

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABETİK SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA ADROPİN VE
APOPTOZİS ÜZERİNE VİTAMİN D'NİN ETKİLERİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Kemal YILMAZ**

**TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN**

**ELAZIĞ
2018**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Üroloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN

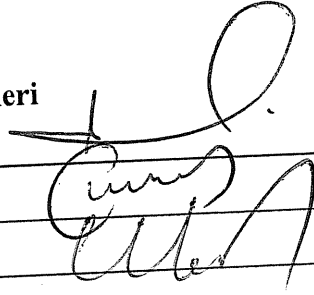
Danışman

Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İrfan ORHAN

Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN

Mansur Dağgözü



TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, Üroloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İrfan ORHAN'a, tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle bana her zaman yardımcı olan ve asistanlık eğitimime büyük katkı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Tunç OZAN'a, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Üroloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Doç. Dr. Necip PİRİNÇÇİ'ye, Doç. Dr. Fatih FIRDOLAŞ'a ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet KARAKEÇİ'ye,

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, Arş. Gör. Nalan KAYA'ya ve doktora öğrencisi Osman Fatih YILMAZ'a,

Üroloji Anabilim Dalı'nda birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarım Dr. İlyas YAĞMUR'a, Dr. Müslüm ÖZER'e ve Dr. Mehmet İkbal İPEK'e, üroloji servisinde çalışan tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma,

Son olarak yaşamım boyunca desteklerini esirgemeyen değerli aileme ve hayatıma anlam katan, kıymetlim, değerli eşime çok teşekkür ederim.

ÖZET

Diabetes mellitus (DM), insülin sekresyonu yokluğu ile gelişen metabolik bir hastalıktır. Bu çalışmada; streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde sıçan testis dokusunda adropin ve apoptozis üzerine vitamin D'nin koruyucu etkileri incelenmiştir.

8-10 haftalık 41 adet Wistar albino cinsi erkek sıçanlar her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Tampon grubuna tek doz 0.1 M sodyum sitrat tamponu ip uygulandı. Vitamin D grubuna günlük 200IU/gün oral yolla Vitamin D uygulandı. Diyabet grubuna 50mg/kg tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tamponunda çözülürerek ip. uygulandı. Glukoz düzeyi 250mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilip, deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçüldü. Diyabet+Vitamin D grubu 50mg/kg tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tampon çözülürerek ip. uygulandı. Diyabet oluşturulduktan sonra Vitamin D 200IU/gün oral yolla uygulandı. Deney sonunda tüm gruptaki sıçanlar anestezi altında dekapite edildi ve hızla testis dokuları çıkarılarak immünohistokimya ile TUNEL boyama, tüm gruplara ait kan serum örneklerine de biyokimyasal analizler yapıldı.

TAS ve TOS, doku ve serum adropin düzeyleri Kontrol grubuyla diğer gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulundu. Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında TUNEL pozitifliği ve immunohistokimyasal reaktivite benzerdi, Diyabet grubunda artmış, Diyabet+Vitamin D grubunda ise azalmıştı.

Sonuç olarak bu deneysel çalışmada DM' nin testis doku hasarına neden olduğu ve adropin düzeyi ile DM arasında paralellik seyrettiği, antioksidan özellikte olan vitamin D'nin nispeten bu hasarı azalttığı saptandı. Gelecekte ileri çalışmalarda tedavide vitamin D' nin alternatif olarak kullanılabileceği sonucunu ortaya koydu.

Anahtar kelimeler: DM, adropin, vitamin D, apoptozis.

ABSTRACT

THE EFFECTS OF VITAMIN D ON ADROPIN AND APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL DIABETIC RAT TESTIS

Diabetes mellitus (DM) is a metabolic disease caused by deficiency of insulin secretion. In this study, protective effects of vitamin D against adropin and apoptosis on testis tissue of streptozotocin-induced experimental diabetic rats were investigated.

Eight-ten-week old 41 Wistar albino rats were divided into five groups of seven rats. No treatment was applied to control group. A single dose of 0.1 M sodium citrate was injected intraperitoneally to buffer group. A daily dose of 200 IU/day vitamin D was orally treated to vitamin D group. A single dose of 50 mg/kg STZ in 0.1 M sodium citrate buffer was intraperitoneally injected to diabetic group. The rats with glucose level of higher than 250 mg/dl were considered as diabetic and glucose levels were recorded at the beginning and end of the experiment. A single dose of 50 mg/kg STZ in 0.1 M sodium citrate was intraperitoneally injected to Diabetes+Vitamin D group. After induction of diabetes, a daily dose of 200 IU/day vitamin D was orally treated to Diabetes+Vitamin D group. At the end of the experiment, all rats were decapitated under anaesthesia and testis tissues were removed immediately for immunohistochemical analysis of TUNEL staining. Moreover, biochemical analyses for blood serum samples of all rats were conducted.

TAS and TOS, tissue and serum adropin levels were found to be statistically significant comparing to control group. TUNEL and immunohistochemical reactivity levels were similar for Control, Buffer and Vitamin D groups while increased for diabetic group and decreased for Diabetes+Vitamin D group.

In conclusion, it was proved in this experimental study that DM causes tissue damage on testis and there is a parallelism between adropin level and DM whereas vitamin D, which is an antioxidant, has decreased this damage relatively. Consequently, it can be stated that vitamin D may be used as an alternative treatment for DM in future.

Keywords: DM, adropin, vitamin D, apoptosis.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ	xi
KISALTMALAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	1
1.1.3. Tanı	2
1.1.3.1. Açlık Plazma Glukoz Ölçümü	2
1.1.3.2. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)	3
1.1.3.3. Rastgele Bir Zamanda Glukoz Ölçümü	3
1.1.3.4. A1C (HbA1c)	3
1.1.4. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	3
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	4
1.2. Serbest Radikaller	5
1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları	7
1.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri	9
1.3. Oksidatif Stres	9
1.3.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres	10
1.3.1.1. Glukozun Otooksidasyonu	12
1.3.1.2. Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu	12
1.3.1.3. Protein Kinaz C Yolağı (PKC)	12
1.3.1.4. Poliöl Yolağı	13
1.4. Diyabet ve Testis	15
1.5. Adropin	16

1.6. Apoptozis	18
1.6.1. Apoptozisin Mekanizmaları	20
1.6.2. Apoptozisin Regülasyonu	21
1.6.2.1. p53'ün Rolü	22
1.6.2.2. Bcl-2/Bax	22
1.6.2.3. Kaspazlar	23
1.6.3. Apoptozun Testisler Üzerindeki Etkisi	23
3.6.4. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar	24
1.6.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	24
1.7. D Vitamini	25
1.7.1. D Vitamini Metabolizması	26
1.7.2. D Vitamininin Fonksiyonu	26
1.7.2.1. Tip 2 Diyabet (T2D) Gelişiminde D Vitaminin Rolü	27
1.7.2.1.1. D Vitamini ve İnsülin Direnci	27
1.7.2.1.2. D vitamini ve Beta Hücre Disfonksiyonu	28
1.7.3. D Vitamini Düzeyleri	28
1.7.4. D Vitamini Kaynakları	29
2.GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	29
2.2. Diyabet İndüksiyonu	30
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	30
2.4. Örneklerin Alınması	32
2.5. Biyokimyasal Çalışma	32
2.5.1. Kan glukoz düzeyleri	32
2.5.2. Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Saklanması	32
2.5.3. Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümleri	32
2.5.3.1. TAS Ölçümü	32
2.5.3.2. TOS Ölçümü	33
2.5.4. Numunelerde Adropin Düzeylerinin Ölçümü	33
2.5.5. Histolojik Çalışma	34
2.6. İmmünohistokimya	34
2.7. TUNEL Metodu	35

2.8. İstatistiksel Analiz	37
3.BULGULAR	38
3.1. Klinik Bulgular	38
3.1.1. Biyokimyasal Bulgular	38
3.1.1.1. Kan-glukoz miktarları	38
3.1.1.2. TAS ve TOS Düzeyleri	39
3.1.1.3. Doku ve Serum Adropin Düzeyleri	40
3.1.1.4. TUNEL Bulgular	42
3.1.1.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	45
4. TARTIŞMA	49
5. KAYNAKLAR	55
6. ÖZGEÇMİŞ	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri	2
Tablo 2. Diabetes Mellitus'un Sınıflaması .	4
Tablo 3. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları.	5
Tablo 5. Serum 25(OH)D3 düzeyine göre D vitamini durumu	28
Tablo 6. Deney Hayvanlarına Verilen Sıçan Yeminin Terkibi	29
Tablo 7. Histolojik takip serileri	34
Tablo 8. TUNEL Boyama Prosedürü.	36



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Oksidatif stresin DM komplikasyonlarının patogenezindeki rolü	11
Şekil 2. Poliöl Yolağı	14
Şekil 3. Adropinin fizyolojik ve biyokimyasal etkileri	18
Şekil 4. Apoptozisin Regulasyonu	21
Şekil 5. Başlangıç ve final vücut ağırlıkları	38
Şekil 6. Deney hayvanlarının başlangıç ve final kan- glukoz miktarları (mg/dl).	39
Şekil 7. Serum TAS düzeyleri	40
Şekil 8. Serum TOS düzeyleri	40
Şekil 9. Doku adropin düzeyleri	41
Şekil 10. Serum adropin düzeyleri	42
Şekil 11. Kontrol grubunda TUNEL pozitifliği (→).	42
Şekil 12. Tampon grubunda TUNEL pozitifliği (→).	43
Şekil 13. Vitamin D grubunda TUNEL pozitifliği (→).	43
Şekil 14. DM grubunda TUNEL pozitifliği (→).	44
Şekil 15. Diyabet+Vitamin D grubunda TUNEL pozitifliği (→).	44
Şekil 16. Apoptotik indeks	45
Şekil 17. Kontrol grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).	46
Şekil 18. Tampon grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).	46
Şekil 19. Vitamin D grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).	47
Şekil 20. DM grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).	47

KISALTMALAR LİSTESİ

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AGEs	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
AIF	: Apoptozis Uyarıcı Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör-1
APG	: Açlık Plazma Glukozu
AR	: Aldoz Redüktaz
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktör
DAG	: Diaçilgliserol
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diabetes Mellitus
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ENHO	: Enerji Dengesi İle İlgili Gen
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
FSH	: Follikül Stimulan Hormon
GAPDH	: Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
HHS	: Hiperosmolar Hiperglisemik Sendrom
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
iNOS	: İmmün Nitrik Oksit
KAT	: Katalaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LH	: Luteinizan Hormon
MAP	: Mitojenle Aktive Edilen Protein
MDA	: Malonildialdehit
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NCV	: Nöron İletim Hızı
NDDG	: Ulusal Diyabet Veri Grubu
NGF	: Nöron Büyüme Faktörü
NO	: Nitrik Oksit

OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCD	: Programmed Cell Death
PG	: Plazma Glukozu
PKC	: Protein kinaz C
PTH	: Parathormon
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RANKL	: Nükleer faktör kappa-B ligand'ın reseptör aktivatörü
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Total Antioksidan Status
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TOS	: Total Oksidan Status
TUNEL	: TdT-mediated nick and labeling
TURDEP	: Türk Diabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu
VKI	: Vücut Kitle İndeksi
VSMC	: Vasküler Düz Kas Hücresi

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Tanım

Diabetes mellitus (DM), insülin sekresyonu yokluğuna veya dokuların insüline duyarlılığında azalmaya bağlı olarak karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmalarının bozulması ile ortaya çıkan kronik metabolik bir hastalıktır (1).

DM polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi klinik belirtiler ile ortaya çıkan, ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi ciddi semptomlar gösterir. Çoğunlukla klinik belirtiler ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Patolojik metabolizma değişikliklerine neden olan hiperglisemi, DM tanısı konulmadan önce uzun süre mevcut olabilir ya da retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonlarda teşhis edilir (1-3).

Ayrıca bazı durumlarda diyabet, Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) ilk kez gebelikte ortaya çıkan veya tanı alan Glukoz İntoleransı olarak tanımlanmaktadır. Bazı kişilerde diyabet gelişme olasılığı glukoz tolerans anomalilerinden önce de tanımlanabilir (4, 5).

1.1.2. Epidemiyoloji

DM bütün toplumlarda sık görülebilen, prevelans ve insidansı farklılık gösteren kronik bir hastalıktır. DM'nin en az görüldüğü toplum Japonya, en çok görüldüğü toplum ise İskandinav ülkeleri olduğu rapor edilmiştir (6). DM'nin 2013 yılına kadar dünya genelinde 382 milyon insanı etkilediği ve bu sayının 2035'e kadar 592 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (7,8). Tip 2 DM'nin erken belirti veren bir semptomu olmadığından kişi hastalığını uzun süre fark etmeyebilir. Tip 2 DM prevelansındaki artışın popülasyonun kırsaldan kentlere geçişi ile ilişkilidir. Günümüzde kentleşmenin yanı sıra epidemiyolojiye genetik, çevresel, davranışsal (yetersiz egzersiz, hazır gıda tüketimi gibi), sosyoekonomik ve kültürel faktörler de etkilidir (9). Ülkemizde popülasyona yönelik ilk diyabet taramaları 1998-1999 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) tarafından yapılmıştır. TURDEP-1 olarak bilinen bu çalışmada diyabetin prevelansının erişkin nüfusta %7.2 ve bozulmuş glukoz intoleransının prevelansı %6.7 olarak bildirilmiştir. 2010 yılında yapılan TURDEP-2 çalışmasında ise diyabet

prevelansının erişkin nüfusta %90 artarak %13.7' ye ulaştığı görülmüştür. Ayrıca kentsel ve kırsal diyabet sıklığı arasında ise anlamlı fark ortadan kalkmıştır (10).

1.1.3. Tanı

Diyabet ve glukoz metabolizmasının diğer bozuklukları için Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından hazırlanan güncel tanı kriterleri Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1. Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri
APG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L)
Veya OGTT 2. Saat PG \geq 200mg/dL (11.1mmol/L)
Veya A1C \geq 6.5% (48 mmol/mol)
Veya Hastada Hipergliseminin Semptomları Olması Durumunda Rastgele PG \geq 200mg/dL (11.1mmol/L)
APG: Açlık Plazma Glukozu OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi PG: Plazma Glukozu

Bu güncel tabloya göre DM tanısı dört tanı yöntemi ile konulabilmektedir. Bu tanı yöntemleri ise şu şekilde açıklanabilir:

1.1.3.1. Açlık Plazma Glukoz Ölçümü

Bu ölçüm hasta açısından daha kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması klinik pratikte halen en fazla kabul gören yöntem olarak kullanılmaktadır. Glukoz kesinlikle plazmadan ölçülür ve hematokritten bağımsız olarak saf glukoz değeri verilir. Açlık terimi bu yöntem için hastanın en az 8 saat boyunca herhangi bir kalori almama olarak tanımlanır.

1.1.3.2. Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)

Bu test rutin olarak uygulanması önerilmez fakat uygulanması durumunda Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün tanımladığı şekilde yapılmalıdır. Bu tanımda hastaya üç günlük diyet kısıtlaması sonrası 75 g. glukoza eşdeğer çözelti 300 ml su içinde çözdürülerek kullanılmalıdır. Bu yöntem ile yüksek Tip 2 DM riski olan kişilerde diyabet-prediyalet ayırımı yapılabilmektedir. Solusyonun içirilmesini takip eden 2 saat sonra alınan kanda plazma glukozunun 200 mg/dL'ye eş veya üzerinde olması durumunda DM tanısı koyulur.

1.1.3.3. Rastgele Bir Zamanda Glukoz Ölçümü

Kişide DM'nin klasik semptomları olan polidipsi, poliüri gibi belirtiler varsa böyle bir bireyde herhangi bir zamanda plazma glukoz düzeyi ölçülebilir. Bu semptomları olan bir kişide plazma glukozu 200 mg/dL veya üzerinde ise hastaya aşikar DM tanısı konulur.

1.1.3.4. A1C (HbA1c)

Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi tarafından uluslararası standardizasyona uygun yöntemle ölçüldüğü takdirde HbA1c ölçümünü de DM tanı kriteri olarak kabul edilebileceğini belirtmiştir (27). HbA1c açlık durumu gerektirmeyen, akut hastalık ve stres durumlarında ise değişkenlik göstermeyen bir yöntemdir. Ancak bu avantajlarının yanında bazı dezavantajları olarak diğer yöntemlere göre daha pahalı olması, maliyeti yüksek olduğundan yaygın kullanılamaması ve hemoglobinin ilişkili bazı durumlardan etkilenmesidir (11).

1.1.4. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

DM'nin sınıflandırılması 1979 yılında ABD'de 'Ulusal Diyabet Veri Grubu' (NDDG) ve 1980'de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yapılmıştır. Kliniksel olarak yapılan bu sınıflandırmaların ardından 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) DM'yi yeniden sınıflandırmış ve bu yeni sınıflama etiyojolojiye göre yapılmış olup, hastanın insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine Tip 1 ve Tip 2 diyabet terminolojisinin kullanılması tavsiye edilmiştir (12).

Tablo 2: Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması (12).

