda, serum kalsiyum ve plazma D vitamini bulgularının 0. ile 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	71
Tablo 4.5: Tüm gruplarda, çalışma sonu serum ve karaciğer bulgularının 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	72
Tablo 4.6: Tüm gruplarda, çalışma sonu serum ve karaciğer bulgularının gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. ....	73

## ÖZET

Çalışmamızda normal ve hiperkolesterolemik erkek tavşanlara D vitamini ilavesinin total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS), malondialdehid (MDA), ve paraoksonaz-1 (PON-1) değerleri üzerine etkilerini araştırmak amaçlandı.

Hayvanlar rastgele dört gruba ayrıldı. 1. Kontrol (n: 6), 2. D vitamini ilave (VitD) (n: 8), 3. % 0.5 Hiperkolesterolemi+D vitamini (HC+VitD) (n: 8), 4. % 0.5 Hiperkolesterolemili (HC) (n: 8). 1. ve 2. grup normal tavşan pelet yemiyle, 3. ve 4. grup önceden hazırlanmış olan % 0.5'lik kolesterol yemi ile 8 hafta süresince beslenildi. 2. ve 3. gruba oral yoldan günlük D vitamini 300 IU/kg olarak 8 hafta boyunca verildi.

Tüm tavşanlardan deney öncesi ve 2 haftada bir kan örnekleri alındı. 8. haftanın sonunda kan ve karaciğer örnekleri alındı. Total kolesterol, HDL-kolesterol (HDL-C), LDL-kolesterol (LDL-C), trigliserit (TG), kalsiyum ve 25OH D vitamini seviyeleri alınan kanlardan bakıldı. TAS, TOS, MDA ve PON-1 ölçümleri ise hem alınan kanlardan hem de karaciğer dokularından çalışıldı.

HC+VitD grubuna göre; HC grubu serum total kolesterol seviyesi ortalamasındaki artış gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). D vitamini grubu HDL-C seviyesi ortalaması grup içi karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). HC+VitD grubuna göre; HC grubu serum OSI seviyesi ortalamasındaki artış gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Serum PON-1 aktivite değerleri HC+VitD grubuna göre; HC grubu serum PON-1 aktivite değerleri ortalamasındaki azalış gruplar arası karşılaştırıldığında anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ).

Sonuç olarak bizim çalışmamızda D vitamini takviyesi yaptığımız erkek tavşanların total kolesterol, HDL-C (Bağımlı değişken), serum OSI seviyelerinde kontrollerine göre anlamlı bir azalış görüldü. Günümüzde D vitamininin ilave olarak alınması çok fazla artmıştır. Doğal yollarla alabildiğimiz D vitaminini, ilave almak gerektiğinde; günlük alınan miktarına, süresine, yaşa, cinsiyete göre dikkat etmek gerektiği düşüncesindeyiz. Çalışmamızda D vitamini her ne kadar OSI ve total kolesterolü azaltsada, aynı zamanda HDL-C ve PON-1 değerlerini de azaltmış

olduğu görüldüğünden alınan miktarın fazlalığına ve süresine göre faydalı olacağı yerde zararlı etkileri ile karşılaşılabilineceği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** D vitamini, hiperkolesterolemi, oksidatif stres, paraoksonaz – 1, tavşan.

## ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of vitamin D supplementation on total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS), malondialdehyde (MDA), and paraoxonase-1 (PON-1) in values in healthy and hypercholesterolemic male rabbits.

Animals were divided into four groups, randomly: 1. Control (n: 6); 2. Vitamin D (VitD) supplementation (n: 8); 3. 0.5 % hypercholesterolemic+Vitamin D (HC+VitD) (n: 8); 4. 0.5 % hypercholesterolemic (HC) (n: 8). Through 8 weeks, while 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> groups were fed with normal rabbit pellets, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> groups were fed with previously prepared 0.5 % cholesterol feeds. During this process, 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> groups were orally administered with 300 IU/kg vitamin D for each day.

Blood samples were collected just before the experiment and 2 weeks periods from all rabbits. End of the 8 weeks, blood and liver samples were collected. Total cholesterol, HDL-cholesterol (HDL-C), LDL-cholesterol (LDL-C) triglyceride (TG), calcium and 25OHD vitamin levels were measured from collected blood samples. TAS, TOS, MDA and PON-1 were measured from both blood samples and liver tissues.

With respect to HC+VitD group; increase in serum total cholesterol levels of HC group is statistically significant ( $p < 0.05$ ) when compared between the groups. HDL-C levels of VitD groups are statistically significant ( $p < 0.05$ ) within the groups. Increase in serum OSI levels of HC group is statistically significant ( $p < 0.05$ ), when compared between the groups with respect to HC+VitD group. Decrease in HC groups serum PON-1 activity is statistically significant ( $p < 0.05$ ) with respect to HC+VitD group, when it is analysed between the groups.

As a conclusion, in our study, it was observed that there was a significant decrease in total cholesterol, HDL-C (dependent variable), serum OSI levels of vitamin D supplemented male rabbits with respect to control group. Nowadays, vitamin D supplementation is increased excessively. Although it can be obtained from natural sources, we suggest that daily dosage, take up period, age and sex should be considered, when vitamin D supplementation is needed. In our study, although administration of vitamin D decreased the OSI and cholesterol levels, it also decreased HDL-C and PON-1 in values at the same time, therefore, we agreed on

that it can show detrimental effects where it can be beneficial based on its dosage and period.

**Keywords:** hypercholesterolemia, oxidative stress, paraoxonase - 1, rabbit, vitamin D.



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yüksek kolesterol seviyeleri canlı organizmasında zararlı olabilirdesede kolesterolün birçok önemli görevleri vardır. Bu görevleri myelin kılıfların etrafını sarmaktan tutunda D vitamini sentezine kadar uzanan pek çok önemli işlevler ve hayati fonksiyonlardır. Bununla birlikte gelişmiş ve ekonomisi yüksek toplumlarda kardiyovasküler hastalıkların oluşma nedenlerinden biri olan, dislipidemiye neden olmaktadır. Ne yazık ki her yıl dünyada kalp krizinden kaynaklanan ölümler, enfeksiyon hastalıklarından ve kanserden daha ön sırada gelmektedir (Al - Asmari ve ark. 2015).

D vitamini eskiden sadece kalsiyum metabolizması üzerine etkili olarak bilinirdi. Günümüzde ise; bağışıklık sistemimizi güçlendirmesi ile birlikte bazı kanser türlerini önlediğine dair pek çok araştırma söz konusudur. D vitamini, dünyamızın hayat kaynağı olan güneş vasıtası ile derimizde sentezlenerek doğal olarak oluşur. Toplumların gelişmesi ile birlikte iç ortamlarda çalışma artmakta, bunun sonucunda da D vitamini eksiklikleri görülmektedir. Dünyada ise D vitamini eksikliğini pandemi oluşturduğu görüldüğünden D vitamini önem kazanmaktadır. D vitamini üzerine yapılan araştırmalarda da belirtildiği gibi; DNA üzerinde 200 den fazla bölgeye bağlandığı belirtilmekte ve bu nedenle, D vitamini seviyemizi ideal seviyede tutmanın kaliteli bir yaşam için gerekli olduğu düşünülmektedir (Calton ve ark. 2015).

Yapılan araştırmalarda diyetle D vitamini ilavesinin lipid paneli üzerine etkisi ile ilgili çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bu durumun ise; D vitamini seviyesini etkileyen cinsiyet faktörü ile birlikte obezite gibi pek çok sebepten kaynaklandığını düşünüyoruz. Biz de çalışmamızda daha randomize olması düşüncesiyle hem normal hem de hiperkolesterolemik erkek tavşanlarda D vitamininin total kolesterol, HDL-kolesterol (HDL-C: *HDL-cholesterol*), LDL-kolesterol (LDL-C: *LDL-cholesterol*), trigliserit (TG: *Triglyceride*) ve kalsiyum seviyelerine etkileri çalışıldı. Böylece ilave D vitamini alımının bireysel etmenlerden kaynaklanan ve/veya lipid paneli seviyeleri farkından kaynaklanan etmenlerin minimize edilmiş olduğu düşüncesindeyiz.

Bütün bunlarla birlikte bu çalışmada diyetle D vitamini ilavesinin total oksidan/antioksidan dengesini nasıl etkileyeceği, lipid peroksidasyonuna karşı koruyuculuğu ve HDL-C ile paraksonaz-1 üzerine olan etkileri araştırıldı.

Bu alışma ile normal ve hiperkolesterolemik erkek tavşanlara D vitamini ilavesinin total antioksidan seviye, total oksidan seviye, malondialdehid ve paraoksonaz-1 seviyeri üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

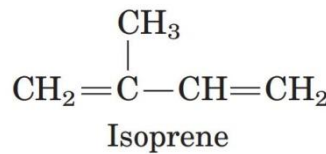
### 2.1. Kolesterol

1815 yılında Fransız kimyacı M.E. CHEVREUL tarafından bulunan kolesterolün yapısının ve biyosentezi şekillerinin açıklanması günümüze kadar devam etmiştir. Chevreul kolesterolü insan safra taşlarının bir bileşeni olarak bulmuş ve “cholesterine” adını vermiştir. 20. yy. başladığında kolesterol izole edilmiş ve kısmen tanımlanmıştır. Ancak yapısı hakkında yeterli bilgi elde edilememiştir. Takip eden yüzyılda kolesterolün yapısı açıklanmış, biyosentez yolları bulunmuş ve kolesterol metabolizmasını düzenleyen mekanizma açıklanmıştır (Vance ve Van den Bosh 2000).

#### 2.1.1. Kolesterol, Steroitler ve İzoprenoitlerin Biyosentezi

Kolesterol şüphesiz en çok tanınan lipiddir, insanda kalp damar hastalıklarının oluşmasıyla kandaki yüksek kolesterol seviyesi arasında güçlü bir bağlantı olmasından dolayı da adı kötüye çıkmıştır. Kolesterolün, hücre zarlarının bir bileşeni olarak, steroid hormonları ve safra asitlerinin öncülü olarak taşıdığı kritik rolün önemi daha az bilinir. Kolesterol, içerisinde insanların da bulunduğu pek çok hayvansal organizma için temel bir molekül olmasına rağmen memeli diyetlerinde bulunması gerekmemektedir. Bunun nedeni de; hemen hemen tüm hücreler onu basit çıkış maddelerini kullanarak sentezleyebilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Kolesterolün 27 karbondan oluşan yapısı karmaşık bir biyosentetik yolu akla getirir, fakat kolesterolün karbon atomlarının tamamı basit bir öncül olan asetattan sağlanır. Asetattan kolesterole giden yoldaki temel ara ürün olan izopren (Şekil: 2.1) birimleri diğer birçok doğal lipidin başlangıç bileşikleri olup, bu yolların tamamında benzer mekanizmalarla polimerleşirler (Nelson ve Cox 2013).

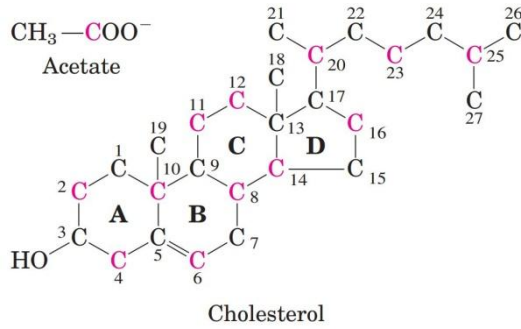


Şekil 2.1: İzopren yapısı.

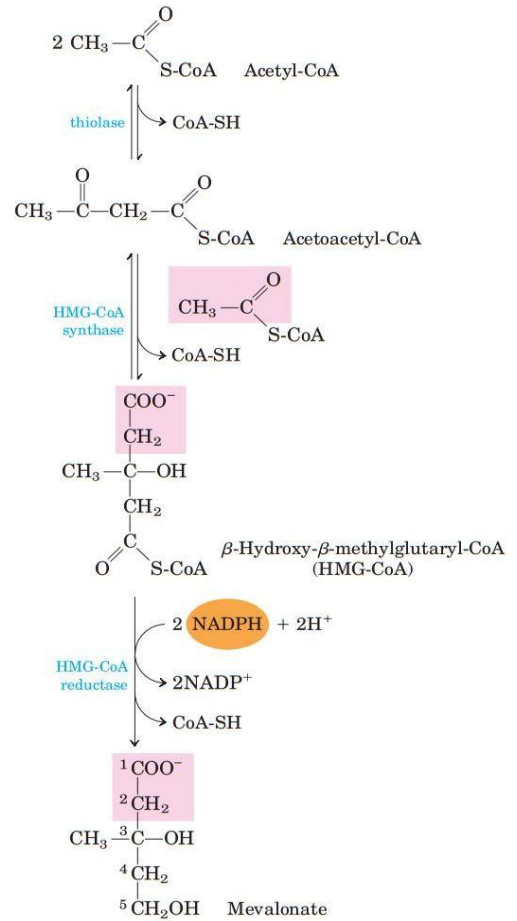
(Nelson ve Cox 2013)

### 2.1.2. Kolesterol Asetil-KoA'dan Dört Aşamada Sentezlenir

Kolesterol de tıpkı uzun zincirli yağ asitleri gibi asetil-KoA'dan yapılır, fakat birleşme planı tamamen farklıdır, ilk araştırmalarda hayvanlar, ya metil karbonu ya da karboksil karbonu  $^{14}\text{C}$  ile işaretlenmiş asetatla beslenmiştir. Hayvanların iki grubundan izole edilen kolesteroldeki (Şekil: 2.2) işaretlemenin deseni kolesterol biyosentezindeki enzimatik adımların çalışma şeklini göstermiştir (Nelson ve Cox 2013).



Şekil 2.2: Kolesteroldeki karbonların kaynakları.  
(Nelson ve Cox 2013)



Şekil 2.3: Mevalonat ara ürünü oluşumu.  
(Nelson ve Cox 2013)

Şekil 2.3'de görüldüğü gibi sentez dört aşamada gerçekleşir:

1- Üç asetat biriminin altı karbonlu bir ara ürün olan mevalonatu vermek üzere birleşmesi.

2- Mevalonatın aktifleşmiş izopren birimlerine dönüşmesi.

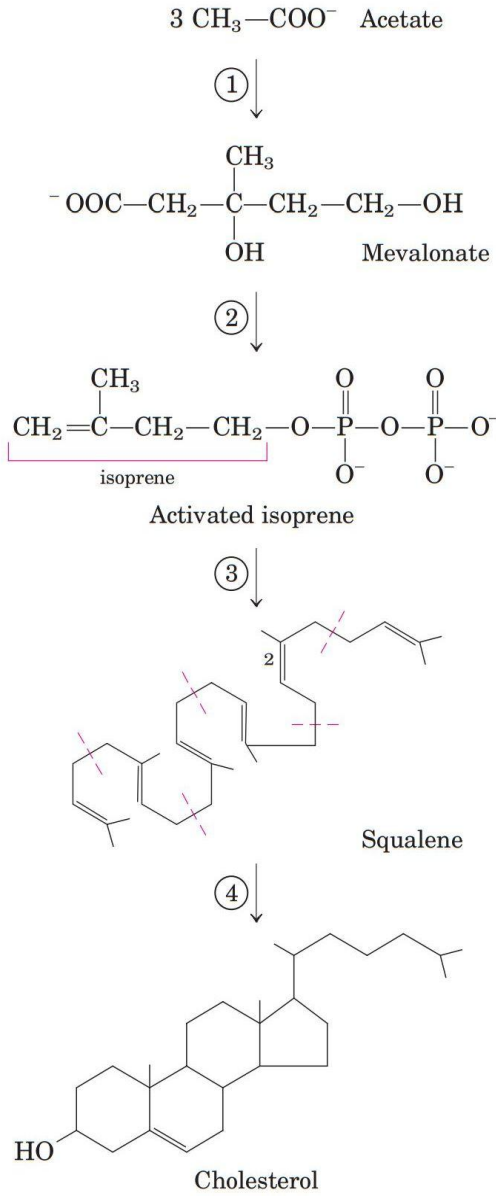
3- Altı tane 5 karbonlu izopren biriminin 30 karbonlu düz zincirli skualeni oluşturmak üzere polimerleşmesi.

4- Skualenin dört tane halkadan oluşan steroid çekirdeğini oluşturmak üzere halkalı yapıya dönüşmesi ve bunu izleyen bir dizi değişiklik (oksidasyonlar, metil gruplarının uzaklaştırılması veya taşınması gibi) sonunda kolesterol üretilir.

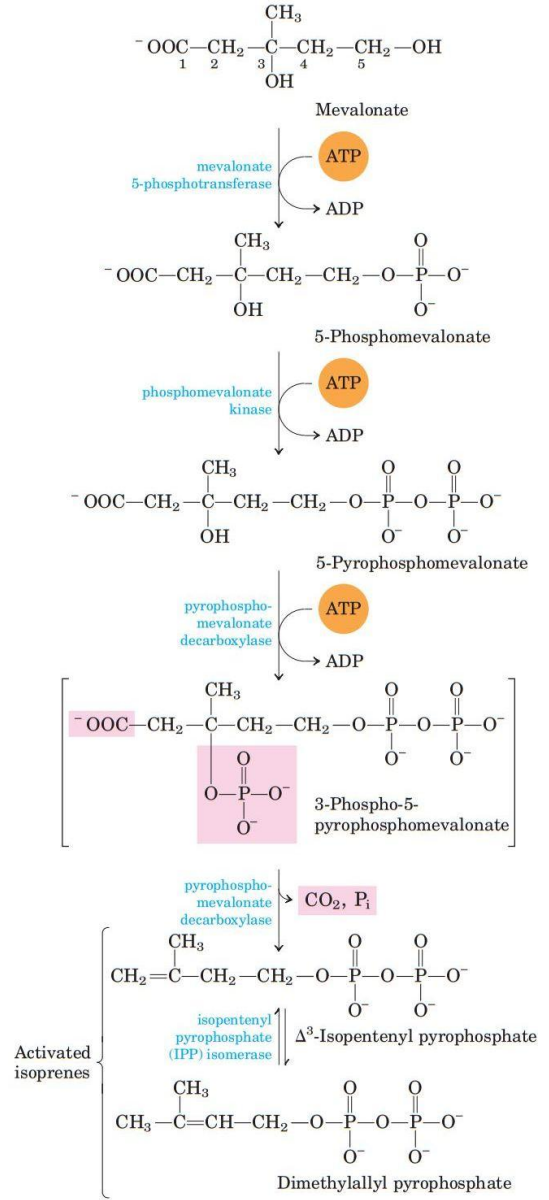
**Basamak (1) Asetattan Mevalonatin Sentezi:** Kolesterol sentezinin birinci basamağında mevalonat ara ürününü oluştur (Şekil: 2.4). Asetil-KoA'nın iki molekülü asetoasetil-KoA vermek üzere birleşir ve daha sonra asetil-KoA'nın üçüncü molekülünün eklenmesiyle altı karbonlu bir bileşik olan  $\beta$ -hidroksi- $\beta$ -metilglutaril-KoA (*HMG-KoA*: $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methyl glutaryl-CoA) oluşur. Buradaki ilk iki tepkime tiyolaz ve HMG-KoA sentaz enzimleri tarafından katalizlenir.

Üçüncü tepkime iki NADPH molekülünün her biri tarafından sağlanan iki elektronla HMG-KoA'nın mevalonata indirgendığı tepkimedir ve aynı zamanda hız belirleyici basamaktır. Düz endoplazmik retikulum (ER: *Endoplasmic reticulum*)'un integral zar proteini olan HMG-KoA redüktaz enzimi kolesterol yolundaki ana düzenleyici noktadır.

**Basamak (2) Mevalonatin İki Adet Aktifleşmiş İzopren Birimine Dönüşmesi:** Kolesterol sentezinin sonraki basamağında, üç ATP molekülünden mevalonata üç fosfat grubu aktarılır (Şekil: 2.5). Fosfat mevalonatin C-3 hidroksil grubuna bağlanarak (iyi bir ayrılan grup olan) 3-fosfo-5-pirofosfomevalonat ara ürününü oluşturur, daha sonraki basamakta hem bu fosfat grubu hem de yakınındaki karboksil grubu ayrılarak çift bağ içeren beş karbonlu bir bileşik olan  $\Delta^3$ -İzopentenilpirofosfatı meydana getirir. Bu kolesterol sentezinin merkezini oluşturan iki aktifleşmiş izopentenilin birincisidir.  $\Delta^3$ -izopentil pirofosfatın ikinci aktifleşmiş izoprenle izomerleşmesi dimetilallil pirofosfat bileşimini oluşturur. Bitki hücrelerinin sitoplazmasında izopentenilpirofosfatın sentezi burada tarif edildiği şekilde gerçekleşir. Bununla birlikte bitki kloroplastları ve bakterilerin çoğu mevalonata bağlı olan yolağı kullanır. Bu alternatif yol hayvanlarda yoktur ve bu nedenle yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi için ilgi çekici bir hedef oluşturmaktadır (Nelson ve Cox 2013).



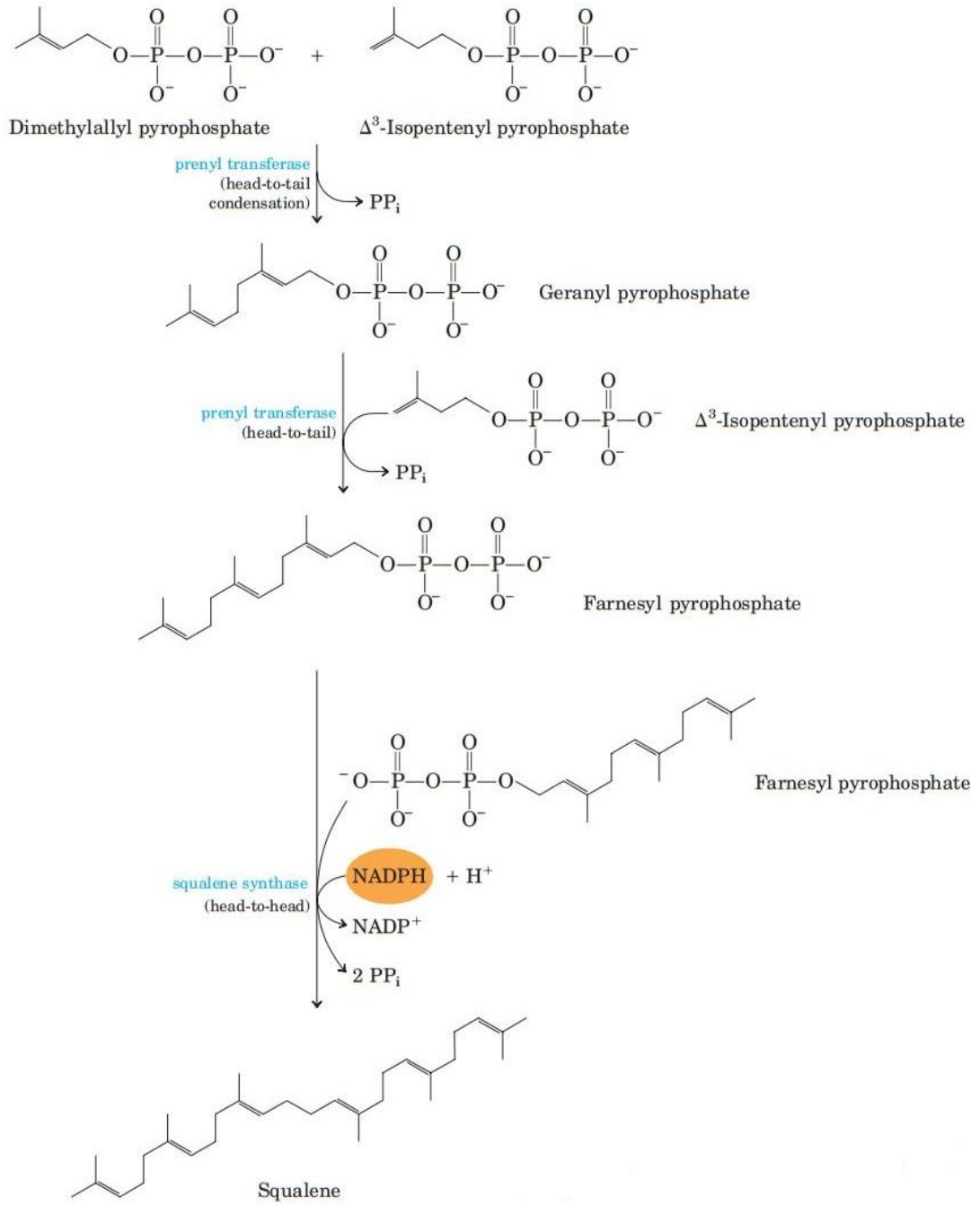
Şekil 2.4: Kolesterol sentez özeti.



Şekil 2.5: Mevalonatın aktif izopren birimlerine dönüşümü.

(Nelson ve Cox 2013)

**Basamak (3) Altı Adet Aktifleşmiş İzopren Biriminin Skualeni Oluşturmak İçin Kondensasyonu:** İzopentenil pirofosfat ve dimetilallil pirofosfat baş - kuyruk kondensasyonuna uğrar. Bu tepkimede bir pirofosfat grubu molekülden ayrılır ve 10 karbonlu bir bileşik olan geranil pirofosfat oluşur (Şekil: 2.6) (molekülün "baş" kısmı pirofosfatın bağlı olduğu uçtur). Geranil pirofosfatın başka bir izopentenil pirofosfatla baş - kuyruk kondensasyonu sonucu 15 karbonlu bir ara ürün olan farnesil pirofosfat ürünü oluşur. Sonunda iki farnesil pirofosfat molekülünün baş başa kondensasyonu sonucu her iki pirofosfat grubunda ayrılır ve skualen yapısı oluşur (Nelson ve Cox 2013).



Şekil 2.6: Skualenin oluşumu.

(Nelson ve Cox 2013)

Bu ara ürünlerin isimleri ilk defa izole edildikleri kaynaklardan türetilmiştir. Geraniol, geranium kokusuna sahip olan bir bileşik olup gül yağının bir bileşenidir. Farnesol, Farnese akasya ağacının çiçeklerinde bulunan kokulu bir bileşiktir. Bitki kökenli doğal kokuların birçoğu izopren birimlerinden sentezlenmiştir. Skualen ilk defa köpek balıklarının karaciğerlerinden izole edilmiştir ve sahip olduğu 30 karbon atomunun 24 tanesi ana zincir üzerinde 6 tanesi de dallanmış metil grupları üzerindedir (Nelson ve Cox 2013).

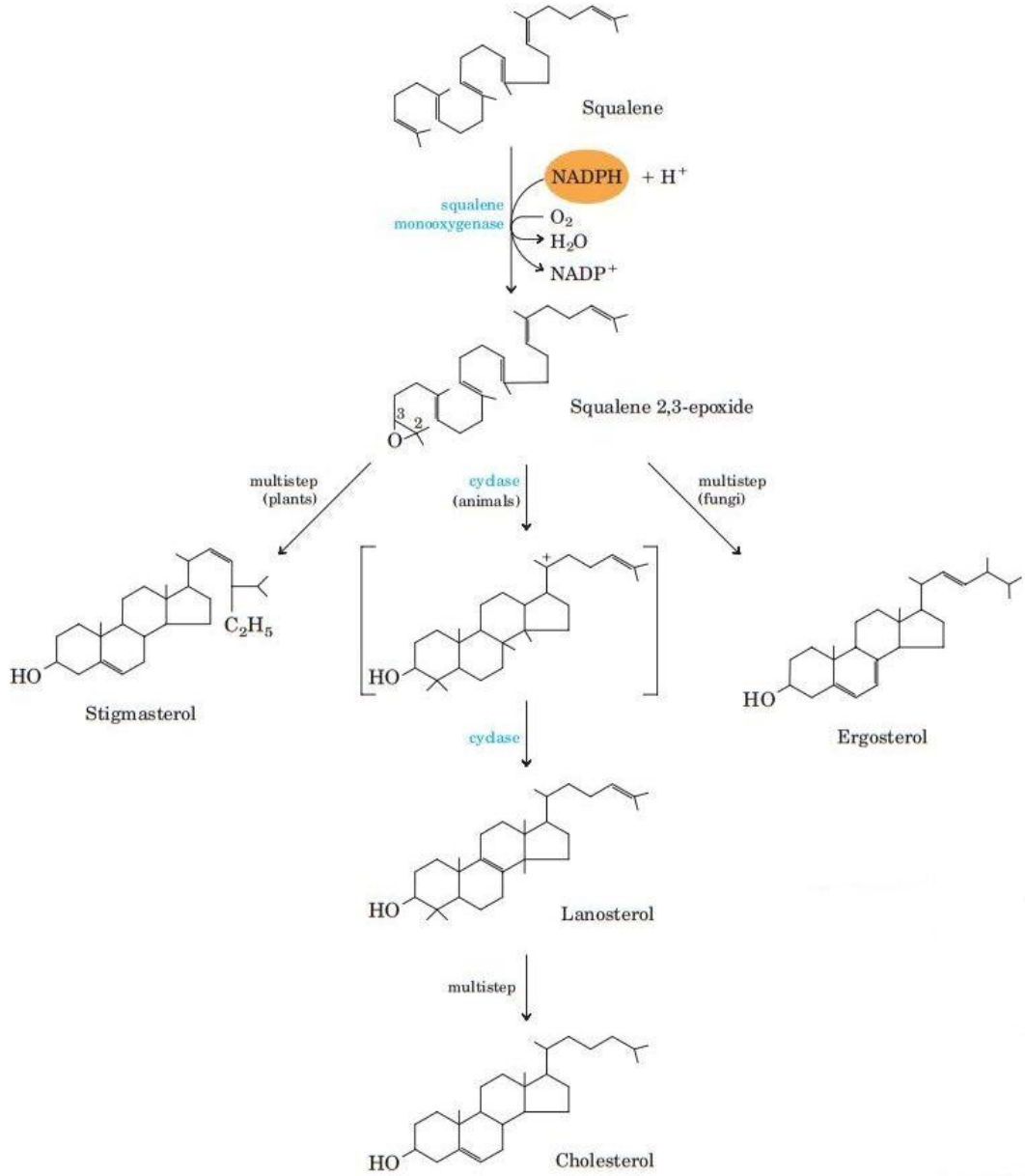
#### **Basamak (4) Skualenin Dört Halkalı Steroit Çekirdeğine Dönüşmesi:**

Skualen molekülünün şekil:2.7'de gösterilen yapısı incelendiği zaman molekülün doğrusal yapısıyla sterollerin halkalı yapısı arasında bir bağıntının olduğu açıkça görülür. Bütün sterollerde steroit çekirdeği denilen ve birbirine bağlanmış dört adet halkadan oluşan bir çekirdek ve C-3 karbonunda da bir alkol grubu bulunur ve bu nedenle de "sterol" olarak isimlendirilirler. Skualen monooksijenaz enziminin etkisiyle O<sub>2</sub>'den alınan bir oksijen atomu skualen zincirinin sonuna eklenerek bir epoksit oluşturulur. Bu enzim başka bir karışık işlevli oksidaz enzimidir. O<sub>2</sub> molekülünün diğer oksijen atomunu NADPH, H<sub>2</sub>O'ya indirir. Ürünün, yani skualen-2,3-epoksitin çift bağları öyle konumlanmıştır ki, son derece özel bir tepkimeyle doğrusal skualen epoksit kolayca halkalı bir yapıya dönüşebilir.

Hayvan hücrelerinde bu halkalaşma sonucunda lanosterol oluşur. Lanosterolde de dört halkalı karakteristik steroit çekirdeği vardır. Lanosterol bazı metil gruplarının taşınmasını, bazılarının da uzaklaştırılmasını gerektiren yaklaşık 20 tepkimeden oluşan bir dizi tepkimenin sonunda kolesterole dönüşür. Bu olağandışı biyosentetik yol (aynı zamanda bilinen en karmaşık biyosentetik yollardan biridir) Konrad Bloch, Feodor Lynen, John Cornforth ve George Popjâk tarafından 1950'lerin sonunda aydınlatılmıştır.

Bitkiler, mantarlar ve diğer tek hücreli canlılar başka sterollerini kullanırken, kolesterol hayvan hücrelerine özgü steroldür. Skualen-2,3-epoksite kadar tüm canlılar aynı yolu izlerken bu noktada yollar biraz farklılaşır ve diğer steroller oluşur. Örneğin bitkilerin çoğunda stigmasterol ve mantarlarda ergosterol gibi farklı steroller oluşur (Şekil: 2.7) (Nelson ve Cox 2013).

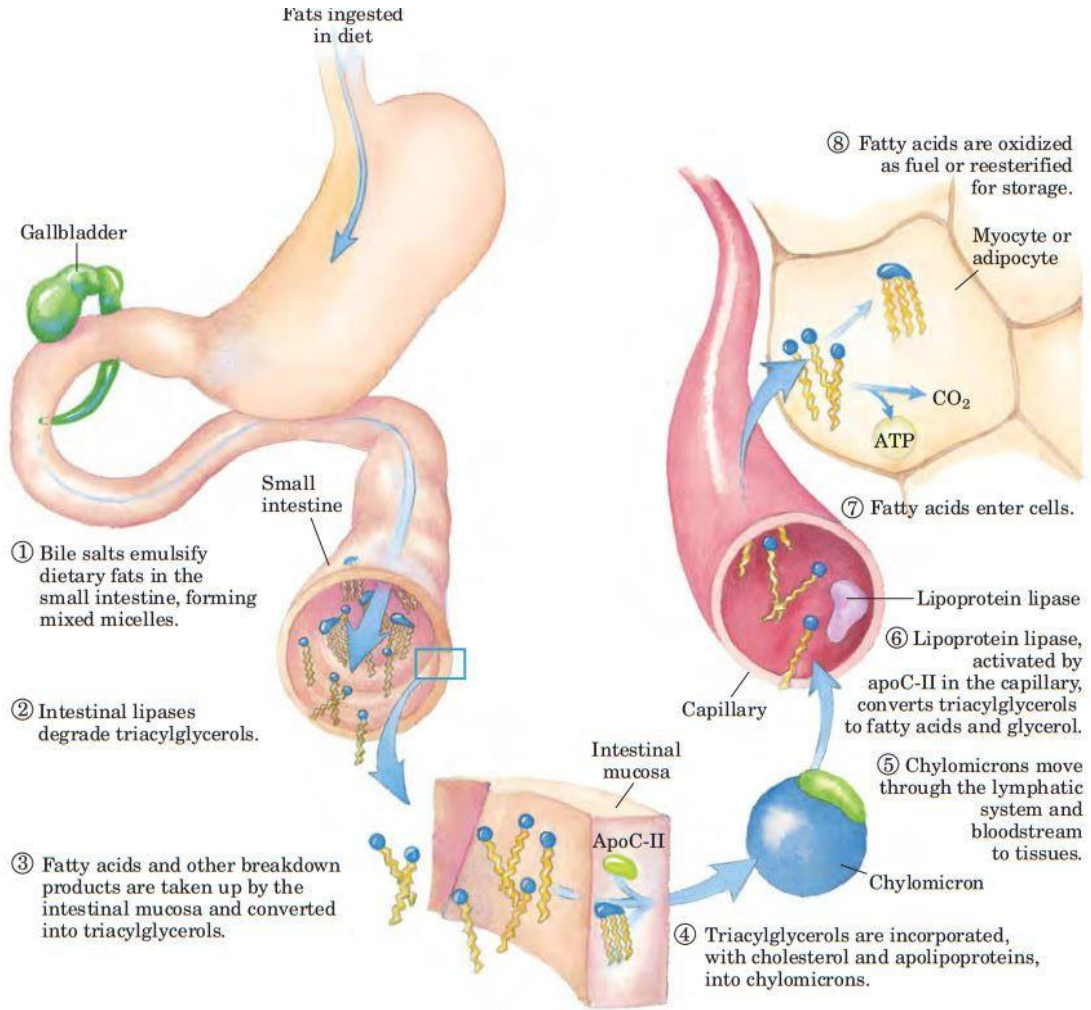




Şekil 2.7: Kolesterolün birkaç akıbeti vardır.

(Nelson ve Cox 2013)

Omurgalılarda kolesterol sentezinin çoğu karaciğerde gerçekleşir. Kolesterolün küçük bir bölümü hepatosit zarlarının içinde gerçekleştirilir. Üretilen kolesterolün çoğu safra kolesterolü, safra asitleri veya kolesterol esterleri şeklinde dışarıya verilir. Safra asitleri ve tuzları nispeten hidrofilik kolesterol türevleridir ve lipidlerin sindirilmesine yardım ederler (Şekil: 2.8) (Nelson ve Cox 2013).



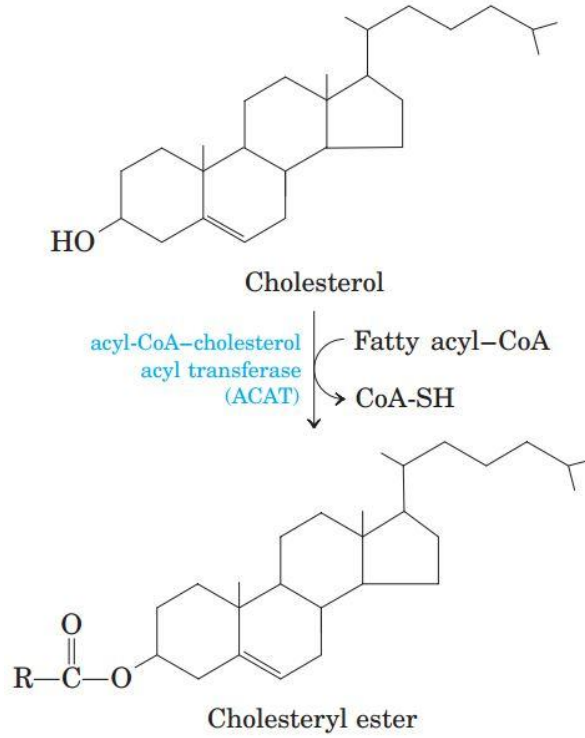
Şekil 2.8: Omurgalılarda besinsel lipidlerin sindirimi, emilimi, taşınması, depolanması ve enerji kaynağı olarak kullanılması.

(Nelson ve Cox 2013)

Safra asitleri, kolesterol katabolizmasının ürünleri, karaciğerde sentezlenir ve bağırsak içine atılır. Salgılanan safra asitlerinin çoğu karaciğere geri döner. Geri dönen safra asitlerinin miktarları sıkı bir şekilde safra asidi sentezi ile kontrol edilir.

Safra asidi homeostazının bozulması ise ikincil safra asidi, litokolik asit (LCA: *Lithocholic acid*), gibi safra asitlerinin anormal birikmesine bunun sonucunda da karaciğer ve bağırsakta hastalıklara sebep olabilir (Jiang ve ark. 2006).

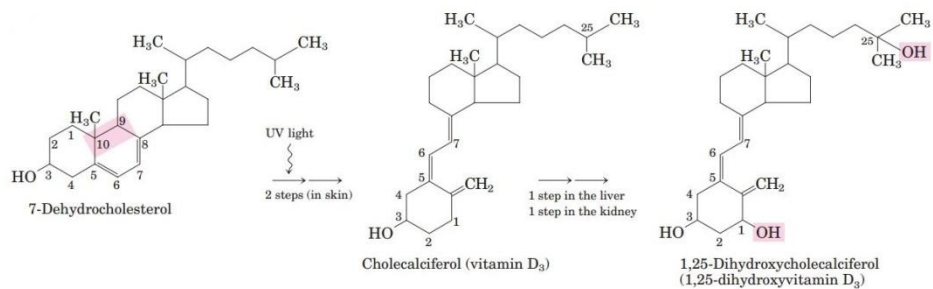
Kolesteril esterleri, açıl-KoA kolesterol açıl transferaz (ACAT: *Acyl-CoA cholesterol acyl transferase*) enziminin katalizörlüğünde karaciğerde oluşturulur. Bu enzim bir yağ asidinin koenzim A'dan kolesterolün hidroksil grubuna taşınmasını katalizler (Şekil: 2.9). Bu taşınmanın sonucunda kolesterol çok hidrofobik bir yapıya dönüşmüş olur. Kolesteril esterleri kolesterol kullanan diğer dokulara lipoprotein parçacıkları şeklinde taşınır veya karaciğerde depolanırlar (Nelson ve Cox 2013).



Şekil 2.9: Kolesteril esterinin sentezi.

(Nelson ve Cox 2013)

Bütün hayvansal dokuların zar sentezlemek için kolesterole ihtiyacı vardır. Bazı organlarda (örneğin adrenal bez, sperm veya yumurta üreten bezler) kolesterolu steroid hormonları üretmek için bir çıkış maddesi olarak kullanırlar. Kolesterol D vitamininin de öncülüdür (Şekil: 2.10).



Şekil 2.10: D vitamini üretimi ve metabolizması.

(Nelson ve Cox 2013)

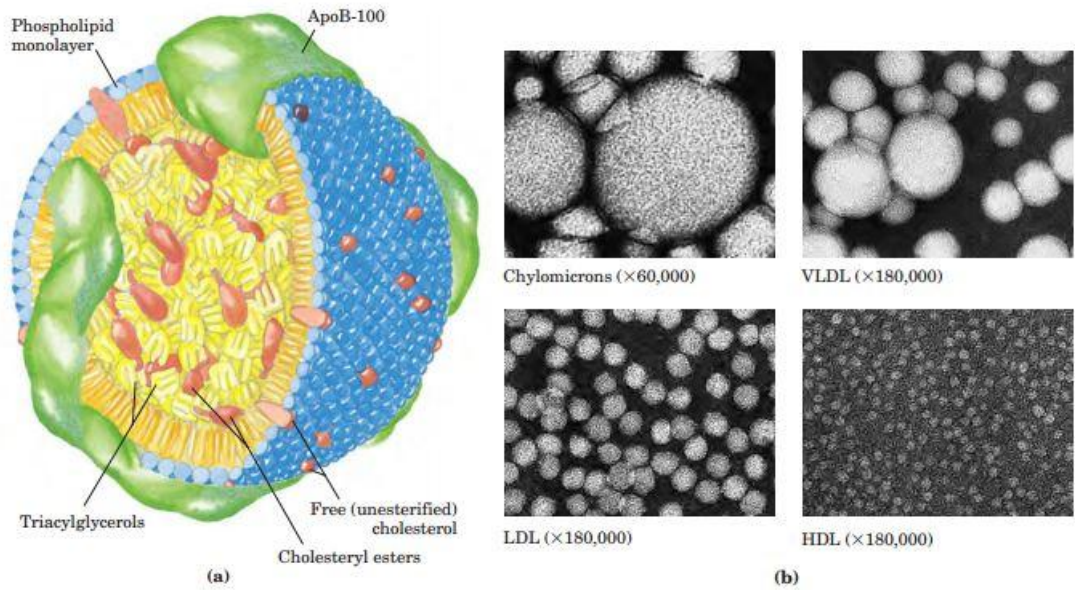
Kolesterol ve kolesteril esterleri de triaçilgliseroller ve fosfolipidler gibi suda çözünmezler. Bu nedenle sentezlendikleri dokudan ya depolanacakları hedef dokuya taşınmaları ya da tüketilmeleri gerekir. Plazma lipoproteinleri kanda, özgül taşıyıcı proteinlerin makromoleküler kompleksleri ve apolipoproteinler şeklinde taşınırlar.

Apolipoproteinler fosfolipidler, kolesterol, kolesterol esterleri ve triaçilgliserollerin değişik oranlarda birleşmesinden oluşur.

Apolipoproteinler ("apo" ön eki proteinin lipidsiz olduğunu gösterir) lipoprotein parçalarının lipidlerle birleşmesi sonucu oluşur; hidrofobik lipidler küresel komplekslerin iç kısmına hidrofilik yan zincirli aminoasitler ise komplekslerin yüzeyine yönelir (Şekil: 2.11-a). Lipidlerle proteinlerin farklı bileşimleri şilomikronlardan yüksek yoğunluklu lipoproteinlere kadar farklı yoğunlukta parçacıklar oluştururlar. Bu parçacıklar ultrasantrifüjle (Tablo: 2.1) ayrılabilirler ve elektron mikroskopuyla görüntülenebilirler (Şekil: 2.11-b)

Lipoprotein	Density (g/mL)	Composition (wt %)				
		Protein	Phospholipids	Free cholesterol	Cholesteryl esters	Triacylglycerols
Chylomicrons	<1.006	2	9	1	3	85
VLDL	0.95–1.006	10	18	7	12	50
LDL	1.006–1.063	23	20	8	37	10
HDL	1.063–1.210	55	24	2	15	4

Tablo 2.1: İnsan plazma lipoproteinlerinin ana sınıfları.



Şekil 2.11: Lipoproteinler.

(Nelson ve Cox 2013)

Lipoproteinlerin her bir sınıfının özgül bir işlevi bulunmaktadır. Bu işlevler sentezin gerçekleştiği yer, lipid bileşimi ve apolipoprotein içeriği ile belirlenir. İnsan plazmasında bulunan lipoproteinler içerisinde en az on farklı apolipoprotein (Tablo: 2.2) keşfedilmiştir. Bu apolipoproteinler hacimleriyle, özgül antikorlarla verdikleri

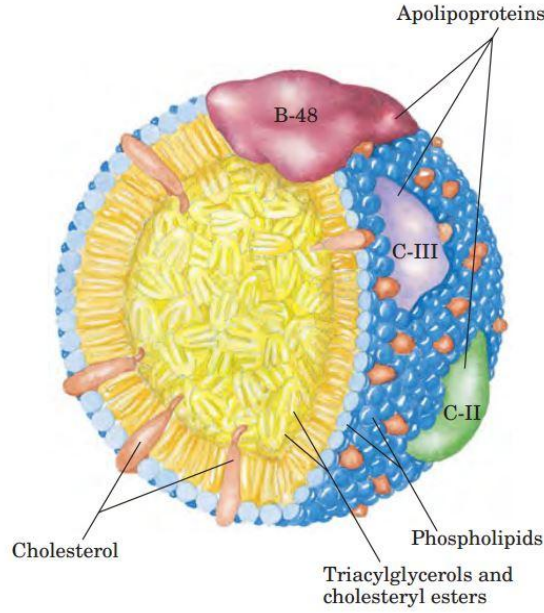
tepkimelerle ve lipoprotein sınıfları içerisindeki karakteristik dağılımlarıyla ayırt edilebilirler. Bu protein bileşenleri belirli dokulara lipoproteinleri hedeflemek veya lipoproteinlerin kendi içerisinde çalışan veya çalışmayan enzimleri aktifleştirmek için sinyal olarak davranabilirler (Nelson ve Cox 2013).

<b>Apolipoprotein</b>	<b>Molecular weight</b>	<b>Lipoprotein association</b>	<b>Function (if known)</b>
ApoA-I	28,331	HDL	Activates LCAT; interacts with ABC transporter
ApoA-II	17,380	HDL	Inhibits LCAT
ApoA-IV	44,000	Chylomicrons, HDL	Activates LCAT; cholesterol transport/clearance
ApoB-48	240,000	Chylomicrons	Cholesterol transport/clearance
ApoB-100	513,000	VLDL, LDL	Binds to LDL receptor
ApoC-I	7,000	VLDL, HDL	
ApoC-II	8,837	Chylomicrons, VLDL, HDL	Activates lipoprotein lipase
ApoC-III	8,751	Chylomicrons, VLDL, HDL	Inhibits lipoprotein lipase
ApoD	32,500	HDL	
ApoE	34,145	Chylomicrons, VLDL, HDL	Triggers clearance of VLDL and chylomicron remnants

Tablo 2.2: İnsan plazma lipoproteinlerinin apolipoproteinleri.

(Nelson ve Cox 2013)

Diyetle alınan triaçilgliserollerin bağırsaklardan diğer dokulara taşınmasıyla ilişkili olan şilomikronların yoğunlukları düşüktür, içeriklerinde yüksek oranda triaçilgliseroller bulundurulur ve en yaygın bulunan lipoprotein sınıfını oluştururlar (Şekil: 2.12). Şilomikronlar ince bağırsağın epitelyal hücrelerinde sentezlendikten sonra lenf sistemi tarafından taşınırlar ve sol subclavian (köprücük kemiğinin altında yer alan) damardan kan dolaşımına girerler. Şilomikronların apolipoproteinleri apo-48, apoE ve apoC-II içerir (Tablo: 2.2) (Nelson ve Cox 2013).

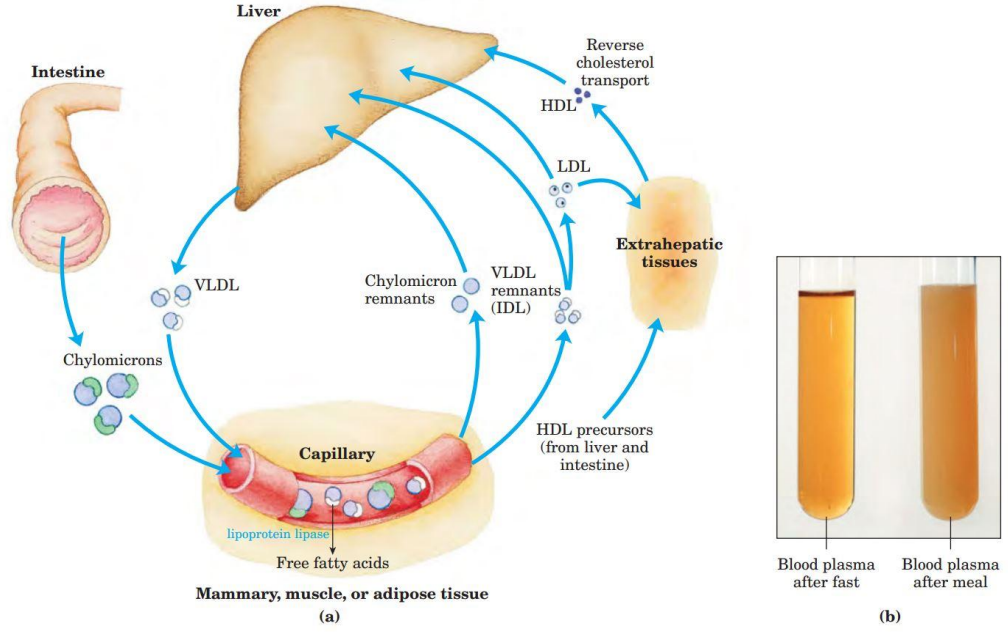


Şekil 2.12: Bir şilomikronun molekül yapısı.

(Nelson ve Cox 2013)

ApoC-II lipoprotein lipaz aktivitesine sahiptir ve adipoz doku, kalp, iskelet kası ve süt salgılayan meme dokularında bu dokulara serbest yağ asitlerinin salıverilmesini sağlar. Şilomikronlar diyetle alınan yağ asitlerini ya kullanılacakları veya depolanacakları dokulara taşırlar (Şekil: 2.13). Şilomikronların kalıntıları kan dolaşımıyla karaciğere taşınır. Bu kalıntıların içlerinde hemen hemen hiç triaçilgliserol kalmamıştır, ancak hâlâ kolesterol, apoE ve apoB-48 bulunmaktadır. Karaciğerdeki reseptörler şilomikron kalıntılarındaki apoE'yi bağlarlar ve onları endositozla hücre içrisine alırlar. Karaciğere girdikten sonra, kalıntılarda bulunan kolesterol serbest kalır ve lizozomlarda parçalanır. Diyetle, acil gerekli yakıt miktarından daha fazla yağ asidi bulunduğunda, karaciğerde triaçilgliserollere dönüştürülürler ve özgül apolipoproteinlerle çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL: *Very low density lipoprotein*) olarak paketlenirler. Diyetteki karbohidratların aşırısı da karaciğerde triaçilgliserollere dönüştürülebilir ve VLDL olarak dolaşıma verilir (Şekil: 2.13). VLDL'ler triaçilgliserollere ilave olarak bir miktar kolesterol ile apoB-100, apoC-I, apoC-II, apoC-III ve apoE gibi kolesterol esterlerini de (Tablo: 2.2) içerir. Bu lipoproteinler kan yoluyla karaciğerden kaslara ve adipoz dokuya taşınır. Bu dokularda apoC-II tarafından lipoprotein lipazın aktifleşmesiyle VLDL'deki triaçilgliserollerden serbest yağ asitlerinin salınımına sebep olur. Adipositler bu yağ asitlerini alıp triaçilgliserollere dönüştürürler ve hücre içi yağ damlacıklarında depolarlar. Buna karşılık miyositler yağ asitlerini oksitleyerek enerji

kaynağı olarak kullanılır. VLDL kalıntılarının çoğu dolaşımdan hepatositler tarafından uzaklaştırılır. Bu kalıntıların endositozu da şilomikronlarda olduğu gibi reseptör desteklidir ve VLDL kalıntılarında apoE'nin olup olmadığına bağlıdır.



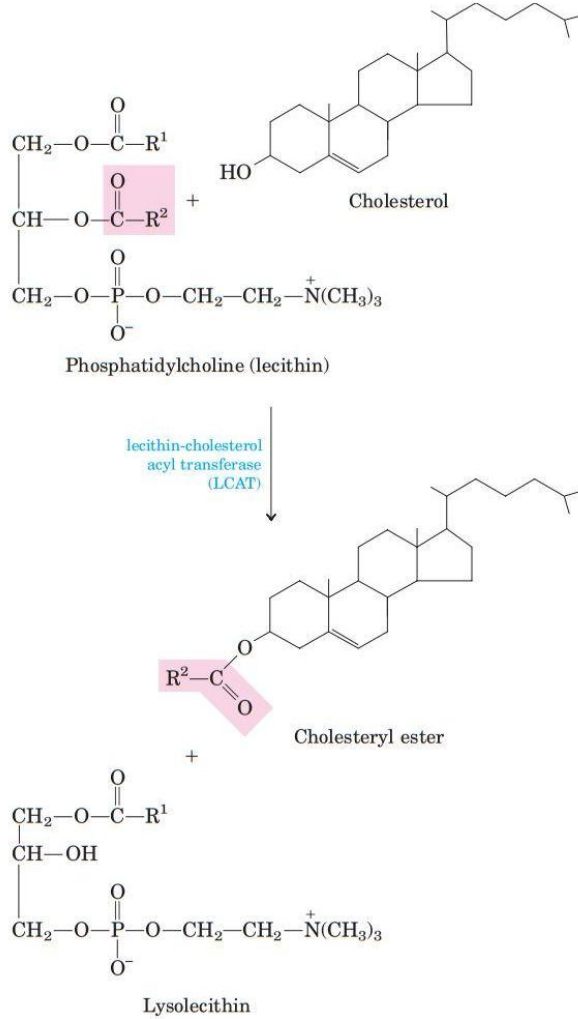
Şekil 2.13: Lipoproteinler ve lipid taşınması.

(Nelson ve Cox 2013)

Triaçilgliserolün kaybı VLDL'nin bir miktarını orta yoğunluklu lipoprotein olarak da isimlendirilen VLDL kalıntısına dönüştürür. VLDL'den triaçilgliserol kaybı devam ederse VLDL, düşük yoğunluklu lipoprotein olan LDL'ye dönüşür (Tablo: 2.1). Kolesterol ve kolesterol esterleri açısından çok zengin olan ve ana apolipoprotein olarak da apoB-100'ü içeren LDL'ler karaciğer harici dokulara kolesterol taşır. Bu dokuların apoB-100'ü tanıyan özgül plazma zar reseptörleri vardır. Bu reseptörler kolesterol ve kolesterol esterlerinin hücre içine alınmasını destekler (Nelson ve Cox 2013).

Dördüncü ana lipoprotein çeşidi, yüksek yoğunluklu lipoproteinler olan HDL'dir. Büyük çoğunluğu karaciğerde olmak üzere ince bağırsakta da üretilirler. Proteince zengin parçacıklarının içerisinde az miktarda kolesterol bulunurken, kolesterol esterleri hiç bulunmaz (Şekil: 2.13). HDL'ler apoA-I, apoC-I, apoC-II ve diğer apolipoproteinleri ve (Tablo: 2.2) bunlara eşdeğer miktarda da lesitin kolesterol açıl transferaz (LCAT: *Lecithin cholesterol acyl transferase*) enzimini içerirler. LCAT enzimi lesitin (fosfatidil kolin) ve kolesterolden kolesterol esterlerinin

oluşumunu katalizler (Şekil: 2.14). HDL parçacığının yüzeyindeki LCAT, şilomikronlarda ve VLDL kalıntılarında bulunan fosfatidil kolini ve kolesterolu kolesteril esterlerine dönüştürür. Yeni oluşan disk şeklindeki HDL, olgunlaşırken değişir ve daha sonra karaciğere döner, kolesterol burada lipoproteinden ayrılır ve bir bölümü safra tuzlarına dönüştürülür (Nelson ve Cox 2013).



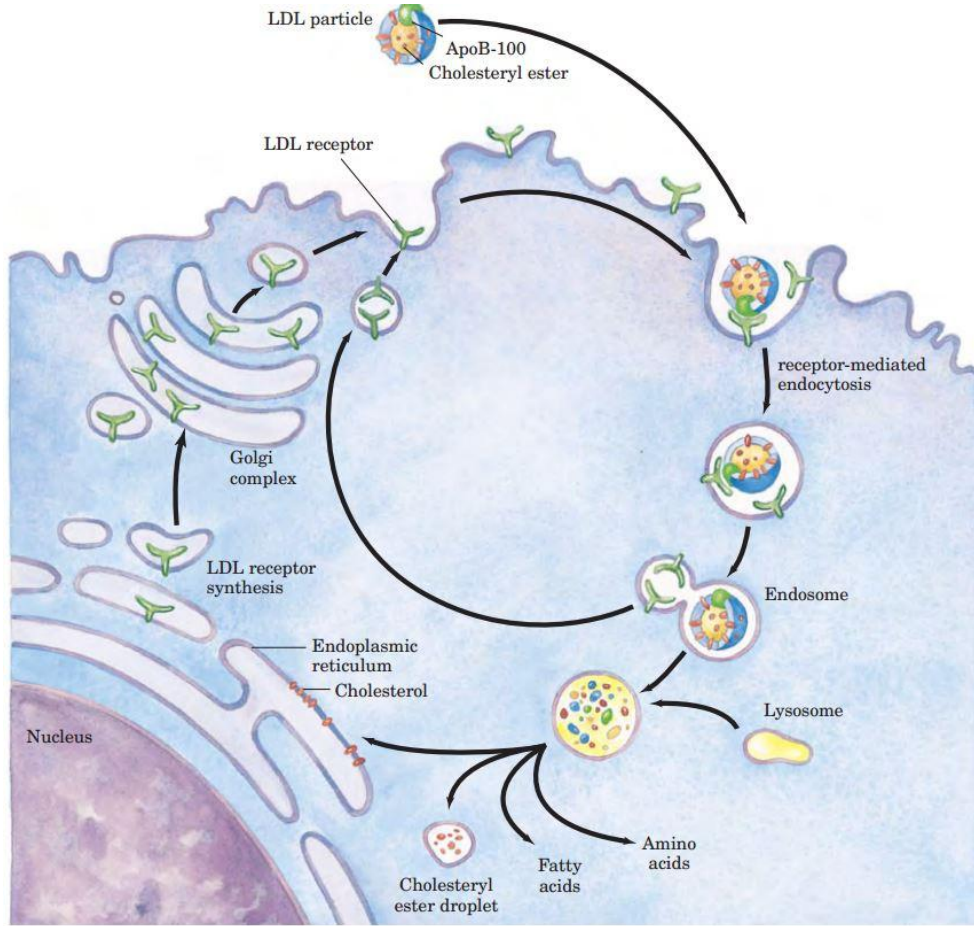
Şekil 2.14: Lesitin kolesterol açıl transferaz tarafından katalizlenen tepkime. (Nelson ve Cox 2013)

HDL, reseptör destekli endositozla karaciğere alınabilmekle birlikte HDL'deki kolesterolün en azından bir bölümü alışılmışın dışında bir işleyişle diğer dokulara bırakılır. HDL, adrenal salgı bezlerindeki stereogenik ve hepatik dokularda bulunan ve SR-BI olarak isimlendirilen plazma zarı reseptör proteinine bağlanabilir. Bu reseptörler endositoza yardım etmez, ancak seçici olarak ve kısmen kolesterolün ve diğer lipidlerin hücre içine taşınmasını sağlar. Kolesterolu ve lipidleri tükenmiş



olan HDL karaciğer harici dokulardaki kolesterolü bağlar ve onu tekrar karaciğere taşır. Bu yola ters kolesterol taşınması denir (Şekil: 2.13). Ters taşıma yolunun birincisinde, HDL'nin kolesterolce zengin hücrelerdeki SR-BI reseptörleriyle etkileşmesi ile kolesterolün hücre yüzeyinden HDL'nin içerisine pasif taşınması sağlanır. Bu şekilde HDL içine giren kolesterol daha sonra karaciğere geri taşınır. İkinci yolda boşalmış HDL'deki apoA-I kolesterolce zengin hücrelerdeki bir aktif taşıyıcı ile (ABC1 proteini: *ATP-binding cassette 1 protein*) etkileşir. ApoA-I (ve muhtemelen HDL) endositozla alınır, kolesterolün yüklenmesinden sonra yeniden kan dolaşımına döner ve aldığı kolesterolü karaciğere taşır.

ABC1 proteini, çoklu ilaç taşıyıcıları büyük ailesinin bir üyesidir. ATP-bağlayıcı kasetlerine sahip olduklarından dolayı bazen ABC (*ATP-binding cassette*) taşıyıcıları olarak da isimlendirilirler ve altı tane zar geçiş sarmaline ve iki tane zar geçiş bölgesine sahiptirler. Bu proteinler değişik iyonları, aminoasitleri, vitaminleri, steroid hormonları ve safra tuzlarını plazma zarının bir tarafından diğer tarafına aktif olarak taşıyabilirler (Nelson ve Cox 2013).



Şekil 2.15: Kolesterolün reseptör endeksi endositozla hücre içine alınması.  
(Nelson ve Cox 2013)

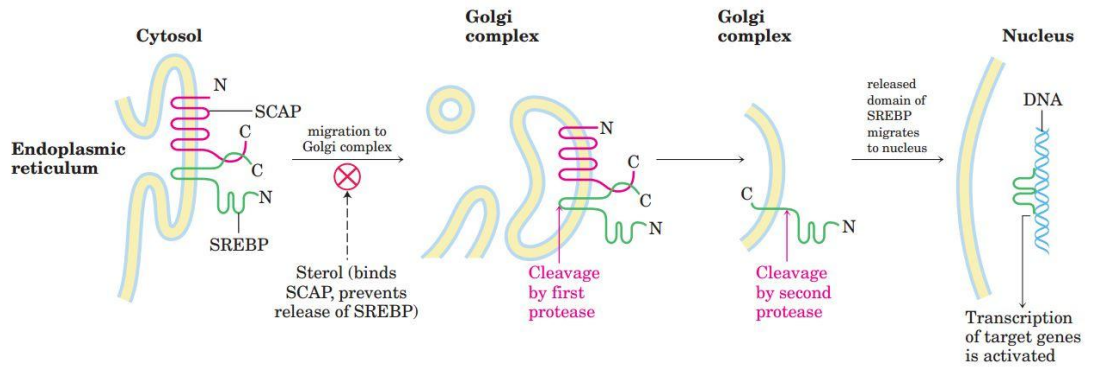
Kan dolaşımındaki her bir LDL parçacığı apoB-100 içerir. ApoB-100, LDL reseptörleri olarak bilinen hücrelerin özgül yüzey reseptör proteinleri tarafından tanınır, hücrelerin kolesterolü içeriye alabilmesi için bu reseptörlere ihtiyaçları vardır (Şekil: 2.15), Sonunda kolesteril esterlerini hidrolizleyen enzimleri içeren lizozom sayesinde kolesteril esterleri hidrolizlenir ve kolesterol ve yağ asitleri sitozole bırakılır. LDL'nin apoB-100'ü, aminoasitlerine kadar yıkılır ve sitozole salınır; fakat LDL reseptörü yıkımdan kurtulur, hücre yüzeyine geri döner ve LDL yakalama işlevine devam eder. VLDL'de apoB-100 bulunmasına rağmen, onun reseptör bağlama bölgesi LDL reseptörüne bağlanmak için uygun değildir. Kolesterolün kandaki taşınması ve kolesterolün hedef dokular tarafından reseptör destekli endositozu Michael Brown ve Joseph Goldstein tarafından aydınlatılmıştır. Bu yolla hücrelerin içine giren kolesterol zar yapısına katılabilir veya sitozolik lipid damlacıkları içerisinde depolanmak için ACAT tarafından tekrar esterleştirilebilir (Şekil: 2.9). Kandaki LDL-C'den yeterli kolesterol alındığı zaman, hücre içerisinde

aşırı kolesterolün birikmesini önlemek için kolesterol sentez hızı düşürülür (Nelson ve Cox 2013).

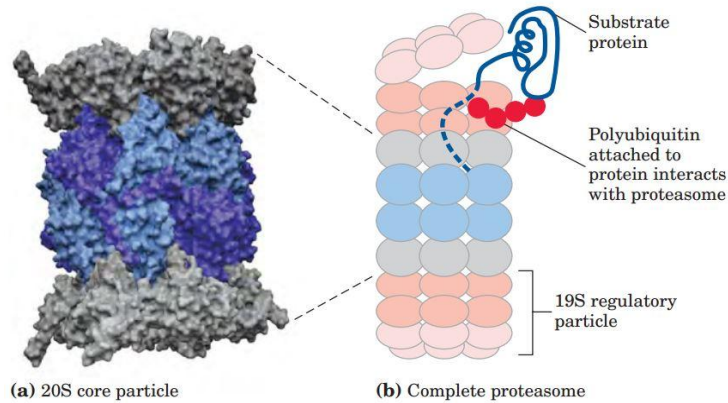
LDL-C reseptörü apoE'ye bağlanır ve hepatik dokuların şilomikronları ve VLDL kalıntılarını yakalamasında önemli bir rol oynar. Eğer LDL-C reseptörleri çalışmıyorsa (örneğin LDL-C reseptör geni bulunmayan farelerde), VLDL kalıntıları ve şilomikronlar karaciğer tarafından yakalanabilirken LDL-C yakalanamaz. Bu sonuç VLDL kalıntıları ve şilomikronların reseptör destekli endositozları için bir destek sisteminin varlığını gösterir. Bir destek reseptörü, lipoprotein reseptör bağlantılı proteindir. Lipoprotein reseptör bağlantılı protein bir takım diğer ligandlar kadar iyi bir şekilde apoE'ye bağlanır. Kolesterol sentezi karmaşık ve çok enerji gerektiren bir işlem olduğundan, diyetle alınan ilave kolesterolün kolesterol biyosentezinin düzenlemesine faydası bulunmaktadır. Memelilerde kolesterol üretimi, hücre içi kolesterol derişimi, insülin ve glukagon hormonları tarafından düzenlenir. Kolesterol yolunun hız sınırlayıcı basamağı HMG-KoA redüktaz tarafından katalizlenen tepkimeyle HMG-KoA'nın mevalonata dönüşümüdür (Şekil: 2.3).

Sentez yolunun kolesterol seviyesi ile ayarlanması HMG-KoA redüktazın gen kodunun çevrilmesiyle gerçekleştirilir. Bu gen ile birlikte kolesterolün ve doymamış yağ asitlerinin sentezine ve organizmaya alınmasına yardım eden diğer enzimleri kodlayan 20'den fazla gen, sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler (SREBPs: *Sterol regulatory element binding proteins*) olarak adlandırılan küçük bir protein ailesince kontrol edilir. Bu proteinler yeni sentezlendikleri zaman ER'ye gömülü halde bulunurlar. Bir SREBP'nin sadece çözünebilen amino uç bölgesi transkripsiyon aktifleştiricisi olarak çalışır. Bununla birlikte, bu bölge SREBP molekülünün bir parçası olarak kalırken çekirdeğe erişemez ve gen aktifleşmesine katılamaz. HMG-KoA redüktaz enziminin geni ve diğer enzimlerin genlerinin transkripsiyonunun aktifleştirilmesiyle, etkinleşen bölge proteolitik kırılmayla SREBP'in kalanından ayrılır. Kolesterol seviyeleri yüksek olduğu zaman SREBP'ler aktif değildir ve SREBP kırılma etkinleştirici proteini (SCAP: *SREBP cleavage activating protein*) olarak adlandırılan başka tip proteinlerle kompleks oluşturularak ER'de (Şekil: 2.16) koruma altına alınır. SCAP kolesterolü ve diğer bir takım sterollerini de bağlar, bu nedenle bir sterol algılayıcı (sensörü) olarak çalışır. Sterol seviyesi yükseldiği zaman SCAP - SREBP kompleksi büyük bir ihtimalle ER'deki kompleksin içerisinde

korunan diğer proteinlerle etkileşir. Hücredeki sterol seviyesi düştüğü zaman, SCAP'da meydana gelen yapısal bir değişim ER'de koruma altında tutulan SCAP - SREBP kompleksinin serbest kalmasına neden olur. Serbestleşen kompleks, veziküller içerisinde Golgi kompleksine doğru göç eder. Golgi kompleksinde, SREBP iki farklı proteaz tarafından iki kere bölünür ve ikinci bölünme amino ucunun sitozolde serbest kalmasını sağlar. Bu bölge çekirdeğe gider ve hedef geninin transkripsiyonunu aktifleştirir. SREBP'in amino uç bölgesinin yarılanma ömrü çok kısadır, bu nedenle proteaz enzimleri tarafından çok hızlı bir şekilde parçalanılır (Şekil: 2.17). Sterol seviyesi yeterince yüksekse, SREBP'in amino uç bölgesinin proteolitik olarak serbest bırakılması tekrar engellenir ve mevcut aktif bölgelerin proteazomlar tarafından yıkımı gen hedeflerinin hızla kapanmasına sebep olur (Nelson ve Cox 2013).

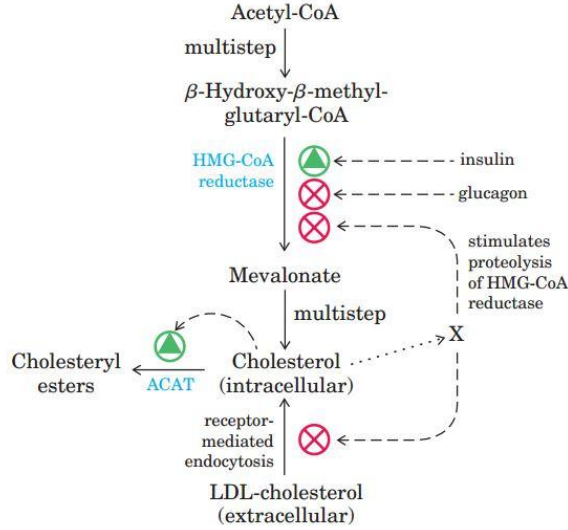


Şekil 2.16: Sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinlerin aktifleşmesi. (Nelson ve Cox 2013)



Şekil 2.17: Ökaryotik proteazomun üç boyutlu yapısı.

(Nelson ve Cox 2013)



Şekil 2.18: Diyetle alınan ve sentezle oluşturulan kolesterol arasındaki dengenin düzenlenmesi. (Nelson ve Cox 2013)

Kolesterol sentezi birkaç farklı mekanizma tarafından düzenlenir (Şekil: 2.18). Hormonal kontrol HMG-KoA redüktazın kendi kendine kovalent modifikasyona uğramasına sebep olur. Enzim fosforilendiğinde inaktif yapısına, defosforillendiğinde ise aktif yapısına dönüşür. Glukagon enzimin fosforillenmesini yani enzimin inaktif yapıya geçmesini uyarır, buna karşılık insülin ise defosforillenmeyi uyararak enzimin aktifleşmesini ve kolesterol sentezinin devam etmesini sağlar. Kolesterolün yüksek hücre içi derişimleri ACAT'ı aktifleştirir, bu da depolama için kolesterolün esterleştirilmesini arttırır. Sonuç olarak yüksek hücrel kolesterol seviyesi LDL-C reseptörünü kodlayan genin transkripsiyonunu azaltarak reseptörün üretimini azaltır. Bu nedenle kandan kolesterol alımı azalır (Nelson ve Cox 2013).