1. Tip 1 DM (β hücre yıkımı ve genellikle mutlak insülin eksikliği)

- a) İmmünolojik
- b) İdiopatik

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

3. Diğer spesifik tipler

- a) Beta hücre fonksiyonundaki genetik defektler
- b) İnsülin etkisindeki genetik defektler
- c) Ekzokrin pancreas hastalıkları
- d) Endokrinopatiler
- e) İlaç ya da kimyasal ajanlar
- f) Enfeksiyonlar
- g) Nadir görülen immün aracılı diyabet
- h) Diğer genetik sendromlar

4. Gestasyonel DM

1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

DM' li hastalar acil önlem almayı veya tedavi edilmeyi gerektirecek bir takım akut ve kronik komplikasyonlar ile yaşamları boyunca birçok kez karşılaşabilirler. DM' nin takip ve tedavisinde önemli gelişmeler olsa da uzun süreli diyabet kapilleri, arterielleri, vasküler hücreleri ve bazal membranları etkileyerek tüm damarların yapısını bozmakta ve bu yapılarda meydana gelen bozulmalar DM'nin mortalite nedeni olmaktadır. Tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine karşın klinikte sık olarak retina, renal glomerül ve büyük sinirlerdeki patolojiler ile ortaya çıkar (13).

Tablo 3. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları.

a)Akut Komplikasyonlar

1. Diyabetik ketoasidoz (DKA)
2. Hiperosmolar hiperglisemik sendrom (HHS)
3. Laktik asidoz
4. Hipoglisemi

b)Kronik Komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar

- Diyabetik kalp hastalığı
- Periferik arter hastalığı
- Serebrovasküler hastalık

Mikrovasküler komplikasyonlar

- Diyabetik nöropati
- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati

Diğer komplikasyonlar

- Diyabetik ayak
 - Diyabetik gastroenteropati
 - Genitoüriner bozukluklar
 - d. Eretil disfonksiyon
-

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin kimyasal ürünlerdir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda birbirine zıt yönde hareket eder ve en fazla iki elektron bulunur. Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller normal hücrel metabolizma sırasında, en fazla elektron transferi ile oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenler vasıtasıyla da oluşabilmektedir (14).

Serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sisteminde görev alan nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin gerekenden fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (15).

Organizmada serbest radikallerin oluşma ve ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve serbest radikallerin aşırı üretimi veya yetersiz transferi söz konusu olduğunda hücrenin yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarında değişiklik meydana gelir ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge oranı sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Ancak bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum, serbest radikallerin üretimi ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan ve vücudun antioksidan mekanizmalar aracılığıyla kendini savunması arasındaki orantının bozulması ve sonuçta doku hasarına neden olan olay olarak tanımlanabilir (16).

Serbest radikaller proteinler, lipidler, karbonhidratlar, nükleik asitler ve DNA üzerinde ciddi hasar yapma kapasitesine sahiptirler. Bu yüzden hücre içi savunma mekanizmalarını inaktive edebilir ve yoğun konsantrasyona ulaştıklarında hücre içi bileşenlerle reaksiyona girerek metabolik ve hücreSEL bozukluklara neden olmaktadır (17). Yaşadığımız çevrede çeşitli fiziksel ve kimyasal olaylardan kaynaklanan sürekli bir serbest radikal oluşumu vardır. Hücrelerdeki metabolik olaylar esnasında farklı tür ve miktarda radikaller meydana gelmektedir. Radikaller genel olarak üç ana mekanizma ile oluşurlar (16).

1) Kovalent Bağların Homolitik Kırılması: Kimyasal bağların kırılmasında yüksek enerjiye sahip elektromanyetik dalgalar ya da yüksek sıcaklık (500-600 °C) neden olur. Kırılma esnasında bağ yapısındaki iki elektron ayrı ayrı atomlar üzerinde kalıyorsa, bu homolitik kırılmadır (18).

2) Normal Bir Molekülün Elektron Kaybetmesi: Radikal yapısında olmayan molekülden elektron kaybı esnasında dış orbitalinde paylaşılmamış elektron kalıyor ise, radikal formu oluşur. Örneğin askorbik asit, redükte glutatyon (GSH) ve tokoferoller (E vitamini) gibi hücreSEL antioksidanlar, radikal türlere tek elektron verip radikalleri indirgerken, kendilerinin radikal formları oluşur.

3) Normal Bir Moleküle Elektron Transferi: Radikal özelliğe sahip olmayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde ortaklaşmamış elektron oluşuyorsa, bu tür indirgenme olayı da radikal oluşumuna neden olabilir. Örneğin moleküler oksijenin tek elektron ile indirgenmesi, radikal formu olan süperoksitin oluşumuna neden olur (16).

Serbest radikaller ve diğer radikal olmayan reaktif oksijen türleri aşağıda belirtilmiştir (14).

Oksijen merkezli serbest radikaller:

- ✓ Süperoksid radikali ($O_2^{\cdot-}$)
- ✓ Hidroksil radikali (OH.)
- ✓ Alkoksil radikali (RO.)
- ✓ Peroksil radikali ($RO_2^{\cdot-}$)
- ✓ Hidroperoksil radikali (HO_2^{\cdot})

Oksijen merkezli olmayan serbest radikaller:

- ✓ Karbon merkezli (Lipid radikalleri)
- ✓ Alkoksi radikalleri
- ✓ Sülfür merkezli (Sülfür radikali)
- ✓ Hidrojen merkezli (Hidrojen radikali)
- ✓ Demir merkezli (Perferil radikali)
- ✓ Azot merkezli (Nitrik oksid, Nitrojen dioksid)

Radikal olmayan reaktif oksijen türleri:

- ✓ Ozon (O_3)
- ✓ Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- ✓ Hipoklorik asid (HOCl)
- ✓ Singlet oksijen (1O_2)
- ✓ Peroksinitrit (ONOO)

1.2.1. Serbest Radikal Kaynakları

Organizmadaki serbest radikaller hücrede ve çevrede sürekli olarak hem endojen hem de eksojen kaynaklar tarafından üretilirler.

Endojen Kaynaklar:

- Mitokondride aerobik solunum sırasında elektron transport sistemi tarafından katalize edilen oksijenler serbest radikalleri yan ürün olarak üretirler.
- Yangı durumunda sitokinler serbest bırakılır ve bunun sonucunda nötrofiller ve makrofajlar serbest radikalleri üretmeye başlar.
- Serbest radikaller lipit peroksidasyonu, ksantin oksidaz ve mitokondriyel sitokrom oksidaz gibi çeşitli kaynaklardan oluşabilir.
- Düz kas hücreleri, plateletler ve araşidonik asit metabolizması tarafından serbest radikaller üretilebilir.
- Otooksidasyon reaksiyonları sırasında ksantin oksidaz (XO) ile nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz gibi enzimlerle endoplazmik retikulumda sitokrom p450 sisteminde meydana gelen elektron kaçaklarından oluşabilir.
- Zihinsel stres veya vücut yorgunluğundan kaynaklanan stres toksik yan ürün olarak serbest radikal üretebilir. Ayrıca kortizol ve kateşolamin gibi hormonlar vücutta stres reaksiyonlarına yol açarlar. Aynı zamanda bu hormonların kendileri de serbest radikallere dönüşebilirler.
- İmmun sistem hücreleri patojenlere yanıt olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve oksi- radikaller üretebilir.

Eksojen Kaynaklar:

- UV ışınlar, X-ray, gamma ışınları, mikrodalga ışınları,
- Pişirme sırasında organik maddelerin yakılması,
- Orman yangınları, volkanik faaliyetler,
- Asbest, benzen, karbonmonoksit, formaldehit, ozon ve toluen gibi hava kirleticiler,
- Temizlik ürünleri, tutkal, boya, tiner, parfümler ve böcek ilaçları gibi kimyasallar,
- Kloroform ve diğer trihalometanlar gibi su kirletici maddeler,
- Alkol, sigara ve egzoz dumanı,

Serbest radikal üretimine katkıda bulunabilen eksojen kaynaklardır (19).

1.2.2. Serbest Radikallerin Biyolojik Hedefleri

Serbest radikaller hücre ve dokularda birçok zarara yol açmaktadır ve bu zararlar şöyle sıralanabilir (20):

1. DNA' nın yapısında tahrip oluşturarak hücrede mutasyona ve ölüme yol açması,
2. Nükleotit yapılı koenzimlerin yıkımı,
3. Lipid peroksidasyonu zar yapısı ve fonksiyonunun değişmesi,
4. Enzim aktivitelerinde ve lipit metabolizmasındaki değişiklikler,
5. Protein ve lipitlerle kovalent bağlantılar yapması,
6. Zar proteinlerinin tahribi, taşıma sistemlerinin bozulması,
7. Steroid ve yaş pigmenti denilen bazı maddelerin birikimi,
8. Proteinlerin tahrip olması ve protein döngüsünün artması,
9. Tiollere bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarının bozulması, hücre ortamının tiol/disülfid oranının değişmesi,
10. Kolojen ve elastin gibi uzun ömürlü proteinlerdeki oksido-redüksiyon olaylarının bozularak kapillerlerde atrofik değişikliklerin oluşması,
11. Mukopolisakkaritlerin yıkımı şeklinde özetlenebilir.

1.3. Oksidatif Stres

Hücrede normal metabolik fonksiyonların enzimatik reaksiyonlarında ara ürünler devamlı olarak serbest radikalleri oluştururlar. Bazen oluşan bu ara ürünler serbest radikal enzimlerin aktif yerinden sızmakta ve moleküler oksijenle kazara etkileşerek serbest oksijen radikallerini oluşturmaktadırlar. Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri (ROS), "antioksidan savunma sistemleri" mekanizmasıyla ortadan kaldırırlar. Ancak bazen ROS hücrel savunma mekanizması aracılığıyla ortadan kaldırılandan daha fazla ise vücutta **oksidatif stres** olarak tanımlanan durum meydana gelir.

Oksidatif stresin oluşturduğu hücrel hasar ile birçok kronik hastalıkların komplikasyonları arasında bir bağ olduğu düşünülmektedir. Aterogenez, akciğer hastalıkları, Parkinson hastalığı, gebelik preeklampsisi, serviks kanseri, alkolik karaciğer hastalığı, diabetes mellitus, akut renal yetmezlik, Down sendromu, yaşlanma, retrolental fibroplazi, serebrovasküler bozukluklar, iskemi/reperfüzyon injürisi gibi hastalıkların oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülmektedir (16).

1.3.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Diabetes Mellitus antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ile fazla miktarda reaktif oksijen türlerinin üretimi ve sonuç olarak artan oksidatif stresle ilişkilidir (21). Son yıllarda yapılan çalışmalarda enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizması değişiklikleri sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, sorbitol yol aktivasyonu, hipoksi ve iskemi/reperfüzyon sonucunda gerçekleşen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olduğu ileri sürülmektedir (22). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasındaki ilişki yapılan in vivo çalışmalarda da deneysel hayvan modellerinde insanlardakine benzer DM oluşturmak amacıyla kullanılan N-nitroso türevi D-glukozamin özelliğindeki streptozotosin (STZ) oksidan maddeler oluşturarak Langerhans adacıklarını selektif olarak hasara uğratarak uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevaplarına binaen diyabeti başlattığı düşünölmektedir (23,24). Yapılan bu çalışmalarda, vasköler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir.

DM olgularında, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonunda da artış olduğu ve özellikle kollajen, elastin ve miyelin kılıfındaki ekstrasellöler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlar görölmektedir (25).

1.3.1.1. Glukozun Otoksidasyonu

Geçiş metallerinin varlığında, glukozun bir enediol radikal anyonuna dönüştüğü olaydır. Bu radikal moleküler oksijeni indirgerken $O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$ ve H_2O_2 gibi oksidan araçlar ve α -ketoaldehidlerin de oluşumuna sebep olur. Bu moleküller DNA, proteinler ve lipidler gibi önemli biyomoleküllerin yapısında hasar oluşturabilir ve ayrıca glukozun otoksidasyonu AGEs'nin (ileri glikasyon son ürünleri) oluşumu ile de yakından ilişkilidir (21,30).

1.3.1.2. Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu

Protein glikasyonu kovalent bağlanmalarla glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki bağ sonucu oluşur. Geçiş metallerinin varlığında (demir, bakır vs.) glikasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerinin yokluğunda da meydana gelebileceği görülmüştür. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan uzun olduğu durumlarda glikasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'ni oluşmasını sağlarlar. Glikasyona uğramış proteinler gibi, AGEs de serbest oksijen radikalleri oluşturabileceği gibi ROS da AGEs'nin oluşumunu hızlandırmaktadır (31).

Diyabetik hayvanlarda ve insanlarda ROS ile mücadele eden SOD ve glutatyon redüktaz gibi enzimlerin non-enzimatik glikasyonunun da bu enzimlerin azalmış aktivitelerinden sorumlu olabileceği ve ayrıca ROS' un artışına neden olabileceği de belirtilmektedir (32).

1.3.1.3. Protein Kinaz C Yolağı (PKC)

Hipergliseminin neden olduğu bazı anahtar hücrel özellikleri değiştirerek ROS' un mitokondriden aşırı miktarda serbestlenmesine neden olabilmekte ve bu değişikliklerden biri Protein Kinaz C Yolağı (PKC) aktivasyonudur (33). Protein kinaz C'nin (PKC) aktivatörü olan diaçilgliserol (DAG) miktarı diyabette hasara uğrayan hedef organellerde, retina, aort, kalp ve renal glomerulde artmaktadır (34). Diyabette glikolizin ara ürünü olan gliseraldehit-3-fosfat gliserol-3-fosfata indirgenerek gliserol-3-fosfatın yer değiştirmesi ile DAG oluşmakta ve DAG konsantrasyonunun artması ile PKC enzim aktivitesi de artış göstermektedir (35).

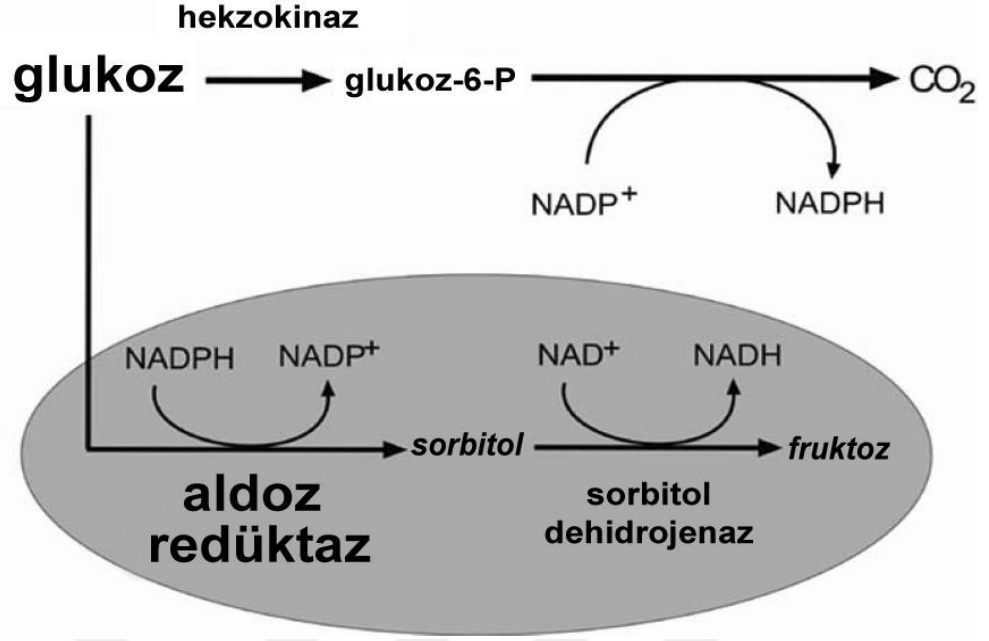
1.3.1.4. Poliöl Yolağı

Poliöl yolağı glukoz metabolizmasını takip eden alternatif bir aktivasyonudur. Hiperglisemi glukoz alımında insüline gerek duyulmayan dokularda poliöl yolağının kullanımını tetiklemektedir (36). Yapılan alışmalar poliöl yolağının hiperglisemik oksidatif stresle ilişkili olabileceğini göstermektedir (37,38).

Poliöl yolağı glukozun sorbitole ve ardındanda sorbitolün fruktoza donüştüğü 2 aşamalı bir aktivasyondur. Aldoz redüktaz (AR) poliöl yolağının ilk enzimidir. Normal koşullarda glukoz hegzokinaz enzimi tarafından fosforilasyona uğrayarak glikoz-6-fosfata (G-6-P) donüşmektedir. Aldoz redüktaz enziminin affinitesi çok düşük olduğundan fosforile olmamış glukozun % 3' ünü sorbitole donüştürür. Meydana gelen bu sorbitol böbreklerdeki 17 ozmotik regölasyonun dunenmesinde kullanılır, sorbitolden oluşan fruktoz ise sperm hücrelerinin enerjisini karşılamaktadır (39).

Hiperglisemi durumlarında retina, böbrek, sinir dokuları gibi insülden bağımsız dokularda yüksek glukoz konsantrasyonunun varlığı aldoz redüktaz enziminin aktivitesini arttırmasının nedeni hegzokinaz enzimi glukoz için doygunluğa ulaşmıştır ve aldoz redüktaz enzimi metabolizmadaki glukozun yaklaşık % 33' ünü kullanmaktadır.

Aldoz redüktaz enzimi poliöl yolağının ilk enzimi olup yolakta hız sınırlayıcı rolü vardır. şekil 2'de gösterildiği gibi NADPH'dan aldığı elektronları glukozu aktararak glukozun sorbitole donüştürür ve yolağın ikinci enzimi olan sorbitoldehidrogenaz (SD) ise NAD⁺ kofaktörünü indirgeyerek sorbitolü fruktoza oksitler (40).



Şekil 2. Poliöl Yolağı (39).

Bu aktivasyonda aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH (Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kullanılmasından dolayı intrasellüler NADPH kullanılır. NADPH okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için gereklidir. Böylece sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'in yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanmasına yol açar (41).

Glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin de NADPH'a ihtiyacı vardır. Bu yüzden bu kofaktörün hücre içi yetersizliği glutatyon redüktaz aktivitesini azaltarak, serbest radikal kaynaklı hasarlara karşı korunmada önemli bir faktör olan intrasellüler GSH içeriğinin azalmasına neden olur (42). Ayrıca aldoz redüktaz inhibitörlerinin kullanıldığı bazı çalışmalarda lipid peroksidasyonunun azaldığı (43) ve eritrosit GSH düzeylerinin arttığı (44) gösterilmiştir.

Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin artması sonucunda hücre içi NADH / NAD⁺ (redükte nikotinamid adenin dinükleotid / nikotinamid adenin dinükleotid) oranının artmasına neden olarak "hiperglisemik psödohipoksi" olarak adlandırılan ve serbest radikal üretiminin artmasına neden olan bu olayın sonucunda iskemi gelişebilir (45). Sorbitol hidrofilik özellikte bir alkol ürünü olduğundan dolayı hücre zarından kolayca geçemez ve hücre içinde birikir. Sorbitolün hücre içinde birikmesi hücrede ozmotik stresin artmasına neden olmaktadır. Sorbitol birikiminin sonucunda

hücrenin su kapasitesi artarak ozmotik stres oluşur ve bu da dokuda ozmotik hasarları meydana getirmektedir. Böbrekte mezenkimal ve proksimal tübül hücrelerinde sorbitol birikimi ile Na⁺ /K⁺ /ATPaz enzim aktivitesinin azalması ile vasküler disfonksiyon meydana gelmektedir. Sinir dokusunda intraaksonal sodyum birikmesi sonucunda sinirsel iletim hızı yavaşlamakta ve sinir hücrelerinde morfolojik bozulmalar meydana gelmektedir (39).

Sorbitolün fruktoza dönüşümünde oluşan NADH miktarının artması reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olur. ROS gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) enzimini inhibe etmekte ve bu da AR enziminin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır. Diyabetik hayvan modellemeleri üzerinde yapılan birçok çalışmada AR enzim inhibitörlerinin kullanılması durumunda diyabetik komplikasyonların tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (46, 47, 48,49).

Son zamanlarda, ROS ve oksidatif stresle ilişkili olarak bazı farklı biyokimyasal aktivasyonlarda da hipergliseminin rolü üzerinde durulmaktadır. Bunlar; nükleer faktör-κB (NF-κB), NH₂-terminal Jun kinazlar / stresle aktive edilen protein kinazlar (JNK/SAPK), p38 mitojenle aktive edilen protein (MAP) kinaz ve heksozaminin stresle aktive edilen yolaklarıdır (29).

1.4. Diyabet ve Testis

Artan tip I ve tip II diyabetin etkisiyle erkeklerde anormal sperm yapımı ve üremedeki engellere bağlı olarak infertiliteye neden olduğu DM' nin uzun zamandır bilinen ve diyabetik erkeklerde ortak bir komplikasyondur (50,51).

STZ ile diyabet oluşturulan rat modellerinde, testis ağırlıklarında, sperm sayısında ve hareketlerinde, testosteron seviyesinde azalmaya ve sıklıkla anormal spermatogoneze neden olabilmektedir (52,53,54). Ayrıca androjen reseptörlerinin testiste, epididimide ve prostat bezinde azaldığı gösterilmiştir. DM'nin hipotalamo-hipofiziyal-gonadal eksenini etkileyerek, luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH)' ların salınımındaki kontrol mekanizmalarını değiştirerek androjen reseptörlerinin azalmasına, hormon sentezinde ve seksüel fonksiyonlarda bozukluklara neden olur (55).

Aynı zamanda STZ uygulanması sonucunda LH, FSH ve testosteron düzeyleri belirgin olarak azalmaktadır. İnsüline bağlı diyabette meydana gelen FSH

azalması sonucu, Leydig hücrelerinin fonksiyonunda ve testosteron üretiminde azalmaya bağlı olarak LH düzeylerinde düşüş gözlenir (56).

Ayrıca spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücrelerinin parakrin ve endokrin kontrolü altındadır ve Sertoli hücrelerini etkileyen bu hormonal dalgalanmalar, spermatogenik seri hücrelerini, özellikle de spermleri olumsuz etkilemektedir. DM' nin spermin DNA yapısında hasar oluşturarak, sperm kalitesini etkilediği, iktidarsızlık ve libido azalması gibi cinsel problemlere de neden olduğu bilinmektedir (57,58).

Kronik hiperglisemi; pankreatik β hücrelerinin fonksiyonlarının bozulmasına ve insülin salınımı için gerekli olan genlerin ekspresyonunun azalmasına bağlı olarak, insülin biyosentez ve sekresyon yapısını bozmaktadır ve bu süreç, "glukoz toksisitesi" olarak adlandırılmaktadır (59-62). Yüksek glukoz ve yağ asit düzeyi, ROS artışına ve sonuçta β hücrelerinin dejenerasyonuna neden olmaktadır (59,62,63). Seminal plazma, oksidatif strese karşı spermi korumak için, serbest radikal süpürücü olarak fonksiyon gören antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır. Ancak serbest radikallerle, antioksidan sistem arasındaki dengenin bozularak serbest radikal yönündeki artışı, apoptozis ile sonuçlanabilmektedir (25).

ROS' un normalde spermlerde akrozomal reaksiyonu, kapasitasyonu ve spermin kalitesini etkilediği bilinmektedir. ROS düzeylerindeki değişimler, fertilizasyon sırasında spermin oosite füzyonunu engelleyebilmesine neden olmaktadır (64,65).

Oksidatif stres, DNA'nın kendini eşlemesini etkileyerek, hücre bölünmesine engel olmaktadır. Ayrıca genellikle hücreyi apoptozise kadar götüren bir süreci de başlatmaktadır (66). ROS üretiminin artışı ile birlikte görülen, sperm hasarında artma ve apoptozis arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu gösterilmiştir (64,67). Yapılan deneylerde diyabetik rat modellerinde de testiküler germ hücrelerinde apoptoziste artışa neden olduğu ortaya konulmuştur (68,69). Diyabetiklerde olgunlaşmamış, apoptozise giden ve az hareketli sperm yüzdesi oldukça yüksektir (70). Diyabete bağlı olarak testislerde, tunika albugeniada, seminifer tübüllerde, intertisyel bağ dokuda ve Leydig hücrelerinde histolojik değişiklikler saptanmıştır (71,72).

1.5. Adropin

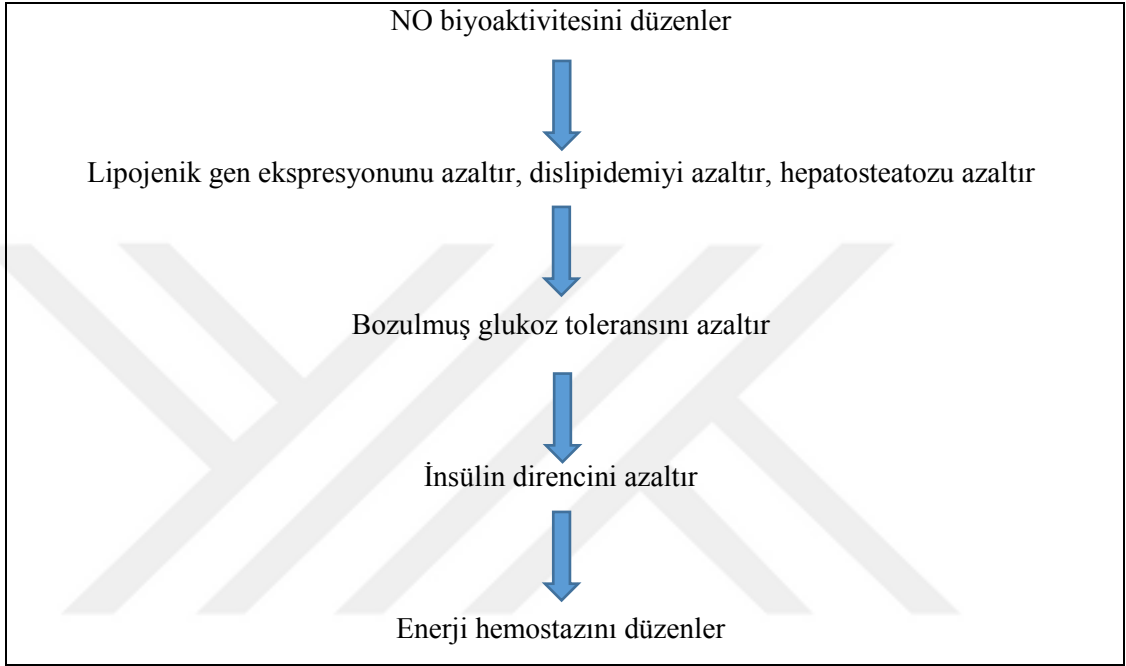
Adropin, 76 aminoasitten oluşan yaklaşık moleküler ağırlığı 7.927 Kda olup ilk olarak 2008 yılında Kumar ve ark. tarafından keşfedilmiş olan bir peptid hormondur. Enerji dengesi ile ilgili gen (ENHO) kodu üzerinden kodlanmakta olup, insan, fare ve sıçan adropin moleküllerinin aminoasit dizilerinin %100 oranında benzerlikte olduğu, ilk yapılan çalışmalarda karaciğer ve beyin dokusu tarafından üretildiği gösterilmiştir (73,74). Yapılan son çalışmalarda ise pankreas, kalp, böbrek ve serebellum dokusundan da üretildiği ve en fazla pankreas dokusundan salındığı kanıtlanmıştır (75). Başka bir çalışmada ise, diyabetik farelerin böbrek dokusunda adropinin immünohistokimyasal olarak artmış olduğu ve proksimal epitel dokusundan salınımının arttığı bildirilmiştir (76). Adropin başlıca insülin cevabı ve enerji dengesinin korunmasını sağlamaktadır, ayrıca vücutta salınımı açlık ve beslenme ile düzenlenmektedir (73).

Adropin molekülünün yarılanma ömrü henüz bilinmemektedir. Ancak peptid hormonların yarılanma ömrü 3-30 dk arasında değiştiğinden adropinin yarılanma ömrünün de birkaç dakika kadar kısa olduğu tahmin edilmektedir (74).

Adropinin etkisi insülin üzerine değil, kan glukozu üzerinedir. Dolaşımda yüksek adropin miktarı, metabolik strese tepki olarak meydana gelen glukoz intoleransını ve insülin direncini azaltmaktadır (74). Fazla yağlı diyet ile beslenen farelerde adropin düzeyinin arttığı gösterilmiştir. Bu genin fazla ekspresyonu veya sistemik adropin tedavisi diyetle ilişkili obezite, insülin direnci, glukoz toleransını düzelttiği bildirilmiştir (73). Adropinin vücut ağırlığı veya kilo kaybından bağımsız olarak obezite ilişkili metabolik stres faktörlerini azalttığı bilinmektedir. Deneysel çalışmalar da yağ dokusundan fakir, zayıf farelerde yüksek yağ içerikli diyetle besleme yapıldıktan sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında adropin ekspresyonunun hızlı bir şekilde arttığı, bunun tam tersi olarak da aç bırakılan farelerde ise adropin değerinin kontrol grubuna kıyasla düştüğü görülmüştür.

Adropin obezite ile bağlantılı hepatosteatoz (karaciğer yağlanması) ve hiperinsülinemiye karşı koruyan glukoz ve lipid homeostazıyla ilişkili bir faktördür (74). Adropinin gıda alımı ile herhangi bir rolü olmadığı, temel işlevinin, insülin direnci, dislipidemi ve bozuk glukoz toleransını önlemektir. Bazı kaynaklara göre kandaki normal adropin konsantrasyonu değişmek ile birlikte; bazı kaynaklarda 1.3 ± 3.1 ng/ml, bazı kaynaklarda ise 3.4–4.5 ng/mL arasında değişip genellikle 10 ng/ml

civarında olduğu belirtilmiştir (77,78). Adropin ayrıca böbrekte, pankreas dokusunda, umbilical vande, tükürük bezinde, kalpte ve koroner arter endotel hücrelerinde gözlemlenmiştir.



Şekil 3. Adropinin fizyolojik ve biyokimyasal etkileri (74).

1.6. Apoptozis

Kelime anlamı olarak Yunanca da apo=ayrı ve ptosis=düşen kelimelerinin birleştirilmesi ile ağaç yapraklarının ayrılması ‘yaprak dökümü’ anlamına gelen ‘apoptosis’ kelimesi, çok hücreli canlılarda görülen programlı hücre ölümü “Programmed cell death (PCD)” anlamına gelir (79). Literatürde fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı terimleri de aynı anlamda kullanılabilen ifadelerdir.

Hücre ölümü ile ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve bunlara istinaden ilk tanımlanan terim nekroz olmuştur. Fizyolojik olarak hücrelerin ölümleri biliniyor olmasına rağmen 1970’li yılların başında, iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı olan, yeni hücre ölüm formları olduğu gözlenmiş ve buna programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis adı verilmiştir (79,80).

Apoptozisin moleküler mekanizması tam olarak çözülememiştir. Hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylar ile aktive olmasıyla başladığı tahmin edilmektedir (81). Ayrıca nekroz oluşturabilen hipertermi, radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve hipoksi gibi etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirebilmektedir (82).

Apoptozisde, hücre ölümü çevre dokuya rahatsızlık vermeksizin gelişse de, bazı durumlarda apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersine nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (83).

Apoptozis olayında morfolojik olarak, nukleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır (84). İmmun elektroforez işlemi yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdivene benzer bir görünüm oluşur (85). Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptoziste yaklaşık 300000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı yapılamaz (86, 87).

Apoptozisin erken evresinde hücreler birleşme bölgelerinden ayrılır, yüzeyinde bulunan özelleşmiş organellerini kaybeder ve belirgin bir şekilde büzülür, bir kaç dakikada hacimlerinin 1/3'ünü kaybederler. Bu görünüm muhtemelen plazma membranında bulunan iyon kanalları ve pompalarında aktivasyonun bozulmasına bağlı olarak gelişmektedir (88). Işık mikroskopunda apoptotik hücrelerin bulunduğu dokulardan elde edilen kesitler incelendiğinde, hücreler etrafında açık bir parlama şeklinde görülmektedir (86).

Plazma membranında tomurcuklanmalar oluşarak hücre, sitoplazma ile çevrilmiş kromatin parçalarından oluşan apoptotik cisimciklere parçalanır. Apoptotik hücreler çevre komşu hücreler ile makrofajlar tarafından tanınır ve fagosite edilir (89). Apoptotik hücrelerin diğer hücreler tarafından tanınması olayı, plazma membranındaki değişikliklerle olur. Normalde hücre membranının iç tabakasında olan fosfatidil serin, aminofosfolipid transferaz enzimi ile membranın dış yaprağına göç eder. Fagositik hücrelerde bulunan vitronektin, lektin özelliğindeki reseptörleri fosfatidilserin ile bağlanarak fagositozu uyarır (86).

Apoptozis, tek bir hücrede meydana gelen büzüşme ve çevre hücrelerle olan temasın kaybolması ile karakterize bir olaydır. Hücresel büzüşmenin nedeni Na, K, Cl taşıyıcı sisteminin durması nedeni ile hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin

bozulması ya da hiç olmamasıdır. Apoptotik sinyal uyarımı alan hücre, var olan hacminin yarısına düşer, çevre ile olan bağlantılarını keser ve mikrovillusları kaybolur. Elektron mikroskopunda gözlenen değişikliklerde, ilk olarak plazma membranının şekli bozulur ve kabarcıklanmalar oluşur. Membrandaki tomurcuklanma ve parçalara ayrılma olayında transglutaminaz enzimi etkili olmaktadır (90).

1.6.1. Apoptozisin Mekanizmaları

Hücrenin kendi otomatik saati olan genlerin aktivasyonu veya çevreden gelen sinyal uyarımları ile apoptozis başlamaktadır (91).