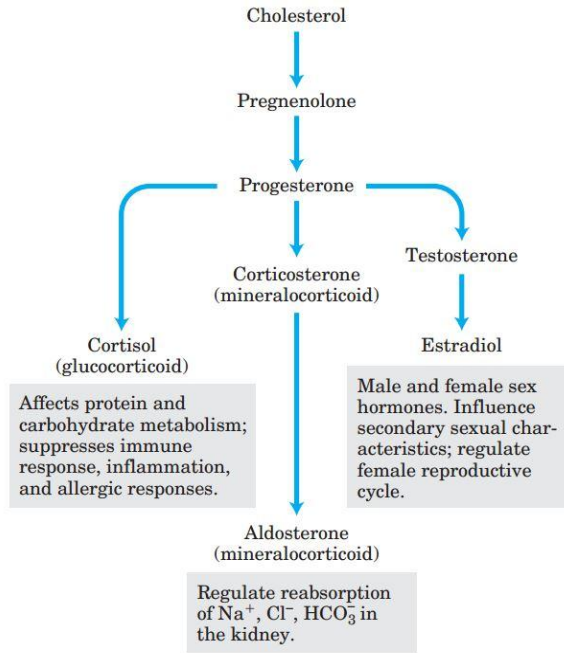
Kolesterol üretiminin ayarlanamaması insanlarda ciddi hastalıklara sebep olabilir. Diyetle alınan ve sentezlenen kolesterolün toplamı, zarların, safra tuzlarının ve steroidlerin sentezi için gerekli olan miktardan daha fazla olduğunda, kolesterolün kan damarlarında patolojik birikimi (aterosklerotik plaklar) başlayabilir. Bu birikim de kan damarlarının tıkanmasıyla (ateroskleroz) sonuçlanır. Koroner arterlerin tıkanması nedeniyle oluşan kalp yetmezliği endüstriyel toplumlardaki ölümlerin başta gelen nedenidir. Ateroskleroz, kan kolesterolünün ve özellikle de LDL-C'ye bağlı kolesterolün yüksek seviyesiyle bağlantılıdır. HDL-C seviyeleriyle arter hastalıkları arasında negatif bir ilişki vardır. Ailesel hiperkolesterolemide kan

kolesterol seviyeleri aşırı derecede yüksektir ve bu nedenle çocuklukta bile ağır ateroskleroz gelişebilir. Bu hastalığa tutulan kişilerin LDL-C reseptörleri kusurludur ve bu nedenle, LDL-C tarafından taşınan kolesterol reseptör destekli olarak hücre içerisine alınmaz. Bunun bir sonucu olarak kolesterol kandan uzaklaştırılmaz ve damarlarda birikerek aterosklerotik plakların oluşumuna katkıda bulunur. Hücre dışındaki kolesterol hücre içerisine giremediği ve hücre içi kolesterol sentezi ayarlanmadığı için kanda aşırı kolesterol olmasına rağmen endojen kolesterol sentezi devam eder (Şekil: 2.18). Bazıları doğal kaynaklardan bazıları da ilaç endüstrisi tarafından sentezlenen ve statinler olarak isimlendirilen bir grup ilaç ailesel hiperkolesterolemili hastaların ve diğer serum kolesterolünün yükselmesine sebep olan şartların tedavi edilmesinde kullanılır. Statinler mevalonata benzerler ve HMG-KoA redüktaz enziminin yarışmalı inhibitörüdürler (Nelson ve Cox 2013).

Ailesel HDL-C eksikliğinde HDL-C seviyeleri çok düşüktür. HDL-C seviyesi Tangier hastalığında hemen hemen belirlenemeyecek kadar azdır. Her iki genetik hastalık da ABC1 proteinindeki mutasyonların sonucunda oluşur. Kolesterolünü tüketmiş HDL, ABC1 proteininin eksikliğinde hücrelerden kolesterol alamaz ve bu durumda kolesterolce fakirleşen HDL kandan çabucak uzaklaştırılır ve yok edilir. Hem ailesel HDL-C eksikliği hem de Tangier hastalığı çok nadir olarak görülür (dünyada Tangier hastalığı olduğu bilinen ailelerin sayısı 100'den daha azdır); fakat bu hastalıkların varlığı plazma HDL-C seviyelerinin ayarlanmasında ABC1 proteininin oynadığı rolü anlamamıza yardım etmiştir. Düşük plazma HDL-C seviyeleriyle koroner kalp hastalıklarının yüksek oranda görülmesi arasında ilişki olduğundan, ABC1 proteini HDL-C seviyelerini kontrol etmek için kullanılan ilaçlar için doğru bir hedefdir (Nelson ve Cox 2013).

### *2.1.3. Steroit Hormonların Yan Zincir Kırılması ve Kolesterol Oksidasyonuyla Oluşumu*

İnsanlar steroid hormonların tümünü kolesterolden türetirler (Şekil: 2.19). Steroit hormonların iki sınıfı adrenal bezin korteksinde sentezlenir. Bunlardan birincisi olan mineralokortikoidler iyonların ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ve  $\text{HCO}_3^-$ ) böbrek tarafından yeniden emilimini kontrol ederken, ikincisi olan glukokortikoidler glukoneogenezin düzenlenmesine ve inflamasyon yanıtının azaltılmasına yardım eder.



Şekil 2.19: Kolesterolden türetilen bazı steroid hormonlar.

(Nelson ve Cox 2013)

Cinsiyet hormonları erkek ve dişi bezlerinde ve plasentada üretilir. Bu hormonların içerisinde kadınlarda üreme çevrimini düzenleyen progesteron, testosteron gibi androjenler ve erkeklerin ve kadınların ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesini etkileyen estradiol gibi östrojenler bulunur.

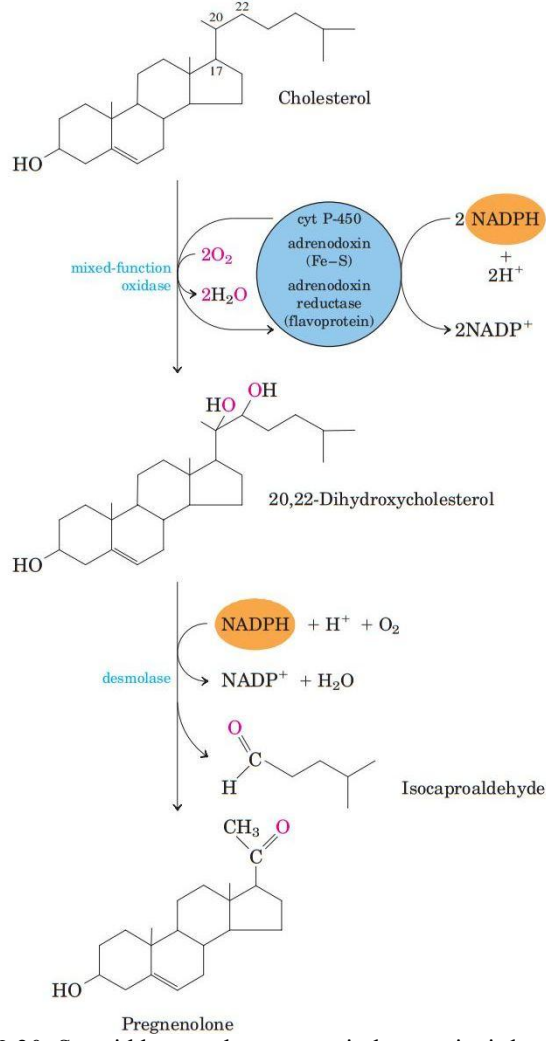
Steroid hormonlar çok düşük derişimlerde etkili olup, oldukça küçük miktarlarda sentezlenirler. Safra tuzlarıyla karşılaştırıldığında üretimleri, kolesterolün çok az miktarda tüketimine yol açar.

Steroid hormonların sentezi kolesterolün D halkasının 17. karbonundaki yan zincir karbonlarının tümünün veya bir bölümünün uzaklaştırılmasını gerektirir. Yan zincirin uzaklaştırılması steroidogenik dokuların mitokondrilerinde gerçekleştirilir. Uzaklaştırma işleminde önce yan zincirdeki iki komşu karbonun (20. ve 22. karbonlar) hidroksillenmesi gerekir ve hidroksillenmeyi bu karbonlar arasındaki bağın kırılması takip eder (Şekil: 2.20). Değişik hormonların oluşumu oksijen atomlarının molekülün içerisine girmesini gerektirir. Steroid biyosentezindeki hidroksillenme ve oksijenlenme tepkimelerinin tamamı NADPH, O<sub>2</sub> ve mitokondriyel sitokrom P450'yi kullanan karışık işlevli oksidazlar tarafından katalizlenir (Nelson ve Cox 2013).

#### *2.1.4. Kolesterol Biyosentezindeki Ara Ürünlerin Akıbetleri*

Kolesterol biyosentezinde ara ürün olarak üstlendiği role ilave olarak izopentenil pirofosfat çeşitli biyolojik rolleri olan geniş bir bileşik grubunun (Şekil: 2.21) aktifleşmiş başlangıç bileşiğidir. Yapısına katıldığı bileşikler arasında A, E ve K vitaminleri, karoten ve klorofilin fitol zinciri gibi bitki pigmentleri, doğal kauçuk, limon yağı, okaliptüs ve misk'in koku veren bileşenleri gibi uçucu yağlar vardır. Ayrıca böceklerde başkalaşımı kontrol eden olgunlaşma hormonu, karmaşık polisakkaritlerin sentezinde kullanılan yağda çözünebilen taşıyıcılar olan dolikoller, mitokondrilerde ve kloroplastlardaki elektron taşıyıcıları olan ubikinon ve plastikinin sayılabilir. Bu moleküllerin tamamı izoprenoitler olarak isimlendirilir. Doğada 20,000'den çok sayıda farklı izoprenoit molekülü keşfedilmiştir ve her yıl yüzlerce yeni izoprenoit molekülünün bulunduğu da rapor edilmektedir (Nelson ve Cox 2013).

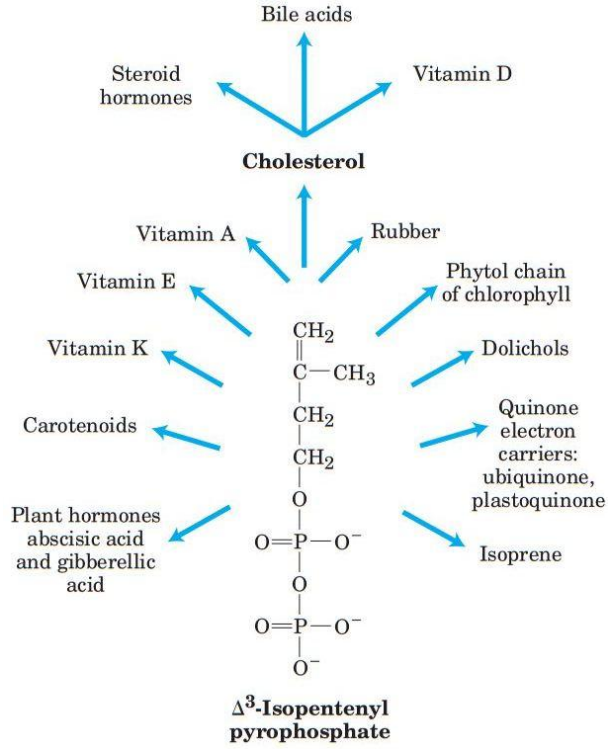




Şekil 2.20: Steroid hormonların sentezinde yan zincir kırılması.

(Nelson ve Cox 2013)

Prenillenme (prenilasyon; bir izoprenoidin kovalent bağlanması) memelilerde proteinleri hücre zarının iç yüzeyine sıkıca bağlamak için yaygın olarak kullanılan bir mekanizmadır. Bu proteinlerin bazılarında bağlanan lipid 15 karbonlu farnesil grubu iken, diğerlerinde 20 karbonlu geranilgeranil grubudur. Farklı enzimler farklı iki tür lipide bağlanırlar. Muhtemelen prenilasyon tepkimeleri hedef proteinleri farklı zarlara bağlarken, proteine bağlanan lipide göre hareket etmektedir. Protein prenilenmesi, kolesterol sentez yolunda izopren türevlerinin aldığı önemli bir roldür (Nelson ve Cox 2013).



Şekil 2.21: İzoprenoid biyosentezinin genel görünümü.

(Nelson ve Cox 2013)

## 2.2. D Vitamini

Vitamin ifadesi ilk kez 1912 yılında Polonyalı biyokimyacı Casimir FUNK tarafından kullanılmıştır. ‘Vita’ Latince, hayat demektir. Hayat veren aminler denilmiş, fakat daha sonraları D vitamininin steroid bir halkaya sahip olduğu belirtilmiştir ([http:// tr.wikipedia.org/wiki/Kazimierz\\_Funk](http://tr.wikipedia.org/wiki/Kazimierz_Funk) 01.11.2015).

Vitaminler, farklı biyokimyasal işlevler için küçük miktarlarda gereken ve genellikle vücut tarafından sentezlenmeyen ve dolayısıyla diyetle sağlanması zorunlu organik besinlerdir. İlk keşfedilen vitaminler, yağda çözünen A ve suda çözünen B vitaminleri olmuştur. Keşfedilen vitaminlerin sayıları artıka, bunların yağda veya suda çözünlükleri de gözlenmiş ve bu özellik, sınıflandırılmalarına esas olmuştur. Suda çözünen vitaminlerin hepsi de B kompleksinin üyeleri olarak tanımlanmışlardır (C vitamini hariç). Çözünlük özelliklerinin dışında, suda çözünen vitaminlerin kimyasal bakımdan birbirlerine benzerlikleri çok azdır. Keşfedilen, yağda çözünen vitaminlere alfabetik tanımlama yapılmıştır (Örn.A, D, E ve K vitaminleri).

D vitamini ilk kez 1922 yılında Oxford üniversitesi Farmakoloji bölümünden Trevor Braby HEATON tarafından keşfedilmiştir. Heaton; Wildiers isimli araştırmacı

tarafından 'BIOS' olarak adlandırılan ve maya mantarlarında hücrenin büyümesi ve gelişmesinde gerekli olanın D vitamini olduğunu belirtmiştir (Heaton 1922).

D vitamini steroid bir prohormondur. Hayvanlar bitkiler ve mayalarda görülen steroidler tarafından temsil edilirler. Vücutta çeşitli metabolik değişikliklere uğrayarak, kalsitriyol adı verilen ve kalsiyum ve fosfat metabolizmasında merkezi bir rol oynayan bir hormona dönüşür (Rodwell ve ark. 2015). Işık etkisi ile D vitamini aktivitesine sahip bileşik oluşturan en az 10 bileşik vardır. Bu bileşiklerin birçoğu sterol çekirdek yapısına 17. karbondan bağlı yan zincirde değişiklikler içerir. İçlerinde en etkili olanları D<sub>2</sub> vitamini olan Ergokalsiferol ve D<sub>3</sub> vitamini olan Kolekalsiferol'dür (Burtis ve Ashwood 2005).

D<sub>2</sub> vitamini; doğal olarak bulunmayan fakat küf, maya ve bitkilerde bulunan ergosterolden ultraviyole ışınları ile D<sub>2</sub> elde edilmektedir (Nelson ve Cox 2013; Burtis ve Ashwood 2005). Işık etkisi ile halka yapısının parçalanması sonucu oluşan preergokalsiferol (ve lumistrol ile diğer ilişkili bileşikler) ara ürününün ısı etkisi ile yeniden düzenlenmesi sonucu ergokalsiferol oluşturur (Burtis ve Ashwood 2005). Kolekalsiferolün yapıldığı 7-dehidrokolesterol ise hayvanlarda bulunur. Ergosterolün 7-dehidrokolesterolden tek farkı, yan zincirde olup bu yan zincir doymamıştır ve fazladan metil grubu içerir. Her iki vitamin (D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub>) eşdeğer güçtedir. Ultraviyole ışınlama, her iki bileşiğin B halkasını keser. D<sub>2</sub> vitamini, bu yolla ticari olarak bitkilerden üretilirken, (Rodwell ve ark. 2015) hayvanlarda, D<sub>3</sub> vitamini, güneşe maruz kalan deride stratum granulosum tabakasında sentez edilip depolanan ve 5 $\alpha$ -kolestan'dan türeyen 7-dehidrokolesterol'un, cildin, güneş ışığı içindeki ultraviyole ışınlarına maruz kalması sonucu oluşur. Kısmen, hayvansal kaynaklı besinler içinde alınır. D<sub>3</sub> vitamini besinler içinde dışarıdan alındıktan başka, vücutta 7-dehidrokolesterolden sentez edilir. 7-dehidrokolesterolün ciltte D<sub>3</sub> vitaminine dönüşümü, kişinin güneş ışığına maruz kalma derecesi ile orantılı bir şekilde artar (Kayaalp 2012). Dolayısı ile güneş ışığındaki mevsimsel değişimlere, giyilen giysilerin miktarına, derideki pigmentasyonun derecesine ve diğer faktörlere bağlıdır (Burtis ve Ashwood 2005). Dünyanın tropikal ve subtropikal bölgeleri dışında kalan, görece az güneş ışığı alan bölgelerinde yaşayanlarda bu dönüşüm yeterli derecede olmayabilir, bu bölgelerde meslek ve sosyal durumu nedeniyle gündüz vaktini kapalı yerlerde geçirenlerde dönüşüm özellikle yetersiz derecededir ve bu gibi kimseler diyetine ilave D vitamini almalıdırlar.

Cildi beyaz kimselerde epiderminin içinde ultraviyole ışınlarının geçişi daha fazla olur ve dönüşüm daha hızlıdır, melezlerde, siyah derililerde, güneşte esmerleşmiş olan beyaz derililerde ve ırksal özellik nedeniyle cildi kalın olanlarda 7-dehidrokolesterol'un D<sub>3</sub> vitaminine dönüşümü yavaş olur. Melanin ultraviyole ışınlarını absorbe ettiğinden dönüşümü azaltır. Sözü edilen durumlar ergosterolün D<sub>2</sub> vitaminine dönüşümü için de geçerlidir. Ortalama bir değer vermek gerekirse, cildi beyaz kimselerde günde ciltte oluşan D<sub>3</sub> vitamini miktarı 200 üniteden daha fazladır. Bir "minimal" eritem dozunda UV ışını uygulanan insanlardan beyaz derili olanlarda serum D vitamini konsantrasyonunun 60 kata kadar arttığı; fakat siyah derililerde belirgin bir artış olmadığı görülmüştür (Kayaalp 2012).

Yağlı balıklar, yumurta ve tereyağı gibi hayvansal besinlerde bulunan D<sub>3</sub> vitamininin miktarı ve tüketimi değişiklik gösterir. Bu nedenle yeterli miktarda alınabilmesi için besin maddelerine yaygın şekilde eklenir. Amerika Birleşik Devletleri'nde diyet ile alınan kalsiyumun yaklaşık % 75 kadarını sağlayan süt ürünleri, kemik gelişmesi için yeterli kalsiyum / fosfor oranının en uygun seviyeye yakın olmasını sağlamaktadır. Yeterli D vitamini sağlanması için süt ve bebek formüllerinin yeterli olduklarına karar verilmiştir. D vitamininin her galonuna (ABD için 1 galon: ~3.78 litre) rutin olarak 40 µg (1600 IU) ilave edilen süt piyasada satılmaktadır (Burtis ve Ashwood 2005).

D<sub>3</sub> (veya D<sub>2</sub>) vitamini, diyetten gelip bağırsaktan miçeller içinde emildikten ve doğrudan şilomikronlara bağlandıktan sonra (Burtis ve Ashwood 2005) lenfatiklerle taşınır. Dolaşımında, özgül bir globülin olan D vitamini bağlayıcı proteine (transkalsiferin) bağlı haldedir (Rodwell ve ark. 2015). Bu taşıyıcı proteinin yarılanma ömürleri 3 - 4 hafta kadardır. Kanda en fazla bulunan biçimi karaciğerde oluşan 25OHD vitamini metabolitidir, bunun yarılanma ömrü 19 gün, 1,25(OH)<sub>2</sub>D metabolitinki ise 3 - 5 gün kadardır. D vitaminleri oldukça lipofilik maddelerdir, karaciğerde ve yağ dokusunda birikirler. Buradaki vitamin stoku rezervuar görevi yapar. Günlük vitamin alımındaki eksiklik veya yokluk; bu rezervuar sayesinde altı aya kadar telafi edilebilir (Kayaalp 2012).

D<sub>3</sub> vitamini karaciğer tarafından alınır ve ER içinde yer alan bir enzim olan D vitamini-25-hidroksilaz ile 25.pozisyonunda hidroksillenir. 25OHD vitamini (kalsidiol), dolaşımdaki D vitamininin ana formu olup, esas olarak yağ dokusu ile iskelet kasında depolandığı bildirilmiş olmasına karşın karaciğerdeki temel

depolanma formudur. 25OHD vitamininin önemli bir bölümü enterohepatik dolaşıma katılır ve bu olaydaki bozulmalar D vitamini eksikliğine yol açabilir (Rodwell ve ark. 2015).

25OHD<sub>3</sub> vitamini oluşumu sıkı bir kontrol altında değildir ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sentezinde hız kısıtlayıcı basamağı teşkil etmez. Dolaşımda 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesi, substrat seviyesine yani vücuda D vitamini girişine ve vücutta oluşumuna bağlıdır. Cildin fazla ışınlanması veya ağızdan fazla D vitamini alınması sonucu 25OHD vitaminli metabolit seviyesi artar. Bu nedenle fazla D vitamini alındığında kolekalsiferol (ve kalsiferol)'un metabolize edilmesi yavaşladığından ciltte ve plazmada birikir. D vitaminlerinin 25OHD vitamini türevi D vitamini bağlayan proteine en fazla afinite gösteren türev olması nedeniyle, kanda en fazla bulunan metabolittir (Kayaalp 2012).

Böbrek proksimal tübüleri, kemik ve plasentada 25OHD vitamini, mitokondriyal bir enzim olan 25OHD-1 $\alpha$ -hidroksilaz tarafından ve kofaktör olarak moleküler O<sub>2</sub> ve NADPH gereksinen reaksiyonla (Lieberman ve ark. 2013) 1.pozisyonunda daha ileri hidroksilasyona uğratılır. Çıkan ürün, en güçlü D vitamini metaboliti olan 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>D vitamindir (kalsitriol) (Rodwell ve ark. 2015). İnsanda bu son metabolitin plazmadaki konsantrasyonu 25OHD vitamini metabolitinkinin yaklaşık binde biri kadardır. 1 $\alpha$ -hidroksilaz, böbrek dışında, plasenta, desidua, cilt ve granulatöz dokuda ve makrofajlarda bulunur. Bu dönüşüm etkin hormon sentezinde hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur ve çeşitli düzenleyici faktörler tarafından etkilenir. Bu enzim etkinliğinin ana düzenleyicisi paratiroid hormonu (PTH: *Parathyroid hormone*) ve enzimin substratı olan 25OHD vitamindir. Adı geçen enzim, PTH tarafından eğer hipokalsemi varsa daima indüklenir; hiperkalsemi varsa bazen indüklenme olmaz. Hipokalsemi 1,25(OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> oluşumunu hem direkt etkisiyle hem de PTH aracılığıyla artırır. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ise enzimi son ürün inhibisyonu olayı ile inhibe eder. Ayrıca 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> paratiroid hücrelerinde kendine özgü reseptörleri aktive ederek PTH salgılanmasını baskılar ve böylece de kendi sentezini düzenler. Diğer bir düzenleyici faktör fosfattır. Hipofosfatemi, 1 $\alpha$ -hidroksilazı indükler; hiperfosfatemi ise inhibe eder. Fosfatın enzim üzerindeki etkisi direktir; paratiroid bezinin yokluğunda bile, fosfat yüklenmesi enzimi inhibe eder. Adı geçen enzim, kalsitonin tarafından etkilenmez veya zayıf şekilde inhibe edilebilir (Kayaalp 2012).

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> etki yönünden 25OHD<sub>3</sub> vitamininden 100 kat daha güçlü iken kanda 25OHD<sub>3</sub> vitamini daha büyük bir derişime ulaşabilir ve bu da bunun kalsiyum ve fosfor metabolizmasında bazı roller oynayabildiğini telkin eder.

Büyüme hormonu ve prolaktin 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> sentezini stimüle eder. Büyüme, gebelik ve laktasyon sırasında artmış olan etkin D vitamini gereksinimi esas mekanizma ile karşılanır, Estrojenler karaciğerde D vitamini bağlayan protein sentezini ve dolayısıyla plazma seviyesini artırarak 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seviyesini arttırırlar; 1α-hidroksilaza dokunmazlar (Kayaalp 2012).

1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün yarılanma ömrü ortalama 3 - 5 gün kadardır. Yağ dokusunda birikme eğilimi göstermez. Böbrekte 25OHD<sub>3</sub> kısmen 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'e dönüşür. Bunun kalsiyotropik etkinliği düşüktür ve plazmadaki konsantrasyonu 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'kinin 100 katıdır ve fizyolojik önemi tartışmalıdır. Bununla birlikte kemiklerdeki bazı anabolik olayların (tavşanlarda kondrositlerde prologlikan sentezi gibi), 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'e, 1,25(OH)<sub>2</sub>D türevine oranla çok daha duyarlı olduğu görülmüştür. Böbrek osteodistrofi olgularında gelişen osteomalazinin sadece, 1,25(OH)<sub>2</sub>D türevi ile tedavi edilemediği, bununla birlikte, 24,25(OH)<sub>2</sub> türevinin verilmesinin de gerektiği bildirilmiştir.

Karaciğer ve böbreklerin D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> vitamininin biyoaktivasyonundaki önemi nedeniyle, ağır karaciğer veya böbrek yetmezliği olgularında D vitamini eksikliğine bağlı osteomalazi ve diğer Ca<sup>+2</sup> metabolizma bozuklukları oluşur. Normal durumda bu organlardan bozuk olanında oluşan 1α-OH, 25OHD vitamini metabolitleri ve son ürün olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ilaç olarak sentezle hazırlanmıştır; adı geçen yetmezlik hallerinde doğal D vitaminlerinin etkinliği azaldığından onlar yerine bu sentetik ilaçlar kullanılır. Örneğin böbrek osteodistrofi veya hipoparatiroidizm olgularında ilaç olarak 1α-OH grubu katılmış olan türevler tercih edilir (Kayaalp 2012).

Normal kimselerde kan dolaşımında 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> seviyesi 20 - 50 pg/ml kadardır, esas kalsiyotropik hormon olarak kabul edilen bu madde barsaktan kalsiyum absorpsiyonunu artırıcı etkisi bakımından 25OHD<sub>3</sub> vitamininden gravimetrik olarak yaklaşık 100 kez daha güçlüdür. Fakat daha fazla sentez edilen ve yarılanma ömrü daha uzun olan 25OHD<sub>3</sub> vitamini kanda 1,000 kez daha yüksek konsantrasyonda bulunduğundan, bu metabolit D vitamini metabolitlerinin fizyolojik total kalsiyotropik etkinliğinde önemli bir paya sahiptir. Biyoessey için civcivlerde

yapılan deneylerde,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  verildiğinde kalsiyum metabolizması üzerindeki etkisinin iki saatte başladığı ve yaklaşık sekiz saatte maksimuma eriştiği saptanmıştır.  $25\text{OHD}$  vitamini türevi verildiğinde ise; etki 6 - 8 saatten önce başlamaz ve maksimuma erişmesi için 1,5 - 2 gün geçmesi gerekir. Vurgulanması gereken önemli bir nokta, yukarıda sadece  $\text{D}_3$  vitamini için belirtilen dönüşümlere, aynı yerlerde ve aynı şekilde  $\text{D}_2$  vitaminininde uğramasıdır (Kayaalp 2012).

Yakın zamana kadar, adı geçen  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün üretiminin böbrekte gerçekleştiği sanılırdı. Son zamanlarda bazı durumlarda böbrek dışında yani ektopik bir şekilde plasentada, desidua'da granülatöz dokuda, aktive edilmiş makrofajlarda (sarkoidoz ve tüberküloz olgularının az bir kısmında olduğu gibi) ve ciltte keratinositlerde  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  sentez edildiği bildirilmiştir. Bu olayın adı geçen durumlarda etkin metabolit seviyesindeki artışa katkısı vardır.

D vitaminleri ve metabolitleri, steroidler gibi karaciğerde hidroksillenmek ve konjüge edilmek suretiyle inaktive edilirler. Bu olayda karaciğerin mikrozomal sitokrom P450 enzim türleri kısmen rol oynarlar.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün yarılanma ömrü 3 - 5 gün kadardır. D vitamini metabolitlerinin büyük kısmı safra içinde atılırlar ve enterohepatik dolaşıma girerler. Fenitoin ve fenobarbital gibi epilepsili hastalarda uzun süre kullanılan ilaçlar, bu enzimleri indükleyip D vitamini ile onun etkin metabolitinin inaktivasyonunu hızlandırdıkları için göreceli D vitamini yetersizliği oluşturabilirler. Bu ilaçları alanlarda karaciğerde  $25\text{OHD}$  vitaminlerinin oluşumu da azalır. Bir tüberküloz ilacı olan izoniazid ise D vitamininin akut hidroksilli türevlerine dönüşmesini inhibe eder. Bu nedenle izoniazid alanlara profilaktik dozda D vitamini verilmelidir (Kayaalp 2012).

D vitamininin aktif metabolitlerini özellikli olarak yüksek afiniteli bir şekilde bağlayan ve onun hedef hücrelerdeki etkisine aracılık eden D vitamini reseptörleri barsak epiteli, böbrek tubulus hücreleri ve kemik hücreleri gibi hedef hücrelerde sitoplazma ve çekirdek içinde bulunmuştur. Bunlar steroid ve tiroid hormon reseptörlerine özellikleri bakımından benzer. Aktif D vitamini molekülünün sitosolik reseptörle kombinasyonu sonucu oluşan kompleks çekirdeğe geçer ve orada özel genleri aktive ederek, özel mRNA'ların sentezini artırır; böylece hücrelerde D vitamini etkisi için gerekli proteinlerin (barsakta kalsiyum bağlayan protein gibi) ve enzimlerin sentezi artırılır. Tritiyumlanmış  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  vitamini ilk işaretlemeden

sonra memeli barsak mukozasındandaki sitoplazmik VDR kısmen saflaştırılmış ve 55 kilodalton molekül ağırlığında bir protein olduğu saptanmıştır (Kayaalp 2012).

D vitamini preparatlarının etkinliği eskiden biyoessey yoluyla saptanırdı ve miktarı ünite olarak belirtilirdi. Bugün vitamin miktarının ünite olarak belirtilmesine devam edilmekle beraber etkinliğin saptanması biyoessey değil, kimyasal yöntemlerle miktar ölçümü yapılmaktadır. Biyoesseyde denek olarak, D vitamininden yoksun diyetle beslenen civcivler kullanılır ve etkinliği araştırılacak preparatın, intragastrik verilen <sup>45</sup>Ca radyoizotopunun plazma seviyesi veya barsaktan absorpsiyon hızı üzerindeki etkisi ölçülür. Son zamanlarda embriyonik kemik dokusundan hazırlanan hücre kültürlerinde, hormonun kalsiyum mobilize edici etkisine dayanan invitro biyoessey testi geliştirilmiştir. Kemiklerde osteoid dokunun kalsifikasyon hızı da bir gösterge olarak değerlendirilebilir. Biyoesseyle D vitamini miktarını belirtmek için kullanılan 1 internasyonal ünite (IU: *International unit*), 25 ng D<sub>3</sub> vitaminine eşdeğerdir (Kayaalp 2012).

D vitamini eksikliği oluşmaması için 1 - 12 yaş çocukların günde 1,000 - 2,000 IU ve 13 yaş üzeri günde 1,500 - 2,000 IU, obez bireylerin ise normal bireylere göre en az 2 - 3 kat daha fazla günlük D vitamini alması önerilmektedir (Holick 2010).

25OHD vitamini seviyesi <20 ng/mL eksiklik, 20 - 29 ng/mL yetersizlik, 40 - 60 ng/mL ideal, 150 ng/ml ise toksik D vitamini seviyesi olarak tanımlanmıştır. Vitamin eksikliğinde ise 8 hafta boyunca 50,000 IU D vitamini haftada bir alınması, sonrasında her 2 - 4 haftada bir 50,000 IU D vitamini alınması tedaviyi oluşturmaktadır (Holick 2010).

### 2.2.1. D vitamininin Görevleri

D vitamininin etkilerine nükleer/sitoplazmik VDR aracılık eder. Steroid/tiroid hormon reseptör ailesinin bir üyesi olan VDR birçok genin transkripsiyonunu aktive eder. VDR'nin farklı doku tipinde farklı dağılımı vardır (Haussler ve ark. 2008).

D vitamini VDR'ye bağlanınca retinoid x reseptörü (RXR: *Retinoid x receptor*) ile dimerizasyon olur ve D vitamini yanıt elemanı bölgesine bağlanarak etkisini gen seviyesinde gösterir (Jones ve ark. 1998).



D vitamininin en önemli iki görevinden biri vücutta kalsiyum ve fosfat tutulmasını sağlayıp bunların kan seviyesini yükseltmek, ikincisi de tutulan bu iki iyonun kandan kemik matriksine geçmesini sağlamaktır (Kayaalp 2012).

D vitamini, bu ana görevi başlıca üç hedef yapıyı etkilemek suretiyle yapar:

1- *Barsaktan Kalsiyum ve Fosfat Absorpsiyonu:* D vitamini ve onun aktif metabolitleri ince barsak epitelinden  $Ca^{+2}$  absorpsiyonunu artırır. Daha ufak ölçüde olmak üzere fosfat ve magnezyum absorpsiyonunu da artırır.  $Ca^{+2}$ , ince barsak hücresine apikal membrandaki özgül  $Ca^{+2}$  kanallarından girer. Elektriksel olarak hücre içi lumene göre daha negatiftir ve bu şekilde oluşan elektrokimyasal gradient girişi kolaylaştırır. Daha az miktarda  $Ca^{+2}$ , barsak epitel tabakasını, hücreler arasındaki aralıktan geçerek (paraselüler) aşar. Proksimal duodenumda absorpsiyon akut transportla olur.  $Ca^{+2}$ 'nin mukoza epitel hücrelerinde taşınması hücre membranında ve sitoplazmada yerleşmiş bulunan ve intestinal kalbindin diye adlandırılan özel transportör moleküllerin yardımı ile olur. D vitamini eksikliğinde hücrede kalbindin azalır ve absorpsiyon yavaşlar (Kayaalp 2012). D vitamini varlığında diyetdeki kalsiyumun % 30 - 40'ı emilirken D vitamini yetersizliğinde kalsiyumun % 10 - 15'i emilir (Holick 2010; Lee ve ark. 2008).

$Ca^{+2}$  sitoplazma içinden geçerek epitel hücrelerinin bazolateral membranında yerleşmiş olan  $Ca^{+2}$  pompası ( $Ca^{+2}$  ye bağımlı ATPaz) tarafından kapillerler içine aktarılır (Kayaalp 2012).

D vitamininin aktif hormon şekli olan  $1,25(OH)_2D_3$ , bu etkisini, epitel hücresinde VDR'yi aktive ederek ve böylece hücre çekirdeğindeki spesifik bir genin transkripsiyonunu artırarak hücrede kalbindin ve  $Ca^{+2}$  pompası ekspresyonunu stimüle etmek suretiyle yapar. Hücrede kalbindin seviyesindeki artış 2 saat gecikmeyle başlar. D vitamini ayrıca hemen başlayan non-genomik etkisiyle barsak epitelinin kalsiyum kanallarını açar ve  $Ca^{+2}$ 'a permeabiliteyi artırır. D vitamini, yukarıda belirtildiği gibi, barsaktan fosfat ve magnezyum absorpsiyonunu da artırır (Kayaalp 2012).

$1,25(OH)_2D_3$ 'ün barsak mukoza epiteli üzerindeki  $Ca^{+2}$  absorpsiyonunu artırıcı etkisi glukokortikoidler tarafından inhibe edilirken diğer taraftan büyüme hormonu tarafından kolaylaştırılır. Fenitoin ve diğer bazı ilaçlar da inhibisyon yapar (Kayaalp 2012).

2- *Kemikler*: D vitamininin antirazitik etkisi, D vitamini uygulanmış hayvanlarda osteoid dokuda kalsiyum birikmesini (kalsifikasyonu veya mineralizasyonu), artırması olayı ile değerlendirilir. D vitamininin kemiklerde kalsifikasyonu artırması bir görüşe göre, kalsiyum ve fosfatın barsaktan absorpsiyonunu artırması sonucu kemiğin, ekstraselüler sıvısında bu substratların seviyesinin artırmasına bağlıdır. Diğer bir görüşe göre, D vitamini bu şekildeki etkisine ilave olarak, daha önce oluşmuş kemik dokusunda dokunun rezorpsiyonunu artırır ve oradaki kalsiyumun mobilizasyonuna neden olur. Kemik dokusu kemiğin neresinde olursa olsun, bir taraftan yıkılırken, öbür taraftan yeniden oluşur (remodelling). Bu olay, vitaminin, direkt etkisine bağlıdır ve PTH'dan bağımsız bir şekilde meydana gelir. Ancak bu hormon D vitaminine bağımlıdır. D vitamini eksikliğinde hormon, kalsiyum mobilizasyonu yapamaz. Öte yandan, yıkımın artışı vücut sıvılarının kalsiyum seviyesini yükseltir. Bu durum gelişmekte olan kimselerde epifiz plağında, yeni kemik oluşumunu ve mineralizasyonu hızlandırır. Başka bir deyişle D vitamini, eskimiş kemik dokusundan mobilize edilen kalsiyum ve fosfat iyonunun, yeni kemik oluşan bölgeye aktarılmasına olanak verir. Böylece, büyüyenlerde yeni kemik yapımını hızlandırır, büyümesini tamamlayan erişkinlerde ise eski kemik dokusunun yenilenme veya turnover hızını artırır (Kayaalp 2012).