Programlı hücre ölümü önceden hazır olan hücrelerde primer başlatılabilir ya da bir uyarın sonucu sekonder olarak gelişir. Tümör nekroz faktörü (TNF), koloni uyarıcı faktörler (CSF), nöron büyüme faktörü (NGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) (92), IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması, glukokortikoidler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler gibi hücre dışı uyarınlar da önemli yere sahiptir. Otoimmün hastalık gelişiminde rolü olduğu belirtilen Fas/FasL (93), sFas proteinleri, virüsler de (HIV gp120 proteini, influenza virüsü TNF reseptörü üzerinden; adenovirüs hücre genetik yapısını bozarak) hücrelerde apoptozise neden olmaktadır (91). Organizmada apoptozisi uyarın ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (86).

Apoptozis süreci üç farklı şekilde; DNA hasarına genlerin yanıtı, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınması (Fas ligandı), hücreye doğrudan proteolitik enzim girişi (granzim) ile gerçekleşebilir (95). Apoptoz sürecinde Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar ve Apaf-1 (Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör-1) proteini olmak üzere belli başlı üç anahtar bileşen vardır. Bu bileşenlerin biyokimyasal aktivasyonu, apoptozda gözlenen mitokondriyal hasar, çekirdek zarı kırılması, DNA fragmentasyonu, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimlerin şekillenmesi gibi morfolojik değişikliklerden sorumludur (95).

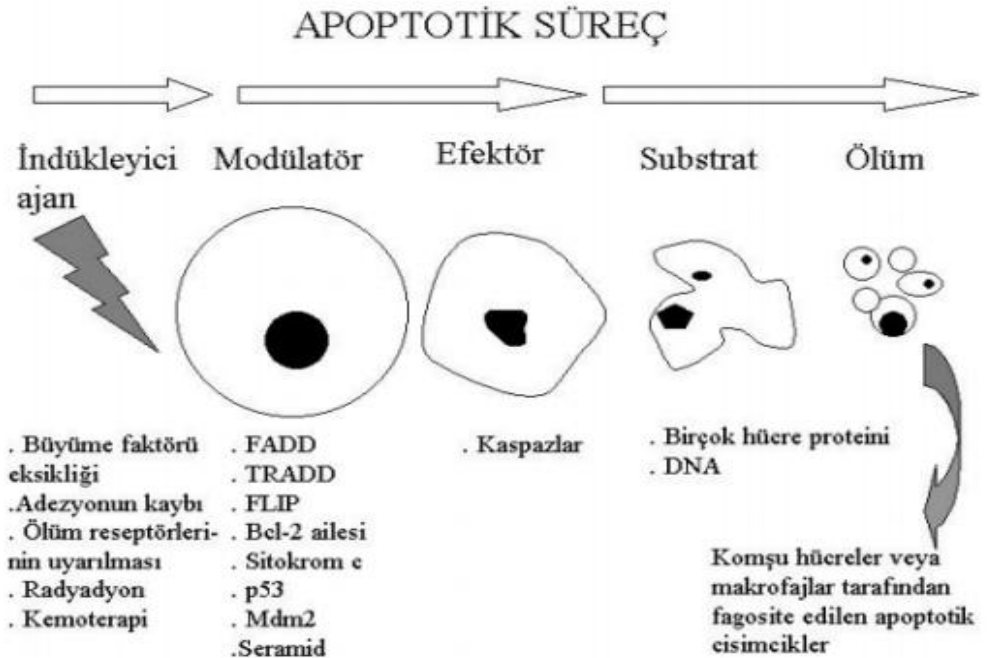
Tablo 4: Apoptozis ve Genler (86).

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1	• Bcl- 2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-Xs, bid, bik, Hrk-1

- c-abl geni
- Ras onkogeni
- Çözünebilir fas
- p35
- A20
- c-myc
- P53, p21
- Fas (CD95/APO1) FADD, MORT, RIP, FAST
- İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)
- LOH (MTS1/CDK41)

1.6.2. Apoptozisin Regülasyonu

Apoptozun düzenlenmesi Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu gen ailesinin 20 üyesi tanımlanmıştır ve bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları ise apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak tanımlanır (96). Apoptotik sinyalin alınmasından sonra Bax (proapoptotik) proteinleri, mitokondri membranının iyon permeabilitesini azaltabilir. Membrandaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptozis Uyarıcı Faktör) gibi mitokondri membranı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya geçer (97). AIF direkt yoğunlaşan kromatine ve parçalanmış çekirdeğe yönelirken, sitoplazmaki sitokrom c apoptozun en son basamağında görev alır. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptosom' olarak isimlendirilir. Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır(90, 96).



Şekil 4. Apoptozisin Regülasyonu (98).

1.6.2.1. p53'ün Rolü

İnsanda apoptozisin düzenlenmesi, DNA tamiri yapan proteinlerin yazılımını sağlayan p53 geni ile başlar ve kaspazlara kadar devam eden olaylar zinciridir. Normalde inaktif bulunan p53 geni hücrede çeşitli etkilerle (radyasyon, kemoterapi vb.) DNA'ya doğrudan bağlanarak meydana gelen hasarı tanıdıktan sonra, aktifleşerek hücre döngüsünü G1 fazında durmasını uyararak bloke eder ve hücrenin DNA'sını kontrol edebilmesi ve gerekirse tamiri için zaman tanır. Böylelikle hücre siklusu durdurulur ve DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Diğer bir taraftan hasar fazla ise hücreyi apoptozise sevkeder. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2 ve Bcl-2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği sanılmaktadır (99).

1.6.2.2. Bcl-2/Bax

Bcl-2 geni, üyelerinin bir kısmı apoptozisi tetiklerken (Bid, Bad, Bax), diğer bir kısmı (Bcl-2, Bcl-xl) inhibe eder. İlk olarak insan B hücreli foliküler lenfomasında tanımlanan Bcl-2 proteini mitokondrinin hem iç hem de dış membranında yerleşir. Ayrıca endoplazmik retikulum, çekirdek membranı dış yüzeyi ve sitoplazmada da bulunabilmektedir. Mitokondri dış membranında bulunan Bcl-2, özellikle iyon transportunun düzenlenmesinden sorumludur ve sitokrom c salınımını da engeller (100,101).

Bcl-2, APAF1'e tutunmuş olarak bulunur. Hücrenin içinden alınan apoptotik sinyaller APAF1'in mitokondrinin dış membranından ayrılmasına neden olur. Bunun sonucunda ise mitokondri dış membranının geçirgenliği artar. Bu sırada apoptozisi tetikleyen Bax hücre sitoplazmasında bulunur ve herhangi bir sebeple apoptotik bir uyarının alınması durumunda mitokondri membranına bağlandığı görülür ve burada sitokrom c ve AIF mitokondriden sitoplazmaya çıkmasını sağlayan deliklerin oluşmasına neden olur. Apoptozis indükleyici faktör hücre çekirdeğine transloke olur. Apoptozom kompleksinin oluşması için sitokrom c'nin sitoplazmaya çıkarak ATP, APAF1 ve Kaspaz 9 ile birleşmesi gerekmektedir. Sağlıklı hücrelerde Bad, mitokondri membranının dış membranında yerleşim gösterir. Apoptozis esnasında Bcl-xl'nin Bad'dan ayrıldığı sırada Bax farklılaşmaya uğrar (90,100,102).

Bcl-xl mitokondri membranının dışında bir yerleşim gösterir. Mitokondri membranının geçirgenliğinin düzenlenmesinde Bcl-2 ve Bcl-xl genleri görev alır. Bu proteinler, Bad ve Bax gibi proapoptotik özellik taşıyan proteinleri inhibe ederek

apoptozisi engellemede görev alırlar. APAF-1 üzerinden kaspaz aktivasyonunu Bcl-1 tarafından önlediği ve bu proteinin apoptozisi engelleme fonksiyonu kaspazların öncü formlarını durdurmak ya da sitokrom c ve AIF gibi proapoptotik faktörlerin mitokondriden hücre sitoplazmasına çıkmasını bloke ederek gerçekleştirmektedir (100, 103, 104, 105).

1.6.2.3. Kaspazlar

İçsel ve dışsal kaynaklı sinyallerle hücre içinde bir grup proteaz aktive olur ve bunlar kaspaz (Caspase: Cysteine-Containing Aspartate Specific Proteases) olarak isimlendirilirler (106). Kaspazlar, proteolitik etki gösteren moleküllerin oluşturduğu bir gruptur ve apoptozisde ortaya çıkan morfolojik değişiklikleri uyarmaktadır. İnsan hücrelerinde bir düzineden fazla kaspaz olduğu bilinmektedir (107). Bu proteinler, inaktif olarak yani zimojen (prokaspaz) formda hücrenin sitoplazmasında bulunurlar. Aktif merkezlerinde sistein bulunduğundan dolayı sistein proteazlar olarak isimlendirilen enzim gruplarıdır. Prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü hücreye ölüm uyarısının gelmesini takiben proteolitik bir işlem ile meydana gelir. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek kaspaz aktivasyon serisinin oluşumuna neden olurlar. Kaspaz 9, Kaspaz 8 gibi bazıları başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, Kaspaz 3, Kaspaz 7 gibi bazıları da efektör kaspazlar olarak bilinirler. Hücrenin apoptotik uyarıyı almasıyla aktive olan başlatıcı kaspazlar takiben efektör kaspazları aktifleştirirler. Aktive olmuş efektör kaspazlar ise kendisi ile ilişkili proteinleri parçalarlar ve karakteristik apoptotik hücre morfolojisi şekillenmeye başlar. Bu morfolojik bozulma hücre iskeletinin ana bileşeni olan aktin filamanlarının yıkımıdır ki bu yıkım sonucu hücre normal şeklini kaybeder (106). Kaspazlara ihtiyaç duyulduğunda yeniden sentezlenmesine gerek duyulmaz. Apoptozisi tetikleyen başlangıç sinyalinin ardından, sitoplazmadaki proenzimler aktif kaspaz formuna geçerler ve yaklaşık bir saat içinde hücre ölümü meydana gelir (108).

1.6.3. Apoptozun Testisler Üzerindeki Etkisi

Apoptozis kusurlu hücrelerin elimine edilmesinde rol oynamakta olup germ hücreleri ve sperm hücrelerinin normal fizyolojide gelişmeleri için gereklidir. Testislerde apoptozisi patofizyolojik dış etmenler ve testise bağlı hastalıklar artırmaktadır (109,110). Ayrıca hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondrial defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması da apoptoz

oluşumunu tetikleyebilmektedir (111). Testiste, kusurlu germ hücrelerinin toplam germ hücresine oranı yaklaşık %75 olup bu dejenere hücreler apoptoz mekanizması ile ortamdaki uzaklaştırılırlar (112). Testiste sürekli olarak apoptozis gerçekleştiği Kerry ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada bildirilmiştir (113). Dokuların normal fizyolojik yaşamını devam ettirebilmeleri için apoptozis mekanizması diğer dokularda olduğu gibi testislerde de çok önemlidir. Bcl-2 ailesi, kaspazlar, ölüm reseptörleri ve p53 gibi temel faktörler apoptoz mekanizmasında yer alırlar. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır (114). Spermatozaların fizyolojik gelişimi için germ hücrelerinde meydana gelen apoptozis çok önemli bir rol oynamaktadır. Hormonal yetersizlik, kriptorşidizm, testiste artan kan akış hızı, testiste lokal ısı artışı, venöz staz ve buna bağlı hipoksi, azospermi testiküler hipotermi olgularının tümü testiste apoptozu artıran etkenlerdir (115). Seminifer tübül epitelinde meydana gelen çevresel faktörler de (ısı, radyasyon veya soğutma gibi) germ hücrelerinde apoptozisi artırabilir (109).

3.6.4. Apoptozis ve Nekrozis Arasındaki Farklar

- Nekrozis fizyolojik bir ölüm şekli değildir. Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelebilir.
- Nekroziste hücre şişerken apoptotik hücre tam tersine küçülür. Nekroziste kromatin patterni hemen hemen normaldir.
- Apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır ve yoğunlaşır. Apoptozisin en önemli özgül yönü DNA'nın internükleozomal bölgelerden parçalanmasıdır.
- Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder. Apoptotik hücre membranı sağlamdır.
- Nekrotik hücre sonradan lizise uğrar. Apoptik hücre küçük cisimciklere parçalanır.
- Nekroziste inflamasyon uyarılır. Apoptoziste inflamasyon oluşmaz (116-118).

1.6.5. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne

göre karar verilmişti. Oysa günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (119).

1.Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Hematoksilen Boyama
- Giemsa Boyama

2.İmmünohistokimyasal yöntemler

- Anneksin V Yöntemi
- TUNEL Yöntemi (TdT-mediated nick and labeling technique)
- M30 Yöntemi
- Kaspaz-3 Yöntemi

3.Biyokimyasal yöntemler

- Agaroz Jel Elektroforezi
- Western Blotting
- Flow Sitometri
- Malondialdehit (MDA)Yöntemi

4.İmmunolojik yöntemler

ELISA (Enzyme Linked İmmunosorbent Assay)

Fluorimetrik Yöntem

5.Moleküler biyoloji yöntemleri

Dna Microarray

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Çalışması

1.7. D Vitamini

D vitamini, çok işlevli bir hormon olup, Vitamin D2 (Ergokalsiferol) ve vitamin D3 (Kolekalsiferol) olarak iki formda bulunur ve bağışıklık sisteminin regülasyonundan iyon metabolizmasına kadar birçok temel fonksiyonu etkilemektedir (120,121). Asıl görevi, iskelet sisteminde kalsiyum ve fosfat dengesini düzenlemesi ve kemik mineralizasyonu olup, iskelet dışı görevleri de bulunmaktadır (122,123). Vitamin D3 (Kolekalsiferol) dışarıdan alınır, ya da ciltte UV radyasyon etkisiyle 7-dehidrokolesterolden sentezlenir. Ciltteki D vitamini

sentezi maruz kalınan UV radyasyonun yoğunluğuna göre değişir. UV radyasyon yoğunluğu, mevsim ve yaşanılan yükseklik ile ilişkilidir (124).

1.7.1. D Vitamini Metabolizması

Vitaminin insandaki temel kaynağının güneş işınlarına maruz kalma ve yağda çözünerek yağ dokusunda depolanmaktadır (125,126). Günlük D vitamini ihtiyaının ancak %30'u besinlerle karşılanabilmekte geri kalanı da epidermiste bulunan dehidrokolesteroln güneş işığıyla fotokimyasal tepkimeye girmesi ile karşılanmaktadır (125). Bu endojen sentez esnasında epidermiste bulunan dehidrokolesterol 7-dehidrokolesterolle dönüşmekte ve 7-dehidrokolesterol, karaciğerde 25-hidroksi vitamin D3'e [25(OH)D3]; böbreklerde de vitaminin aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D3'e [1,25(OH)2D3] dönüşmektedir (125, 126,127). Serumda bulunan 25(OH)D3 D vitamini reseptörlerine bağlanarak ince bağırsaklardan kalsiyum ve fosforun, böbreklerden de kalsiyumun geri emilimini arttırarak plazma mineral dengesini ve kemik gelişimini düzenlemektedir (125). Bu mekanizma ile paratiroid bezlerini doğrudan inhibe ederek parathormon (PTH) düzeyini azaltmakta ve serum kalsiyum miktarının artmasını sağlamaktadır (128). Kolekalsiferol, öncelikle yağ dokusunda depolandığından vücut yağ oranının artması, kolekalsiferoln biyoyararlılığını azaltmaktadır (122). Aktif metabolit 1,25(OH)2D3 olmasına rağmen, serum D vitamini düzeyi, alım ve endojen üretimi yarılanma ömrü uzun olan ve depo D vitamini düzeyini yansıtan (122) serum 25 hidroksi D3 [25(OH)D3] düzeyi ile değerlendirilmektedir (125- 127).

1.7.2. D Vitamininin Fonksiyonu

1,25(OH)2D3'n genel fonksiyonu yeterli plazma kalsiyum düzeyini devam ettirmektir. Bu fonksiyonu kemik, barsak ve böbrekler üzerinden yapabilmektedir. 1,25(OH)2D3 kalsiyum ve fosforun barsaklardan emilimini arttırmaktadır. 1,25(OH)2D3 PTH sentez ve salınımını arttırıcı rol oynamakta, PTH varlığıyla kemikten kalsiyum ve fosfat serbestleşmesini uyarmaktadır. 1,25(OH)2D3 RANKL (nükleer faktör kappa-B ligand'ın reseptör aktivatörü) ekspresyonunu arttırır. RANKL, proteoklastlarda RANK ile etkileşime girip proteoklastların osteoklastlara dönüşümü gerçekleştirerek kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır (129).

D vitamini reseptörleri beyin, hipofiz, tiroid, meme, kalp kası, karaciğer, böbrek, deri, kolon ve ince barsak, prostat bezi, gonadlar, osteoblastlar, mononükleer

hücreler, lenfositler ve pankreas adacık hücreleri gibi pek çok dokuda bulunmaktadır (130).