Dışardan yüksek dozda D vitamini verildiğinde yani vitaminin vücuttaki farmakolojik (suprafizyolojik) konsantrasyonlarında, kemiklerden kalsiyum mobilizasyonu dengelenemeyecek derecede hızlanır hiperkalsemi gelişir ve vitamin verilmeye uzun süre devam edilirse, kemiklerde belirgin bir osteoporoz oluşur (Kayaalp 2012).

1,25(OH)<sub>2</sub> D'nin kemik rezorpsiyonunu artırmasının mekanizması tam olarak belli değildir. Otoradyografik incelemeler osteoklastlarda D vitamini reseptörlerinin bulunmadığını göstermiştir. Osteoblastlarda ve osteoklastların öncülü olan, kanda dolaşan monositlerde ise reseptör vardır. D vitamini, olağan konsantrasyon seviyesinde osteoklastları stimüle etmez; fakat onların öncülü olan monositlerin birkaçının füzyon sonucu, multinükleer osteoklastlara dönüşümünü stimüle eder. Böylece kemik dokusunda osteoklastların sayısını yükselterek onların etkinliğini artırır. Ancak yüksek dozdaki 1,25(OH)<sub>2</sub> D'nin osteoklastları stimüle edebildiği bazı durumlarda gösterilmiştir. D vitamini eksikliğinde temel bozukluk, kemiklerde mineralizasyonun azalmasıdır. Bir görüşe göre 1,25(OH)<sub>2</sub>D vitamini ve PTH, kemik rezorpsiyonunu düzenler, fakat kemik mineralizasyonu bu hormonlar tarafından

direkt etkilenmez. Şöyle ki; mineralizasyon, ekstraselüler sıvıdaki “kalsiyum konsantrasyonu x fosfat konsantrasyonu” çarpımı ile orantılı bir şekilde pasif olarak gelişir. D vitamini eksikliği olan kimselerde damar yolu ile kalsiyum ve fosfat verilmesinin de remineralizasyon yapması, bu görüşü desteklerse de bu şekildeki remineralizasyon yer yer ve düzensiz olur, geç gelişir ve D vitamininin yaptığından farklıdır (Kayaalp 2012).

D vitamininin anabolik etkisi de vardır; böylece kemik protein matriksinin yapımından sorumlu osteoblastları aktive eder; bu hücrelerde K vitaminine bağımlı bir protein olan osteokalsinin sentezini stimüle eder (Kayaalp 2012).

3- *Böbrekler:*  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , ultrafiltrattaki  $\text{Ca}^{+2}$  ve fosfatın tubulus hücreleri tarafından reabsorpsiyonunu direkt etkisiyle artırır. Böylece kalsiyum ve fosfat itrahını azaltır. Öte yandan D vitamininin oluşturduğu hiperkalsemi paratroid hormon salgısını azaltarak indirekt yoldan  $\text{Ca}^{+2}$  reabsorpsiyonunu azaltmaya çalışır, bu durum, fosfat reabsorpsiyonu üzerindeki direkt etkiyi ise pekiştirir.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün kalsiyum metabolizması üzerindeki genel tesirine en az katkıda bulunan, böbrek üzerindeki etkisidir (Kayaalp 2012).

Düzenleyici etkileri:  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , kendi biyosentezi üzerinde negatif feedback inhibitör etki yapar. Proksimal tubulus hücrelerinde  $1\alpha$ -hidroksilaz etkinliğini inhibe eder, fakat karaciğerdeki 25OHD vitamini etkinliğini stimüle eder. Paratiroid bezinde PTH biyosentezini ve salıverilmesini inhibe eder. Bu olay böbrek yetmezliğinde gelişen paratiroid hiperplazisinde katkıda bulunabilir (Kayaalp 2012).

Non-kalsiyotropik etkileri: D vitamini ve aktif metabolitlerinin, kalsiyum homeostazı dışında kalan, hücre proliferasyonu ve farklılaşması, hücrel ve humoral immunité ve diğer bazı olaylarla ilgili etkileri de vardır. Hemotopoietik ana hücrelerin farklılaşması ve olgunlaşmasında rol oynayabilirler; proliferasyonlarını azaltabilirler. Raşitizmde anemi olması, kemik iliğinin selülaritesinin azalması, nötrofillerin yaptığı fagositozun azalması ve enfeksiyon sıklığının artışı söz konusu etkilerin varlığını doğrular. D vitamini verilmesi raşitizmin bu belirtilerini de düzeltir. Hücre kültürlerinde promyelositlerin, monositlere farklılaşmasını stimüle ettiği bulunmuştur. Monositler osteoklastların prekürsörüdür. D vitamini; osteoklast oluşturmak üzere, monositlerin füzyonunu kolaylaştırabilir. Bazı lösemik hücre kültürlerinde ve diğer birçok maliyn hücre türlerinde  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , reseptörleri bulunur; yüksek konsantrasyondaki D vitamininin, bu hücrelerin kültürlerinde hücre

çoğalmasını baskıladığı saptanmıştır (Kayaalp 2012). Ayrıca radyoaktif  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  kullanılarak yapılan araştırmalar barsak villus ve kripta hücreleri, osteoblastlar ve distal böbrek tübül hücrelerinin çekirdeklerinde yerleştiğini göstermiştir. Derinin malpighi katmanındaki hücreler, pankreas adacık hücreleri, bazı beyin hücreleri, hipofiz, ovaryum, testis, plasenta, uterus, meme bezi ve timustaki bazı hücreler ve miyeloid öncülleri dâhil daha önce hedef olduklarından kuşkulanılmamış hücrelerde de bu hormonun çekirdekte birikimi görölmektedir (Rodwell ve ark. 2015).

Psöriyazis gibi, epidermisteki keratinositlerin aşırı proliferasyonuna ve fonksiyonlarının bozulmasına bağlı bir cilt hastalığında bölgesel  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , merhemi uygulanması lezyonlarda düzelme yapar. Bu hastalıkta plazmada  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , seviyesi normalden daha düşük bulunmuştur. Ciltte keratinositlerde ve fibroblastlarda  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ , reseptörünün varlığı gösterilmiştir. Belirtilen bulgulara dayanarak,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün, kalsiyotropik hormon işlevi yanında, normal gelişmeye katkısı olan bir gelişme hormonu işlevi de yaptığı varsayımlanmıştır. Yukarıda belirtilen etkiler yüksek dozdaki ilaçla meydana geldiğinden ve buna hiperkalsemi eşlik ettiğinden, kalsitriolün fazla hiperkalsemi yapmaksızın hücre proliferasyonunu baskılayabilen yeni türevlerinin yapılmasına çalışılmaktadır.  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e dirençli kimselerde total alopesi oluşmasına dayanarak, bu hormonun kıl foliküllerinin gelişmesinde ve olgunlaşmasında da rolü olabileceği ileri sürölmüştür (Kayaalp 2012).

**D vitamini eksikliği:** Bu vitaminin eksikliği halinde, bebeklerde ve büyüme çağında olan çocuklarda raşitizm (rickets) ve erişkinlerde osteomalazi denilen hastalık ortaya çıkar (Kayaalp 2012).

#### *D Vitamini Eksikliği Sendromu Üç Dönemde Oluşur:*

1- Birinci dönemde hipokalsemi gelişir, buna bağlı olarak PTH salgısı artar. Plazma fosfat seviyesi normaldir. Kemiklerde ancak radyolojik olarak saptanabilen hafif demineralizasyon hali vardır (Kayaalp 2012).

2- İkinci dönemde kalsemi normal seviyeye çıkar, fakat fosfat seviyesi düşmüştür. Aminoasidüri vardır. Plazmada PTH seviyesi daha da yükselmiştir. Bu dönemde dışardan verilen ilave hormona kemikler yanıt verir ve hiperkalsemi oluşur. Kemiklerde belirgin raşitizm veya osteomalazi belirtileri ortaya çıkar. Hidroksiprolin

içeren peptid parçalarının idrarla itrahi normal seviyededir veya hafif artmıştır (Kayaalp 2012).

3- Üçüncü dönemde kalıcı hipokalsemi gelişir; plazma fosfat seviyesindeki azalma daha belirginleşir. PTH konsantrasyonu daha da artar. Dışarıdan verilen hormon hipokalsemiyi yükseltmez. Kemiklerin büyümesi ve yenilenmesi durmuştur. Demineralizasyon çok belirgindir. Bütün bu dönemler boyunca plazmada alkalın fosfataz seviyesi yükselmiştir. Zamanla paratiroid bezlerde hipertrofi gelişir; hormon seviyesi vücut sıvılarında fazla yükseldiği halde, kemiklerde mobilizasyona uğrayacak kalsiyum fosfat kalmadığından kalsemi ve fosfatemi düşük seviyede kalır. Bu hastalarda D vitamini tedavisi uygulandığında başlangıçta birkaç gün süreyle plazma kalsiyum ve fosfat seviyesi daha da düşer ondan sonra artışa başlayarak normal seviyeye çıkar. Kalsiyumun barsaktan absorpsiyon hızındaki azalma çabuk bir şekilde normale döner (Kayaalp 2012).

Raşitizmin veya osteomalazinin, seyrek görülen D vitaminine dirençli tipleri de vardır. Bunların bir grubu kalıtsaldır. Kalıtsal nitelikteki raşitizmin bir türü X - kromozomu ile ilişkili, dominant, D vitaminine dirençli raşitizm (hipofosfatemik raşitizm)'dir. Bu durum yüksek dozda D vitamini (günde 50,000 - 250,000 IU) ve oral fosfat (günde 1 - 3 g) ile tedavi edilir. Bu durumda kalsitriolün fizyolojik dozları daha az etkilidir. Diğer bir tipi otozomal resesif D vitaminine bağımlı tip I raşitizmdir: Bu durumda D vitamininin biyoaktivasyonundaki defekte bağılı olarak kalsitriol sentezi bozulmuştur. Fizyolojik doz da verilen kalsitriol (günde 1 - 2 µg) ile tedavi edilir. Üçüncü bir kalıtsal raşitizm türü otozomal resesif tip II raşitizm'dir; Bu, yüksek dozdaki D vitaminine veya kalsitriol'a yanıt vermez. Çünkü hedef hücrelerde kalsitriol reseptörlerinde azalma vardır (Kayaalp 2012).

D vitaminine dirençli hastalığın kalıtsal olmayan tipi kronik böbrek yetmezliği olgularında gelişen böbrek osteodistrofisisidir. Sözü edilen hastalar, dışarıdan yeterli miktarda D vitamini alsalar bile, onu böbrekte 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> vitamini yeterli miktarda dönüştüremezler. Sonuçta hipokalsemi, sekonder hiperparatiroidizm ve kemiklerde D vitamini eksikliğine bağılı kronik bozukluklar (osteomalazi) ve/veya kistik fibröz osteitte görülene benzer bozukluklar ortaya çıkar. Diyalizle tedavi edilen son dönem böbrek yetmezliği olgularında kemik bozukluğu, olguların % 50 - 80'inde bulunmuştur. 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> bağlanması paratiroid hücrelerinde de görülmüş olup bu olay, bunların, PTH metabolizmasına katılabileceği yönünde şaşırtıcı bir olasılığa yol açmıştır (Kayaalp 2012).

D vitamini safra asitlerinin ikincil türevleri olan ürünleri ile ilgili LCA ve ksenobiyotiklerin metabolik dönüşümünü katalize eden sitokrom P450 enziminin (CYP3A: Cytochrome P450, family 3, subfamily A) VDR'nin bir hedef geni olduğunu göstermiştir (Jiang ve ark. 2006).

### 2.2.2. Güncel Yönleriyle D vitamininin Hastalıklarla İlişkisi

D vitamininin immuniteye etkisi, hem antimikrobiyal fonksiyonları destekleyerek hem de enflamatuar aktiviteyi baskılayarak olur. D vitamininin immun regülasyondaki önemi giderek artmaktadır. 25OHD vitamininin 1 $\alpha$ -hidroksilasyonu, beyin, meme, kolon, prostat ve inflamasyon bölgesindeki immün sistem hücreleri gibi böbrek dışı bölgelerde de gerçekleşir. Lokal olarak sentezlenen 25OHD vitamini parakrin etkiyle immün cevabı düzenler. 25OHD vitamini, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve aktive T ve B hücreleri gibi immün sistem hücreleri dâhil çoğu hücre tipinde yer alan nükleer VDR'lere bağlanır (Dimeloe ve ark. 2010).

Ekvatorдан uzaklaştıkça, bazı kanser riskinde ve insidansında artış gözlemlenmiştir (Garland ve ark. 2006). Ayrıca yaz aylarında tanı alan kanserlerin, sağ kalımlarının daha da iyi olduğu gösterilmiştir (Lim ve ark. 2006) Kanser gelişme riskinin artışının ve daha yüksek enlemlerde daha kötü prognoza sahip olmasının en olası açıklaması güneşe maruziyetin azalması sonucu oluşan D vitamini eksikliğidir. D vitamininin kansere karşı koruyucu etkisini, hem anti-proliferatif etkiyle hem de hücrelerin differansiyasyonunu düzenleyerek gösterdiği düşünülmektedir. D vitamini aynı zamanda tümörün yayılımını kolaylaştıran telomeraz ekspresyonunu, apoptozisi ve anjiyogenezi inhibe etmektedir (Deeb ve ark. 2007).

Doğal güneş ışınlarına maruz kalma ile kanserden ölüm oranları arasındaki ters ilişki olduğunu, bu kanserin ise non-hodgkin lenfoma ve multiple miyelomanın yanı sıra, meme, rektum, yumurtalık, prostat, mide, mesane, yemek borusu, böbrek, akciğer, pankreas ve uterus kanserleri olduğu bildirilmiştir. Ayrıca D vitamini seviyesinin artışı ile kolon kanseri riskinde % 50, azalış tespit edilmiştir (Lappe ve ark. 2007).

D vitamini eksikliği ile insülin rezistansına, hipertansiyona, vasküler kalsifikasyona, inflamasyona ve sol ventriküler hipertrofi gibi kardiyak risklere yatkınlığın arttığı bulunmuştur. Aynı zamanda D vitamini eksikliği konjestif kalp

yetmezliğinin insidansında ve kalp yetmezliği mortalitesindeki artışla ilişkili bulunmuştur (Lee ve ark. 2008).

Framingham Offspring alıřmasında, D vitamini seviyesi en dūřuk çeyrekte olan hastalarla, D vitamini seviyesi en yūksek çeyrekte olan hastalar karřılařtırıldıđında; en yūksek çeyrekte olanlarda tip 2 diyabet insidansında % 40 azalıř tespit edilmiřtir (Liu ve ark. 2010).

D vitamininin biyolojik aktif formu olan 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin yarılanma mrū az olduđu için 1,25(OH)<sub>2</sub>D ideal ölüm için uygun deđildir. Kiřide D vitamini seviyesinin normal, eksik veya fazla olduđunu anlamak için yarılanma mrū daha uzun olan 25OHD vitamini seviyesine bakılmalıdır. 25OHD vitamini seviyesi hem D vitamini alımını ve hem de endojen yapımını göstermektedir. Ayrıca D vitamini ölümünde altın standart olarak kabul edilen en ideal yöntem Sıvı kromatografisi - Kūtle spektrometresi / Kūtle spektrometresi (LC – MS / MS: *Liquid chromatography - Mass spectrometry / Mass spectrometry*) kabul edilmektedir. LC – MS / MS yöntemi aynı anda 25OHD<sub>2</sub> ve 25OHD<sub>3</sub> vitaminlerini eř zamanlı olarak ölüp, toplam 25OHD vitamini sonucunu verebilmektedir (Fraser ve Milan 2013).

### 2.3. Serbest Radikaller

Radikaller, dıř orbitallerinde paylařılmamıř elektron içeren kimyasal tūrlerdir. Böyle bir kimyasal tūr basit bir atom ya da kompleks yapılı bir organik molekūl olabilir. Her tūrden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dıř orbitallerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleřir. Dıř orbitallerde paylařılmamıř elektron bulunması söz konusu kimyasal tūrūn reaktivitesini olađanūstū arttırdıđı için, radikaller reaktivitesi çok yūksek olan kimyasal tūrlerdir. Elementlerin bir kısmı, atomik yapılarında paylařılmamıř elektron içerdiklerinden, dođada atomları řeklinde deđil; molekūller řeklinde bulunurlar. Örneđin hidrojen, karbon, nitrojen, oksijen ve diđer bazı elementler dođada atomları řeklinde serbest bulunmazlar. Asalgazlar (soygazlar) gibi elementlerde ise ierebildikleri būtūn orbitalleri elektronlarla doyurulduđu için serbest atom řeklinde bulunabilirler ve reaktiviteleri yoktur. Kimyasal olarak radikal yapısına sahip olan tūrlar, paylařılmamıř elektron içeren atom üzerine konulan nokta (X•) ile belirtilmektedir (Kılınç ve Kılınç 2002).

İçinde bulunduğumuz çevrede çeşitli fiziksel etkenler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Hūresel koşullarda da ciddi bir miktar

ve çeşitlilikte radikaller üretilmektedir. Nerede ve nasıl üretildiklerine bakılmaksızın, radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Kılınç ve Kılınç 2002).

1. *Kovalent Bağların Homolitik Kırılması*: Yüksek enerjili elektromanyetik dalgalar ve yüksek sıcaklık (500 - 600 °C) kimyasal bağların kırılmasına neden olur. Kırılma sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu tür kırılmaya homolitik kırılma denir ve her iki atom üzerinde de paylaşılmamış elektron kalır. Organik moleküllerdeki bağların heterolitik kırılması durumunda zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.

2. *Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi*: Radikal özelliği bulunmayan bir molekülden elektron kaybı sırasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyorsa, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, glutatyon ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücrel antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur. Glutatyon (GSH) radikalleri indirgerken, kendisinin tiyil radikali (GS•) oluşur. İki tiyil radikalinin birbiriyle tepkimesi sonucu oluşan tür ise glutatyonun oksitlenmiş (GSSG) formudur.

3. *Normal Bir Moleküle Elektron Transferi*: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde paylaşılmamış elektron oluşturuluyorsa, bu tür indirgenme radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin ( $O_2^{\bullet-}$ ) oluşumuna neden olur (Kılınç ve Kılınç 2002).

Oksijen bulunan bir ortamda çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenlerle oksijen radikalleri yapılabilir. Özellikle oksijenin metabolize edildiği canlılarda önemli derişim ve çeşitlilikte radikal üretimi gerçekleşir. Hücrel koşullarda oluşabilen oksijen radikalleri ile oksijen içeren reaktif türlerin önemli olanları tablo: 2.3'de görülmektedir. Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı “yüzlerce farklı tür” şeklinde ifade edilebilirse de, bu radikaller arasında süperoksit,  $H_2O_2$ , nitrik oksit ve hidroksil radikalinin özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler (Kılınç ve Kılınç 2002).



Tür	Adı	Tür	Adı
$^1O_2$	Singlet oksijen	$NO^\bullet$	Nitrik oksit
$O_2^{\bullet-}$	Süperoksit	$NO_2^\bullet$	Nitrojen Dioksit
$H_2O_2$	Hidrojen peroksit	$NO_2^+$	Nitril Katyonu
$OH^\bullet$	Hidroksil radikali	$NO^\bullet$	Nitroksil anyonu
$ROO^\bullet$	Peroksi radikali	$NO^+$	Nitrozonyum iyonu
$ROOOH$	Hidroperoksit	$ONOO^-$	Peroksinitrit
$RO^\bullet$	Alkoksi radikali	$ONOO^\bullet$	Peroksinitrit radikali
$ROOR'$	Endoperoksit	$N_2O_3$	Dinitrojen trioksit
$HO_2^\bullet$	Hidroperoksi radikali	$N_2O_4$	Dinitrojen tetroksit

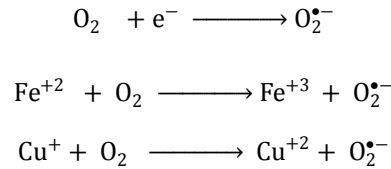
Tablo 2.3: Reaktif oksijen ve azot türleri.

(Kılınç ve Kılınç 2002).

### 2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

#### Süperoksit Radikali ( $O_2^{\bullet-}$ )

Hemen hemen tüm aerobik hücrelerde, oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle süperoksit radikali ( $O_2^{\bullet-}$ ) oluşur. Süperoksit radikalının oluşumuna; indirgeyici özellikteki biyomoleküller (örn: hidrokionlar), yüzlerce enziminin katalitik etkisi (örn: dehidrogenazlar), mitokondrideki enerji metabolizması sonucu ve aktive edilen lökositlerde oluşan  $O_2^{\bullet-}$  örnek gösterilebilir. Süperoksit indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyon reaksiyonu ile de oluşabilmektedir. Bu reaksiyonlar geri dönüşümlüdür.

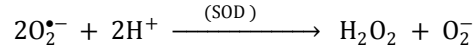


(Kılınç ve Kılınç 2002).

#### Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ )

Hidrojen peroksit, oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi ya da süperoksitlerin enzimatik/enzimatik olmayan dismutasyonu tepkimeleri sonucu oluşur. Hidrojen peroksitin pK'sı 10.6 olduğundan, nötral ve asidik koşullarda net yük taşımaz, biyolojik zarları kolayca geçebilir. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. Hidrojen peroksitin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni, Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalının öncülü olarak davranmasıdır. Belirtilen oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan  $H_2O_2$ 'in derhal ortamdan uzaklaştırılması

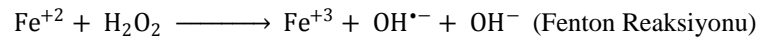
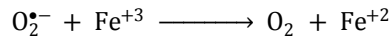
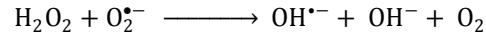
gerekir (Kılınç ve Kılınç 2002). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in üretimi süperoksit dismutaz (SOD: *Superoxide dismutase*) enzimi ile de olmaktadır.



(Aslani ve Ghobadi 2016).

### *Hidroksil Radikali (OH<sup>•</sup>)*

Hidroksil radikali genellikle fenton veya fenton tipi reaksiyonu sonucunda oluşan son derece reaktif bir oksidandır. Lipidler, proteinler ve nükleik asitleri okside edebilir. Yarılanma ömrü çok (10<sup>-9</sup>saniye) kısadır. Oluştığı yerde büyük hasara sebep olur.



(Aslani ve Ghobadi 2016).

### *Singlet Oksijen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>)*

Radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Serbest radikal reaksiyonları sonucu meydana geldiği gibi, serbest radikal reaksiyonlarının başlamasına da sebep olur. Doymamış yağ asitleri ile de doğrudan tepkimeye girerek peroksit radikalini oluşturur ve OH<sup>•</sup> kadar etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir.

Oksijenin enerjetik olarak uyarılan bu formunun da reaktivitesi çok yüksektir. Başlıca şu mekanizmalarla vücutta oluşabilir: **a)** Pigmentlerin (örneğin flavin içeren nükleotidler, retinal, bilirubin) oksijenli ortamda ışığı absorplamasıyla, **b)** Hidroperoksitlerin metaller varlığındaki yıkım tepkimelerinde, **c)** Kendiliğinden dismutasyon tepkimeleri sırasında (örneğin fagozom içinde), **d)** Prostoglandin endoperoksit sentaz, bazı sitokrom P450 tepkimelerinde, miyelo/ kloro/ laktoperoksidad enzimlerinin etkileri sırasında.

Singlet oksijen diğer moleküllerle etkileştiğinde ya içerdiği enejiyi transfer eder, ya da kovalent tepkimelere girer. Özellikle karbon - karbon çift bağları singlet oksijenin tepkimeye girdiği bağlardır. Doymamış yağ asitleri ile doğrudan tepkimeye

girerek peroksi radikalini oluşturur ve etkin bir şekilde lipid peroksidasyonunu başlatabilir (Kılınç ve Kılınç 2002).

### 2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin yüksek konsantrasyonları hücrelerin lipid, aminoasitler, proteinler, DNA, karbonhidrat ve enzimler de dâhil olmak üzere, vücutta bulunan biyomoleküllerin her türlüünün zarar görmesine neden olabilirler. Radikaller mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller permeabiliteyi bozar, bunun sonucunda apoptozun başlaması ile mitokondriyal hasara neden olabilirler (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### *Lipidler Üzerine Etkisi*

Serbest radikaller, savunma mekanizmalarının kapasitesini aşacak oranlarda oluştuğu zaman hücre sel elemanlara zarar verirler ve çeşitli bozukluklara sebep olurlar. Biyomoleküller serbest radikaller tarafından etkilenirler, fakat lipidler daha hassastırlar. Hücre membranındaki doymamış bağlar serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA: *Polyunsaturated fatty acids*) ve fosfolipidlerin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü Peroksidasyon bir kere oluştuğundan sonra endoperoksitlerin (MDA prekürsörü) siklizasyon reaksiyonuyla yeni radikallere sebep olur ve sonuçta MDA oluşur. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen hücre zarı hasarı, geri dönüşümsüzdür (Aslani ve Ghobadi 2016).

Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan bir serbest radikal etkisi sonucu hücre zarı yapısında bulunan PUFA'lardan bir hidrojen atomu uzaklaştırması ile başlar. Peroksidasyon bir kere oluştuğundan sonra endoperoksitlerin siklizasyon reaksiyonuyla yeni radikaller oluşur ve devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid hidroperoksitlerinin yıkımı, geçiş metalleri (demir ve bakır gibi) iyon katalizini gerektirir. Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler (MDA, 4-hidroksinonenal, alkanlar ve alkenler, dienler ve hidroksitler ve hidroperoksitler) oluşurlar (Aslani ve Ghobadi 2016). MDA gibi tiyobarbitirik asid reaktifleri lipid peroksitlerin en çok bilinen aldehid formu olup, araşidonik asidin oksijenasyonu ya da PUFA'ların enzimatik olmayan oksidatif yıkımı sonucu ortaya çıkmaktadır. MDA, hücre zarındaki komponentlerin polimerizasyonu ve

çapraz bağlanmasına neden olarak iyon transportu, enzimatik aktivite, hücre yüzey determinantlarının agregasyon durumları ve intrinsik membran özelliklerini değiştirmektedir. MDA, profibrogenetik sitokinleri (TGF- $\beta$ 1: *Transforming growth faktör- $\beta$ 1*) salan kupffer hücrelerini aktive etmekte, ayrıca kollagen gen ekspresyonunu ve üretimini artırmaktadır. Bu nedenle, lipid peroksidasyonun son ürünlerinden olan MDA ölçümü hücresel hasarın derecesini ölçmede kullanılmaktadır. ROS'un direk ölçümü zor olduğu için moleküler ve enzimatik antioksidanların doku ve kandaki seviyeleri oksidatif durumu yansıtmaktadır (Sezer ve Keskin 2014).

Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Doğrudan olarak hücre zarı yapısına ve dolaylı olarak reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Hücre zarı permeabilitesi, proteinleri ve akışkanlığı zarar görür. Peroksidasyonla oluşan MDA, hücre zarı komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi hücre zarı özelliklerini değiştirir. MDA bakteriyel ve memeli hücrelerinde mutajenik ve sıçanlarda kanserojeniktir (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### *Proteinlere Etkileri*

Proteinlerin serbest radikalleren etkilenme dereceleri aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Özellikle sistein (C: Cysteine) ve metiyonin (M: *Methionine*) aminoasitleri ROS/ reaktif nitrojen türleri (RNS: *Reactive nitrogen species*) oksidasyonuna duyarlıdır (Valko ve ark. 2007). Doymamış bağ sülfür ya da M, C, fenilalanin, triptofan ve tirozin gibi aromatik halkaları olan aminoasitler, reaktif oksijen metabolitlerinin oksidasyonuna çok yatkındır. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikalleri oluşurlar (Aslani ve Ghobadi 2016). Birçok farklı mekanizma tarafından oluşan karbonil gruplarının konsantrasyonu ROS aracılı protein oksidasyonunun iyi ölçüsüdür. Protein karbonil gruplarının analizi için hassas bir yöntem, geliştirilmiştir. İleri glikasyon son ürünleri (AGEs: *Advanced glycation end products*) karmaşık ürünlerin bir sınıfıdır. Bunlar karbonhidratların ve proteinlerin serbest amino grupları arasındaki bir tepkimenin sonucudur. AGEs'lerin çoğu çok kararsız reaktif bileşiklerdir ve son ürünlerin tamamen analiz edilebilirliği zordur (Valko ve ark. 2007).

Lipofusin; protein ve lipid kalıntılarının demir katalizli oksidasyon/polimerizasyon reaksiyonu ile oluşan parçalanamayan bu madde, genellikle lizozomlarda kahverengi - sarı bir pigment olarak oluşur. Diğer protein agregatlarına benzer şekilde, lipofusin proteolize son derece dayanıklıdır ve yaşlanmanın belirtisi olarak kabul edilir (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### *Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri*

ROS/RNS türleri DNA'yı etkileyerek oksidatif hasardan kaynaklanan genetik materyalde kalıcı değişiklik mutajenez, karsinogenezis ve yaşlanma hatta hücrede ölüme yol açarlar.

Hidroksil radikali purin ve pirimidin bazları hatta deoksiriboz yapı da olmak üzere DNA molekülünün tüm bileşenlerine zarar verdiği bilinmektedir. Ayrıca, peroksinitritin DNA hasarı ve lipid oksidasyonunu ve aynı zamanda DNA'da tekrarlayan zararlı etkileri nedeniyle yaşlanmada rolü vardır (Aslani ve Ghobadi 2016). Bu konuda en fazla çalışılan DNA lezyonu, radikal hasar sunucu oluşan, 8-hidroksiguanindir (Valko ve ark. 2007).

#### *Karbonhidratlara Etkileri*

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de önemli etkileri vardır. Karbonhidratların oksidatif hasarı, hormonal ve nörotransmitter yanıtları, interlökin aktiviteleri ve prostaglandin oluşumu ile ilişkili hücresele reseptör işlevlerinde değişikliğe sebep olabilir. Bununla birlikte pek çok hastalığın patogeneğinde ve yaşlanmaya neden olabilir (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### *2.3.4. Başlıca Serbest Radikal Üretim Kaynakları*

Serbest radikal oluşturan kaynaklar endojen ve ekzojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Organizmada serbest radikallerin en önemli oluşum kaynağı, normal hücre metabolizması sırasında elektron transport zinciri sayesinde mitokondridir. Bunlardan başka bazı enzimlerin aktivitesi sırasında (oksidaz, siklooksijenaz, lipoksijenaz, dehidrojenaz ve peroksidaz gibi) serbest radikallerin üretilmesine neden olabilir. Sitokrom P450 metabolizması, lizozomlar, peroksizomlar ve enflamatuar hücre aktivasyonu ROS'ların diğer endojen üretim kaynaklarıdır.

Serbest radikallerin hücre dışı kaynakları ise radyasyon, sigara, bazı kirleticiler, böcek ilaçları ve bazı ilaçlardır (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### 2.4. Antioksidan Sistem

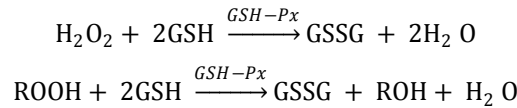
Biyolojik sistemler serbest radikalleri nötralize etme ve zararlı etkilerine karşı hücreleri korumak için koruyucu antioksidan sistemleri ile donatılmıştır. Antioksidanları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan olarak iki kategoriye ayrılabilir. Enzimatik antioksidanlar ise ya "birincil" ya da ikincil "enzimlerdir.

En etkili antioksidan olan "birincil enzim" enzimler (GPx, CAT ve SOD) serbest radikalleri nötralize eder veya serbest radikalleri oluşumunu engellerler. Okside glutasyonu (GSSG) redükte hale getiren glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH üreten glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi "ikincil enzimler" doğrudan doğruya serbest radikalleri nötralize etmez ancak diğer endojen antioksidanları desteklerler (Aslani ve Ghobadi 2016).

##### 2.4.1. Hücre İçi Enzimatik Antioksidan Savunma

###### *Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)*

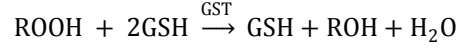
Bu enzim, iki formu vardır: Selenyum bağımlı (GPx: EC.1.11.1.19) ve selenyum bağımsız (glutasyon-S-transferaz, GST: EC.2.5.1.18) Glutasyon peroksidaz, hidroperoksitlerin veya organik peroksitlerin indirgenmesinden sorumlu enzimdir. GSH-Px aşağıdaki reaksiyonları katalizler.



(Aslani ve Ghobadi 2016).

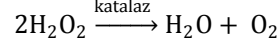
###### *Glutasyon S-Transferaz (GST)*

GST enzim ailesi içinde kanserojenleri, ilaçları ve oksidatif stres ürünleri de dâhil olmak üzere geniş bir yelpazede etkilidir. GST'ler GSTM1 - GSTM5 olarak adlandırılan beş farklı izoenzimleri beş sınıfa ayrılır. GSTM1 GST'ler içinde kanser ve mutasyon ile en çok ilişkilidir (Valko ve ark. 2007).



### *Katalaz (CAT)*

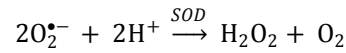
Katalaz (E.C.1.11.1.6) tetramerik porfirin içeren bir enzimdir. Görevi, hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksizomlarda lokalizedir.



CAT bir dakikada yaklaşık 6 milyon  $\text{H}_2\text{O}_2$ 'yi  $\text{H}_2\text{O}$  ve  $\text{O}_2$ 'ye dönüştürme yeteneğine sahip, tüm enzimler içinde bilinen en büyük dönüştürme oranlarına sahip bir enzimdir. CAT tüm dokularda mevcut olsa da, bu enzimin en yüksek aktivitesi, karaciğer ve eritrositlerdedir.

### *Süperoksit Dismutaz (SOD)*

Süperoksit dismutaz (EC.1.15.1.1), vücuttaki antioksidan enzimlerin içinde en etkili olan, bir metaloenzimdir. SOD organizmanın reaktif oksijen türlerine (ROS: *Reactive oxygen species*) karşı ilk savunma hattı olarak kabul edilir. SOD süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ardından, CAT ya da GPx aktivitesi ile ortamdaki uzaklaştırılır. SOD enziminin birçok izoformu vardır. Bu farklılık aktif merkezindeki subünitlerin ve kofaktörlerin sayısı kadar, aminoasit dizilişi gibi birçok yönden kaynaklanır (Aslani ve Ghobadi 2016).



Bunlar, sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn ihtiva eden izomer (Cu-Zn SOD), mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomer (Mn-SOD) ve izoform bakır ve çinko iyonları her ikisini birlikte salgısal tetramerik glikoprotein içeren hücre dışı SOD'dir. Genel olarak hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu-Zn SOD neredeyse bütün memeli hücrelerinde bulunur. Enzimin fizyolojik fonksiyonu; oksijeni metabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikallerinin zararlı etkilerine karşı korumaktır. Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından

yüksek oranda süperoksit üretimi olmasına rağmen bu enzim sayesinde hücre içi süperoksit seviyeleri düşük tutulur. Mn-SOD anti-tümör aktivitesine sahip en etkili antioksidan enzimlerden biri olduğu düşünülmektedir. Hücre dışı SOD fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi sadece bir kaç hücre tipinde sentez edilir. Hücre dışı SOD hücre yüzeyi üzerinde yer almaktadır ve heparin ve heparan sülfatlara yüksek afiniteye sahiptir (Aslani ve Ghobadi 2016).

### *Peroksiredoksin*

Peroksiredoksin (tioredoksin peroksidazlar) doğrudan indirgenebilen peroksidazlardır ve evrimsel olarak korunmuş antioksidan proteinlerin bir ailesidir.

Peroksiredoksin (tioredoksin peroksidazlar) bir peroksidazlar ailesidir ve peroksitlerin ( $H_2O_2$  ve farklı alkil hidroperoksitler) doğrudan indirgenmesi kapasitesine sahip antioksidan proteinlerdir (Aslani ve Ghobadi 2016).