1.7.2.1. Tip 2 Diyabet (T2D) Gelişiminde D Vitaminin Rolü

Tip 2 diabet (T2D) ve D vitamini ilişkisi, ilk kez 1986 yılında Gedik ve Akalın tarafından D vitamini eksikliği olan dört sağlıklı kişide, insülin salınımının bozulması ve 6 ay süre ile D vitamini verildikten sonra insülin salınımının normale döndüğünün belirlenmesi ile gündeme gelmiştir (131). D vitamini ile T2D arasındaki fizyolojik ilişki detaylı bir şekilde incelenmiş ve yetersizliği, glukagon salınımını değiştirmeden elektrik bağımlı seçici olmayan Ca^{2+} kanalları üzerinden hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu artırarak insülin salınımını azalttığı ortaya konulmuştur (125,132).

D vitamini reseptörleri, beta hücrelerinde ve periferde, insüline cevap veren iskelet kası ile yağ dokusu gibi hedef dokularda ve çeşitli hücrelerde bulunmaktadır (120, 133). D vitamini, beta hücrelerinde bulunan reseptörleri uyararak insülinin salınmasını ve pankreasta bulunan D vitamene bağımlı kalsiyum bağlayan proteinlerin aktifleşmesini sağlamaktadır (125, 134). Bazı yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar da, D vitamininin glikoza cevap olarak glikoz toleransının sürdürülmesi için gerekli olan normal insülin salınımından sorumlu hormon olduğunu göstermiştir (125).

T2D'nin ortaya çıkması, insülin direnci ve beta hücre disfonksiyonu gibi iki temel metabolik eksiklikten kaynaklanmaktadır (135).

1.7.2.1.1. D Vitaminin ve İnsülin Direnci

D vitamini reseptörlerinden olan kalsiyum, yağ dokusu ve iskelet kası gibi insüline yanıt veren dokularda etkili olduğundan, Ca referans aralığının dar olması, insülinin maksimum seviyede etkinliğini sağlamaktadır. İnsülinin hedef dokularındaki hücre içi Ca değişimi, periferik insülin direnci ile sonuçlanarak glukozun hücre içi girişini sağlayan Glut-4 aktivitesini de azaltmaktadır (136). D vitamini yetersizliği durumunda, Ca emilimi azalarak PTH sekresyonu başlamaktadır ve böbreklerden Ca geri emilmektedir. Bunun sonucunda hücre içi Ca seviyesinin artmasına ve insülinin hedef dokulara etki edebilmesi gerekli hücre içi Ca akışını inhibe ettiğinden insülin hassasiyetini de azaltmaktadır (133). İnsülin hassasiyetinin

azalması halinde PTH sekresyonunu da artırmaktadır. D vitamini yetersizliğinde, PTH sekresyonu uyarılır ve hücre içi Ca seviyesinde de artış görülür (134).

1.7.2.1.2. D vitamini ve Beta Hücre Disfonksiyonu

D vitamini, bazal insülin salınımını ile birlikte, kan glukoz artışına karşılık salınan insülin düzeyini etkilemektedir (137). D vitamininin dolaşımdaki aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃, beta hücrelerinde yer alan D vitamini reseptörlerine bağlanarak hücre dışı ve hücre içi Ca akışını düzenlemekte görev alır. İnsülin salınımı, Ca bağımlı bir süreç olduğundan, Ca akışındaki değişiklikler durumunda, beta hücrelerinin insülin salgılamasını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (137). Buradaki temel mekanizma, D vitamini eksikliği veya yetersiz Ca alımının, beta hücresindeki hücre dışı ve hücre içi Ca havuzları arasındaki dengeyi bozarak kan glukoz seviyesine yanıt olarak oluşan insülin salınımını kesintiye uğratmasıdır (133,137). Beta hücrelerinden insülin salınması, akut hücre içi Ca miktarındaki artışa bağlı olarak gerçekleşmektedir (127).

1.7.3. D Vitamini Düzeyleri

D vitamini düzeyinin normal ya da yetersizliği ve eksikliği için 25OHD₃ seviyesine bakılmalıdır. Yarılanma ömrü 2-3 hafta olan, D vitamini alımını ve endojen D vitamini üretimini gösteren formu 25OHD₃' dür. Yarılanma ömrü 4-6 saat gibi kısa olan 1,25(OH)₂D₃ ideal ölçüm için uygun değildir. Ayrıca dolaşımdaki düzeyleri 25OHD₃ ye göre 1000 kat daha düşüktür. D vitamini yetersizliği durumunda barsaklardan kalsiyum Emilimi azalmakta ve PTH salınımı ise artmaktadır. Bu PTH salınımının artışına bağlı olarak 1,25(OH)₂D₃ yapımı artar. Sonuç olarak kişide D vitamini eksikliği olmasına rağmen 1,25(OH)₂D₃ seviyelerini yüksek göstermektedir (129).

Tablo 5. Serum 25(OH)D₃ düzeyine göre D vitamini durumu

Serum 25(OH)D₃ Değerleri		
ng/mL	nmol/L	D Vitamini Durumu
< 12	< 30	D vitamini eksikliği
12-20	30-50	D vitamini yetersizliği
≥ 20	≥ 50	Yeterli D vitamini düzeyi
> 50	> 125	Potansiyel olumsuz etkiler

1.7.4. D Vitamini Kaynakları

Güneş ışınları: Ultraviöle (UV) ışınlarına 20 dakikada maruz kalan yüz ve kol bölgesine ait deride günlük 200 IU vitamin D sentezlenebilmektedir.

Besinsel kaynaklar: Hayvansal kaynaklı gıdalardan; balık yağı, tereyağı, yumurta sarısı, süt gibi besinlerin içeriğinde, sebzelerden ise koyu yapraklı yeşil sebzeler ve mantar vitamin D bakımından zengindir. Anne sütü de 25 hidroksikolekalsiferol içermektedir. Bu durum yeni doğanlarda karaciğerin kolekalsiferolün ilk hidroksilasyonunun gelişmemiş olmasından ileri gelir (138).

2.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 03.03.2017 tarih ve 61 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları Ve Beslenmeleri

Deneysel çalışmada kullanılan 41 adet 8-10 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında buldukları ortamın sıcaklığı 22–25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00- 07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerin terkihi Tablo 6'da gösterildi.

Tablo 6. Deney Hayvanlarına Verilen Sıçan Yeminin Terkihi

Sıçan Yeminin Terkihi	%
Buğday	15
Mısır	10
Arpa	27
Kepek	8
Soya	29,4

Balık Unu	8
Tuz	0,6
Kavimix VM 23-Z*	0,2
Methionin	0,2
DCP **	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur

2.2. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 20 adet sıçanda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal (ip) olarak 0, 4 ml (0, 1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4, 5) çözdürülerek tek doz uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu > 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar, diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile yapıldı. Sıçanların açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 8-10 arasında alındı.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 215-250 gr arasında değişen 8-12 haftalık 41 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar 5 gruba ayrıldı;

Grup I (Kontrol grubu) (n=7); Deney süresi olan 8 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı. Deney başlangıcı ve sonunda açlık glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

Grup II (Tampon grubu) (n=7); Tek doz 0.1 M sodyum sitrat tamponu ip. uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

Grup III (Vitamin D grubu) (n=7); ; 8 haftalık deney süresi boyunca her gün Vitamin D 200 IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda düzenli bir şekilde glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

Grup IV (Diyabetik grup) (n=10); 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tamponunda (pH:4.5) çözdürülerek ip olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edilip, deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.

Grup V (Diyabet + Vitamin D grubu) (n=10); 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0.1 M sodyum sitrat tampon (pH:4.5) çözdürülerek ip olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk venin den kan glukoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün Vitamin D 200 IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı. Deney başlangıcı ve sonunda glukoz düzeyleri ölçülüp kaydedildi.



2.4. Örneklerin Alınması

Tüm gruplardaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) ip uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Tüm gruplara ait serum ve testis dokuları biyokimyasal ELİSA çalışması için -80 C°'de saklandı. Histolojik çalışma için ise bouin solüsyonunda tespit edildi.

2.5. Biyokimyasal Çalışma

2.5.1. Kan glukoz düzeyleri

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile ölçüldü. Bununla birlikte diğer biyokimyasal çalışmalar Aydın S. (139)'nin kullandığı moleküler teknikler modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır.

2.5.2. Doku Homojenatlarının Hazırlanması ve Saklanması

Tüm gruplardan alınan testis dokuları -80 °C'ye alındıktan sonra her bir örnek 200 mg olacak şekilde tartıldı. testis dokularındaki kan ve artıkları uzaklaştırmak için üç kez fosfat tampon solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra her bir doku içerisinde 500 KIU/ml olacak şekilde ayarlanan ependorf tüplerin içerisine yerleştirildi. Her bir ependorf içerisine 200 ml 0,5 mm çaplı zirkonyum oksit boncuk (beads)' larından konuldu. Bütün örnekler bir ml'ye tamamlanacak şekilde fosfat tamponu ilave edildi. Mikrosantrifüj tüplerinin ağızları kapatılıp Bullet Blender adındaki homojenatörün içerisine yerleştirildi. Homojenatörde 5 dakika homojenize edildi. Elde edilen süpernatant tabaka başka bir ependorfa aktarıldı. Tekrar 10 dakika daha 4000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üstteki süpernatant enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) çalışmalarında kullanılmak üzere ayrıldı ve derhal çalışıldı.

2.5.3. Total Antioksidan (TAS) ve Total Oksidan Seviye (TOS) Ölçümleri

2.5.3.1. TAS Ölçümü

Serum TAS düzeyleri Olympus AU2700 otoanalizöründe Rel Assay Total Antioksidan Status Test Kiti (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (140).

Çalışma Prensibi: Örnekteki antioksidanlar, asetat tampon (0,4 mol/L, pH:3.6) solüsyonunun içerisinde bulunan konsantre haldeki koyu mavi-yeşil renkli ABTS•+ (30 mmol/L) [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]

radikalini indirgenmiş renksiz ABTS şekline çevirir. Yüksek pH' daki asetat tampon (0.4 mol/L, pH:5.8) solüsyonu ile dilüe edildiğinde örneklerde bulunan antioksidanlar sayesinde ABTS molekülü indirgenir ve renk açılır. Örneklerde bulunan antioksidan maddelerin konsantrasyonu ile renkteki açılma arasında ters orantı vardır. Spektrofotometrik olarak saptanan absorbans değişikliği örnekteki antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Stabil antioksidan standart solüsyonu (Trolox equivalent) ile kalibrasyon yapılır. Vitamin E analogu olan Trolox ile reaksiyon hızı ayarlanır ve birimi Trolox equivalent/L'dir (140).

2.5.3.2. TOS Ölçümü

Serum TOS düzeyleri Olympus AU2700 otoanalizöründe Rel Assay Total Oksidan Status Test Kiti (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti., Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (140).

Çalışma Prensipleri: Örnekte bulunan oksidan ajanlar ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla okside ederler. Reaksiyon okside edici moleküller tarafından sürdürülür. Ferik iyonu, asidik ortamda bulunan kromojen ile renkli bir kompleks yapar. Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örneklerde bulunan oksidan maddelerin miktarı ile doğru orantılıdır. Bu ölçüm yöntemi hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit equivalent ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L) olarak ölçülür.

2.5.4. Numunelerde Adropin Düzeylerinin Ölçümü

Sıçanlardan alınan kanlar aprotinin ihtiva eden düz biyokimya tüplerine alındı. 4000 rpm'de santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışılincaya kadar -80°C'de saklandı. Aprotinin ihtiva eden tüplerden elde edilen serumlarda da irisin derişimleri ölçüldü.

Sıçanların serum ve testis supernatantlarında adropin düzeyleri, Adropin Enzyme immunoassay (EIA) kiti (Phoenix Pharmaceuticals, katalog no: EK-032-35, Belmont, CA, USA, USA) kataloglarında belirtilen çalışma prosedürlerine uygun olarak çalışıldı.

Doku supernatantlarında adropin ölçümlerinin doğruluğunu göstermek için biyokimyasal assay geçerlik deneyleri (lineerite, recovery, specifity, sensitivity, intra ve inter assay deneyleri) daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (141). Doku supernatantlarında, adropin seviyesinin aynı duyarlılıkla ölçüldüğü tespit edildi. Plate

yıkamalarında otomatik yıkayıcı Bio-Tek ELX50 (BioTek Instruments, USA) cihazı, absorbans okumalarında Bio-Tek ELX800 cihazı sonuçları yazdırmada ise panosonik yazıcı kullanıldı. Test sonuçları ng/ml olarak belirtildi.

2.5.5. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan testis dokuları, bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra dereceli alkol serilerinde (%50, %60 ve %70) 12'şer saat yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 7). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı.

Tablo 7. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1,5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	%96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1,5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

2.6. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için

hidrojen peroksit blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanana dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilüe edilen primer antikor (anti-adropin antibody, ab122800, Abcam, Cambridge, UK) ile 60 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylkarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solüsyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <25, 0.4:26-50, 0.6:51-75, 0.9:76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak histoskor oluşturuldu. Histoskor= yaygınlık x şiddet

2.7. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksitaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika

Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer+%30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı. Pozitif kontrol dokusu olarak sıçan meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol için çalışma solüsyonu yerine Reaction Buffer uygulandı.

Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 8).

Tablo 8. TUNEL Boyama Prosedürü.

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.
6 1:500 d ilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme)	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika

2.8. İstatistiksel Analiz

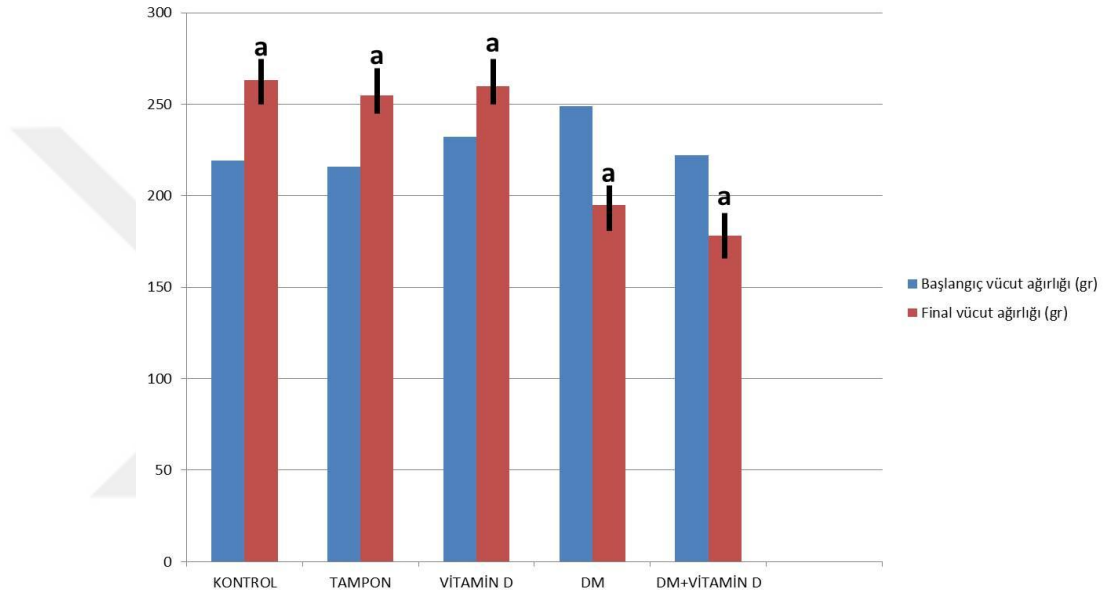
Elde edilen veriler ortalama \pm standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Deney hayvanlarının başlangıç ve final kan glukoz değerleri ile vücut ağırlıklarının değerlendirilmesinde Paired-Samples T Test kullanıldı. Bununla birlikte Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve Posthoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



3.BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Tüm gruplardaki sıçanların başlangıç ve final vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde; Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte, Diyabet ve Diyabet+Vitamin D gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p<0.05$) (Şekil 5).



Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

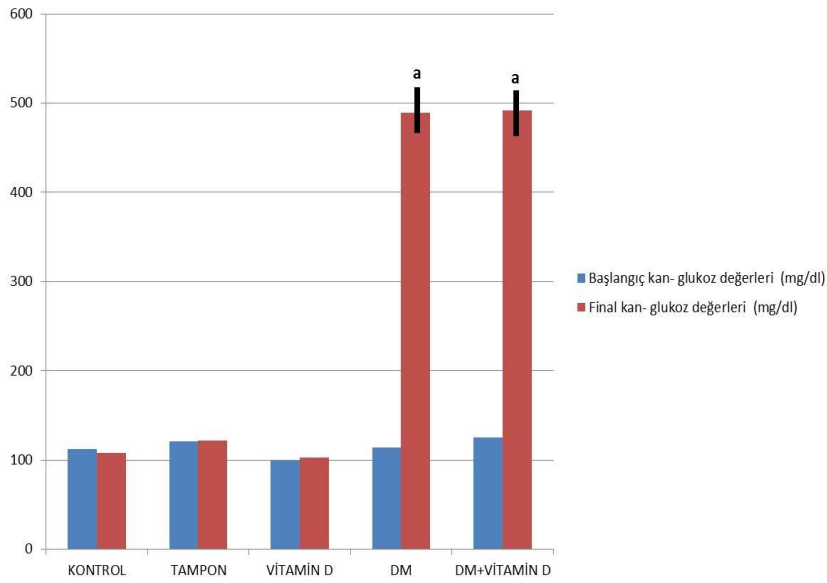
^a Başlangıç vücut ağırlıklarına göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

Şekil 5. Başlangıç ve final vücut ağırlıkları

3.1.1. Biyokimyasal Bulgular

3.1.1.1. Kan-glukoz miktarları

Tüm gruplardaki sıçanların başlangıç ve final kan glukoz miktarları değerlendirildiğinde; Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarındaki sıçanların kan-glukoz miktarlarında başlangıca göre bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte, Diyabet ve Diyabet+Vitamin D gruplarındaki sıçanların kan-glukoz miktarları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.05$) (Şekil 6).