### *2.4.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar*

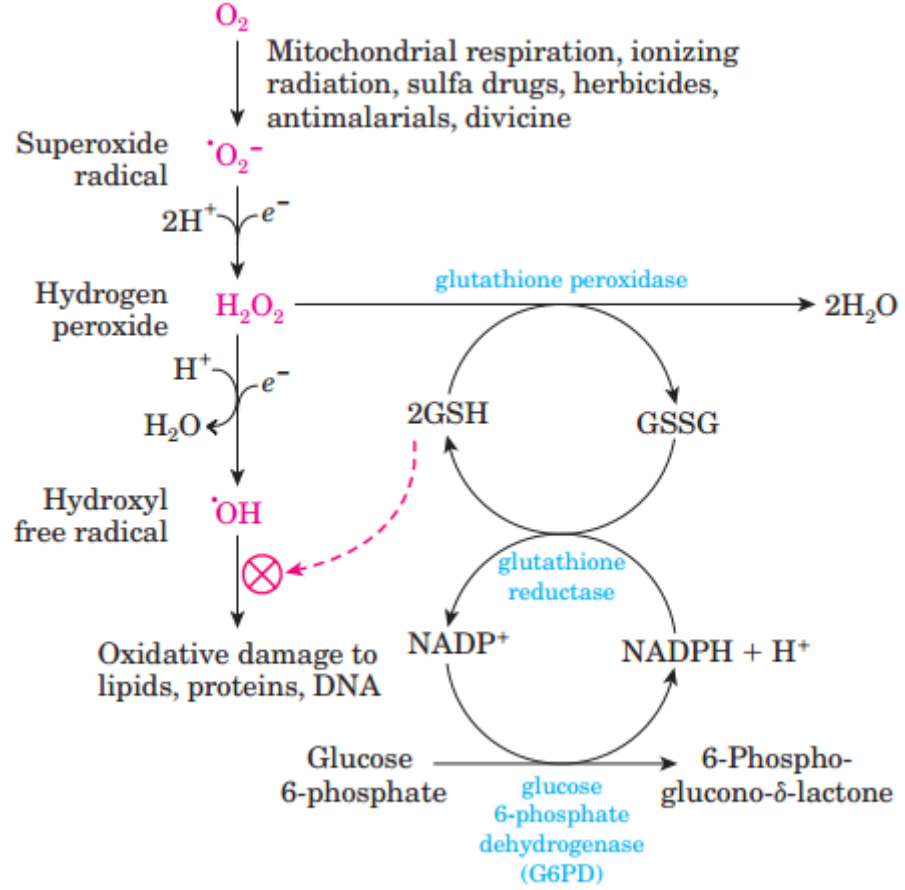
#### *2.4.2.1. Metabolik Antioksidanlar,*

##### *Tiyol antioksidanlar – glutasyon (GSH)*

Hayvan hücrelerindeki yaygın, düşük molekül ağırlıklı tiyol antioksidanı tripeptit GSH (L- $\gamma$ -glutamil-L-sisteinil-glisin)'dir. GSH genellikle olarak sitoplazmada bulunmakla birlikte aynı zamanda, mitokondri, peroksizom, nükleer matris ve ER'de dâhil olmak üzere diğer hücre bölümlerinde de bulunabilir.

GSH'ler serbest radikaller ve diğer ROS'ları temizleyici olarak hareket eder. Ayrıca, proteinlerdeki -SH gruplarını redükte halde tutar ve bu grupları oksidasyona karşı korurlar. GSH'lar bu temizleme işlemlerinde  $OH^\bullet$ ,  $LOO^\bullet$ ,  $ONOO^-$  ve  $H_2O_2$ 'yi doğrudan, dolaylı enzimatik reaksiyonlarla redükte glutasyonu (GSH), oksitlenerek okside glutatona (GSSG) dönüşür (Şekil: 2.22). Okside glutasyonun tekrar redükte hale gelmesi NADPH'in kullanılması ile olur. Bunların dışında GSH, hücrede C aminoasidinin önemli bir rezervidir (Aslani ve Ghobadi 2016).





Şekil 2.22: Glutatyon redoks sistemi.

(Nelson ve Cox 2013)

### *Tiyol antioksidanlar - tioredoksin sistem:*

Bir başka tiyol antioksidan tioredoksin sistemi her ikisi de oksidoredüktaz özellikte olan tioredoksin redüktaz enzimi ve tioredoksindir. Tioredoksinin sitozolik tioredoksin-1 ve mitokondriyal tioredoksin-2 olmak üzere iki önemli formu hücrelerde vardır. Tioredoksinler proteinler ve peptidleri oksidatif hasara karşı korurlar.

### *Tiyol antioksidanlar - lipoik asit*

$\alpha$ -lipoik asit hemen hemen tüm canlı türlerinde bulunan önemli bir doğal tiyol antioksidandır. Çünkü hem su hem de yağda çözünebilir nitelikte olduğu için ideal bir antioksidandır (Aslani ve Ghobadi 2016).

### *Melatonin*

Melatonin, ağırlıklı olarak omurgalıların pineal bezi tarafından üretilen triptofandan türetilmiş hormondur. Melatonin salgılanması sirkadiyen gerçekleşir ve en fazla gece oluşur. Melatonin, çok güçlü bir antioksidandır. Bu yüzden, günümüze kadar bilinen antioksidanların en güçlüsü (Örn: vitamin A, E, C,'den daha güçlü) olarak bilinmektedir. Melatonin OH<sup>-</sup> radikalini GSH'a göre 5 kat daha güçlü olarak temizlediği kaydedilmiştir. Melatoninin antioksidan olarak diğer önemli bir özelliği de lipofilik olması ve diğer antioksidanları da uyarabilmesidir. Böylece çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite sahiptir.

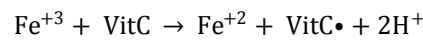
### *Koenzim Q10*

Koenzim Q10, hücre membranlarında doğal olarak bulunmaktadır. Hücre içi bir antioksidan olarak koenzim Q10, membran fosfolipidlerini, mitokondriyal membran proteinlerini ve LDL-C'yi serbest radikallerin oluşturacağı oksidatif hasara karşı korur (Aslani ve Ghobadi 2016).

#### *2.4.2.2. Besinsel Antioksidanlar*

##### *C Vitamini*

Askorbik asit olarak da adlandırılan C vitamini, suda çözünen taze meyve ve sebzelerde bulunan güçlü bir antioksidandır. C vitamininin sentezi çoğunlukla bitkilerde ve hayvanlarda D-glukoz ve D-galaktoz'dan gerçekleşir. C vitamini insanda L-glukonolakton oksidaz enzimi eksiliğinden dolayı sentezlenemez. C vitamini güçlü bir elektron vericisidir. Elektronlarını vererek, diğer bileşiklerin okside olmasını engeller. Süperoksit radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit ile reaksiyona girerek onları ortamdan temizler. Lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin etkilerini yok ederek, lipidleri oksidasyona karşı korur. C vitamini hem E vitamini ile birlikte radikallerle birlikte savaşır hem de E vitaminin rejenerasyonunda görev alarak tokoferoksil radikalinin α-tokoferole indirgenmesini sağlar.

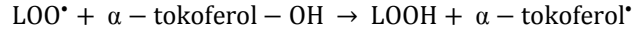


(Aslani ve Ghobadi 2016)

### *E Vitamini*

E vitamini doğada sekiz farklı stereoizomeri olan lipid faz zincir kıran antioksidandır. Bu stereoizomerleri tokoferoller ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ ) ve tokotrenioller ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ )'dir.

$\alpha$  tokoferol E vitamininin insanda ana biyoaktif formudur. Hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansature yağ asitlerini serbest radikal etkisinden korur. Süperoksit ve hidroksi radikallerini, singlet oksijen, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikalleri indirger. E vitamini fındık ve yer fıstığı, yumurta, meyve, lahana, balık, pamuk, tüm tahıllarda ve işlenmemiş bitkisel yağlar da dâhil olmak üzere, doğal kaynaklardan bulunabilir (Aslani ve Ghobadi 2016).



### *Karotenoidler*

A vitamininin metabolik ön maddesi olan  $\beta$ -karoten karotenoid familyasının bir üyesidir. Karotenoidler taze meyve ve sebze bulunurlar. Karotenoidler güçlü ROS temizleyicileridir. A, C ve E vitaminleri birlikte hücreyi RNS ye karşı korurlar.

### *Polifenoller*

Polifenoller, yaygın olarak meyveler, sebzeler ve tahıllarda doğal olarak bulunan bitkilerin ikincil metabolitleridir. Polifenoller ultraviyole radyasyon ve patojen saldırılarına karşı bitkileri korumakla sorumludurlar. Güçlü antioksidan olan polifenoller oksidatif hasara karşı hücre bileşenlerini koruyarak ve ilgili dejeneratif bozuklukların riskini azaltabilirler (Aslani ve Ghobadi 2016).

### *2.5. Total Antioksidan Seviye, Total Oksidan Seviye ve OSI Hesabı*

Organizma normalde fizyolojik koşullarda, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden karmaşık bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Oluşan oksidan durumlara karşı vücudun redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan, antioksidanların vücudun tüm hücrelerine taşınmasını ve dağıtımını

gerçekleştirmektedir. Total oksidan seviyenin (TOS: *Total oksidan status*) artışında en büyük rolü endojen olarak vücutta sentezlenen serbest oksijen moleküllerinin yan ürünleri sağlamaktadır. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller oluşur. Bu ürünler oluştukları yerde hemen detoksifiye edilmezler ise zararlı etkilerini oluştururlar. Total antioksidan seviyeye (TAS: *Total antioksidan status*) en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, ürik asit, vitamin E, vitamin C, transferin ve seruloplazmin, gibi proteinler yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkilerin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalış, diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan seviyeyi değerlendirmek için oksidan ve antioksidan moleküllerin bireysel ölçümü yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler yaygınlaşmaktadır (Erel 2005; Erel 2004). TOS seviyesinin, TAS seviyesine oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi (OSI: *Oxidative stress index*) hesaplanmaktadır. OSI vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirtir. OSI Hesabı:  $\frac{TOS}{TAS} \times 100$  şeklinde hesaplanmıştır (<http://www.baranmedikal.com.tr/tr/sayfa.php?/4>).

## 2.6. Paraoksonaz

Kalsiyum bağımlı, ester bağlarını hidrolizeden paraoksonaz, (Durrington ve ark. 2001), hem arilesteraz (ARE: *Arilesterase*, E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip enzimdir (van Himbergen ve ark. 2006). İlk olarak Mazur (1946) tarafından keşfedilen enzim, sonraki yıllarda tavşanda dâhil olmak üzere çeşitli memelilerde paraoksonaz olarak tanımlanmıştır (Aldridge 1953; Aldridge 1953). Paraoksonaz bir tarım ilacı olan son derece zehirli organofosfat parationun toksik metaboliti paraoksonu (organofosfat substratı) hidroliz edebilmesinden dolayı bu ismi almıştır. Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda 7q 21.3-22.1 kromozomunun uzun kolunda, birbiriyle bağlantılı Paraoksonaz-1 (PON-1: *Paraoxonase 1*), Paraoksonaz-2 (PON-2: *Paraoxonase 2*) ve Paraoksonaz-3 (PON-3: *Paraoxonase 3*) şeklinde üç üyeden oluşmaktadır (van Himbergen ev ark. 2006).

Karaciğerde sentezlenip kana salınan PON-1, 43 kDa moleküler ağırlığa sahip, 354 aminoasitten oluşan bir protein olup, serumda genellikle HDL-C üzerine (apoJ ve apoA-I'i de içeren) lokalizedir (Durrington ve ark. 2001; van Himbergen ve ark. 2006). PON-1 gibi çoğunlukla karaciğerde eksprese olan PON-3, düşük miktarda böbreklerde de bulunur ve HDL-C ile ilişkilidir (Aviram ve Rosenblat 2005). PON-2 ise serumda tespit edilemeyen ancak; beyin, karaciğer, akciğer kalp gibi dokularda salgılanır (van Himbergen ve ark. 2006).

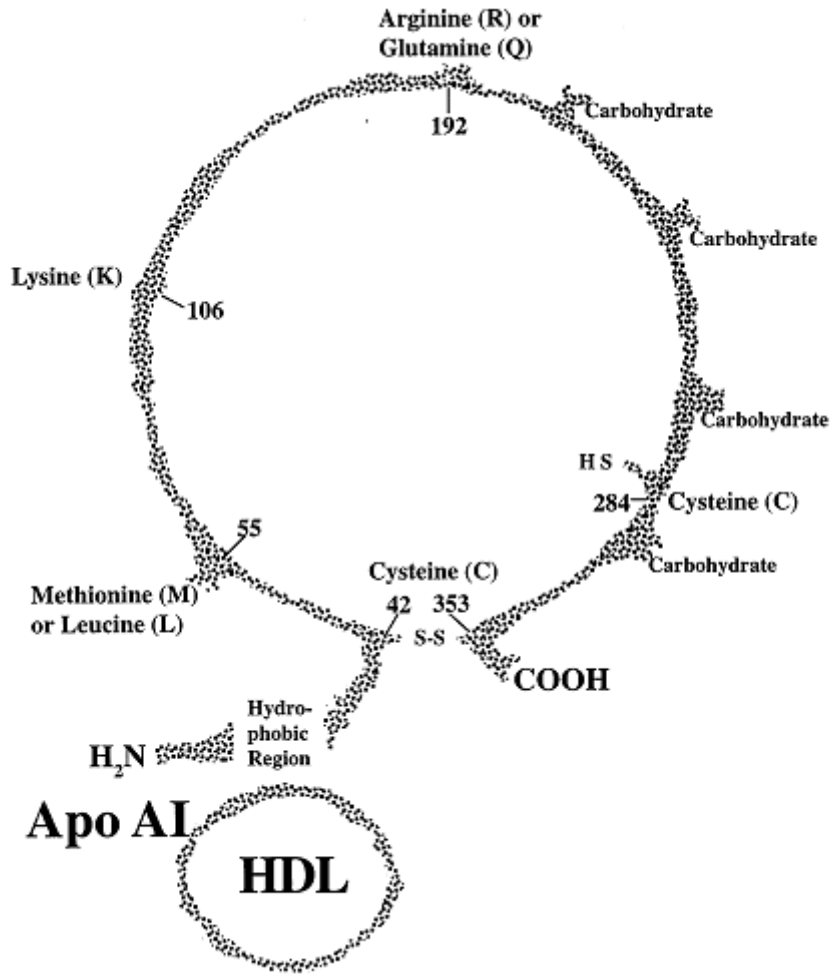
Yapılan invitro çalışmalarda, PON-1 ve PON-3'ün LDL-C'nin lipid oksidasyonunu inhibe ettiğini, böylece ateroskleroza başlatan ve ilerleten okside lipid seviyelerini azalttığı bildirilmiştir (Harel ve ark. 2007). Paraoksonazlar için bildirilen fizyolojik roller arasında; platelet-aktive edici faktör hidrolizi (Rodrigo ve ark. 2001), lipid oksidasyonu (aldehitler gibi) (Ahmed ve ark. 2001), aterosklerotik vasküler hastalık için risk faktörü olarak bilinen homosistein tiyolaktan hidroliz ve inaktivasyonu (Jakubowski 2000) yer almaktadır. PON-1, makrofaj kolesterol biyosentezini inhibe eder ve makrofajlara kolesterol akışını stimüle eder (Rozenberg ve ark. 2003; Aviram ve Rosenblat 2005).

PON-1 aynı zamanda kolesterol esterlerinin peroksidlerini metabolize eder (Aviram ve Rosenblat 2005). Paraoksonazların ateroskleroza karşı etkisi HDL-C partikülleri üzerindeki lokalizasyonları ile ilişkilidir ve LDL-C'nin lipid oksidasyonunda sınırlama rolüne sahiptir. PON-1, HDL-C'nin glikasyon ve homosisteinilasyon yatkınlığında modülatör etkiye sahiptir (Ferretti ve ark. 2005). PON-1'in LDL-C oksidasyonunun engellemesinde, LCAT ve apoA-I'den daha etkili olduğu deneysel olarak kanıtlanmıştır (Durrington ve ark. 2001).

PON-1'in kodlama bölgesinde iki polimorfizm bulunmaktadır. Bunlar pozisyon 55'de lösin (L: *Leucine*) ve M aminoasitleri (55 L>M) transisyonu ve pozisyon 192'de glutamin (Q: *Glutamine*) ve arginin (R: *Arginine*) (192 Q>R) transisyonudur (Şekil: 2.23). Kodlama bölgesindeki bu polimorfizme ilaveten, promotor bölgede de önemli değişiklikler olduğu da rapor edilmiştir (Gupta ve ark. 2009). PON-1 promotor bölgesindeki polimorfizm bağlantısı yüzünden, 55 L>M polimorfizmi enzim konsantrasyonunu etkiler. Yani M polimorfizminde daha az enzim konsantrasyonu vardır (Leviev ve ark. 2001). 192 Q>R polimorfizmi, enzimin hidrolitik aktivitesinde substrat farklılığından sorumludur. 192 Q/R polimorfizminde, Q aleline sahip kişilerde, R alelini taşıyanlara göre daha düşük PON-1 aktivitesi

gözlenirken (Mackness ve ark. 1997), 55 L/M polimorfizminde ise; MM homozigot bireylerde, LL homozigotlara kıyasla paraoksone karşı daha düşük PON-1 aktivitesi bulunmaktadır (Leviev ve ark. 2001).

192 R izoformu paraoksone, 192 Q izoformu ise diazoksone, soman ve sarin gibi kimyasal zehirleri hidrolize eder (Mackness ve ark. 1998). Q alloenzimi, R alloenzimine göre LDL-C üzerindeki lipid peroksitlerin birikimini daha çok engeller (Mackness ve ark.1997)

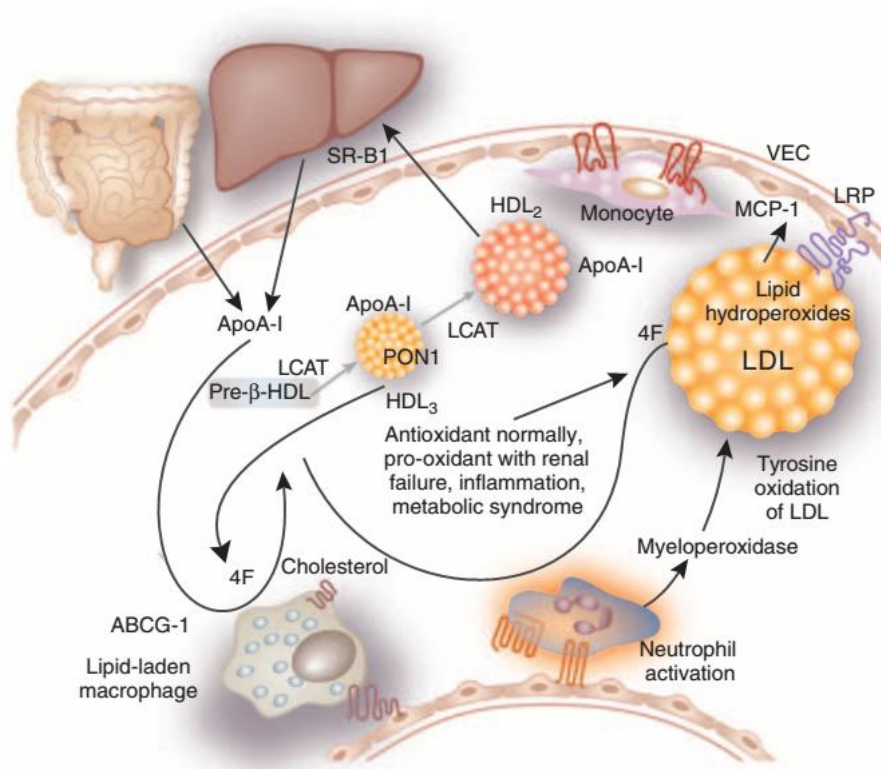


Şekil 2.23: Paraoksonaz 1'in yapısı.

(La Du 1999)

PON-1 enziminin HDL-C yapısında yer alması ve koroner arter hastalarında HDL-C seviyesinin düşük bulunması, bu hasta grubunda HDL-C ve alt tiplerinin önemini ortaya çıkarmıştır (Gordon ve ark. 1986). HDL-C'nin olgunlaşma sürecinde HDL-C'nin ana apolipoproteini olan apoA-I ilk olarak karaciğer ve barsaklardan

salınan apoA-I, ABCA1 (veya daha spesifik olan ABCG1) proteinine bağlanarak makrofajlardan kolesterol alır ve pre- $\beta$  HDL-C'yi oluşturur (Şekil: 2.24). Bu diskoid HDL-C molekülü LCAT enzimi aracılığı ile HDL3 alt tipine dönüşür ve en sonunda daha büyük bir molekül olan HDL2 meydana gelir. PON-1 gibi antioksidan enzimler, HDL3 yapısında daha fazla olmak üzere her iki alt tipte de bulunmaktadır (Kaysen 2009). Dolaşımda HDL-C'nin yapısındaki bulunan PON-1 her ne kadar polimorfik yapılara göre farklılık gösterebilir ve LDL-C oksidasyonunu önler ve okside-LDL(Ox-LDL) oluşumunu azaltır. Böylece endotel hücrelerde Ox-LDL'ye bağlı oluşan inflamasyon süreci engellenmiş olur (Mackness ve ark. 1998).



Şekil 2.24: HDL-C'nin olgunlaşması ve paraoksonaz ile ilişkisi.

(Kaysen 2009)

Serum PON-1 aktivitesi; kardiyovasküler hastalığı olanlarda, ailesel hiperkolesterolemi ve tip 1 diyabet hastalarında, sağlıklılara göre daha düşük bulunmuştur (Mackness ve ark. 1991). Ayrıca paraoksonazın; obezite, metabolik sendrom ve tip 2 diyabet, bazı karaciğer hastalıkları ve alzheimer gibi nörolojik hastalıklarla ilişkili olduğu yönünde, hatta kanserle ilişkili olduğu araştırmalar mevcuttur (Uysal ve ark. 2011).

### 3. GEREÇ YÖNTEM

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. Araştırma Laboratuvarı ve Özel Konya Medicana Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan 30.03.2012 tarihinde 2012 - 030 sayı numarası ile onay alındı.

#### 3.1. Deney Hayvanlarının ve Yemlerinin Hazırlanması

##### 3.1.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Hayvanlar Necmettin Erbakan Üniversitesi. KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edildi, bu hayvanların barınmaları ve bakımları deney hayvanları yönetmeliğinde geçen hususlara uygun şekilde yine aynı merkezde yapıldı.

Çalışmada deney hayvanı olarak 2.5 - 3.8 kg vücut ağırlıklı, 8 - 12 aylık, 30 erkek yeni zelandalı tavşanı kullanıldı. Tavşanlar 12 / 12 saat aydınlık - karanlık periyodunun uygulandığı, saatte 15 defa havalandırılması yapılan, yaklaşık % 45 nispi nemli, ortalama 20 °C sıcaklığı olan odalarda her kafeste bir tavşan olacak şekilde beslenildi. Çalışmaya başlamadan ve iki haftada bir bütün hayvanların ağırlık, total kolesterol, HDL-C, LDL-C, TG, kalsiyum kan seviyelerine Özel Konya Medicana Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında ve 25 Hidroksi D vitamini kan seviyeleri takipleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Metabolizma Laboratuvarında testlere uygun kitlerle bakıldı.

Hayvanlar rastgele dört gruba ayrıldı,

1.Grup: Kontrol, (n:6)

2.Grup: D vitamini (VitD: *Vitamin D*) ilave, (n:8)

3.Grup: % 0.5 Hiperkolesterolemi ve D vitamini (HCVitD: *High cholesterol and vitamin D*) (n:8)

4. Grup: % 0.5 Hiperkolesterolemili (HC: *High Cholesterol*) ilave. (n:8)



1. ve 2. grup normal tavşan pelet yemiyle, 3. ve 4. grup önceden hazırlanmış olan % 0.5'lik kolesterol yemi ile 8 hafta süresince beslenildi (Bojic ve ark. 2014).

2. ve 3. Gruba oral yoldan günlük D vitamini 300 IU/kg (Sigma - C9756) olarak 8 hafta boyunca (solvent içinde çözülüp) verildi (Lebas 2000). 1. ve 4. Gruba D vitamini içermeyen solvent (mısır yağı: Sigma - C8267) verildi (minimum miktarda).

Gruplar	1.Kontrol	2.D vitamini	3.Hiperkolesterolemi ve D vitamini	4.Hiperkolesterolemi
Beslenme	Normal yem	Normal yem	% 0.5'lik kolesterol yemi	% 0.5'lik kolesterol yemi
D vitamini		300 IU/kg/gün + ~50 µl solvent	300 IU/kg/gün + ~50 µl solvent	
Solvent	~50µl solvent/gün			~50µl solvent/gün

Tablo 3.1: Grupların tablo şeklinde gösterimi.

Tüm tavşanlardan deney öncesi ve 2 haftada bir kan örnekleri EDTA'lı ve normal tüplere kulak veninden alındı, serum için 10 dakika pıhtılaşmaya bırakıldı. EDTA'lı tüpe alınan kanlar yavaşça 8 - 10 defa alt-üst edilerek karıştırıldı. Daha sonra tüm kan örnekleri 3700 rpm'de 7 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra alınan serum ve plazma örnekleri bekletilmeden donduruldu.

8. haftanın sonunda tavşanların anestezi altında kalplerinden EDTA'lı ve normal tüplere kanları alınıp, ketamin ile hayatlarına son verildikten sonra karaciğerleri alındı. Karaciğer dokularından (örnekler tüm gruplarda aynı bölgeden alındı) soğuk (+4°C) serum fizyolojik ile kanlar uzaklaştırılarak temizliği yapıldı. Temizlenip kurulan karaciğer örnekleri bekletilmeden donduruldu. Serum ve plazma örneklerinin hazırlanması daha önceden yapıldığı gibi yapıldı.

Total kolesterol, HDL-C, LDL-C, TG, kalsiyum (serum) ve 25OHD vitamini (plazma) seviyeleri alınan kanlardan bakıldı. Malondialdehid (MDA), paraoksonaz (PON-1), total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) seviyeleri ise hem alınan kanların serumlarında hem de karaciğer dokularında çalışıldı.

Numuneler çalışma yapılincaya kadar -80°C'de saklandı. Tüm testler çalışmaya başlamadan, serum ve doku numuneleri, oda sıcaklığına getirildikten ve vortekslendikten sonra çalışmaya alındı.

### 3.1.2. Hiperkolesterolemi Modeli

Tavşanların normal pelet yemlerine % 0.5 oranında kolesterol (Sigma - C75209) ilave edildi (Bojic ve ark. 2014). Benzer çalışmalarda tavşanların normal yemlerine % 1 - 2 oranında kolesterol eklenip pelet yem hazırlanmış fakat bu yöntemle hazırlanan yemle beslenen tavşanların serum total kolesterol seviyeleri ilk başlangıca göre ~200 kat artmıştır. Serum total kolesterol seviyelerinin bu kadar artışı hem çok fazla hayvan kayıplarına yol açtığı hem de insanla karşılaştırıldığında çok çok yüksek bir seviye olduğu için tercih edilmedi. Serum total kolesterol, HDL-C, LDL-C, TG, kalsiyum ve plazma D vitamini seviyeleri 2 haftada bir, 8 - 10 saat açlığı takiben kulak veninden alınan kanlar ile takipleri yapıldı.

### 3.1.3. Tavşan Standart Pelet Yemi ve Kolesterolü Yemin Hazırlanması

Standart tavşan pelet yem içeriği içine %0.5 kolesterol (Sigma-C75209) olacak şekilde yem hazırlandı. Tavşan yemleri Tarım ve Köy İşleri Bakanlığında ruhsatlı Bilyem Gıda Sanayii Ticaret LTD.ŞTİ.'ye (Ayaş Yolu 4. Km Akçaören köyü Yenikent - Ankara - TÜRKİYE) ait yemler kullanıldı. Standart tavşan pelet yem içeriği tablo: 3.2'de verilmiştir.

Temel Besin Maddeleri ve Diğer Özellikler		Makro Elementler (%)	
Su (% en çok)	12	Kalsiyum (en az - en çok)	1.2 - 2.5
Ham Potein (% en az)	15	Fosfor (en az)	0.8
Ham Selüloz (% en çok)	10	Sodyum (en az - en çok)	0.050 - 0.4
Ham Kül (% en çok)	10	<b>Mikro Elementler (mg / kg)</b>	
HCl'de çözünmeyen Kül (% en çok)	1	Mangan (en az)	8.5
NaCl (% en çok)	1	Çinko (en az)	70
Metabolik Enerji (en az Kcal / kg)	2,500		
<b>Vitaminler (IU / kg, mg / kg)</b>			
A vit (en az) IU / kg	8,000		
D <sub>3</sub> Vit (en az) IU / kg	800		
B <sub>2</sub> vit (en az) mg / kg	3		
B <sub>12</sub> vit (en az) mg / kg	5		
E vit (en az) mg / kg	10		
K <sub>3</sub> vit (en az) mg / kg	1		

Tablo 3.2: Standart tavşan yem içeriği.

### 3.2. Ölçümler ve Yöntem

#### 3.2.1. Kullanılan Ekipmanlar

Biyokimya otoanalizörü (Architect C8000)  
Eliza yıkayıcı ve okuyucu (ELx 800 / ELx 50)  
Hassas terazi (Precisa 125A Swiss Quality)  
Homojenizatör (Bandelin Sonopuls UW 2070)  
Homojenizatör (Ultra - Turrax T10)  
Konik cam tüpler ve eppendorf tüpler  
LC-MS/MS cihazı (Zivak - Tandem)  
Manyetik karıştırıcı (Elektromag)  
Otomatik, cam pipetler ve pipet uçları  
pH metre (Jenway )  
Santrifüj (Nüve)  
Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 30 RF)  
Vortex (Nuve NM110 )

#### 3.2.2. Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Tavşan karaciğer örnekleri tartılarak toplam 10 kat(w/v) olacak şekilde 50mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.4) içine koyuldu. Örnekler, buz banyosu içinde soğutulularak 20 saniye süreyle homojenize edildi (Ultra - Turrax T10, ALMANYA). Homojenat 30 saniye süreyle buz banyosu içinde soğutulularak sonike edildi (Bandelin Sonopuls UW 2070, ALMANYA) ve 4 °C'de, 10,000 g hızla, 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Çalışma yapılıncaya kadar -80 °C de saklandı. Süpernatantlarda mikroprotein, TAS, TOS, MDA ve PON-1 parametreleri çalışıldı.

#### 3.2.3. Total Antioksidan Seviye (TAS)

Serum ve karaciğer dokusu TAS seviyesi Konya Medicana Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında otoanalizörle, (Architect C8000, Abbott, USA) Rel Assay Total Antioksidan Status Test Kiti (Katalog No: RL0017, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, TÜRKİYE) kullanılarak ölçüldü.

Total antioksidan seviye Erel yöntemi ile ölçüldü. Bu ölçüm yönteminde 2,2'-azinobis-(Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit) radikali (ABTS) kullanılmaktadır. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve antioksidan seviyeye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, absorbanans değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün ABTS<sup>+</sup> molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. 30 mmol/L asetat tamponu ve pH: 3.6'da koyu yeşil renkte olan radikalın, asetat tamponu 400 mmol/L, pH: 5.8 olduğunda rengi açılmaktadır. Renk değişimi ile örnek içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Ölçüm tekrarlanabilirliği % 3'ün altında mükemmel yakındır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edilmektedir. Birimi mmol Trolox Equivalent/L'dir.

Çalışmada serum örnekleri direkt olarak, karaciğer doku örnekleri ise 1/5 oranında serum fizyolojik ile sulandırılarak ölçüldü. Dokular ilave olarak okunan mikroprotein değerine bölündü, çıkan değer dilüsyon faktörleri ile çarpıldı. Serum örnekleri mmol Trolox equivalent/L doku örnekleri ise µmol Trolox Equivalent/mg protein olarak rapor edildi.

#### 3.2.4. Total Oksidan Seviye (TOS)

Serum ve karaciğer doku TOS seviyesi Konya Medica Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında otoanalizörle, (Architect C8000, Abbott, USA) Rel Assay Total Oksidan Seviye Test Kiti (Katalog No: RL0024, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti, Gaziantep, TÜRKİYE) kullanılarak ölçüldü.

Total antioksidan seviye Erel yöntemi ile ölçüldü. Bu ölçüm yönteminde; örnekte bulunan oksidanlar, (Ferröz) Fe<sup>+2</sup>-o-dianisidine kompleksini (Ferrik) Fe<sup>+3</sup> iyonuna okside eder. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri ile hızlandırılır. Fe<sup>+3</sup> iyonu asidik ortamda ksilenol oranj (xylenol orange) ile renkli bir kompleks yapar. Renk şiddeti, örnekte bulunan oksidan moleküllerin miktarı ile orantılıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülebilir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve birimi µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ekivalent/L olarak ifade edilir.

Çalışmada serum örnekleri direkt olarak, karaciğer doku örnekleri ise 1/5 oranında serum fizyolojik ile sulandırılarak ölçüldü. Dokular ilave olarak okunan

mikroprotein değerine bölündü, çıkan değer dilüsyon faktörleri ile çarpıldı. Serum örnekleri  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  ekivalent/L, doku örnekleri ise;  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  ekivalent/mg protein olarak rapor edildi.

### 3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

TOS seviyesinin, TAS seviyesine oranlanmasıyla OSI hesaplanmaktadır. OSI vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirtir. OSI Hesabı:  $\frac{\text{TOS}}{\text{TAS}} \times 100$  şeklinde hesaplanmıştır ([http:// www.baranmedikal.com.tr/tr/sayfa.php?/4](http://www.baranmedikal.com.tr/tr/sayfa.php?/4)).

### 3.2.6. Malondialdehid Ölçümü (MDA)

Serum ve karaciğer doku MDA seviyeleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D. Araştırma Laboratuvarında ölçüldü.

Çalışmada serum MDA seviyeleri Sandwich Enzim Linked Immunosorbent Assay (ELISA) yöntemi ile ölçüldü. MDA aranan örnekler (serum / doku) MDA monoklonal antikoları ile önceden kaplanan kuyucuklara içine eklendi ve inkübe edildi. Ardından, streptavidin-HRP ile immun kompleks oluşturan biotin ile işaretli anti-MDA antikoları eklenildi. İnkübasyondan sonra bağlanmayan enzimler yıkanarak uzaklaştırıldı. Substrat A ve B eklenildi. Daha sonra solüsyon maviye ve asit etkisiyle sarı dönüştü. Çözeltinin renk şiddeti ile tavşan MDA konsantrasyonu arasında pozitif korelasyon vardı. Ölçümler için 96 numunelik tavşan MDA kiti kullanıldı (Katalog No: CK-E10376, Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd., Shanghai, CHINA). Kullanılan kit prosedürüne göre çalışılarak MDA seviyeleri belirlendi.

1- Çalışmaya başlamadan önce  $-80^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilen serum, karaciğer doku örnekleri ve MDA kiti oda ısısına gelene kadar bekletildi.

2- Seri Dilüsyon: Bu adımda tavşan MDA standart solüsyonu (konsantrasyon 32 nmol/ml) dilüe edildi. Seri dilüsyon işlemi için 5 boş tüpün içine 120'şer  $\mu\text{l}$  standart dilüent konuldu. Sonrasında ilk tüpe 120  $\mu\text{l}$  tavşan MDA standart eklenerek karıştırıldı(konsantrasyon 16nmol/ml oldu). Bu karışımdan 120  $\mu\text{l}$  alınıp ikinci tüpe eklendi ve karıştırıldı. Bu seyreltme işlemi 5. tüpe kadar aynı şekilde devam ettirildi. Sonuç olarak 32 nmol/L konsantrasyondan 1 nmol/L konsantrasyona kadar standart hazırlandı.

3- Elde edilen Standart, 96 numunelik pleytin ilk kuyucuğuna pipetlendi. Sonraki 5 kuyucuğa (2., 3., 4., 5. ve 6. kuyucuklar) 50 µl tavşan MDA standart çözeltisi pipetlendi.

4- Yedinci kuyucuktan itibaren bütün kuyucuklara sırayla test kontrol ve tavşan serum ve doku numunelerinden çiftler şekilde 40 µl pipetlendi.

5- Numunelerin ardından tekrar 7. kuyucuktan itibaren tüm kuyucuklara 10µl Biotin-MDA Ab dilüent solüsyonu pipetlendi.

6- İkinci kuyucuktan itibaren (kalibratör ve numune kuyucukları) tüm kuyucuklara 50 µl Str-HRP conjugate reager çözeltisi pipetlendi.

7- Bu aşamaya gelen pleytin üzeri kapatılarak 37°C de 1 saat çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

8- İnkübasyonun ardından pleytin her sefer 350 µl ile 6 defa cihaz tarafından yıkanması için gerekli olan 600 ml yıkama çözeltisi hazırlandı. Yıkama çözeltisi 20 ml esas yıkama solüsyonunun (washing solution) üzerine son hacim 600 ml ye tamamlana kadar distile su ilave edildi.

9- Hazırlanan yıkama solüsyonu ve plate cihaza yerleştirilerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. Pleyt üzerinde yıkama işleminden kalan fazla su, pleyt ters çevrilip hafifçe vurularak kurulama kâğıdı ile uzaklaştırıldı.

10- Sonrasında bütün kuyucuklara önce 50 µl chromogen solution A ardından tekrar tüm kuyucuklara 50 µl chromogen solution B pipetlendi.

11- Pleytin üzeri kapatılarak 10 dk 37°C de çalkalamalı inkübasyon yapıldı.

12- İnkübasyonun ardından tüm kuyucuklara 50 µl stop solution pipetlendi. 450 nm de MDA değerleri okundu.

MDA sonuçları, konsantrasyon absorbans grafiğine göre absorbansa karşılık gelen değer şeklinde belirlendi. Karaciğer dokuları ise ilave olarak okunan mikroprotein değerine bölündü, çıkan değer dilüsyon faktörleri ile çarpıldı. Serum örnekleri nmol/ml doku örnekleri ise nmol/mg protein olarak rapor edildi.

### 3.2.7. Paraoksonaz I(PON-1)

Serum ve karaciğer doku PON-1 aktivite değerleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıbbi Biyokimya A.D'de otoanalizör (Architect C8000, Abbott, USA)

Rel Assay PON-1 Test Kiti (Katalog No: RL0031, Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, TÜRKİYE) kullanılarak ölçüldü.

PON-1 aktivite ölçüm yönteminde, substrat olarak kullanılan paraoksonun enzimatik hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün oluşturduğu absorbansın kinetik yöntemle fotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Ölçme için paraoksonun hidrolizinden meydana gelen p-nitrofenolün 412 nm dalga boyunda oluşturduğu absorbans kinetik yöntemle ölçüldü.

Çalışmada serum örnekleri direkt olarak, karaciğer doku örnekleri ise 1/5 oranında serum fizyolojik ile sulandırılarak ölçüldü. Dokular ilave olarak okunan mikroprotein değerine bölündü, çıkan değer dilüsyon faktörleri ile çarpıldı. Serum örnekleri U/L, doku örnekleri ise; U/mg protein olarak rapor edildi.

### 3.2.8. D Vitamini Ölçümü

Plazma 25OHD vitamini seviyeleri Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya A.D. Araştırma Laboratuvarında analizörle (Zivak - Tandem LC – MS / MS, İstanbul, TÜRKİYE), kütle spektrometresi yöntemi kullanılarak ölçüldü.

#### *Kalibratörlerin ve Kontrollerin Hazırlanması*

Kalibratör, kontrol 1 ve 2 liyofilize halde bulunmaktadır. Çözme işlemi için her bir cam tüpe 2ml distile su eklenildi, iyice çözünene kadar vorteksle karıştırıldı. Çözme işleminden sonra eppendorf tüplerde 350 µl'lik hacimlere bölünerek -20 °C de saklandı.

#### *Kalibrator Hazırlama Prosedürü:*

1- Daha önceden hazırlanarak dondurulmuş 350 µl kalibratör oda sıcaklığına getirildi.

2- Üzerine 70 µl R1 eklenildi.

3- Ardından 400 µl R2 eklenildi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı.

4- 2,000 µl R3 eklenildi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı.

5- 5,000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 1,700 µl üst faz cam vialde alındı. (Bu aşamada alt fazdan çekmemeye dikkat edildi.)

- 6- Cam vialle alınan üst faz azot akışı altında 37 °C de tamamen uçuruldu.
- 7- 400 µl R4 eklendi. Vialin kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı. 50 µl LC – MS / MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

*Numune Hazırlama Prosedürü:*

- 1- Daha önceden hazırlanarak dondurulmuş 350 µl plazma oda sıcaklığına getirildi.
- 2- Üzerine 70 µl R1 eklendi.
- 3- Ardından 400 µl R2 eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı.
- 4- 2,000 µl R3 eklendi. Tüpün kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı.
- 5- 5,000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 1,700 µl üst faz cam vialle alındı.(Bu aşamada alt fazdan çekmemeye dikkat edildi.)
- 6- Cam vialle alınan üst faz azot akışı altında 37 °C de tamamen uçuruldu.
- 7- 400 µl R4 eklendi. Vialin kapağı kapatılarak 15 sn vorteksle karıştırıldı. 50 µl LC – MS / MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

LC/MS/MS ölçüm yöntemi; Bu yöntem 25OHD<sub>3</sub> ve 25OHD<sub>2</sub> vitaminlerinin serum veya plazmada ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. Zivak Tandem LC – MS / MS kütle spektrometresi elektrosray iyonizasyonu (ESI: *Elektrosray ionization*) pozitif modda kullanıldı. Her analit için bir ESI geçişi ve iç standart izlendi. 25OHD<sub>3</sub> için m/z 383.2/401.3; 25OHD<sub>2</sub> için 395.5/413.1; 25OH D<sub>3</sub> (internal standart) için 407.3/389.2 ESI modu kullanıldı. Ayırma işlemi için Zivak Vit D kolonu kullanıldı. Hareketli faz için iki farklı çözücü (A ve B) kullanıldı. Akış hızı 350 µl/dk olarak ayarlandı ve her numune için 50 µl örnek enjekte edildi.

Analitleri kolondan elue etmek için metanol gradienti kullanıldı. İlk 2 dakika hareketli fazın % 70'i B'den % 30'u A'dan alınacak şekilde ayarlandı. Bu 25OHD vitamini metabolitlerinin kolonda tutulması için yapıldı. Sonraki 1.5 dakikada çözücü B'nin derişimi % 100'e çıkartıldı derişim sabit tutuldu. Sonraki 3.5 dakikada ise hareketli fazın % 70'i B'den % 30'u A'dan alınacak şekilde ayarlandı. Her örnek toplam çalışma zamanı 7 dakika idi.



### *Sonuçların Hesaplanması*

Standartın alanına karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi. Standart eğrisi lineer regresyon veya ağırlıklı lineer regresyon fonksiyonu ile hesaplandı. Regresyon eğrisini hesaplamak için, her bir standarda karşılık gelen sinyal değeri grafiğe alındı. Bilinmeyen konsantrasyonu regresyon eğrisinin fonksiyonundan direk olarak okunabildi. Sonuçlar ng/ml olarak rapor edildi.

### *3.2.9. Total Kolesterol, HDL-C, LDL-C, Trigliserit, Kalsiyum Ölçümü*

Serum total kolesterol, HDL-C, LDL-C, TG, kalsiyum, seviyeleri Konya Medicana Hastanesi Biyokimya Laboratuvarında oto analizörle (Architect C8000, Abbott, USA) kendilerine uygun kolorimetrik test kitleri kullanılarak ölçüldü. Testlerin ölçümünde spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar mg/dl olarak rapor edildi.

### *3.3. İstatistik Değerlendirme*

İstatiksel değerlendirme için SPSS paket programı 16.0 kullanıldı. Grupların normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. Ağırlık ölçümü, total kolesterol, TG, HDL-C, LDL-C, D vitamini ve kalsiyum sonuçlarının çoklu karşılaştırma değerlendirmeleri tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi (RMA: *Repeated measures anova*) testi ile yapıldı. RMA testinde, “Mauchly’s Test of Sphericity” değerinin  $p>0.05$  den büyük olup olmadığının kontrolü ve ayrıca “Bonferroni” düzelmesi de yapıldı. Kontrol grubu ile diğer grupların Post-Hoc değerlendirilmesi için “Dunnett” testi, her bir grubun birbirleriyle karşılaştırılması için de “Tukey” testi kullanıldı. Ayrıca normal dağılım gösteren parametrelerin grup içi değerlendirilmesi “paired T” testi ile yapıldı. İstatiksel olarak  $p<0.05$ ’den küçük olan değerler anlamlı kabul edildi. TAS, TOS, OSI, MDA ve PON-1 testlerinin gruplar arası karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (OWA: *One way anova*) testi ile yapıldı.

#### 4. BULGULAR

Tavşanlardan çalışma başlangıcı (0. Hafta), 2., 4., 6. ve 8. hafta da kanları (serum ve plazma) alındı. Alınan bu kanların serumlarında total kolesterol, TG, HDL-C, LDL-C, kalsiyum ve plazmasında ise D vitamini seviyeleri takip edildi (Takibi yapılan test parametreleri bölümünün sonunda grafikler halinde sunuldu.)

Tavşanların ortalama ağırlık değerleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı değildi (Tablo: 4.1 - 2). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi ağırlık ölçümleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda; 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol grubunda anlamlı arttığı ( $p<0.05$ ), HC+VitD grubunda anlamlı azaldığı ( $p<0.05$ ), D vitamini grubunda arttığı ve HC grubunda ise azaldığı fakat anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü (Tablo: 4.1).

Tavşanların serum total kolesterol seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ). D vitamini grubuna göre; hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ), (Tablo: 4.1 - 2). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi serum total kolesterol seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda; 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol grubunda anlamlı bir farklılık oluşmadığı ( $p>0.05$ ), D vitamini grubundaki azalışın anlamlı olduğu ( $p<0.05$ ), HC+VitD ve HC gruplarında ise anlamlı artış olduğu ( $p<0.001$ ;  $p<0.01$ ) görüldü (Tablo: 4.1).

Parametreler	Gruplar	0. Hafta	8. Hafta	Grup içi P değerleri	Gruplar arası p<0.05 olan değerler
Ağırlık ölçümleri (gram)	Kontrol	3137 ± 415	3363 ± 433	<b>0.021</b>	
	D vitamini	3159 ± 531	3227 ± 335	0.571	
	HC+VitD	3249 ± 422	3091 ± 388	<b>0.022</b>	
	HC	3088 ± 405	2960 ± 484	0.227	
Total kolesterol (mg/dl)	Kontrol	39.2 ± 15.1	46.0 ± 17.1	0.323	<b>b, c</b>
	D vitamini	54.8 ± 13.7	35.0 ± 12.4	<b>0.040</b>	<b>d, e</b>
	HC+VitD	49.3 ± 16.4	725.6 ± 245.8	<b>0.000</b>	<b>f</b>
	HC	52.4 ± 20.5	1312.4 ± 648.8	<b>0.001</b>	
TG (mg/dl)	Kontrol	70.7 ± 20.2	49.7 ± 21.9	0.244	<b>b, c</b>
	D vitamini	54.9 ± 13.1	75.3 ± 14.0	0.051	<b>d, e</b>
	HC+VitD	54.1 ± 21.3	199.0 ± 94.5	<b>0.007</b>	
	HC	72.8 ± 23.0	183.8 ± 64.1	<b>0.001</b>	
LDL-C (mg/dl)	Kontrol	6.83 ± 3.55	6.83 ± 4.45	1.000	<b>b, c</b>
	D vitamini	8.00 ± 2.89	9.13 ± 8.11	0.737	<b>d, e</b>
	HC+VitD	6.00 ± 2.93	372.63 ± 141.57	<b>0.000</b>	
	HC	7.88 ± 3.40	438.88 ± 209.21	<b>0.001</b>	
HDL-C (mg/dl)	Kontrol	27.50 ± 15.83	24.33 ± 14.04	0.615	
	D vitamini	32.75 ± 9.85	17.50 ± 8.05	<b>0.028</b>	
	HC+VitD	23.25 ± 12.14	34.50 ± 9.12	0.066	
	HC	20.63 ± 10.74	21.38 ± 4.53	0.844	

Tablo 4.1: Tüm gruplarda, ağırlık ve lipid paneli parametre bulgularının 0. ile 8.haftaya göre grup içi ve gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. Not: **a**= Kontrol & D vitamini, **b**= Kontrol & HC+VitD, **c**= Kontrol & HC, **d**= D vitamini & HC+VitD, **e**= D vitamini & HC, **f**= HC+VitD & HC gruplarının gruplar arası karşılaştırılması sonucu (p<0.05) anlamlı olan değerler. Gruplar arası karşılaştırmada daha detaylı değerler tablo 4.2’de belirtilmektedir.

Parametreler	Gruplar		P değerleri
<b>Ağırlık ölçümleri (gram)</b>	Kontrol	D vitamini	0.994
	Kontrol	HC+VitD	0.984
	Kontrol	HC	0.743
	D vitamini	HC+VitD	1.000
	D vitamini	HC	0.846
	HC+VitD	HC	0.893
<b>Total kolesterol (mg/dl)</b>	Kontrol	D vitamini	1.000
	Kontrol	HC+VitD	<b>0.008</b>
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.004</b>
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>
	HC+VitD	HC	<b>0.015</b>
<b>TG (mg/dl)</b>	Kontrol	D vitamini	1.000
	Kontrol	HC+VitD	<b>0.002</b>
	Kontrol	HC	<b>0.001</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.002</b>
	D vitamini	HC	<b>0.001</b>
	HC+VitD	HC	1.000
<b>LDL-C (mg/dl)</b>	Kontrol	D vitamini	1.000
	Kontrol	HC+VitD	<b>0.000</b>
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>
	HC+VitD	HC	1.000
<b>HDL-C (mg/dl)</b>	Kontrol	D vitamini	1.000
	Kontrol	HC+VitD	1.000
	Kontrol	HC	1.000
	D vitamini	HC+VitD	1.000
	D vitamini	HC	1.000
	HC+VitD	HC	0.380

Tablo 4.2: Tüm gruplarda, ağırlık ve lipid paneli parametre bulgularının 0. ile 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi.

Tavşanların serum TG seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ;  $p<0.01$ ). Ayrıca D vitamini grubuna göre; hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ;  $p<0.01$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.1 - 2). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi serum TG seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda; 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol grubunda anlamlı bir farklılık oluşmadığı ( $p>0.05$ ), D vitamini grubunda artış

olduğu fakat istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ( $p=0.051$ ), HC+VitD ve HC gruplarında ise artışın anlamlı olduğu ( $p<0.01$ ;  $p<0.01$ ) görüldü (Tablo: 4.1).

Tavşanların serum LDL-C seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ;  $p<0.001$ ). Ayrıca D vitamini grubuna göre; hem HC+VitD hem de HC grubundaki artış anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ;  $p<0.001$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.1 - 2). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi serum LDL-C seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol ve D vitamini gruplarında anlamlı bir farklılık oluşmadığı ( $p>0.05$ ), HC+VitD ve HC gruplarında ise anlamlı arttığı ( $p<0.001$ ;  $p=0.001$ ) görüldü (Tablo: 4.1).

Tavşanların serum HDL-C seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.1 - 2). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi serum HDL-C seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda 0. hafta ortalama değerlerine göre; kontrol, HC+VitD ve HC gruplarında çalışma sonunda bir farklılık oluşmadığı, D vitamini grubunda ise anlamlı bir azalış olduğu ( $p<0.05$ ) görüldü (Tablo: 4.1).

Serum kalsiyum seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Kontrol ve D vitamini gruplarına göre hem HC+VitD hem de HC gruplarındaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.001$ ;  $p<0.001$ ). HC+VitD grubundaki HC grubuna göre artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.3 - 4). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ve 8. hafta grup içi serum kalsiyum seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda; 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol grubunda anlamlı bir farklılık oluşmadığı ( $p>0.05$ ), D vitamini ve HC gruplarındaki azalışın anlamlı olduğu ( $p<0.01$ ;  $p<0.001$ ), HC+VitD grubunda ise, azalışın anlamlı olmadığı ( $p>0.05$ ) görüldü (Tablo: 4.3).

Tavşanların plazma D vitamini seviyeleri ortalamaları gruplar arası karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki artış HC+VitD gruplarındaki fark anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat kontrol ve D vitamini gruplarına

göre; HC grubundaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ ). Ayrıca D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki azalış anlamlı değildi ( $P>0.05$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ) (Tablo: 4.3 - 4). Bağımlı değişkenlerde ise; 0. ile 8. hafta grup içi plazma D vitamini seviyeleri farklılıkları değerlendirildi. Tüm gruplarda; 0. hafta ortalama değerlerine göre; çalışma sonunda, kontrol ve HC+VitD gruplarında anlamlılık olmadığı ( $p>0.05$ ), D vitamini grubundaki artışın ( $p<0.05$ ), HC grubundaki azalışın anlamlı ( $p<0.001$ ) olduğu görüldü (Tablo: 4.3).

Parametreler	Gruplar	0. Hafta	8. Hafta	Grup içi P değerleri	Gruplar arası $p<0.05$ olan değerler
Kalsiyum (mg/dl)	Kontrol	15.03 ± 1.13	15.67 ± 1.03	0.369	<b>b, c</b>
	D vitamini	15.59 ± 0.94	13.62 ± 0.92	<b>0.002</b>	<b>d, e</b>
	HC+VitD	14.84 ± 0.57	14.38 ± 1.85	0.529	
	HC	15.05 ± 1.05	12.25 ± 0.89	<b>0.000</b>	
D vitamini (ng/ml)	Kontrol	88.67 ± 10.31	86.17 ± 15.77	0.793	<b>c</b>
	D vitamini	85.23 ± 12.95	128.71 ± 43.25	<b>0.027</b>	<b>e</b>
	HC+VitD	78.40 ± 17.18	85.13 ± 49.60	0.740	<b>f</b>
	HC	81.40 ± 16.34	24.53 ± 13.14	<b>0.000</b>	

Tablo 4.3: Tüm gruplarda, serum kalsiyum ve plazma D vitamini bulgularının 0. ile 8.haftaya göre grup içi ve gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. Not: Tüm gruplarda (**a**= Kontrol & D vitamini, **b**= Kontrol & HC+VitD, **c**= Kontrol & HC, **d**= D vitamini & HC+VitD, **e**= D vitamini & HC, **f**= HC+VitD & HC) gruplar arası karşılaştırılması sonucu ( $p<0.05$ ) anlamlı olan değerler. Gruplar arası karşılaştırmada daha detaylı değerler tablo:4.5’de belirtilmektedir.

Parametreler	Gruplar		P değerleri
<b>Kalsiyum (mg/dl)</b>	Kontrol	D vitamini	0.997
	Kontrol	HC+VitD	<b>0.000</b>
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>
	HC+VitD	HC	0.729
<b>D vitamini (ng/ml)</b>	Kontrol	D vitamini	0.399
	Kontrol	HC+VitD	1.000
	Kontrol	HC	<b>0.014</b>
	D vitamini	HC+VitD	0.078
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>
	HC+VitD	HC	<b>0.031</b>

Tablo 4.4: Tüm gruplarda, serum kalsiyum ve plazma D vitamini bulgularının 0. ile 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi.

Tavşanların serum ve karaciğer TAS seviyeleri çalışma sonu alınan kanlardan ve karaciğer dokularından çalışıldı. Serum TAS seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD grupları TAS seviyeleri ortalamalarındaki artış, HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış ve HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6). Karaciğer dokusunda ise, kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki azalış, HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.05$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6).

Parametreler	Gruplar	Serum	Karaciğer	Gruplar arası p<0.05 olan değerler.	
				Serum - Karaciğer	
<b>TAS</b> Serum: mmol/L Karaciğer: µmol/mg protein	<b>Kontrol</b>	1.78 ± 0.25	15.17 ± 3.24		<b>e</b>
	<b>D vitamini</b>	1.81 ± 0.36	11.84 ± 2.10		
	<b>HC+VitD</b>	1.87 ± 0.33	14.03 ± 1.76		
	<b>HC</b>	1.64 ± 0.14	16.06 ± 3.60		
<b>TOS</b> Serum: µmol/L Karaciğer: µmol/mg protein	<b>Kontrol</b>	15.43 ± 10.18	1.04 ± 0.16	<b>c</b>	<b>c</b>
	<b>D vitamini</b>	10.47 ± 5.43	0.95 ± 0.22	<b>d, e</b>	<b>e</b>
	<b>HC+VitD</b>	40.43 ± 16.58	1.65 ± 0.40		
	<b>HC</b>	61.02 ± 31.31	2.21 ± 1.04		
<b>OSI</b>	<b>Kontrol</b>	0.86 ± 0.57	7.07 ± 1.44	<b>c</b>	<b>c</b>
	<b>D vitamini</b>	0.55 ± 0.23	8.20 ± 2.33	<b>d, e</b>	
	<b>HC+VitD</b>	2.11 ± 0.71	11.85 ± 2.83	<b>f</b>	
	<b>HC</b>	3.75 ± 1.96	15.30 ± 10.41		
<b>MDA</b> Serum: nmol/ml Karaciğer: nmol/mg protein	<b>Kontrol</b>	6.28 ± 0.42	9.49 ± 3.07	<b>c</b>	<b>e</b>
	<b>D vitamini</b>	6.44 ± 1.24	7.33 ± 2.53	<b>e</b>	
	<b>HC+VitD</b>	7.57 ± 0.68	9.64 ± 1.74		
	<b>HC</b>	8.83 ± 1.37	11.34 ± 2.53		
<b>PON-1</b> Serum: U/L Karaciğer: U/mg protein	<b>Kontrol</b>	232.83 ± 32.9	8.98 ± 0.92	<b>c</b>	<b>b, c</b>
	<b>D vitamini</b>	210.7 ± 56.2	8.15 ± 1.35		<b>e</b>
	<b>HC+VitD</b>	218.1 ± 56.5	7.68 ± 0.45		
	<b>HC</b>	147.85 ± 40.0	6.43 ± 0.52	<b>f</b>	

Tablo 4.5: Tüm gruplarda, çalışma sonu serum ve karaciğer bulgularının 8.haftaya göre gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi. Not: Tüm gruplarda (**a**= Kontrol & D vitamini, **b**= Kontrol & HC+VitD, **c**= Kontrol & HC, **d**= D vitamini & HC+VitD, **e**= D vitamini & HC, **f**= HC+VitD & HC) gruplar arası karşılaştırılması sonucu (p<0.05) anlamlı olan değerler. Gruplar arası karşılaştırmada daha detaylı değerler tablo:4.6'da belirtilmektedir.

Tavşanların serum ve karaciğer TOS seviyeleri çalışma sonu alınan kanlardan ve karaciğer dokularından çalışıldı. Serum TOS seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış ve HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi (p>0.05), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı (p<0.001). D vitamini grubuna göre; HC+VitD ve HC gruplarındaki artış anlamlıydı (p<0.05; p<0.001). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi (p>0.05), (Tablo: 4.5 - 6). Karaciğer dokusunda ise, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış ve HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi (p>0.05), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı (p<0.01). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi (p>0.05), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı (p<0.01). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi (p>0.05), (Tablo: 4.5 - 6).



Parametreler	Gruplar		P değerleri / serum	P değerleri / karaciğer
<b>TAS</b> <b>Serum:</b> mmol/L <b>Karaciğer:</b> µmol/mg protein	Kontrol	D vitamini	0.992	0.080
	Kontrol	HC+VitD	0.877	0.769
	Kontrol	HC	0.383	0.872
	D vitamini	HC+VitD	0.977	0.397
	D vitamini	HC	0.634	<b>0.024</b>
	HC+VitD	HC	0.396	0.468
<b>TOS</b> <b>Serum:</b> µmol/L <b>Karaciğer:</b> µmol/mg protein	Kontrol	D vitamini	0.925	0.978
	Kontrol	HC+VitD	0.056	0.158
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>	<b>0.003</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.021</b>	0.105
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
	HC+VitD	HC	0.163	0.251
<b>OSI</b>	Kontrol	D vitamini	0.910	0.964
	Kontrol	HC+VitD	0.112	0.294
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>	<b>0.035</b>
	D vitamini	HC+VitD	<b>0.044</b>	0.591
	D vitamini	HC	<b>0.000</b>	0.090
	HC+VitD	HC	<b>0.034</b>	0.635
<b>MDA</b> <b>Serum:</b> nmol/ml <b>Karaciğer:</b> nmol/mg protein	Kontrol	D vitamini	0.981	0.258
	Kontrol	HC+VitD	0.072	0.999
	Kontrol	HC	<b>0.000</b>	0.365
	D vitamini	HC+VitD	0.158	0.262
	D vitamini	HC	<b>0.001</b>	<b>0.016</b>
	HC+VitD	HC	0.094	0.523
<b>PON-1</b> <b>Serum:</b> U/L <b>Karaciğer:</b> U/mg protein	Kontrol	D vitamini	0.719	0.214
	Kontrol	HC+VitD	0.888	<b>0.030</b>
	Kontrol	HC	<b>0.008</b>	<b>0.000</b>
	D vitamini	HC+VitD	0.990	0.714
	D vitamini	HC	0.068	<b>0.003</b>
	HC+VitD	HC	<b>0.035</b>	0.714

Tablo 4.6: Tüm gruplarda, çalışma sonu serum ve karaciğer bulgularının gruplar arası istatistiksel değerlendirilmesi.

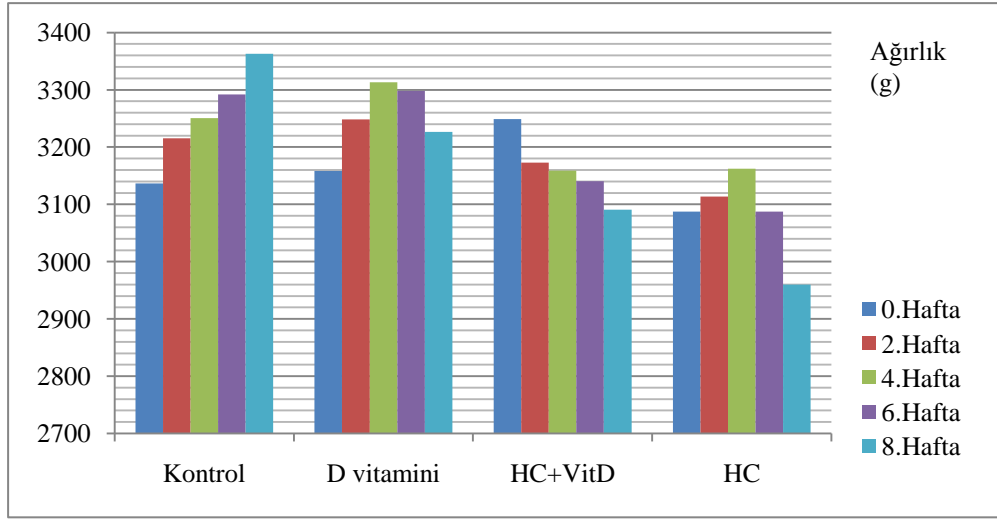
Tavşanların serum ve karaciğer OSI seviyeleri çalışma sonu alınan kanlardan ve karaciğer dokularından TOS/TAS\*100 formülü ile hesaplandı. Serum OSI seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış ve HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.001$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD ve HC gruplarındaki artış anlamlıydı ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6). Karaciğer dokusunda ise, kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.05$ ). D vitamini grubuna göre;

HC+VitD ve HC gruplarındaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6).

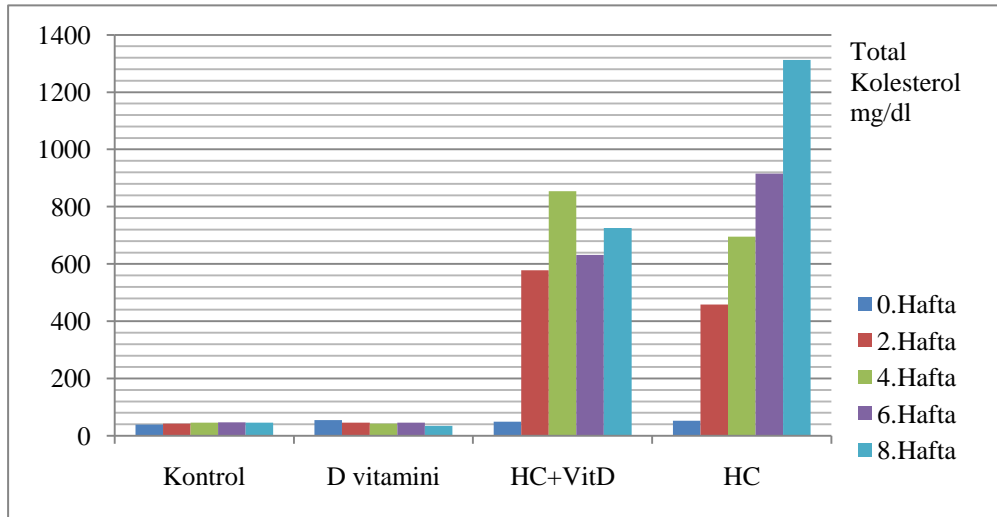
Tavşanların serum ve karaciğer MDA seviyeleri çalışma sonu alınan kanlardan ve karaciğer dokularından çalışıldı. Serum MDA seviyelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.001$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.01$ ). HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6). Karaciğer dokusunda ise, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış ve HC+VitD ve HC gruplarındaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki artış anlamlıydı ( $p<0.05$ ). HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki artış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6).

Tavşanların serum ve karaciğer PON-1 aktiviteleri çalışma sonu alınan kanlardan ve karaciğer dokularından çalışıldı. Serum PON-1 aktivitelerinin gruplar arası karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki azalış anlamlıydı ( $p<0.01$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış ve HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ;  $p>0.05$ ), fakat HC+VitD grubuna göre HC grubundaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6). Karaciğer dokusunda ise, kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC+VitD ve HC gruplarındaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ;  $p<0.001$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), fakat HC grubundaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ). Yine HC+VitD grubuna göre; HC grubundaki azalış anlamlı değildi ( $p>0.05$ ), (Tablo: 4.5 - 6).

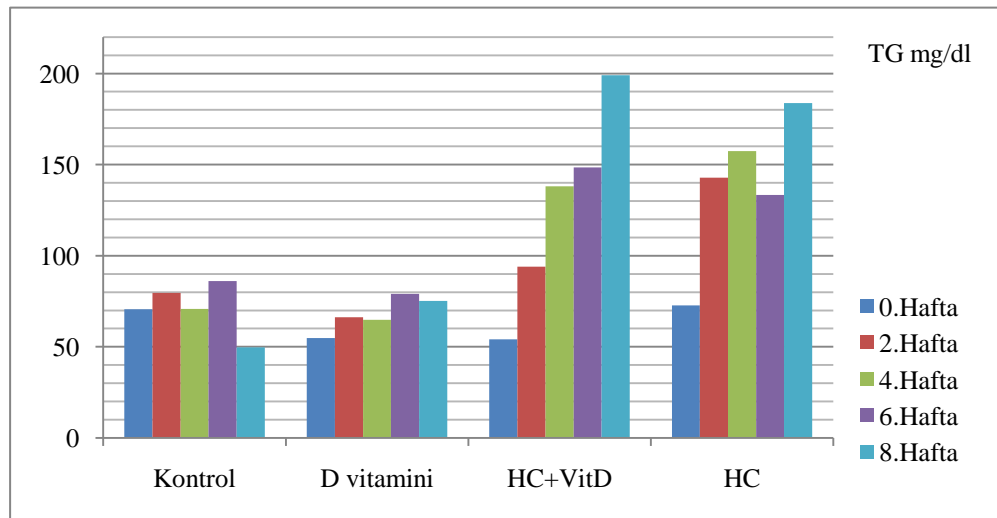
#### 4.1. Çalışma Süresince Takipleri Yapılan Parametrelerin Grafikleri.



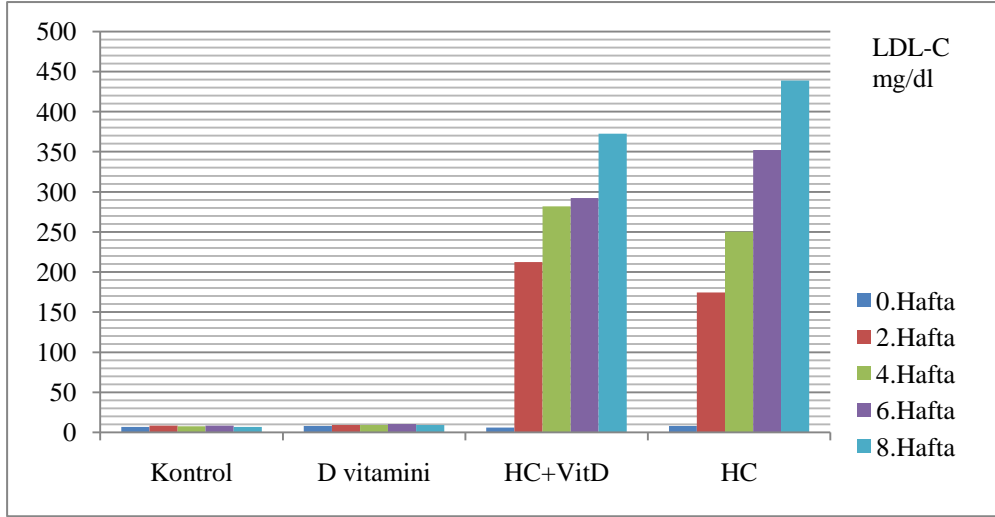
Grafik 4.1: Ağırlık seviyeleri takipleri.



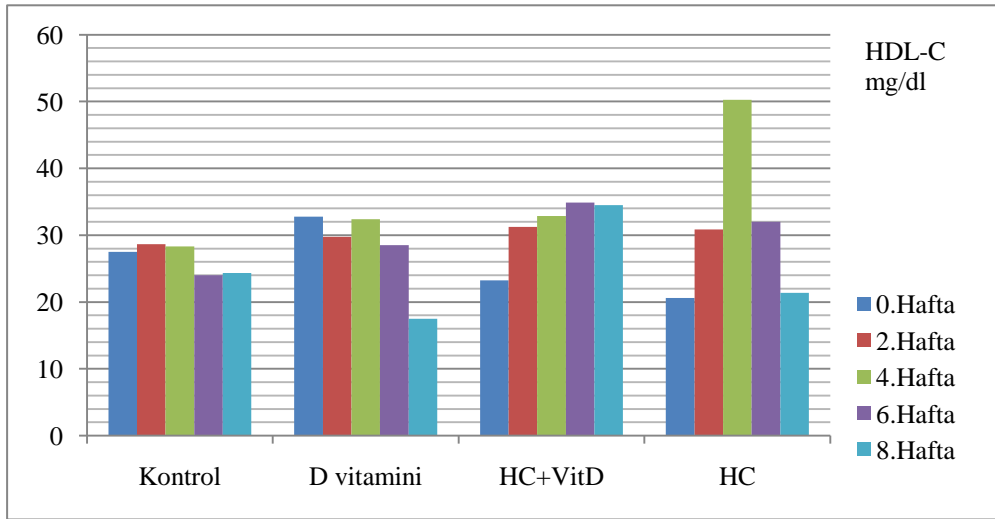
Grafik 4.2: Serum total kolesterol seviyeleri takipleri.



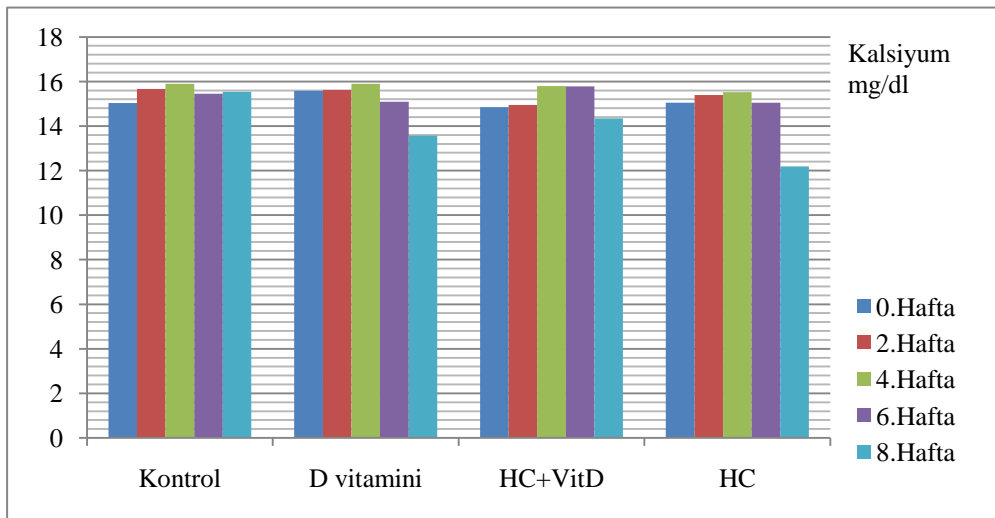
Grafik 4.3: Serum TG seviyeleri takipleri.



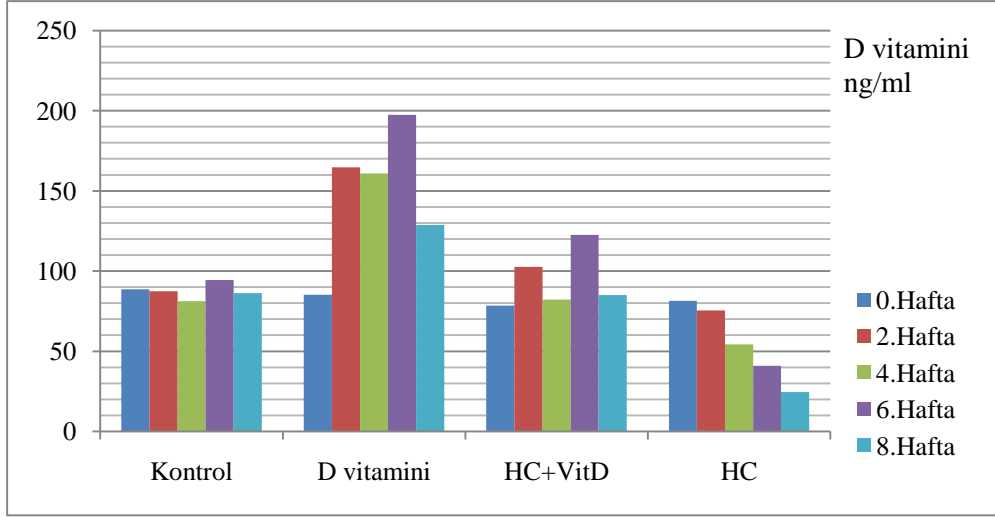
Grafik 4.4: Serum LDL-C seviyeleri takipleri.