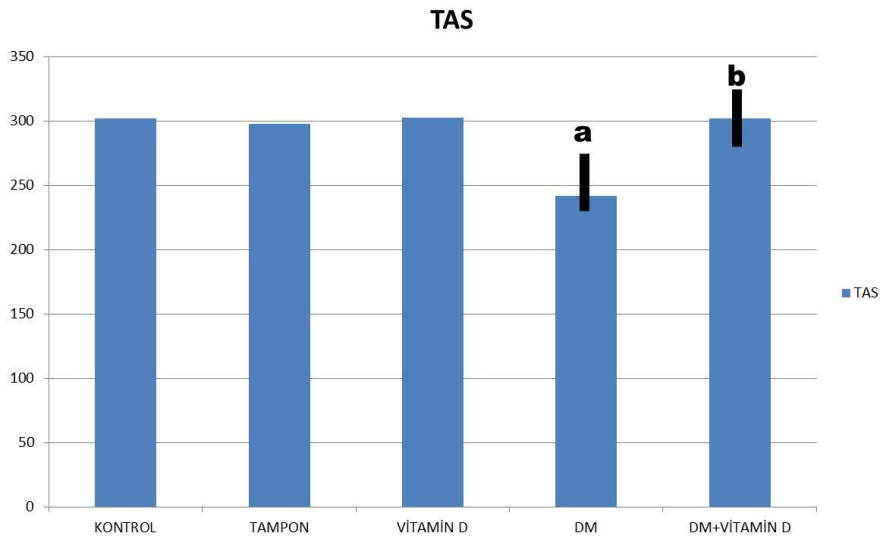
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^a Başlangıç vücut kan- glukoz değerlerine göre karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 6. Deney hayvanlarının başlangıç ve final kan- glukoz miktarları (mg/dl).

3.1.1.2. TAS ve TOS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TAS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış izlendi ($p < 0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 7).

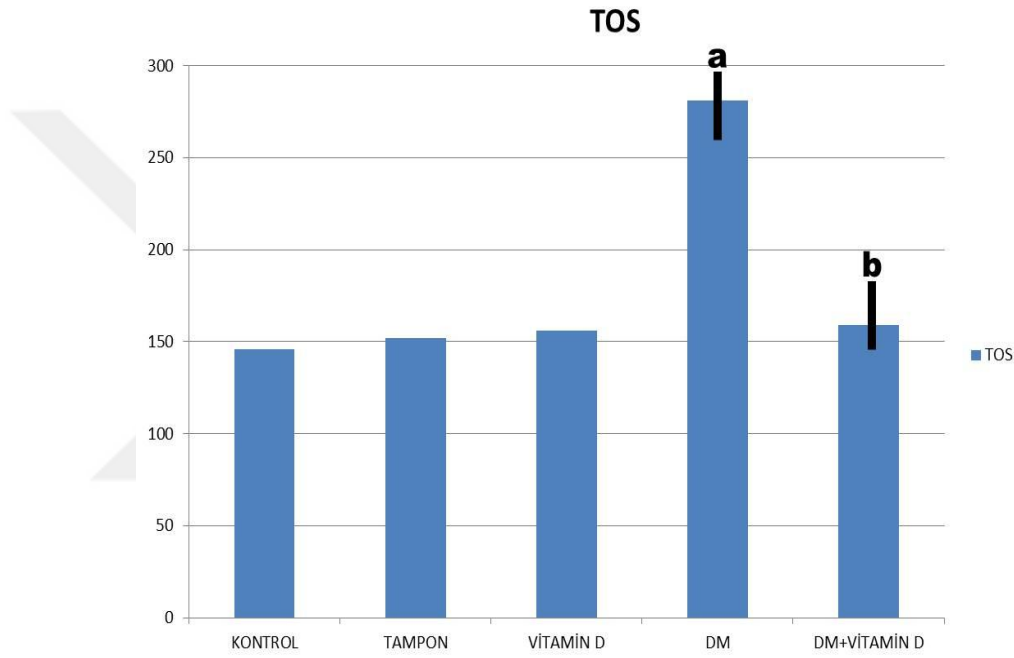


Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

Şekil 7. Serum TAS düzeyleri

Tüm gruplara ait serum TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TOS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 8).



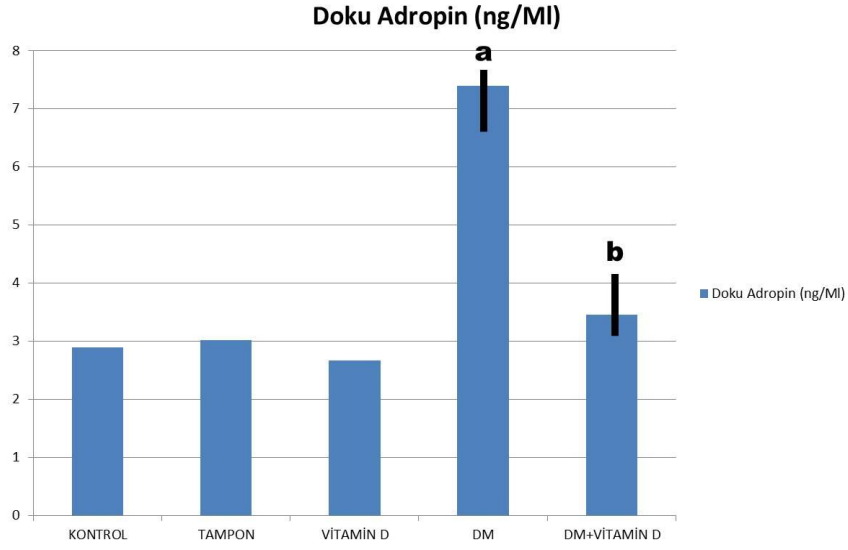
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

Şekil 8. Serum TOS düzeyleri

3.1.1.3. Doku ve Serum Adropin Düzeyleri

Tüm gruplara ait doku adropin düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada, doku adropin düzeyleri; Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda doku adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p<0.05$) (Şekil 9).

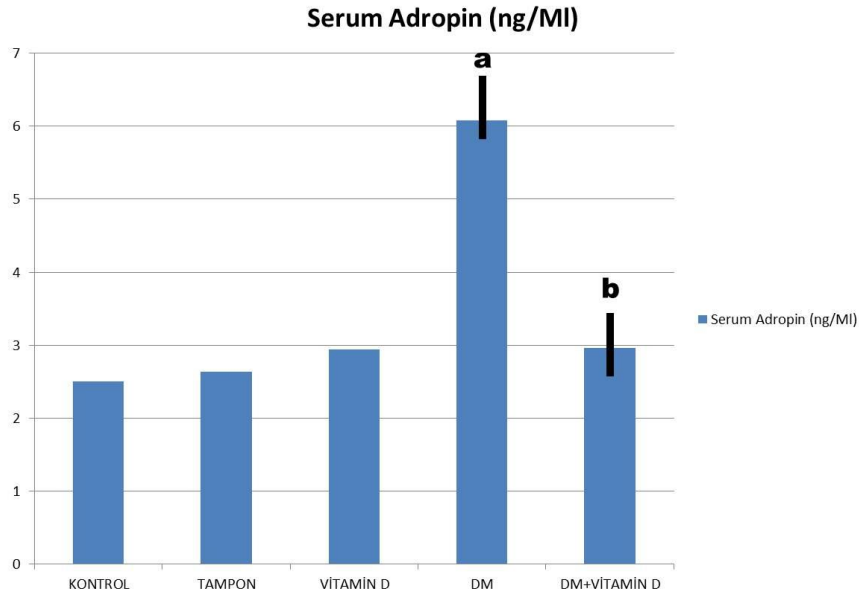


Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 9. Doku adropin düzeyleri

Tüm gruplara ait serum adropin düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada, serum adropin düzeyleri; Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda serum adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p < 0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p < 0.05$) (Şekil 10).



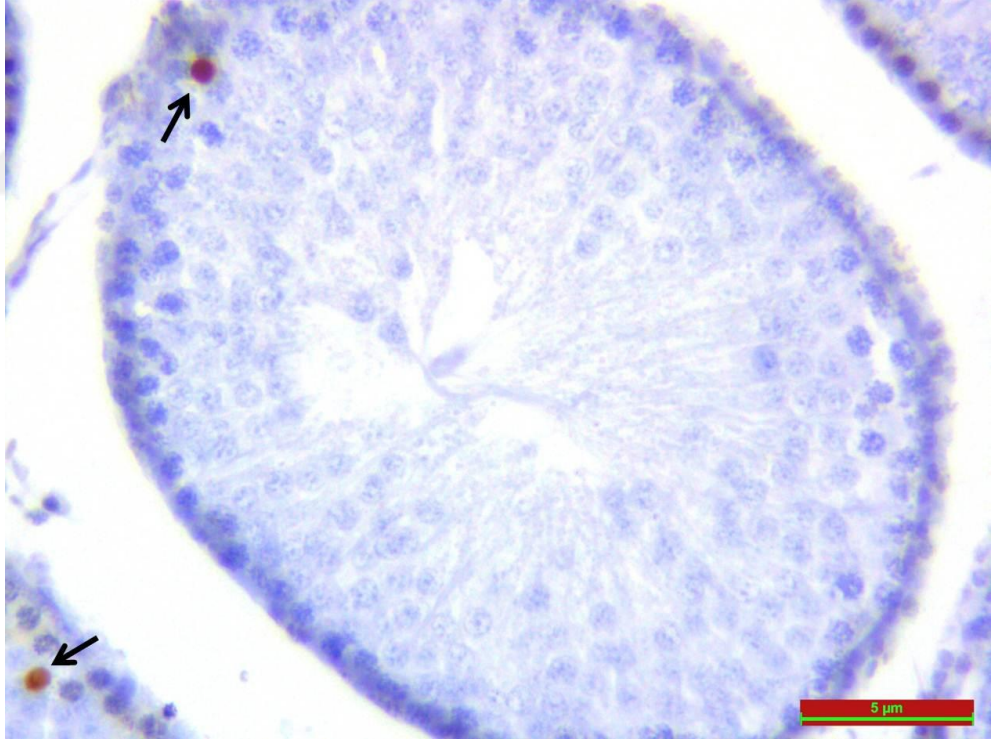
Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).
Şekil 10. Serum adropin düzeyleri

3.1.1.4. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatogenetik seri hücrelerinde (siyah ok) gözlemlendi.

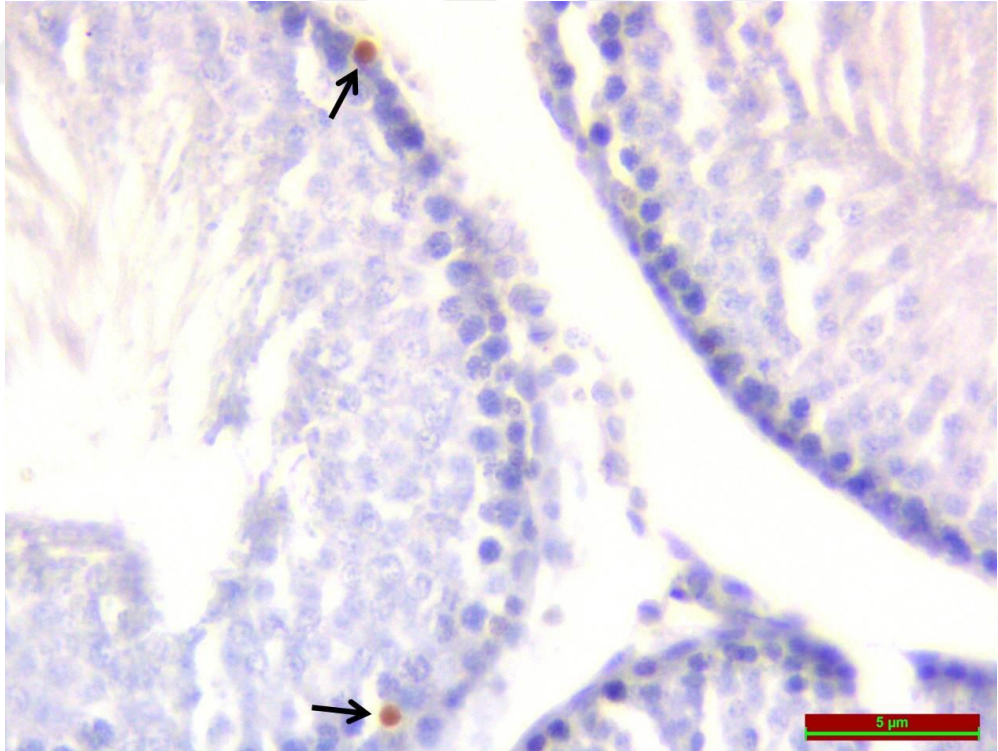
TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 11), Tampon (Şekil 12) ve Vitamin D (Şekil 13) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 14) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği Diyabet+Vitamin D (Şekil 15) grubunda belirgin olarak azalmıştı ($p<0.05$). Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ile apoptotik indeks oluşturuldu (Şekil 16).



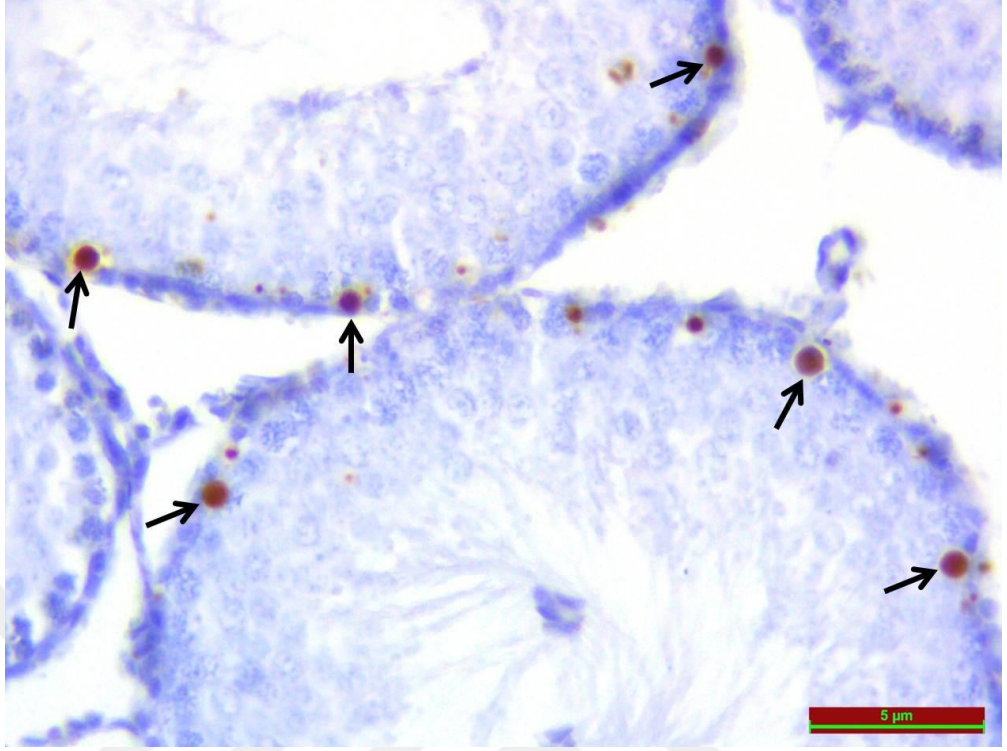
Şekil 11. Kontrol grubunda TUNEL pozitifliği (→).