Grafik 4.5: Serum HDL-C seviyeleri takipleri.



Grafik 4.6: Serum kalsiyum seviyeleri takipleri.



Grafik 4.7: Plazma D vitamini seviyeleri takipleri

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada hem normal hem de hiperkolesterolemik tavşanlara D vitamini ilavesinin TAS, TOS, MDA, PON-1 değerlerine etkileri analiz edildi. Aynı zamanda çalışma başlangıcından itibaren çalışma süresince ve sonunda vücut ağırlıkları, total kolesterol, TG, LDL-C, HDL-C, kalsiyum ve D vitamini seviyeleri takibi yapıldı.

### 5.1. Vücut Ağırlıkları Değerleri

Çalışmamızda kontrol grubundaki tavşanların ağırlıklarında tablo: 4.1’de görüldüğü gibi 8. haftanın sonunda başlangıç ağırlıklarına göre ağırlıklarında artış gözlemlendi ( $p<0.05$ ). HC+VitD grubunda ise ağırlık azalışı belirlendi ( $p<0.05$ ).

Kolesterol beslenmesi ve hayvanların vücut ağırlıklarına olan etkisi ile ilgili yapılmış çalışmalarda kolesterol diyeti ile beslenme sonucunda kontrol grubuna göre, yüksek kolesterollü grupta ağırlık artışı gözlemlenmiştir (Yu 2012; El - Awady ve Suddek 2014). Bazı çalışmalarda da bizim bulgularımızı destekleyen ağırlık azalışını bildirmişlerdir. Sun ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada yüksek yağla besledikleri hiperkolesterolemik tavşan modelinde kontrol grubuna göre yüksek yağlı diyetle beslenen grupta vücut ağırlığı azalışı gözlemlenmişler ve bu farkın önemli ( $p<0.05$ ) olduğu bildirmişlerdir. Medina ve ark. (2014), % 1’lik kolesterol diyeti ile tavşanları beslemişler kolesterol grubunda kontrol grubuna göre ağırlıklarında azalış tespit etmişler fakat bu azalışı anlamlı bulmamışlardır.

### 5.2. Lipid Paneli Değerleri

Koroner kalp hastalıkları küresel morbidite ve mortalitenin ana sebeplerinden biridir. Her yıl dünya üzerindeki 13 milyon insan kalp krizinden ölmektedir ve bu miktar kanser ve enfeksiyon hastalıklarından ölenlerden daha fazladır. Koroner kalp hastalıkları için tedavi edilebilir ve önlenebilir risk faktörlerinin üçü ise dislipidemi, hipertansiyon ve sigara kullanımınıdır (Al - Asmari ve ark. 2015). D vitamini ise lipid panelini iyileştirici özelliğinin olup olmadığı üzerinde çalışmalar olmakla birlikte konu tam olarak anlaşılammış ve açıklanamamıştır. Bizim çalışmamızda tavşanlarda hiperkolesterolemi modeli oluşturup hem normal hem de

hiperkolesterolemik tavşanlarda D vitaminin lipid paneli üzerindeki etkileri araştırıldı.

Hiperkolesterolemi modeli ile ilgili pek çok araştırma bulunmakta olup, kimi çalışmalarda % 1, % 2 ve hatta % 5'lik kolesterol diyeti ile tavşanları beslemişlerdir. Bu tür çalışmalarda serum total kolesterol seviyesi kontrol grubuna göre çok çok fazla, 3,000 mg/dl, yükseldiği için % 0.5'lik kolesterol diyeti tercih edildi. Çalışmamızda kontrol grubundaki tavşanların serum total kolesterol seviyesinde tablo: 4.1 - 2'de görüldüğü gibi bir değişiklik gözlenmez iken 8. haftanın sonunda HC grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış olmuştur ( $p<0.001$ ). Bojic ve ark. (2014), oluşturdukları tavşan hiperkolesterolemi modelinde aterosklerotik plak kompozisyonunu LC - MS / MS yöntemi ile inceledikleri araştırmada bizim çalışmamızda olduğu gibi yeni zellanda tavşanlarını % 0.5'lik kolesterol diyeti ile beslemişlerdir. Ayrıca Yu ve ark. (2012), % 0.3 - 0.5'lik kolesterol ve % 0.3 mısır yağı karışımı diyeti ile beslenmiş yeni zellanda tavşanlarında aterosklerotik lezyonların takibini yapmışlar ve 6. haftadan itibaren tavşanlarda lezyonların oluştuğunu bildirmişlerdir. El - Awady ve Suddek (2014), yine bizim çalışmamızda olduğu gibi yeni zellanda tavşanlarını % 0.5'lik kolesterol diyeti ile 8 hafta beslemişler, serum total kolesterol seviyelerini kontrol grubuna göre anlamlı arttığını gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da normal tavşan diyeti ile beslenen tavşanların iki haftada bir ölçülen serum total kolesterol seviyelerinde bir anlamlı değişme gözlenmez iken % 0.5'lik kolesterol diyeti beslenen tavşanlarda serum total kolesterol seyileri tablo: 4.1'de görüldüğü gibi artmaya başladı ve 8. haftanın sonunda 0. hafta seviyelerine göre (yaklaşık 35) kat artmış ve bu artış anlamlı ( $p<0.001$ ) bulundu.

Maki ve ark. (2011), ilave olarak D vitamini almanın lipid profili üzerine olan etkisinin net bilinmediğini ve sınırlı bilgiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada belçevresi genişliği kadınlarda 88 cm ve daha fazla, erkeklerde ise 102 cm ve daha fazla olan 18 - 79 yaş arası obez katılımcıları multivitamin, multivitamin+D vitamini grubu olarak ikiye ayırmışlardır. Multivitamin D grubunda olanlara, ilave olarak günlük 1200 IU D vitaminini vermişler ve D vitamini seviyelerini 63.9 nmol/L den 16 hafta sonunda 83.6 nmol/L seviyelerine yükseltmişlerdir. Araştırmacılar serum HDL-C ortalamalarında başlangıç haftasına göre 8. haftanın sonunda artış olduğunu fakat anlamlı olmadığını bildirmişlerdir.

Çalışmaya ilave 8 haftalık süre sonunda ise multivitamin+D vitamini grubunda serum HDL-C seviyesinin başlangıca göre anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir ( $p<0.05$ ). Aynı araştırmacılar serum total kolesterol seviyesinin çalışma başlangıcına göre; multivitamin+D vitamini grubunda 16. haftalık süre sonunda anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir ( $p<0.05$ ). Araştırmacılar serum TG ve LDL-C seviyelerinin çalışma başlangıcına göre; multivitamin+D vitamini grubunda 16. haftalık süre sonunda her iki testinde ortalamalarının azaldığı fakat anlamlı olmadığını bildirmişlerdir ( $p>0.05$ ). Ayrıca araştırmacılar total kolesterol/HDL-C oranının 16. haftalık süre sonunda anlamlı şekilde azaldığını bildirmişlerdir ( $p<0.01$ ). Fakat araştırmacıların çalışmasında D vitaminine ilave olarak multivitamin içeriğinde probiyotikler ve omega yağ asitleride bulunmaktadır, bireyler arasında yaş aralığı çok geniştir üstelik bireyler obezdir.

Wang ve ark. (2012), yaptıkları metaanalizde 1384 adet makaleyi incelemişler, ilave olarak D vitamini almanın LDL-C seviyesini anlamlı şekilde artırdığını ( $p<0.05$ ), total kolesterol seviyelerindeki artışın, HDL-C ve TG seviyelerindeki azalışın ise istatistiksel olarak anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar inceledikleri makalelerde birbiriyle uyumsuz sonuçlarla da karşılaşmışlar bu farklılıkların bireysel, verilen D vitamini dozu, çalışma süresi, obezite, farklı coğrafi bölgelerde bulunma gibi faktörlerden kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca D vitaminini ilave olarak almanın çalışma süresi uzadıkça HDL-C seviyesini de azaltabileceğini bildirmişlerdir.

Schnatz ve ark. (2014), yaşları 50 - 79 arasında değişen, 300'ü beyaz ırk, 200'ü siyah ırk ve 100'ü latin amerikalı toplam 600 menopozlu katılımcı kadına günlük 1gr kalsiyum ve 400 - 1,000 IU D vitaminini günlük besinlerine ilave olarak vermişlerdir. Araştırmacılar LDL-C seviyesinin anlamlı ( $p=0.02$ ) şekilde azaldığını diğer lipid parametrelerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Muñoz - Aguirre ve ark. (2015), tip 2 diyabetli postmenapozal yaşları 45 - 65 arasında değişen, vücut kütle indeksleri 25 ve üstü olan toplam 104 adet kadın üzerinde yaptıkları araştırmada (çalışma başlangıcı D vitamini seviyeleri en az 50 nmol/L) 6 ay boyunca günlük 4,000 IU D vitamini takviyesi almışlardır. Çalışma sonucunda bu grubun lipid parametreleri incelenmiş, serum TG seviyelerinin D vitamini grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azaldığını ( $p<0.05$ ), serum total



kolesterol, LDL-C ve HDL-C seviyelerinde önemli bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Islam ve ark. (2014), Bangladeşli giysi fabrikasında çalışan toplam 153 adet yaşları 18 - 36 arasında değişen D vitamini seviyesi düşük bayanları dört gruba ayırarak yaptıkları çalışmada; grupları sırası ile kontrol, D vitamini, D vitamini+kalsiyum grubu ve D vitamini+kalsiyum+multivitamin grubu şeklinde 4 grup oluşturmuşlar. 12 ay devam etmiş olan çalışmada katılımcılar, kontrol grubu hariç günlük 400 IU D vitaminini (tablet şeklinde) almışlardır. Süre sonunda D vitamini alan grubun total kolesterol, HDL-C, LDL-C seviyelerindeki azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını, TG ve VLDL kolesterol seviyelerindeki azalışın ise anlamlı ( $p<0.05$ ) olduğunu bildirmişlerdir.

Calgaroto ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada deneysel diyabet oluşturdukları sıçanlara 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dozunda 30 gün boyunca D vitamini vermişler; D vitamini verilen hem diyabetik hem de diyabetli olmayan sıçanlarda kendi kontrol gruplarına göre LDL-C seviyelerinin azaldığını ( $p<0.05$ ) bildirmişlerdir. TG seviyelerinin ise kontrol grubuna göre sadece diyabetik grupta azaldığı ( $p<0.05$ ), diyabetik olmayan grupta ise azalışın anlamlı olmadığı bildirilmiştir. HDL-C seviyelerinin ise kontrol gruplarına göre hem diyabetik hem de diyabetli olmayan sıçanlarda arttığını ( $p<0.05$ ) bildirmişlerdir.

Al - Asmari ve ark. (2015), erkek sıçanlarda HMG-CoA redüktaz inhibitörü simvastatin ile D vitamininin (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) birlikte ve ayrı ayrı etkisini incelemişlerdir. Çalışmada toplam dört grup olup; kontrol, simvastatin, simvastatin+D vitamini ve D vitamini gruplarında total kolesterol, TG seviyelerine incelemişler ve toplam 8 gün uygulama sonunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında D vitamini grubu total kolesterol ve TG seviyelerindeki değişikliğin anlamsız olduğunu bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2009), yaptıkları çalışmada VDR knock-out erkek ve dişi farelerin kolesterol konsantrasyonları üzerine etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada D vitamini reseptörü knock-out erkek ve dişi farelerin normal farelere göre daha yüksek ( $p=0.05$ ) total kolesterol seviyesine sahip olduğunu bildirmişler. Aynı şekilde D vitamini reseptörü knock-out erkek farelerin normal farelere göre daha yüksek

( $p < 0.05$ ) HDL-C seviyesine sahip olduğunu bildirmişler. Ayrıca araştırmacılar real time PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile ABCA1, Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein 2 (SREBP2: *Sterol regulatory element binding protein 2*), apoA-I, LDL-C reseptörü ve LXR $\beta$  mRNA ekspresyonları çalışmışlar ve çalışmalarında mutant erkek farelerin normal farelere göre daha yüksek ( $p < 0.05$ ) apoA-I, LXR $\beta$  mRNA seviyelerine sahip olduğunu bildirmişler. Fakat aynı değişiklikler dişi farelerde gözlenmemiş ve dişi mutant farelerde ise SREBP2 mRNA ekspresyonunu normal farelere göre azalmış ( $p < 0.05$ ) bulmuşlardır. Araştırmacılar mutant farelerdeki bu kolesterol yüksekliğinin besledikleri özel yemden mi kaynaklandığını araştırmak için aynı yemle mutant NMRI ve normal fareleri beslemişler ve mutant ve normal fareler arasında total kolesterol ve HDL-C seviyesi bakımından bir fark olmadığını bildirmişler. Bütün bunların ışığı altında kolesterol metabolizmasını beslenme, cinsiyet ve genetik yatkınlığın etkileyeceğini, VDR'nin etkisinin minimal olabileceğini bildirmişler. Araştırmacılar ayrıca çalışmalarında LXR $\beta$  mRNA ekspresyonları erkek farelerde artışına rağmen bununla birlikte artışı düşünülen ABCA1 (HDL-C'deki kolesterolü karaciğere taşınması ile ilişkili) mRNA ekspresyonlarının değişmediğini, dolayısı ile ABCA1'den farklı faktör ile (ABCG1, ABCG5 ve ABCG8) serum lipid değişikliklerinin etkilenmiş olabileceğini bildirmişlerdir. LXR $\alpha$ 'yı ise D vitamininin inhibe ettiğini ve bunun sonucunda ABCG1, ABCG5 ve ABCG8 ekspresyonlarının artışına katkısı olabileceğini de bildirmişlerdir.

Wehmeier ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada hücre kültüründe Western blot ve Northern yöntemi ile HDL-C'nin ana proteini olan apoA-I gen ekspresyonu üzerine 24,25(OH) $_2$ D $_3$  ve 25OHD $_3$  vitamini etkisini değerlendirmişler. Araştırmacılar karaciğer ve bağırsak hücrelerinde 24,25(OH) $_2$ D $_3$ 'nin hem apoA-I gen ekspresyonunu hem de apoA-I mRNA seviyelerini azalttığını ( $p < 0.05$ ), fakat 25OHD $_3$  vitamininin istatistiksel değerlendirme açısından anlamlı bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. 24,25(OH) $_2$ D $_3$  apoA-I gen ekspresyonu üzerine baskılayıcı etkilerini, bilinen (Wehmeier 2005), 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün VDR sinyal mekanizmasından farklı şekilde gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca ilave D vitamini almanın dozuna dikkat etmek gerektiğini de bildirmişlerdir.

Asemi ve ark. (2013), çift körlü randomize kontrollü olarak yaptıkları klinik çalışmada gestasyonel diyabetli gebe kadınlara D vitamini ilavesinin lipid

metabolizması, oksidatif parametreler ve yüksek duyarlıklı C-reaktif protein (hs-CRP: *high sensitive C-reaktive protein*) üzerine etkisine incelemişler. Araştırmacılar çalışma esnasında D vitamini alan gruba iki defa (50,000 IU) D vitamini vermişlerdir. Çalışma sonunda total kolesterol ( $p=0.01$ ) ve LDL-C ( $p=0.003$ ) seviyelerinde anlamlı azalış olduğunu, serum kalsiyum, TG, HDL-C, seviyelerinde ise anlamlı bir etkinin olmadığını bildirmişlerdir. D vitamini seviyeleri ise 6 haftalık süre sonunda 20.41(ng/ml) den 20.92 seviyelerine yükselmiştir.

#### *Total Kolesterol Değerleri*

Çalışmamızda HC+VitD ve HC gruplarında serum total kolesterol seviyerinde tablo: 4.1’de görüldüğü gibi yükselme belirlendi. HC grubu ile HC+VitD grubu karşılaştırıldığında, HC+VitD grubundaki HC grubuna göre serum total kolesterol seviyeleri düşük ( $p<0.05$ ) bulundu. Grup içi değerlendirmeye baktığımızda ise D vitamini grubunda başlangıç seviyelerine göre çalışma sonu serum total kolesterol seviyesindeki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Yine D vitamini grubu total kolesterol seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olmamakla birlikte düşük bulundu. Bu bulguda HC ye göre HC+VitD grubu ve D vitamini grubundaki total kolesterol seviyesindeki anlamlı azalışı, destekler niteliktedir.

Schnatz ve ark. (2014), Al-Asmari ve ark. (2015) ve Muñoz - Aguirre ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin total kolesterol seviyesi üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2012), metaanalizlerinde ve Islam ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada D vitamini ilavesinin total kolesterol seviyesi üzerinde anlamlı olmasada bir azalış olduğunu bildirmişlerdir.

Asemi ve ark. (2013), Maki ve ark. (2011) ve Wang ve ark. (2009) ise yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin total kolesterol seviyesi üzerine anlamlı azalışa yol açtığını bildirmektedirler. Araştırmacıların bulguları bizim bulgularımızla uyumludur.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda kimi grupta obez bireyler, kimi grupta yaşlı bireyler, hatta farklı ırklar incelenmiştir. Wang ve ark. (2012)’nin yaptıkları metaanaliz sonucunda da belirttikleri gibi bireysel farklılıklardan, verilen D vitamini

dozu, süresi, cinsiyet farklılıkları gibi sebeplerden kaynaklanan farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Bizim çalışmamızda kontrol grubuna göre D vitamini verilen grupta serum total kolesterol seviyelerinde anlamlı ( $p<0.05$ ) bir azalış görüldü. Tablo: 4.1 - 2'ye baktığımızda ise HC grubuna göre HC+VitD grubunda serum total kolesterol seviyesinde azalış görüldü ( $p<0.05$ ). Çalışmamızda D vitamininin total kolesterolü düşürücü etkisi Wang ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada belirttiği gibi 'VDR'nin etkisi minimal olabilir' ancak yüksek kolesterol seviyelerinde etkisi daha belirgin oluşacağı için kontrol grubu ile D vitamini grubu arasında anlamlı bir fark oluşmamış olabilir.

Karaciğer x reseptörleri (LXRs: *Liver x receptors*) hedef genlerinin birçoğu yağ asidi metabolizması sentez yolunu ve kolesterolü de içeren düzenleyici bir role sahiptir. Bu reseptörler RXR ile heterodimer oluşturarak kolesterol sensörü olarak davrandığı kadar kolesterol hemostazını sağlamak için lipid transportu ve kolesterolün hücre içinden dışına çıkışı için genlerin düzenleyicisi olarak da davranırlar (Wang ve ark. 2009). D vitamini ise kanda 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesinin yükselmesiyle birlikte kalsitriyolün veya D vitamini metabolitlerinin herhangi biri LXR $\alpha$  ve/veya LXR $\beta$ 'yı etkilediği, dolayısıyla kolesterol sentezini veya emilimini azaltmış ve/veya kolesterol akışını, (Jiang 2006; Wang ve ark. 2009) atımını (Wójcicka 2007) artırmış olabilir.

#### *Trigliserit Değerleri*

Çalışmamızda gruplar arası TG seviyeleri D vitamini ilavesi açısından bakıldığında farklılıklar anlamlı değildi (Tablo: 4.1 - 2). Grup içi değerlendirmelerde ise D vitamini grubundaki başlangıç seviyelerine göre çalışma sonu TG seviyelerindeki artış anlamlı olmamakla birlikte  $p=0.051$  olarak bulundu. HC+VitD ve HC gruplarında ise başlangıç seviyelerine göre çalışma sonu TG seviyesindeki artış anlamlı bulundu (Tablo: 4.1), ( $p<0.01$ ;  $p<0.01$ );

D vitamini ilavesinin TG seviyesi üzerine etkisi incelendiğinde; Muñoz - Aguirre ark. (2015), Islam ve ark. (2014) yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesiyle TG seviyelerinde azalış olduğunu ( $p<0.05$ ), Calgaroto ve ark. (2015) ise

sadece diyabetik grupta kendi kontrol grubuna göre azalış olduğunu ( $p<0.05$ ) bildirmişlerdir.

Maki ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada D vitamini ilavesinin 16 haftalık süre sonunda TG seviyesinde azalış olduğunu fakat anlamsız olduğunu, Wang ve ark. (2012) ise yaptıkları metaanaliz de TG seviyelerinin azalış eğiliminde olabileceğini bildirmişlerdir.

Al - Asmari ve ark. (2015), Schnatz ve ark. (2014) ve Asemi ve ark. (2013) ise yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin TG seviyesi üzerine etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Bilindiği gibi tavşanlarda kaprofaji görülmektedir. Yani gece yaptığı yumuşak dışkıyı yemektirler. Leiber ve ark. (2008), tavşanlarda ve diğer küçük otcul canlılardaki mikrobiyal lipid sindirimini ve çekumdaki mikrobiyal fermantasyonun önemi henüz tam bilinmediğini açıklamışlardır. Besinlerin mikrobiyal fermantasyon ile sindirimi, doymamış yağ asitlerinin izomerleşmesi ve hidrojenlenmesi ile ilişkilidir. Bu durum stearik asit, konjuge linoleik asit ve çeşitli trans yağ asitlerinin önemli miktarda üretimi ile sonuçlanmaktadır. Tavşanlarda kaprofaji yoluyla bu tür yağlar, vitaminler ve besinler vücuda tekrar alınmaktadır. Biz çalışmamızda tavşanlarımızı kan alacağımız günün akşamı aç bıraksakda kaprofaji yolu ile tekrar beslenebildikleri için TG seviyeleri bu durumdan etkilenmiş olabilir. Bizim sonuçlarımızda D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki TG seviyelerindeki kontrollerine göre artış eğilimi, her ne kadar gruplar arası değerlendirmede anlamlı olmasa da kaprofajiden veya kaprofaji ve D vitamini etkileşiminden veya D vitamini ilavesinden kaynaklanmış olabileceği kanaatine varıldı.

#### *LDL Kolesterol Değerleri*

Çalışmamızda HC+VitD ve HC gruplarında serum LDL-C seviyelerinde tablo: 4.1'de görüldüğü gibi başlangıç seviyelerine göre yükselme belirlendi. Çalışma sonu HC+VitD grubundaki, HC grubuna göre serum LDL-C seviyelerindeki azalış ve kontrol grubuna göre D vitamini LDL-C seviyelerindeki fark anlamlı değildi (Tablo: 4.1 - 2).

Son yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde sadece Wang ve ark. (2012) yaptıkları metaanalizde bizim sonuçlarımızdan farklı olarak D vitamini ilavesinin LDL-C seviyelerinde anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir ( $p<0.05$ ).

Muñoz - Aguirre ve ark. (2015), ise yaptıkları çalışmada D vitamini ilavesinin LDL-C seviyesi üzerine etkisini görememişlerdir.

Calgaroto ve ark. (2015), Schnatz ve ark. (2014) ve Asemi ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin LDL-C seviyesi üzerine anlamlı bir azalış olduğunu bildirmektedir ( $p<0.05$ ).

Islam ve ark. (2014) ve Maki ark. (2011), ise yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin LDL-C seviyelerinde bizim çalışmamızda olduğu gibi anlamlı olmayan bir azalış olduğunu bildirmektedirler ( $p>0.05$ ).

#### *HDL Kolesterol Değerleri*

Çalışmamızda gruplar arası HDL-C seviyesi farklılıkları anlamlı değildi (Tablo: 4.2). Grup içi değerlendirmeye baktığımızda ise D vitamini grubunda başlangıç seviyelerine göre çalışma sonu HDL-C seviyesindeki azalış anlamlı bulundu (Tablo: 4.1), ( $p<0.05$ ).

D vitamini ilavesinin HDL-C seviyesi üzerine etkisinde, ‘tıpkı total kolesterolde olduğu gibi’ farklılıklar görülmektedir. Maki ve ark. (2011), Calgaroto ve ark. (2015) bizim çalışmamızdaki sonuçlardan farklı olarak HDL-C seviyelerinde anlamlı artış ( $p<0.05$ ;  $p<0.05$ ) gözlemlemişler fakat Maki ve ark. (2011),’nın çalışmasındaki bireyler obez olduğu gibi ve bireyler arasında yaş farkı fazla ve aynı zamanda bireyler farklı ırklardan oluşmakta, ayrıca bu araştırmada D vitamini ile birlikte multivitamin ve probiyotiklerde verilmiş olması sonuçlarımızdan farklılık oluşturmuştur.

Schnatz ve ark. (2014), Muñoz - Aguirre ve ark. (2015) ve Asemi ve ark. (2013) yaptıkları çalışmalarda D vitamini ilavesinin HDL-C seviyesi üzerine etkisini görememişlerdir.

Islam ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada ve Wang ve ark. (2012), yaptığı metaanalizde HDL-C seviyesi üzerine anlamlı olmayan bir azalış olduğunu bildirmektedir. Wang ve ark. (2012), yaptıkları metaanaliz çalışmasında devamlı D vitamini almanın HDL-C’yi düşürebileceğini bildirmişlerdir. Wang ve ark. (2009),

bildirdikleri bizim çalışmamızdaki sonuçları destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar VDR knock-out erkek farelerde hem HDL-C seviyesini anlamlı şekilde yüksek bulmuşlar hem de HDL-C'nin ana proteini olan apoA-I'i yüksek bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda sadece D vitamini verilen grupta çalışma başlangıcı ve sonu karşılaştırıldığında HDL-C seviyesininin anlamlı şekilde azaldığı bulundu (Tablo: 4.2). Bununla birlikte Wehmeier ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada  $24,25(OH)_2D_3$  ün HDL-C'nin major proteini apoA-I gen ekspresyonunu baskıladığı da belirtilmektedirler. Kanda  $25OHD_3$  vitamini seviyesinin yükselmesiyle birlikte kalsitriyolün veya D vitamini metabolitlerinin birinin apoA-I (Wehmeier 2005), LXR $\alpha$  (Jiang 2006) ve/veya LXR $\beta$ 'yı (Wang ve ark. 2009) etkilediği dolayısıyla kolesterolün azalışı ile birlikte HDL-C'de azalmış olabileceği kanaatine varıldı.

### 5.3. D Vitamini ve Kalsiyum Değerleri

Çalışmamızda tavşanlara verilecek olan D vitamini dozu belirlenirken yedikleri yemin içeriğinin de bulunan ve verilecek olan D vitamini miktarının beslenme için normal sınırlar içerisinde kalmasına dikkat edildi. Curry ve ark. (1974), hayatı devam ettirmek için gerekli D vitamini miktarının 10 - 13 IU/kg/gün olabileceğini bildirmişlerdir. Fakat Lebas (2000),'a göre; Coudert ve Lebas (1982) tavşanların beslenmesinde 300 IU/kg/gün miktarın yetersiz olduğunu bildirmiş, Bourdeau ve ark. (1986) pratikte 600 - 1,000 IU/kg/gün D vitaminin büyüme ve emzirilen tavşanlarda yeterli miktar olduğunu bildirmişlerdir. Löliger ve Vogt (1980) ise 3250 IU D vitamini/kg'ın diyet içeriğinde olduğunda D vitamini aşırılığında dolayı yumuşak dokularda, aortta ve böbrekte kalsifikasyonlar olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kullandığımız 2.5 - 3.8 kg vücut ağırlıklı, 8 - 12 aylık erkek tavşanların her birinin günde 120 - 180 gram yem tükettiği çalışma öncesinde belirlendi. Tablo: 3.2'de görüldüğü gibi yem 800 IU D vitamini/kg içermektedir. Bir tavşanın günde 120 - 180 gram yem tükettiği düşünüldüğünde aldığı D vitamini miktarı ise ~10 - 14 IU' ye denk gelmektedir. Bu alınan D vitamini miktarı ise, Curry ve ark. (1974) belirtmiş olduğu gerekli miktara uygun gelmektedir. Çalışmamıza başlamadan yaptığımız pilot araştırmada 8 hafta süresince erkek tavşanları 600 IU/kg/gün D vitamini uygulandı. Bu pilot çalışmadaki tavşanlar 8 haftalık süre dolmadan (5.-6. haftalarda) ölmeye başladılar. Bu ölen hayvanların D vitamini seviyeleri başlangıca göre ~4 kat arttı. Çalışmamızda toplam 8 hafta gibi bir

süre D vitamini uygulayacağımız için, Bourdeau ve ark. (1986) ve Löliger ve Vogt (1980) belirttikleri miktarlar ve yaptığımız pilot çalışmada göz önüne alınarak 300 IU/kg/gün D vitamini dozu belirlendi.

Çalışmamızda D vitamini grubunda 85.23 ng/ml ortalama seviyelerinde olan plazma 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesi tablo: 4.3'de görüldüğü gibi başlangıç seviyelerine göre yükselme belirlendi. HC+VitD grubunda D ilavesine rağmen çalışma sonuna kadar başlangıç seviyelerini yaklaşık olarak koruyabildi. HC grubunda ise D vitamini seviyeleri gittikçe azalarak çalışma sonunda başlangıç seviyelerine göre azaldı (p<0.001). Amacımız burada D<sub>3</sub> vitamini verdiğimiz gruplarda; D<sub>3</sub> vitamininin bağırsaklardan emilip ardından 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesinin takibini yapmaktı. Kontrol grubunda 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesinde artış gözlenmez iken D vitamini grubunda plazma 25OHD<sub>3</sub> seviyeleri arttı. Hiperkolesterolemi gruplarında ise; HC grubundaki plazma 25OHD<sub>3</sub> seviyelerinin çalışma sonuna doğru gittikçe azaldığı ve HC+VitD grubunun plazma 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyesinin ise başlangıç seviyelerini koruyabildiği görüldü. Ayrıca çalışma sonu HC+VitD grubuna göre HC grubu 25OHD<sub>3</sub> vitamini seviyeleri farkı anlamlı bulundu (Tablo: 4.3 - 4). Bilindiği gibi 25OHD vitamini, D vitamininin vücutta depo şekli olup, gerektiğinde kalsitrole veya D vitamininin diğer metabolitlerine dönüşebilmektedir (Rodwell ve ark. 2015).

Kan kalsiyum seviyeleri D<sub>3</sub> vitamini verdiğimiz gruplarda D<sub>3</sub> vitaminine bağlı hiperkalsemi gelişme riskine karşı kalsiyum seviyeleri takibe alındı. D<sub>3</sub> vitamini verdiğimiz D vitamini ve HC gruplarında çalışma başlangıcına göre çalışma sonunda kalsiyum seviyeleri azaldı (p<0.01; p<0.001). HC+VitD grubunda çalışma başlangıcına göre çalışma sonunda kalsiyum seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

Diğer memeli türlerinden farklı olarak tavşanlarda kalsiyumun emilimi D vitamininden bağımsız olarak gerçekleşir (Jekl ve Redrobe 2013). Kanlarındaki total kalsiyum konsantrasyonu diyetlerindeki kalsiyum miktarına göre değişir (Clauss ve ark. 2012; Jekl ve Redrobe 2013). Kalsiyumun intestinal absorpsiyonu pasif difüzyon yolu ile olmaktadır (Jekl ve Redrobe 2013). Vücut için fazlalık olan miktar idrar ile atılmaktadır (Clauss ve ark. 2012).



Tavşanlarda kan kalsiyum normal seviyeleri aldığı diyetle göre değişken olmakla birlikte Redrobe (2002)'ye göre 13 - 15 mg/dl, Jekl ve Redrobe (2013)'ye göre ise 5.96 - 14.8 mg/dl seviyelerindedir. Hatta yetişkin tavşanları yüksek kalsiyum diyeti ile beslendiğinde kalsiyum seviyeleri 18 mg/dl seviyelerinin üzerine hızla çıkabileceği de bildirilmiştir (Jekl ve Redrobe 2013). Bizim çalışmamızda ise D vitamini grubu 0. hafta kalsiyum seviyeleri ortalaması tablo: 4.3'e bakıldığında  $15.59 \pm 0.94$ 'den çalışma sonunda  $13.62 \pm 0.92$  seviyelerine gerilemektedir. Ayrıca çalışmamızdaki 2 haftada bir yapılan ölçüm sonuçlarında, kontrol grubumuzdaki maksimum kalsiyum seviyesi ortalamaları ile D vitamini grubundaki ortalamalar birbirine yakın değerlerdir. Kalsiyum seviyelerindeki azalış her ne kadar anlamlı olsa da literatüre göre (Jekl ve Redrobe (2013) bu azalış normal sınırlar içerisindedir. Ayrıca çalışmamızda kalsiyum seviyesini takip etme amacımız D vitamini hipervitaminözüne bağlı olarak gelişebilecek olan hiperkalsemidir. Çalışmamızdaki tavşanların günlük yedikleri diyetlerine bağlı olarak gelişebilecek bireysel kalsiyum seviyeleri yükseklikleri de göz önünde bulundurulduğunda; kontrol grubu kalsiyum seviyeleri ortalamalarını, D vitamini verdiğimiz gruplarda aşmadığı için D vitaminine bağlı bir hipervitaminöz oluşmadığı düşüncesindeyiz.

#### *5.4. TAS, TOS, OSI ve MDA Değerleri*

##### *TAS Değerleri*

Çalışmamızda tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; serum TAS seviyeleri ortalamalarında bir artış olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; serum TAS seviyeleri ortalamalarında artış olduğu fakat bu gruplardaki artışların anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokularında D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; doku TAS seviyeleri ortalamalarında azalış olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda; HC grubuna göre doku TAS seviyeleri ortalamalarında azalış olduğu, fakat bu gruplardaki azalmaların anlamlı olmadığı görüldü.

### *TOS Değerleri*

Çalışmamızda tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; serum TOS seviyelerinde bir azalış olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; serum TOS seviyeleri ortalamalarında azalış olduğu fakat bu gruplardaki azalmaların anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokularında D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre, serum TOS seviyelerinde azalış olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre doku TOS seviyeleri ortalamalarında azalış olduğu fakat bu gruplardaki azalmaların anlamlı olmadığı görüldü.

### *OSI Değerleri*

Çalışmamızda tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; serum OSI seviyelerinde azalış olduğu fakat bu azalışın anlamlı olmadığı görüldü. Hiperkolesterolemi gruplarında ise, D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; serum OSI seviyelerinde azalış olduğu ve bu azalışın anlamlı olduğu ( $p<0.05$ ) görüldü. Karaciğer dokularında D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; doku OSI seviyeleri ortalamalarında artışın olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında ise D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; doku OSI seviyelerinde azalışın olduğu fakat bu gruplardaki artış ve azalışın anlamlı olmadığı görüldü.

### *MDA Değerleri*

Çalışmamızda tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre; serum MDA seviyelerinde artış olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında ise D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; serum MDA seviyelerinde azalış olduğu fakat bu gruplardaki artış ve azalışın anlamlı olmadığı görüldü. Karaciğer dokularında D vitamini verdiğimiz grupta kontrol grubuna göre, doku MDA seviyelerinde azalışın olduğu, yine hiperkolesterolemi gruplarında D vitamini verdiğimiz HC+VitD grubunda HC grubuna göre; doku MDA seviyelerinde azalışın olduğu fakat bu gruplardaki azalmaların anlamlı olmadığı görüldü.

Bhat ve İsmail (2015), sıçan kas dokularında hafif oksidatif stresi önlemede D vitamininin etkisini incemişler ve çalışmada hayvanları iki gruba ayırmışlar bir grup D vitamini yoksun diyetle diğer grubu normal diyetle beslemişlerdir. Araştırmacılar D vitamini eksikliğinin sıçan kaslarında hafif oksidatif stresi indüklediğini, protein karbonillerini ve antioksidan enzim aktivitelerini değiştirdiğini bildirmişlerdir. D vitamini ilavesinin bütün oksidatif stresle ilişkili parametreleri düzeltebileceğini de bildirmişlerdir.

Foroozanfard ve ark. (2015), polikistik over sendromlu, kilolu ve D vitamini eksikliği bulunan hastalara 8 hafta kalsiyum ve D vitamini takviyesi yapıp HOMA-B skoru, hs-CRP, nitrik oksit, MDA, TAS, GSH ve CAT seviyelerini incelemişler. Çalışmada kalsiyum ve D vitamini takviyesi yapılan grupta HOMA-B ( $p=0.03$ ), hs-CRP ( $p=0.04$ ), MDA ( $p<0.01$ ) serum seviyelerinde diğer gruplara göre anlamlı bir azalış olduğunu, TAS ( $p<0.01$ ) ve GSH ( $p<0.01$ ) serum seviyelerinde ise anlamlı bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca sadece D vitamini ilavesi yapılan grupta ise çalışma başlangıcına göre; HOMA-B, hs-CRP seviyelerinde, plasebo grubunda artışına rağmen, D vitamini grubunda azalış olduğu, yine NO ve MDA seviyeleri plasebo grubunda artışına rağmen D vitamini ilavesi yapılan grupta kayda değer bir değişikliğin olmadığını, TAS seviyesinin ise plasebo grubunda azalmasına rağmen D vitamini ilavesi yapılan grupta anlamlı şekilde ( $p<0.05$ ) arttığını bildirmişlerdir.

Asemi ve ark. (2013), yaptıkları klinik çalışmada gestasyonel diyabetli gebe kadınlara D vitamini ilavesinin lipid metabolizması, oksidatif parametreler ve hs-CRP üzerine etkisini incelemişler. Çalışma esnasında D vitamini alan gruba iki defa (50,000 IU) D vitamini vermişler. hs-CRP seviyeleri D vitamini alan grupta çalışma sonunda plasebo grubuna göre daha fazla azalmıştır. D vitamini seviyeleri ise 6 haftalık süre sonunda 20.41(ng/ml) den 20.92 seviyelerine yükselmiş olduğunu görmüşler fakat çalışma sonunda hs-CRP, TAS ve GSH üzerine anlamlı bir etki göremediklerini bildirmişlerdir.

de Medeiros Cavalcante ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada D vitamini seviyesi yetersiz yaşlı bayanlara yüksek doz (200,000 IU) D<sub>3</sub> vitamini vererek oksidatif parametrelerine incelemişler, araştırmacılar 4 hafta süre sonunda TAS'ın anlamlı şekilde arttığı ( $p=0.03$ ) hs-CRP seviyelerinin anlamlı şekilde azaldığı ( $p=0.007$ ) ve MDA seviyelerinde bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Sharifi ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı olan yetişkin hastalara D vitamini takviyesinin oksidatif stres, enflamatuar belirteçler üzerine etkisini incelemişler, hastalara 4 ay boyunca 2 haftada bir 50,000 IU D<sub>3</sub> vitamini vermişler. Çalışma sonunda D vitamini alan grubun serum MDA seviyelerinin kontrole göre anlamlı şekilde azaldığı (p=0,03), hs-CRP seviyesinin azaldığı fakat anlamlı olmadığını, TNF $\alpha$  ve TAS parametrelerinde ise bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir.

Lan ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada ağır astım krizleri olan hastalarda D vitamini seviyelerine bakılarak; oksidatif stres, kortikoidlere direnç, DNA hasarı üzerine farklılıklarını incelemişler. Ağır astım alevlenmesi olan ve D vitamini eksikliği olan hastalarda perifer kanda bulunan monositlerde DNA hasarı ve hastalarda oksidatif stres gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bu hastalarda D vitamini eksikliğinin TNF $\alpha$ , nükleer faktör kapp B ekspresyonlarının ve nükleer faktör kapp B fosforilasyonunun arttığını, ilave olarak D vitamini almanın oksidatif stresi azalttığını ve kortikosteroidlere karşı cevabı artırdığını bildirmişlerdir. Yine ilave olarak D vitamini almanın ROS salınımını ve solunum yolları epitel hücrelerindeki DNA hasarını azalttığını bildirmişlerdir.

Başer ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada D vitamini seviyesi düşük (< 20 ng/ml) 41 adet birey ile D vitamini seviyesi normal (>30 ng/ml) 30 adet bireyin TAS, TOS, iskemiye modifiye albumin, Ox-LDL ve hs-CRP seviyelerini karşılaştırmışlar. Araştırmacılar kontrollere göre; D vitamini seviyesi düşük olan bireylerde TAS seviyesinin anlamlı şekilde (p<0.001) daha az olduğunu, TOS ve iskemiye modifiye albumin seviyelerinin anlamlı şekilde (p<0.05; p<0.001) daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Saedisomeolia ve ark. (2013), yaptıkları çalışmalarında tip2 diyabetli ve normal bireylerde SOD, glutatyon redüktaz, GSH-Px ve TAS seviyelerini karşılaştırmışlar, tip2 diyabetli hastalarda D vitamini seviyesi ile TAS seviyeleri arasında anlamlı (p<0.05) pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2014), 1488 adet katılımcı ile yaptıkları çalışmada yaşları 7 - 11 arasında değişen okul çocuklarının 25OHD vitamini seviyelerine bakıp; şişmanlık, inflamasyon ve oksidatif stres parametrelerini değerlendirmişler. Araştırmacılar çocuklarda 25OHD vitamini seviyelerinin ortalama 18.4 ng/ml

olduğunu ve 839 adet çocukta 25OHD vitamini seviyesinin yetersiz olduğunu (<20 ng/ml) belirlemişlerdir. Yetersizlik belirlenen çocuklarda yetersizlik olmayanlara göre vücut ağırlığı (p<0.001), vücut kitle indeksi (p<0.001), belçevresi genişliği (p<0.001) vücut yağ oranının (p<0.001) daha fazla olduğunu, SOD seviyesinin ise daha düşük olduğunu (p<0.001) bildirmişler. Sonuç olarak D vitamini eksikliğinin, şişmanlık ve oksidatif stresin yol açtığı hastalık risklerini artırabileceğini bildirmişlerdir.

Eftekhari ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada çift körlü plasebo kontrollü yaşları 30 - 75 arasında değişen tip 2 diyabetli hastaları iki gruba ayırıp, bir gruba kalsitriyolu (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) 50 µg dozunda her gün vermişler. 6. ve 12. hafta sonunda total kolesterol, LDL-C, HDL-C, TG, ve MDA seviyelerine incelemişler. Araştırmacılar total kolesterol, LDL-C, TG ve MDA seviyelerini hem plasebo grubunda hem de çalışma grubunda başlangıç seviyelerine göre; anlamlı şekilde (p<0.05) azaldığını, fakat HDL-C seviyesinin sadece plasebo grubunda azaldığını (p<0.05) bildirmişler fakat gruplar arasında her bir değişken için anlamlı bir fark olmadığını, sonuç olarak bulguların istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kalsitriolün lipid profilini ve oksidatif stres belirteçlerini tip 2 diyabetli hastalarda azalttığını bildirmişlerdir.

Nseir ve ark. (2011), non-alkolik karaciğer hastalığı olan hastalarda tekrarlayan bakteriyel enfeksiyon riskinin olup olmadığını araştırmışlar ve serumda MDA, CRP, D vitamini gibi parametreleri değerlendirmişler. MDA ve CRP seviyelerinin non-alkolik karaciğer hastalığı olanlarda kontrole göre daha yüksek (p<0.01; p<0.05) olduğunu, D vitamini seviyesinin ise yine kontrole göre daha düşük (p<0.01) olduğunu bildirmişler. D vitamini seviyelerinin non-alkolik karaciğer hastalığı olanlarda kontrollere göre düşük olmasının tekrarlayan enfeksiyonlardan dolayı olabileceğini ve sonuçta D vitamini verilmesinin tekrarlayan enfeksiyonlardan koruyabileceğini bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda hiperkolesterolemi gruplarında; D vitamini verdiğimiz hayvanlarda serum OSI hariç, diğer parametrelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Yani HC+VitD grubunda HC grubuna göre serum OSI anlamlı şekilde (p<0.05) azaldı.

Foroozanfard ve ark. (2015), de Medeiros Cavalcante ve ark. (2015) ve Başer ve ark. (2015) alışmalarında D vitamini ilavesi yapılan gruplarla D vitamini eksikliği olan grupları karşılaştırmışlar ve D vitamini ilavesi yapılan gruplarda D vitamini eksikliği olan gruplara göre TAS seviyelerinde anlamlı bir artış ( $p<0.01$ ;  $p=0.03$ ;  $p<0.001$ ) gözlenmiştir. Asemi ve ark. (2013) ve Sharifi ve ark. (2014) ise D vitamini ilavesi ile kontrollere göre TAS seviyelerinde bir değişiklik gzlemlememişler. Bu araştırmacılarından Asemi gebelerde, Sharifi ise karaciğer yağlanması olan bireylerde çalışma yaptıklarından dolayı başka bir sebepten veya çalışma sonunda başlangıca göre D vitamini seviyelerinde fazla bir artış olmadığı için TAS seviyeleri üzerine anlamlı bir artış gözlenmemiş olabilir. D vitamini seviyesi ile TAS seviyesinin pozitif korole (Saedisomeolia ve ark. 2013; Başer ve ark. 2015) olduğu için bizim çalışmamızda normal diyetle beslenenlerin D vitamini seviyeleri düşük olmadığı için TAS seviyeleri arasında anlamlı bir fark oluşmamış olabilir. Çalışmamızda D vitamini verilen grupta kontrol grubuna göre TAS seviyelerindeki artış (Tablo: 4.5 - 6) anlamlı değilse de daha yüksektir. Bu bulgular ışığında diyetlerine D vitamini ilavesinin TAS seviyelerinde kısmi bir artış yapabileceği kanaatine vardık.

TOS seviyeleri açısından baktığımızda Başer ve ark. (2015) D vitamini seviyesi düşük olan kişilerde D vitamini seviyesi normal olanlara göre anlamlı ( $p<0.05$ ) şekilde TOS seviyelerininin daha yüksek olduğunu, de Medeiros Cavalcante ve ark. (2015) D vitamini verilen grupta D vitamini eksikliği olan gruba göre hassas bir enflamasyon belirteci olan hs-CRP seviyesinin anlamlı ( $p=0.007$ ) azaldığını, yine Foroozanfard ve ark. (2015) ve Sharifi ve ark. (2014) D vitamini verilen grupta D vitamini verilmeyen gruba göre hs-CRP seviyesinin azaldığını fakat anlamlı olmadığını, yine Sharifi ve ark. (2014) D vitamini almanın almayan gruba göre bir iflamasyon belirteci olan TNF $\alpha$  seviyesine etkisinin olmadığını, Başer ve ark. (2015) D vitamini seviyesi düşük olan kişilerle D vitamini seviyesi normal olanlar arasında hs-CRP ve Ox-LDL seviyelerinde anlamlı bir değişikliğin olmadığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızdada özellikle HC grubunda TOS seviyesi diğer gruplara göre (Kontrol, D vitamini ve HC+VitD) daha yüksek çıkmıştır. Fakat gruplar kendi içinde (VitD ile kontrol, HC+VitD ile HC) karşılaştırıldığında anlamlı çıkmamıştır. Çünkü tıpkı TAS seviyelerinde olduğu gibi, normal diyetle beslenen tavşanlarla, ilave D vitamini alan tavşanların D vitamini

seviyeleri çok farklı olmadığı için oksidan strese karşı cevapları da birbirlerine yakın olabilir. Dolayısı ile oksidan strese, (Eftekhari ve ark. 2014; Lan ve ark. 2014; Bhat ve İsmail 2015) katekolaminlere, DNA hasarını engellemeye (Lan ve ark. 2014) karşı cevapları birbirine yakındır. Çalışmamızda organizmanın oksidatif stres indeksi göstergesi olan (antioksidan/oksidan dengesinin bir göstergesi) OSI kontrol grubuna göre D vitamini grubunda, serum ve doku örneklerinde anlamlı bulunmayıp hiperkolesterolemi gruplarında (HC'ye göre HC+VitD grubunda) serum OSI seviyelerinin anlamlı olarak düşük olması oksidan strese artırıcı etkenlere karşı, D vitamini ilavesinin OSI indeksini azaltıcı etkisinin olduğunu desteklemektedir. Bu etki ise kan D vitamini seviyesine göre farklılık gösterebilir.

Çalışmamızda MDA seviyelerinde D vitamini verdiğimiz gruplarda verilmeyenlere göre anlamlı bir fark görülmemiştir. Bulgularımız Foroozanfar ve ark. (2015), de Medeiros Cavalcante ve ark. (2015) ve Eftekhari ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmalarla uyumludur. Fakat tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi D vitamini verilen gruplarda MDA seviyesi azalma eğilimindedir. D vitamininin oksidatif strese karşı koruyuculuğu, Bhat ve İsmail 2015; Lan ve ark. 2014; Eftekhari ve ark. 2014'ün çalışmalarında olduğu gibi az seviyede olabileceğinden veya D vitamini verdiğimiz gruplarla vermediğimiz gruplar arasında kan D vitamini seviyesi farklılığı yeterince oluşmamış olduğu için MDA seviyelerinde anlamlı bir fark oluşmamış olabilir. Nseir ve ark. (2011) çalışmalarında; non-alkolik karaciğer hastalığı olanlarda kontrol grubuna göre MDA ve CRP seviyelerinde anlamlı şekilde artış belirlemişlerdir. Bu hastalarda D vitamini seviyesini düşük tespit etmişler ve D vitamini verilmesinin tekrarlayan enfeksiyonlardan koruyabileceğini de bildirmişlerdir.

##### *5.5. PON- 1 Değerleri*

Çalışmamızda tablo 4:5 - 'da da görüldüğü gibi serum PON-1 aktivite değerlerinin kontrol grubuna göre; D vitamini ve HC+VitD gruplarındaki azalış anlamlı bulunmadı, fakat HC grubundaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.01$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki artış ve HC grubundaki azalış anlamlı bulunmadı. Fakat HC+VitD grubuna göre HC grubu serum PON-1 aktivitelerindeki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). Karaciğer dokusunda tablo: 4.5 - 6'da da görüldüğü gibi kontrol grubuna göre; D vitamini grubundaki azalış anlamlı bulunmadı, fakat

HC+VitD ve HC gruplarındaki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ;  $p<0.01$ ). D vitamini grubuna göre; HC+VitD grubundaki karaciğer PON-1 aktivite değerindeki azalış anlamlı bulunmadı, fakat HC grubunun karaciğer PON-1 aktivite değerindeki azalış anlamlı bulundu ( $p<0.05$ ). HC+VitD grubuna göre; HC grubunun PON-1 aktivite değerindeki azalış anlamlı bulunmadı.

Eren ve ark. (2014), ST elevasyonlu miyokard infarktüsü geçirmiş 30 adet hastada D vitamini seviyesi ile TAS, TOS, Paraoksonaz-ARE ve oksidatif stres belirteçlerini incelemişler. Araştırmacılar  $TNF\alpha$  ve ARE aktivitesi arasında negatif korelasyon, OSI ve TOS arasında serum amiloid A (akut faz yanıt elemanı) ile pozitif korelasyon, yine D vitamini seviyesi ile ARE aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. HDL-C ile ilişkili farklı fonksiyonları olan serum amiloid A (antiinflamatuvar) ve PON-1-ARE (antioksidan) moleküllerinin açık bir şekilde farklı yönde değişiklikler gösterdiği bildirilmiştir. Araştırmacılar D vitamini seviyesini; yeterli ( $\leq 30$  ng/ml), eksiklik (21 - 29 ng/ml) ve yetersizlik ( $\leq 20$  ng/ml) olarak sınıflandırmışlar. PON-1-ARE enzim aktivitesi D vitamini eksikliğinin derecesi ile azaldığını, D vitamini seviyesi ne kadar düşüğe PON-1-ARE enzim aktivitesinin o kadar düşük olduğunu bildirmektedirler. Ayrıca araştırmacılar D vitamini seviyesi düşük ST elevasyonlu miyokard infarktüsülü hastalara destek tedavisi olarak D vitamini verilebileceğini de bildirmişlerdir.

Ferreti ve ark. (2015), yaptıkları metaanalizde PON-1 aktivite değerindeki azalışın kardiyovasküler hastalıklarda ortaya konulduğunu, statinlerin kullanılması ile PON-1 ve ARE'deki artışın kardiyovasküler sonuçları önlemede kısmen klinik yarar sağlayabileceğini bildirmişlerdir.

Akalin Çiftçi ve ark. (2015), yaşları 40 - 60 arasında olan (20 erkek 10 bayan) hiperolesterolemili hastalara statin tedavisi verilerek tedaviden önce ve sonra oksidatif parametreler, NO, PON-1 ve lipid paneli çalışmışlar. Araştırmacılar 3 aylık atorvastatin tedavisi ile NO ( $p<0.001$ ), PON-1 ( $p<0.001$ ), ARE ( $p<0.01$ ), HDL-C ve apoA1 seviyelerinde artış olduğunu, MDA ( $p<0.001$ ) ve asimetrik dimetil arjinin ( $p<0.001$ ) seviyelerinde azalış olduğunu bildirilmişler. Sonuç olarak atorvastatin tedavisinin HDL-C'nin antiinflamatuvar ve/veya antioksidan kapasitesini artırdığı ve ateroskleroza ve endotelial disfonksiyona karşı koruyucu olduğunu bildirmişlerdir.



Çalışmamızla ilgili olarak D vitamini takviyesinin PON-1 üzerine olan etkisi ile ilgili literatür taramasında ulaşabildiğimiz bilgiler sınırlı kalmıştır. Çalışmamızda D vitamini verilen HC+VitD grubunda HC grubuna göre enzim aktivitesi daha yüksek bulundu. Serumda genellikle HDL-C üzerinde lokalize olan PON-1'in (Durrington ve ark. 2001; van Himbergen ev ark. 2006) HC+VitD grubunda tablo: 4 - 1,5,6'ya bakıldığında çalışma başlangıcına göre çalışma sonunda HDL-C seviyesinin artışından kaynaklanabileceği, HC grubunda PON-1 aktivite değerindeki artış olmadığı HC+VitD grubundaki artışın D vitamini takviyesinden olmayıp daha çok HDL-C seviyelerinin artışından kaynaklandığı düşünüldü. Çünkü D vitamini verilen grupta kontrol grubuna göre PON-1 aktivite değeri (anlamli olmasa da) serum ve dokuda azaldığı tablo: 4.5'de görülmektedir. Eren ve ark. (2014), yaptıkları çalışmada D vitamini seviyesinin azalışı ile PON-1 aktivite değerinde azaldığı bildirilmektedir. Fakat bu çalışmada D vitamini takviyesi yapılmamıştır. Ferretti ve ark. (2015), çalışmalarında PON-1 aktivite değeri azalmasının kardiyoasküler hastalıklar ile ilişkilendirmişlerdir. Bu hastalık durumu PON-1 aktivite değerindeki azalışın bir sonucunu yoksa kardiyoasküler hastalıklardan dolayı mı veya hastalığı hazırlayan sebeplerden mi PON-1 aktivite değerinde azaldığı sorusunu akla getirmektedir. Tablo: 4.1'de görüldüğü gibi D vitamini verilen grupta çalışma başlangıcına göre çalışma sonunda anlamlı şekilde HDL-C seviyesinin azaldığı görülmektedir. D vitamini verilen grupta kontrole göre hem PON-1 aktivite değerinin hem de HDL-C seviyesinin de azaldığı için D vitamini verilmesine bağlı PON-1 aktivite değerinin azaldığı düşünülebilir. Pek çok önemli fonksiyonu olan PON-1 aktivite değeri D vitamini takviyesine bağlı olarak azalabilir.

Sonuç olarak; bizim çalışmamızda D vitamini takviyesi yaptığımız tavşanlarda (erkek) total kolesterol, HDL-C(bağımlı), serum OSI seviyelerinde kontrollerine göre anlamlı bir azalış görüldü. Ayrıca HDL-C seviyesinin azalışından dolayı genellikle HDL-C üzerinde lokalize olan PON-1 aktivite değerinde de azalma oldu, ancak istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Günümüzde ise D vitamini ilave olarak alınması çok fazla artmıştır. Güneşten doğal yollarla alabildiğimiz D vitaminini, ilave almak gerektiğinde ise günlük alınan miktarına, süresine, yaşa, cinsiyete göre dikkat etmek gerektiği düşüncesindeyiz. Çalışmamızın sonuçlarına göre (Tablo: 4.1,2,5,6) D vitamini her ne kadar OSI ve total kolesterolü azaltsada, aynı zamanda

HDL-C seviyesini ve PON-1 aktivitesini de azaltabilir veya alınan miktarın fazlalığına ve süresine göre faydalı olacağı yerde zararlı etkileri ile karşılaşılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Ahmed Z, Ravandi A, Maguire GF, Emili A, Draganov D, La Du BN, Kuksis A, Connelly PW. Apolipoprotein A-I promotes the formation of phosphatidylcholine core aldehydes that are hydrolyzed by paraoxonase (PON-1) during high density lipoprotein oxidation with a peroxy nitrite donor. *J Biol Chem*. 2001; 276(27): 24473-81.
2. Akalin Çiftçi G, Erturun İ, Akalin A, Alataş İÖ, Musmul A. The effects of atorvastatin on antioxidant / antiinflammatory properties of HDLs in hypercholesterolemics. *Turk J Med Sci*. 2015; 45(2): 345-51.
3. Al - Asmari AK, Ullah Z, Al - Sabaan F, Tariq M, Al - Eid A, Al - Omani SF. Effect of vitamin D on bioavailability and lipid lowering efficacy of simvastatin. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2015; 40(1): 87-94.
4. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J*. 1953; 53(1): 110-7.
5. Aldridge WN. Serum esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. *Biochem J*. 1953; 53(1): 117-24.
6. Asemi Z, Hashemi T, Karamali M, Samimi M, Esmailzadeh A. Effects of vitamin D supplementation on glucose metabolism, lipid concentrations, inflammation, and oxidative stress in gestational diabetes: a double - blind randomized controlled clinical trial. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98(6): 1425-32.
7. Aslani BA, Ghobadi S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sci*. 2016; 146: 163-73.
8. Aviram M, Rosenblat M. Paraoxonases and cardiovascular diseases: pharmacological and nutritional influences. *Curr Opin Lipidol*. 2005; 16(4): 393-9.
9. Başer H, Can U, Başer S, Hidayetoğlu BT, Aslan U, Büyükturun İ, Yerlikaya FH. Serum total oxidant / anti-oxidant status, ischemia-modified albumin and oxidized - low density lipoprotein levels in patients with vitamin D deficiency. *Arch Endocrinol Metab*. 2015; 59(4): 318-24.

10. Bhat M, Ismail A. Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; 152: 171-9.
11. Bojic LA, McLaren DG, Shah V, Previs SF, Johns DG, Castro - Perez JM. Lipidome of atherosclerotic plaques from hypercholesterolemic rabbits. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(12): 23283-93.
12. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler.* Eds: Aslan D. Palme Yayıncılık. 2005, 5<sup>th</sup> Baskı, Ankara, TÜRKİYE, p: 547-8.
13. Calgaroto NS, da Costa P, Cardoso AM, Pereira LB, Vieira JM, Dalenogare D, Pelinson LP, Baldissarelli J, Morsch VM, Schetinger MR. Vitamin D<sub>3</sub> prevents the increase in ectonucleotidase activities and ameliorates lipid profile in type 1 diabetic rats. *Mol Cell Biochem.* 2015; 405(1-2): 11-21.
14. Calton EK, Keane KN, Soares MJ. The potential regulatory role of vitamin D in the bioenergetics of inflammation. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2015; 18(4): 367-73.
15. Clauss M, Burger B, Liesegang A, Del Chicca F, Kaufmann - Bart M, Riond B, Hässig M, Hatt JM. Influence of diet on calcium metabolism, tissue calcification and urinary sludge in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 2012; 96(5): 798-807.
16. de Medeiros Cavalcante IG, Silva AS, Costa MJ, Persuhn DC, Issa CI, de Luna Freire TL, da Conceição Rodrigues Gonçalves M. Effect of vitamin D<sub>3</sub> supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D<sub>3</sub> megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol.* 2015; 66: 10-6.
17. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(9): 684-700.
18. Dimeloe S, Nanzer A, Ryanna K, Hawrylowicz C. Regulatory T cells, inflammation and the allergic response - The role of glucocorticoids and Vitamin D. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2010; 120(2-3): 86-95.
19. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(4): 473-80.

20. Eftekhari MH, Akbarzadeh M, Dabbaghmanesh MH, Hassanzadeh J. The effect of calcitriol on lipid profile and oxidative stress in hyperlipidemic patients with type 2 diabetes mellitus. *ARYA Atheroscler*. 2014; 10(2): 82-8.
21. El - Awady MS, Suddek GM. Argmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol - fed rabbits. *J Pharm Pharmacol*. 2014; 66(6): 835-43.
22. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*. 2005; 38(12): 1103-11.
23. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem*. 2004; 37(2): 112-9.
24. Eren E, Ellidag HY, Yılmaz A, Aydın O, Yılmaz N. Acute Phase Response: Implication in ST - segment Elevation Myocardial Infarction. *Open Biochem J*. 2014; 8: 44-51.
25. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, Savino S, Liuzzi A, Balzola F, Bicchiega V. Paraoxonase activity in high-density lipoproteins: a comparison between healthy and obese females. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005; 90(3): 1728-33.
26. Ferretti G, Bacchetti T, Sahebkar A. Effect of statin therapy on paraoxonase-1 status: A systematic review and meta-analysis of 25 clinical trials. *Prog Lipid Res*. 2015; 60: 50-73.
27. Foroozanfard F, Jamilian M, Bahmani F, Talae R, Talae N, Hashemi T, Nasri K, Asemi Z, Esmailzadeh A. Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: a randomized double - blind placebo - controlled clinical trial. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015; 83(6): 888-94.
28. Fraser WD ve Milan AM. Vitamin D assays: past and present debates, difficulties, and developments. *Calcif Tissue Int*. 2013; 92(2): 118-27.
29. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health*. 2006; 96(2): 252-61.
30. Gordon DJ, Knoke J, Probstfield JL, Superko R, Tyroler HA. High-density lipoprotein cholesterol and coronary heart disease in hypercholesterolemic men: the

Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial. *Circulation*. 1986; 74(6): 1217-25.

31. Gupta N, Gill K, Singh S. Paraoxonases: structure, gene polymorphism & role in coronary artery disease. *Indian J Med Res*. 2009; 130(4): 361-8.

32. Harel M, Brumshtein B, Meged R, Dvir H, Ravelli RB, McCarthy A, Toker L, Silman I, Sussman JL. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Arh Hig Rada Toksikol*. 2007; 58(3): 347-53.

33. Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, Jurutka PW. Vitamin D receptor: molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr Rev*. 2008; 66(10 Suppl 2): 98-112.

34. Heaton TB. On the Vitamin D. *Biochem J*. 1922; 16(6): 800-8.

35. Holick MF. *The Vitamin D Solution: A 3-Step Strategy to Cure Our Most Common Health Problem*. Hudson Street Press. Inc. 2010, New York, USA, p: 45, 204, 219.

36. [http://tr.wikipedia.org/wiki/Kazimierz\\_Funk](http://tr.wikipedia.org/wiki/Kazimierz_Funk) (01.11.2015)

37. <http://www.baranmedikal.com.tr/tr/sayfa.php?/4> (14.01.2016)

38. Islam MZ, Shamim AA, Akhtaruzzaman M, Kärkkäinen M, Lamberg - Allardt C. Effect of vitamin D, calcium and multiple micronutrients supplementation on lipid profile in pre-menopausal Bangladeshi garment factory workers with hypovitaminosis D. *J Health Popul Nutr*. 2014; 32(4): 687-95.

39. Jakubowski H. Calcium - dependent human serum homocysteine thiolactone hydrolase. A protective mechanism against protein N-homocysteinylation. *J Biol Chem*. 2000; 275(6): 3957-62.

40. Jekl V, Redrobe S. Rabbit dental disease and calcium metabolism - the science behind divided opinions. *J Small Anim Pract*. 2013; 54(9): 481-90.

41. Jiang W, Miyamoto T, Kakizawa T, Nishio SI, Oiwa A, Takeda T, Suzuki S, Hashizume K. Inhibition of LXRalpha signaling by vitamin D receptor: possible role of VDR in bile acid synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 351(1): 176-84.

42. Jones G, Strugnell SA, DeLuca HF. Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiol Rev.* 1998; 78(4): 1193-231.
43. Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji.* Ertem Basım Ltd. Şti. 2012, 13. Baskı, Ankara, TÜRKİYE, p: 1165-90.
44. Kaysen GA. Potential restoration of HDL function with apolipoprotein A-I mimetic peptide in end - stage renal disease. *Kidney Int.* 2009; 76(4): 359-61.
45. Kılınç K ve Kılınç A. Oksijen toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002; 33(2): 110-8.
46. Lan N, Luo G, Yang X, Cheng Y, Zhang Y, Wang X, Wang X1, Xie T1, Li G3, Liu Z4, Zhong N5. 25-Hydroxyvitamin D3 - deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. *PLoS One.* 2014; 9(11): e111599.
47. Lappe JM, Travers - Gustafson D, Davies KM, Recker RR, Heaney RP. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(6): 1586-91.
48. Lebas F. Vitamin D in Rabbit Nutritions: Literature Review and Recommendations. *World Rabbit Science.* 2000; 8(4): 185-92.
49. Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF. Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor?. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52(24): 1949-56.
50. Leviev I, Deakin S, James RW. Decreased stability of the M54 isoform of paraoxonase as a contributory factor to variations in human serum paraoxonase concentrations. *J Lipid Res.* 2001; 42(4): 528-35.
51. Lieberman M, Marks A, Peet A. *Mark's Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach.* Lippincott Williams & Wilkins, 2013, 4<sup>th</sup> Edition, Philadelphia, USA, p: 656.
52. Lim HS, Roychoudhuri R, Peto J, Schwartz G, Baade P, Møller H. Cancer survival is dependent on season of diagnosis and sunlight exposure. *Int J Cancer.* 2006; 119(7): 1530-6.

53. Liu E, Meigs JB, Pittas AG, Economos CD, McKeown NM, Booth SL, Jacques PF. Predicted 25-hydroxyvitamin D score and incident type 2 diabetes in the Framingham Offspring Study. *Am J Clin Nutr.* 2010; 91(6): 1627-33.
54. Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high-density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *Lancet.* 1997; 349(9055): 851-2.
55. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, Durrington PN. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis.* 1991; 86(2-3): 193-9.
56. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN, Fogelman AM, Berliner J, Lusis AJ, Navab M, Shih D, Fonarow GC. Paraoxonase and coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol.* 1998; 9(4): 319-24.
57. Maki KC, Rubin MR, Wong LG, McManus JF, Jensen CD, Lawless A. Effects of vitamin D supplementation on 25-hydroxyvitamin D, high-density lipoprotein cholesterol, and other cardiovascular disease risk markers in subjects with elevated waist circumference. *Int J Food Sci Nutr.* 2011; 62(4): 318-27.
58. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus fluorine bond of alkyl fluorophosphates. *J Biol Chem.* 1946; 164: 271-89.
59. Medina M, Alberto MR, Sierra L, Van Nieuwenhove C, Saad S, Isla MI, Jerez S. Hypercholesterolemia increases plasma saturated and n-6 fatty acids altering prostaglandin homeostasis and promotes endothelial dysfunction in rabbits. *Lipids.* 2014; 49(7): 685-93.
60. Muñoz - Aguirre P, Flores M, Macias N, Quezada AD, Denova - Gutiérrez E, Salmerón J. The effect of vitamin D supplementation on serum lipids in postmenopausal women with diabetes: A randomized controlled trial. *Clin Nutr.* 2015; 34(5): 799-804.
61. Nelson DL, MM Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry.* WH Freeman and Company. Inc. 2013, 6<sup>th</sup> Edition, New York, USA, p: 859-75.
62. Nseir W, Taha H, Khateeb J, Grosovski M, Assy N. Fatty liver is associated with recurrent bacterial infections independent of metabolic syndrome. *Dig Dis Sci.* 2011; 56(11): 3328-34.



63. Redrobe S. Calcium Metabolism in Rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2002; 11(2): 94-101.
64. Rodrigo L, Mackness B, Durrington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. *Biochem J*. 2001; 354(Pt 1): 1-7.
65. Rodwell VW, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Weil PA. Harper's Illustrated Biochemistry. McGraw - Hill Education. 2015, 30<sup>th</sup> Edition, NY, USA, p: 508-74.
66. Rozenberg O, Shih DM, Aviram M. Human serum paraoxonase 1 decreases macrophage cholesterol biosynthesis: possible role for its phospholipase-A2-like activity and lysophosphatidylcholine formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23(3): 461-7.
67. Saedisomeolia A, Taheri E, Djalali M, Djazayeri A, Qorbani M, Rajab A, Larijani B. Vitamin D status and its association with antioxidant profiles in diabetic patients: A cross - sectional study in Iran. *Indian J Med Sci*. 2013; 67(1-2): 29-37.
68. Schnatz PF, Jiang X, Vila - Wright S, Aragaki AK, Nudy M, O'Sullivan DM, Jackson R, LeBlanc E, Robinson JG, Shikany JM, Womack CR, Martin LW, Neuhaus ML, Vitolins MZ, Song Y, Kritchevsky S, Manson JE. Calcium / vitamin D supplementation, serum 25-hydroxyvitamin D concentrations, and cholesterol profiles in the Women's Health Initiative calcium / vitamin D randomized trial. *Menopause*. 2014; 21(8): 823-33.
69. Sezer K, Keskin M. Serbest Oksijen Radikallerinin Hastalıkların Patogenezisindeki Rolü. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*. 2014; 28(1): 49-56.
70. Sharifi N, Amani R, Hajiani E, Cheraghian B. Does vitamin D improve liver enzymes, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults with non-alcoholic fatty liver disease? A randomized clinical trial. *Endocrine*. 2014; 47(1): 70-80.
71. Sun L, Gao Y, Zhang W, Liu H, Sun D. Effect of high fluoride and high fat on serum lipid levels and oxidative stress in rabbits. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2014; 38(3): 1000-6.
72. Uysal S, Akyol S, Hasgül R, Armutcu F, Yiğitoğlu MR. Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz. *Yeni Tıp Dergisi*. 2011; 28(3): 136-41.

73. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39(1): 44-84.
74. van Himbergen TM, van Tits LJ, Roest M, Stalenhoef AF. The story of PON-1: how an organophosphate – hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *Neth J Med.* 2006; 64(2): 34-8.
75. Vance DE, Van den Bosch H. Cholesterol in the year 2000. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1529(1-3): 1-8.
76. Wang H, Xia N, Yang Y, Peng DQ. Influence of vitamin D supplementation on plasma lipid profiles: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Lipids Health Dis.* 2012; 11: 42.
77. Wang JH, Keisala T, Solakivi T, Minasyan A, Kalueff AV, Tuohimaa P. Serum cholesterol and expression of ApoAI, LXRBeta and SREBP2 in vitamin D receptor knock-out mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2009; 113(3-5): 222-6.
78. Wehmeier K, Beers A, Haas MJ, Wong NC, Steinmeyer A, Zugel U, Mooradian AD. Inhibition of apolipoprotein AI gene expression by 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1737(1): 16-26.
79. Wehmeier KR, Alamir AR, Sultan S, Haas MJ, Wong NC, Mooradian AD. 24,25-dihydroxycholecalciferol but not 25-hydroxycholecalciferol suppresses apolipoprotein A-I gene expression. *Life Sci.* 2011; 88(1-2): 110-6.
80. Wójcicka G1, Jamroz - Wiśniewska A, Horoszewicz K, Beltowski J. Liver X receptors (LXRs). Part I: structure, function, regulation of activity, and role in lipid metabolism. *Postepy Hig Med Dosw.* 2007; 61: 736-59.
81. Yu Q, Li Y, Waqar AB, Wang Y, Huang B, Chen Y, Zhao S, Yang P, Fan J, Liu E. Temporal and quantitative analysis of atherosclerotic lesions in diet - induced hypercholesterolemic rabbits. *J Biomed Biotechnol.* 2012; 2012: 1-7.
82. Zhang HQ, Teng JH, Li Y, Li XX, He YH, He X, Sun CH. Vitamin D status and its association with adiposity and oxidative stress in schoolchildren. *Nutrition.* 2014; 30(9): 1040-4.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Konya'nın Emirgazi ilçesinde doğdu. İlk ve Orta öğrenimini Emirgazi'de, Lise öğrenimini Aksaray'da tamamladı. Ön Lisans eğitimini Ankara Üniversitesi Dikimevi Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Laboratuvar Bölümünde 1994 - 1996, Lisans eğitimini Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde 2000 - 2004 yılları arasında tamamladı. 2004 - 2007 yılları arasında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp Fakültesi) A.D.'de yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2008 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya (Tıp Fakültesi) A.D.'de doktora eğitimine başladı. Üniversitelerin bölünmesi nedeniyle Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde aynı A.D.'de eğitimine devam etti. Aynı zamanda S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Kan Merkezinde 2001 yılında göreve başladı, ilerleyen yıllarda bölüm sorumlusu olarak 2012'ye kadar çalıştı. Ardından 2012 Nisanda N.E.Ü KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezine çalışmaya başladı. Halen görevine devam etmektedir. Evli ve iki çocuk babasıdır.

### **İletişim:**

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya A.D.

42080 Meram/KONYA

Email: rkocabas@konya.edu.tr , r-kocabas@hotmail.com