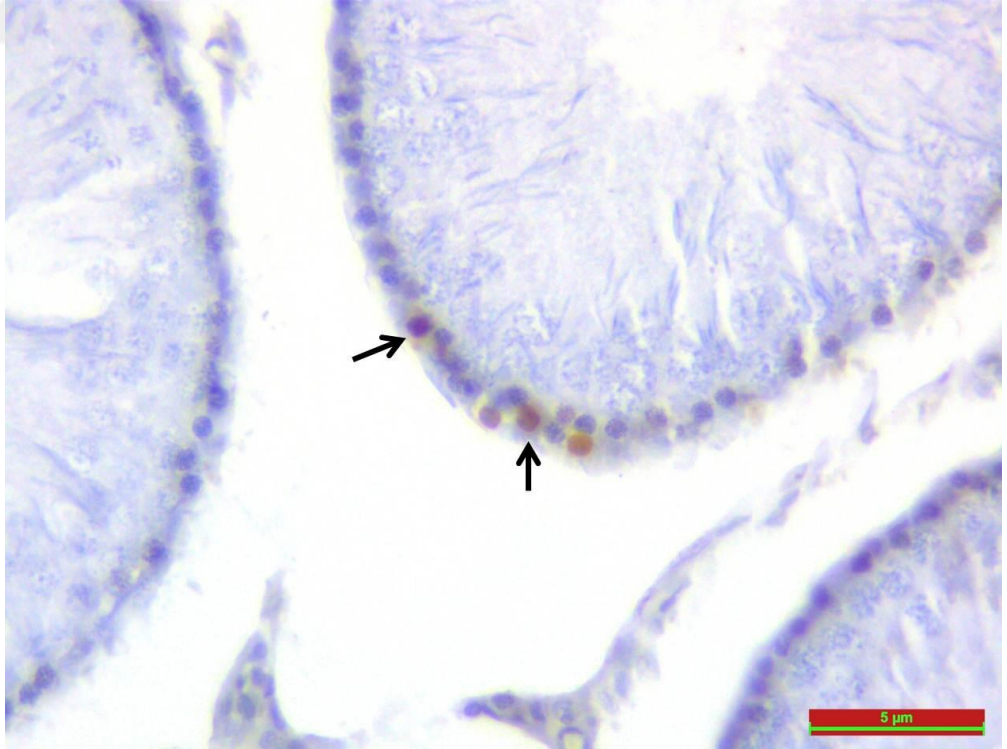
Şekil 12. Tampon grubunda TUNEL pozitifliği (→).



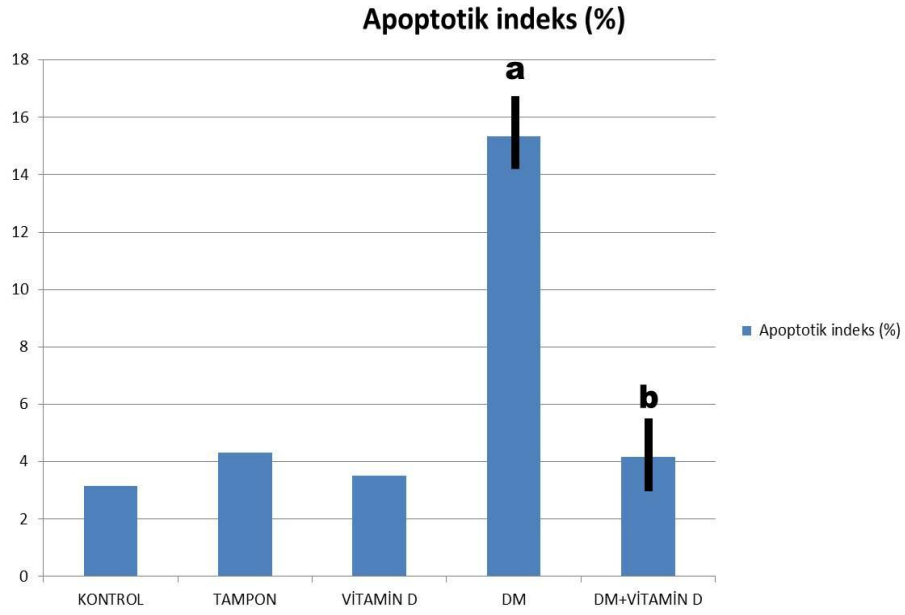
Şekil 13. Vitamin D grubunda TUNEL pozitifliği (→).



Şekil 14. DM grubunda TUNEL pozitifliği (→).



Şekil 15. Diyabet+Vitamin D grubunda TUNEL pozitifliği (→).



Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

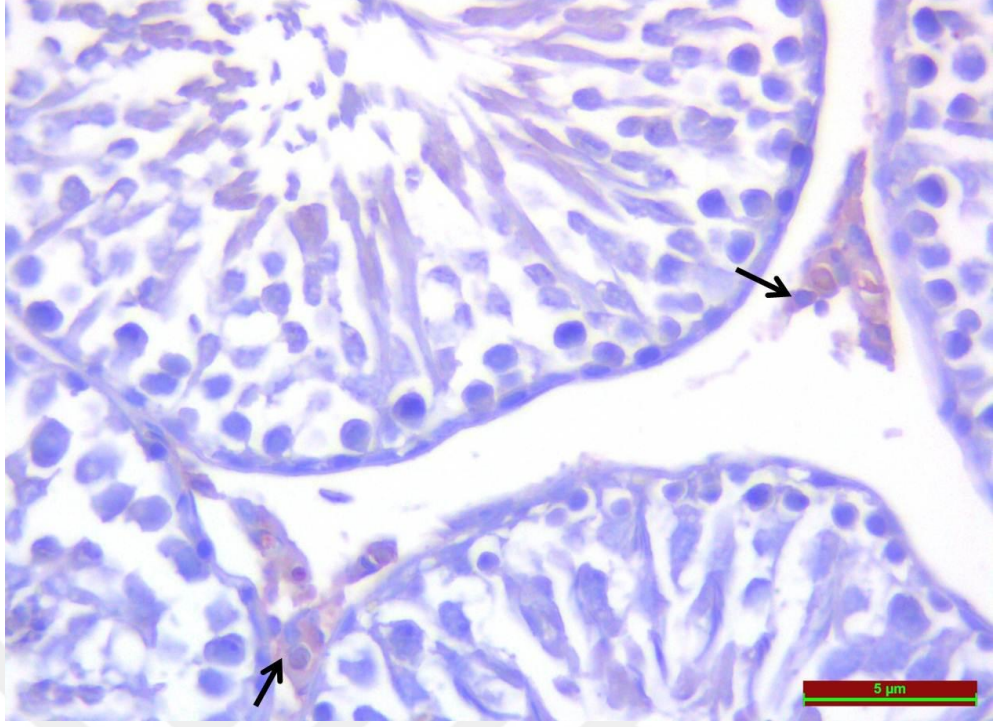
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 16. Apoptotik indeks

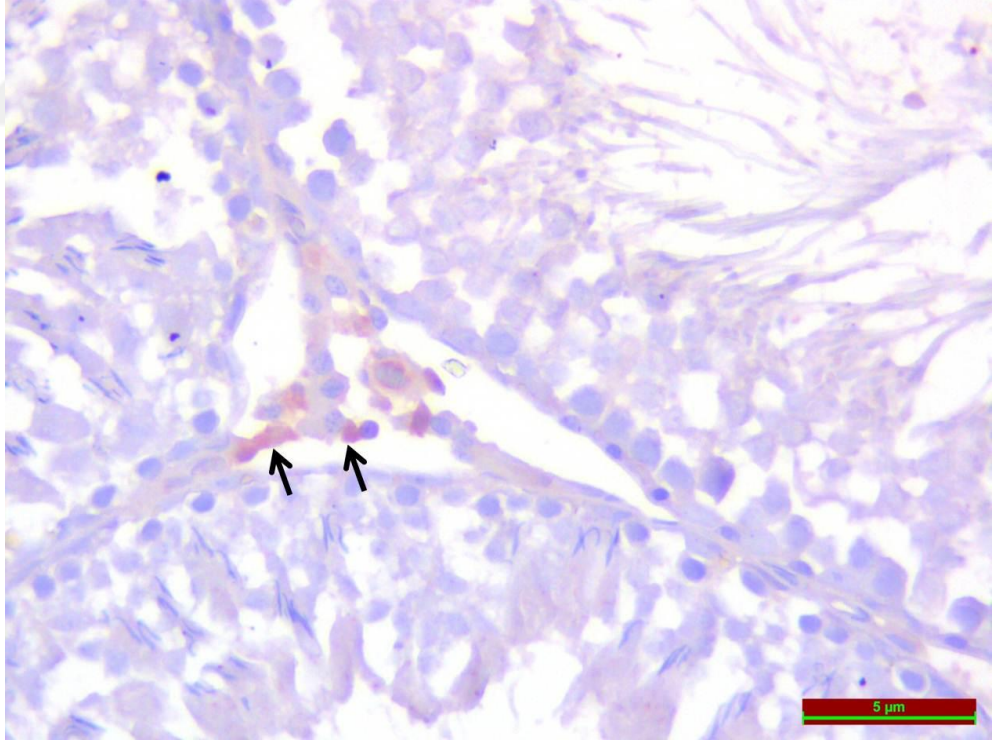
3.1.1.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Adropin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; adropin immünreaktivitesi testis dokusunda intertisyel Leydig hücrelerinde (siyah ok) gözlemlendi.

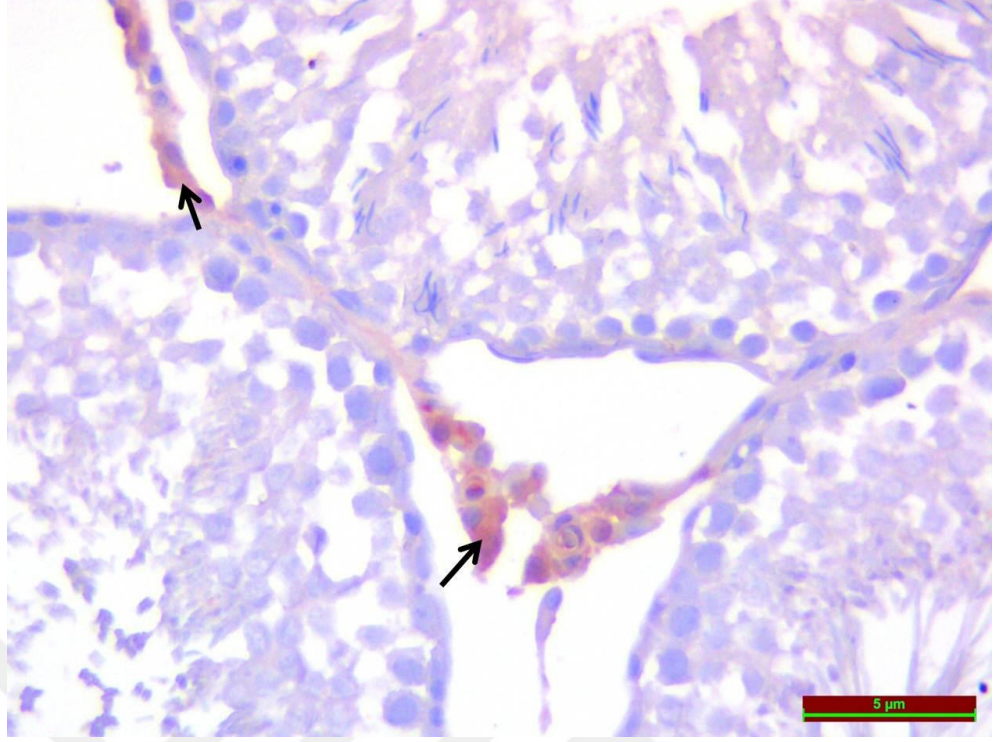
Testis dokusunda adropin immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 17), Tampon (Şekil 18) ve Vitamin D (Şekil 19) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 20) grubunda adropin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p < 0.05$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D (Şekil 21) grubunda adropin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 22).



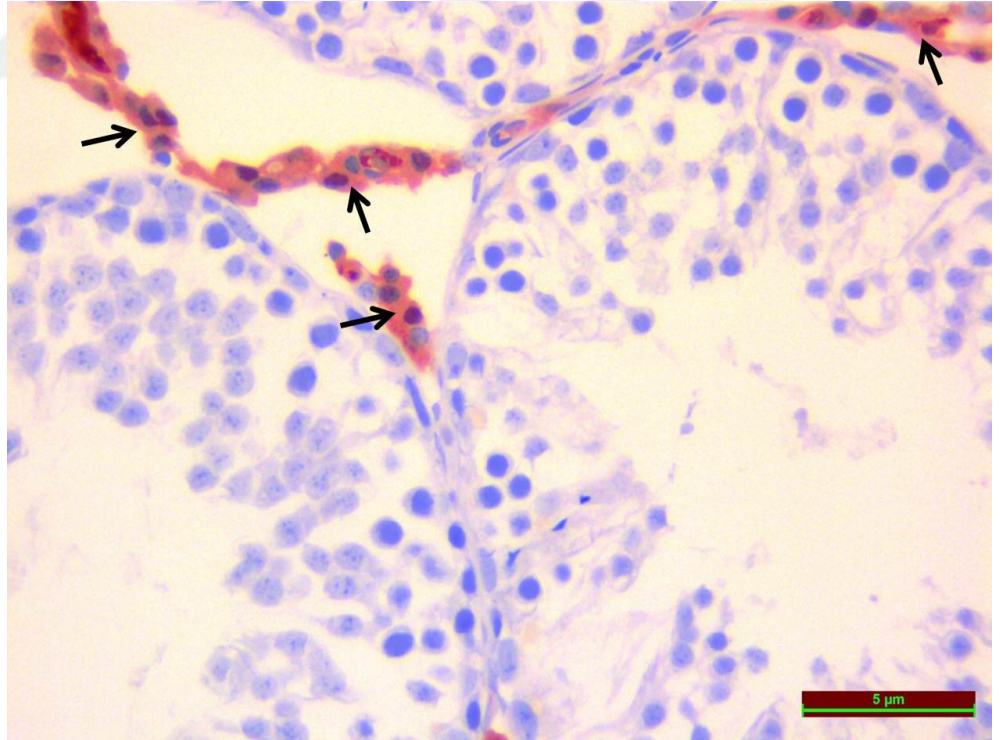
Şekil 17. Kontrol grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).



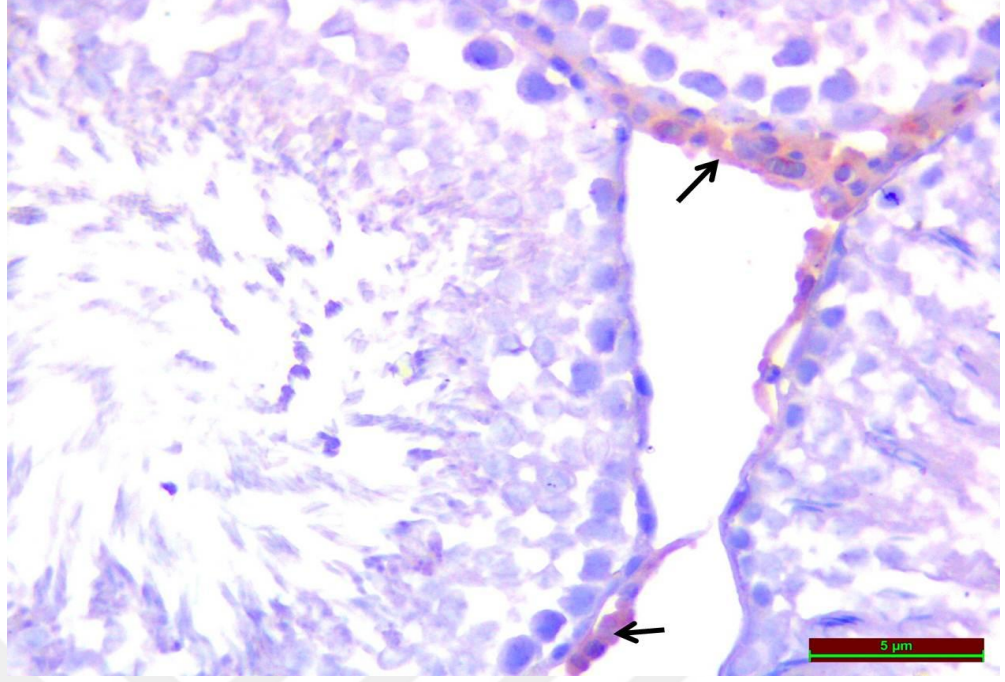
Şekil 18. Tampon grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).



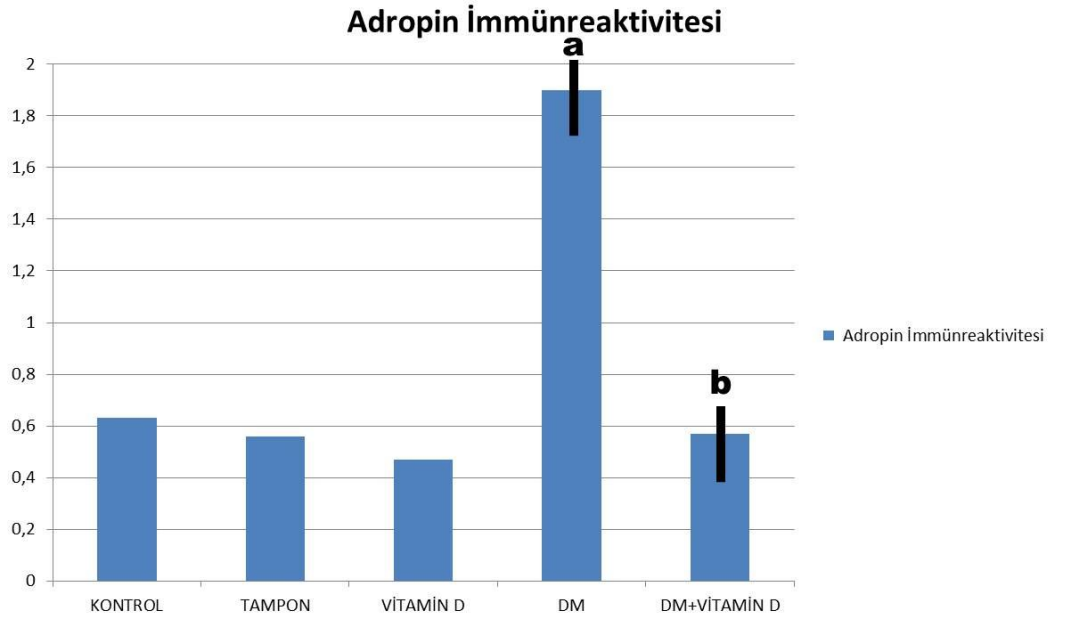
Şekil 19. Vitamin D grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).



Şekil 20. DM grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).



Şekil 21: Diyabet+Vitamin D grubunda Adropin immünreaktivitesi (→).



Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, ^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 22: Adropin immünreaktivitesi histoskoru

4.TARTIŞMA

DM insülin hormonunun sentezlenmesindeki bozukluklardan kaynaklı veya yeterli düzeyde olmamasına bağlı olarak gelişen ve kan şekeri seviyesindeki artışla (hiperglisemi) karakterize olan kronik bir hastalıktır. DM gelişiminde insülin eksikliği ve insüline karşı oluşan direnç de önemli rol oynamakta ve buna bağlı olarak protein, karbohidrat ve lipit metabolizmasında bir takım değişiklikler meydana gelebilmektedir (142).

DM' nin glikasyon reaksiyonundan sonra kimyasal reaksiyon zincirinin bir sonucu olan ileri glikasyon son ürünleri (AGEP)' nin neden olduğu uzun dönem komplikasyonların başında morbidite ve mortalite; kapiller bazal membran kalınlaşmasıyla oluşan mikrovasküler hastalıklar, hızlanmış arteriol sklerozu ile birlikte görülen makrovasküler hastalıklar, somatik ve otonom sinir sistemini içeren nöropati, kas zayıflığı ile birlikte görülen nöromüsküler disfonksiyon ve enfeksiyonlara karşı direncin azalması ile karakterize, göz, böbrek, kalp, sinir ve kan damarlarını etkileyen kronik birçok komplikasyona neden olmaktadır (143). Ayrıca DM' nin neden olduğu komplikasyonlara artmış ROS üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ile kaynaklanan ve sonuç olarak artmış oksidatif stresin neden olması ile ilişkilidir (21, 32). Ayrıca ilerleyen yaşla beraber ROS' un birçok doku ve organlara hasar vermesinden dolayı kanser gibi hastalık ortaya çıkmaktadır (144).

DeneySEL diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede artması ile oksidatif stresin diyabet etiyojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu kanıtlanmıştır (145). Diyabet ve reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu komplikasyonların ilişkisini açıklayan çalışmalarda; enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişiklikler sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, sorbitol yol aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucunda gerçekleşen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu artırdığı ileri sürülmektedir (22). Diyabetin penil ereksiyonu, ejakülasyonu ve spermatogenezi olumsuz yönde etkilediği yapılan çalışmalarda vurgulanmış olup deney hayvanlarında oluşturulan diyabet modellerinde ve insanlarda yapılan çalışmalarda DM' nin, üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde

etkileyerek, düşük testosteron düzeyleri, testiküler disfonksiyon ve yetersiz spermatogeneze sebep olduğu bildirilmiştir (146, 147).

Sperm plazma membranında bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri bulunduğu ve sitoplazmasında düşük miktarda temizleyici enzimler yer almasından dolayı ROS tarafından oluşturulan hasara karşı daha yatkındır (67, 148).

Serbest radikallerin artması ile sperm membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanmasıyla lipid peroksidasyonu başlatılabilir ve sperm lipid peroksidasyonu plazma membranlarındaki lipid matriks yapısında hasara yol açarak intraselüler ATP' nin hızlı kaybı ile aksonemal hasar, sperm canlılığında azalma ve bazı olgularda spermatogenezin tam gelişiminin engellenmesine neden olduğu bildirilmiştir (149).

Köksal ve ark.'nın infertil hastalarda yaptıkları çalışmada, testiküler dokuda meydana gelen patolojik değişikliklerin yüksek seviyedeki lipid peroksidasyonundan kaynaklı olduğu ve infertiliteye neden olan testiküler dejenerasyonun oluşumunda da aşırı ROS üretiminin rol oynayabileceği gösterilmiştir (150).

Liu ve arkadaşları STZ ile diyabet oluşturdukları sıçan modellerinde androjen reseptörlerinin testiste, epididimide ve prostat bezinde azaldığını göstermişlerdir (55). Düşük testosteron seviyesi ve bozulmuş spermatogenez, diyabetik hayvan modelleri testislerindeki karakteristik özelliklerdir.

Sexton ve arkadaşları diyabetik hayvan modellerinde, Luteinizan Hormon (LH) ve testosteron seviyelerinde bir azalma olduğunu göstermişlerdir (66). Seethalakshmi ve arkadaşları ise düşük testosteron düzeyinin yetersiz insülin miktarına ya da yokluğuna bağlı olduğunu, uygun insülin tedavisi ile reproduktif organ ağırlıklarında ve vücut ağırlığında anlamlı bir artış olduğunu göstermişlerdir (52).

Yeni keşfedilmiş, sekretuar bir polipeptit yapısında olan adropinin karaciğer, beyin pankreas, kalp, böbrek ve serebellum gibi birçok dokulardan üretildiği (74, 75, 151) ve vücutta enerji metabolizmasında rolü olduğu enerji dengesi ile ilgili gen (ENHO) kodu üzerinden kodlanarak, glukoz ve lipid metabolizması ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca adropin eksikliğinin, artmış yağ dokusu ve insülin direnci ile ilişkili olduğu da gösterilmiştir (73, 151).

Böbrekler diyabetten en çok etkilenen organlardır (152,153). Adropinin sıçan veya insan böbreklerinden sentezlenip sentezlenmediğine dair çok az rapor bulunmaktadır (73). Kuloğlu ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, sağlıklı sıçan böbreklerinin dış korteks ve medullar bölgelerinden adropinin sentezlendiğini ve bu sentezin diyabet ile arttığını göstermişlerdir. Ayrıca diğer peptitlerin de böbreklerden sentezlendiğini ve bunların diyabet ile birlikte artan veya azalan nitelikte olduğunu da göstermişlerdir (153).

Adropinin glukoz homeostazını koruyarak insülin direncini azalttığı düşünülmektedir. Ayrıca endotel hasarını onarmaya karşı eNOS (endotelial nitrik oksit)' u aktive edip NO (nitrik oksit) salınımını artırarak rol oynamaktadır (73). Bu nedenle diyabetin oluşturduğu etkiyi hafifletmeye yardımcı olarak adropin düzeyinin arttığına inanılıyor. Böbrek dokusunda artmış adropin glukoz homeostazının sürdürülmesine ve insülin direncinin azaltılmasına katkıda bulunarak eNOS salınımını artırıp kan damarı endotelini koruduğu gösterilmiştir (73, 151, 154).

Kumar ve ark.'nın yapmış oldukları hayvan deneyi çalışmasında, diyet ile obez oluşturulan sıçanlarda, adropin hormon seviyesinin düştüğü gösterilmiştir (73). Butler ve ark. yapmış oldukları klinik çalışmada, obez olan hastalarda adropin düzeyinin düşük olduğu ve adropin ile vücut kitle indeksi arasında negatif korelasyon olduğu saptanmıştır (78).

Albayrak ve arkadaşlarının yaptıkları klinik çalışmada ise obez olan DM' li hastalarda adropin seviyesinin düşük olduğu saptanmış fakat obez olmayan DM' li hastalara göre istatistiksel anlamlı fark olmadığı görülmüştür. Yine aynı çalışmada adropin düzeyinin cinsiyete göre de bir fark olmadığı belirtilmiştir (155).

Bu çalışmaların aksine, Lian ve arkadaşlarının yaptıkları klinik çalışmasında ise, kalp yetmezliği olan hastaların serum adropin seviyesine bakmışlar ve adropin ile vücut kitle indeksi arasında pozitif korelasyon saptamışlardır (156).

Yukarıda belirtilen çalışmalarda görüldüğü gibi vücut kitle indeksi (VKİ) ile adropin arasındaki korelasyon ilişkisi tam olarak açığa çıkarılamamıştır ve bu konu ile ilgili daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Biz de bu çalışma ile deneysel diyabetik sıçan testis dokusunda adropin reapoitozis üzerine vitamin D'nin etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda tüm gruplara ait doku adropin düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada, Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında doku adropin düzeyleri benzerlik görülürken, Kontrol grubu ile Diyabet grubu kıyaslandığında doku adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. Diyabet grubu ile Diyabet+Vitamin D grubu kıyaslandığında ise adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi. Burada diyabetin oluşturduğu etki ile dokularda ki adropin seviyesinin arttığı belirlendi.

Çelik ve ark.'nın yapmış oldukları başka bir klinik çalışmada ise gestasyonel DM tanısı olan 20 hasta grubu ile sağlıklı kontrol kadın grubunun serum adropin düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, gestasyonel DM'si olan hasta grubunda kan serum adropin düzeyi, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşük olduğu ve gestasyonel DM olan grupta, maternal yüksek açlık glukoz seviyesinin düşük adropin seviyesi ile birlikte olduğu görülmüştür. Yapılan bu çalışmadan çıkan başka bir sonuç ise düşük adropin seviyesinin insülin direnci ile arasındaki pozitif ilişkiyi negatif yönde destekler niteliktedir (77).

Yapılan bu klinik çalışmaların aksine, Aydın ve ark.'nın STZ ile oluşturulan diyabetik sıçan modelinde serum adropin seviyesini, diyabetik olmayan sıçanlara göre daha yüksek bulmuşlardır ve bu sonucun olasılıkla klinik çalışmalardan farkının STZ' nin sıçanlarda oluşturduğu stresten kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Diğer bir olasılıkta araştırmacıların ileri sunduğu gibi bir başka gelişen mekanizmadan kaynaklı yükselmiş olabileceğini düşündürmektedir (75).

Tüm gruplara ait serum adropin düzeylerinin değerlendirilmesi için yaptığımız biyokimyasal çalışmada, serum adropin düzeyleri; Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerlik gösterirken Kontrol grubu ile Diyabet grubu kıyaslandığında serum adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. Diyabet grubu ile Diyabet+Vitamin D grubu kıyaslandığında ise adropin düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yaptığımız TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği testis dokusunda spermatogenetik seri hücrelerinde; TUNEL pozitifliği Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerlik görülürken, Kontrol grubu ile Diyabet grubu kıyaslandığında TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. Diyabet

grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği Diyabet+Vitamin D grubunda belirgin olarak azalmıştı.

Çalışmamızda ayrıca adropin immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucunda adropin immünreaktivitesi testis dokusunda Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla Diyabet grubu kıyaslandığında adropin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda adropin immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu.

Vitamin D aktif bir metabolittir ve değişik biyolojik olaylarda önemli rol oynadığı rapor edilmiştir (157, 158). Ayrıca vitamin D'nin geçtiğimiz on yılda antioksidatif özellikte etkiye sahip olduğu da gösterilmiştir (159). Garcion ve ark. D vitamininin iNOS (immün nitrik oksit) aktivitesini azaltarak primer sıçan astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azalttığını göstermişlerdir (160).

Pittas ve ark. hafif ve orta seviyedeki D vitamini yetersizliğinin diyabetin gelişiminde risk faktörü olduğunu bildirmişlerdir (137). Dalgard ve ark. yaptıkları bir çalışmada, yetersiz 25(OH)D3 düzeyinin tip 2 diyabet riskini iki kat arttırdığını belirtmişlerdir (161).

Hamden ve arkadaşlarının yaptıkları diyabetik sıçan modelleri çalışmasında vitamin D'nin testosteron ve 17 beta-östradiol düzeylerini arttırdığını ayrıca oksidatif stres, hücrel hasar, sperm motilitesi ve sayısı üzerine de koruyucu etkilerini göstermişlerdir (162).

Başka bir çalışmada Bo-Ying-Bao ve ark. ROS ile ilgili araştırmalarında benin prostat hiperplazisinde D vitaminin antioksidan özelliğini ve bu özelliği ile vitamin D'nin prostat kanseri insidansını azalttığını belirlemişlerdir (163).

Yapılan çalışmalarda antioksidan özellikteki maddelerin deneysel diyabet modellerinde testislerde oksidatif stres kaynaklı hasara karşı koruyucu nitelikte oldukları gösterilmiştir. Erkek infertilitesine karşı sperm motilitesi ve DNA da meydana gelen hasarın iyileşmesinde antioksidan tedavilerin olumlu yönde etki ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (164,165).

Bizim çalışmamızda tüm gruplara ait serum TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada TAS düzeyleri Kontrol,

Tampon ve Vitamin D grupları arasında benzerdi. Kontrol grubuyla Diyabet grubu kıyaslandığında TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken, Diyabet grubu ile Diyabet + Vitamin D grubu kıyaslandığında ise TAS düzeyleri anlamlı bir şekilde artmış olarak gözlemlendi.

Tüm gruplara ait serum TOS düzeylerinin değerlendirilmesinde ise TOS düzeyleri Kontrol, Tampon ve Vitamin D gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi. Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Vitamin D grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak gözlemlendi.

Bu çalışmada STZ verilerek diyabet modeli oluşturulan sıçanlarda testis dokusunda hücresel hasar olduğu ve DM' nin oksidatif hasar ile apoptozise neden olduğu gözlemlenmiştir. Çalışmamızda tedavi amaçlı uyguladığımız D vitamininin, DM' nin testislerde oluşturduğu oksidatif stres kaynaklı hasar ile apoptozise karşı koruyucu etkisi olduğunu belirledik.

Sonuç olarak diyabet, metabolizmayı etkileyerek birçok hastalıklara neden olan ve etiyojisi tam olarak ortaya konulmayan kronik bir durumdur. Günümüzde erkek infertilitesi ciddi bir problem teşkil etmekte ve bu soruna neden olan birçok faktör arasında DM de yer almaktadır. Çalışmamızda DM' nin testis dokusunda oluşturduğu muhtemel doku hasarında adropin seviyesine ve vitamin D' nin oluşan bu doku hasarına karşı antioksidatif özelliği ile koruyucu etkisini araştırdık. Yaptığımız bu çalışmada DM ile adropin düzeyi arasında pozitif korelasyon olduğunu tespit ettik. Ayrıca oluşan doku hasarına karşı D vitamininin tedavi edici özellikte olduğunu belirledik. İleride daha ayrıntılı çalışmalarla, DM 'nin komplikasyonları ve adropin arasındaki mekanizma ile D vitamininin patofizyolojik durumlarda tedavi yaklaşımlarının arasına alınabileceğini düşündürmektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001: 237-243.
2. Foster DW. Diabetes Mellitus. In Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, et al. (eds), Harrison's Principle of Internal Medicine. 14. edition. New York, Mc Graw Hill Companies 1998: 2: 2060-2080.
3. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik. Birinci Baskı. Ankara, Medical Network & Nobel 1996: 368-385.
4. Davey RX. Gestational diabetes mellitus: a review from 2004. Curr Diabetes Rev. 1,2005: 2: 203-213.
5. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston 2005: 331-338.
6. Danaei G, Finucane MM, Lu Y, Singh GM, Cowan MJ, Paciorek CJ, Lin JK, Farzadfar F, Khang YH, Stevens GA, Rao M, Ali MK, L. Riley M, Robinson CA, Ezzati M. National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. Lancet 2011; 378,9785:31–40.
7. Kudiyirickal MG, Pappachan JM. Diabetes mellitus and oral health. Endocrine 2015;49,(1):27–34.
8. Aguiree F, Brown A, Cho NH, Dahlquist G, Dodd S, Dunning T, Hirst M, Hwang C, Magliano D, Patterson C, Scott C, Shaw J, Soltesz G, Usher-Smith J, Whiting D. IDF Diabetes Atlas:sixth edition. 2013.
9. Preshaw PM, Foster N, Taylor JJ. Cross-susceptibility between periodontal disease and type 2 diabetes mellitus: an immunobiological perspective. Periodontol 2000. 2007; 45:138–157.

10. Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargin M, Dinççag N, Karsidag K, Kalaça S, Ozcan C, King H. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care*. 2002; 25(9): 1551–1556.
11. International Expert Committee. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334.
12. American Diabetes Association. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes Care* 2014; 37(1): 81–90.
13. Altuntaş Y. Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflaması. Yenigün M (editör). Her yönüyle diabetes mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 51-62.
14. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
15. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 2004; 9: 145-152.
16. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 3-95.
17. Ames Bn, Shigenaga, Mk, Hagen, Tm. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 17: 7915-7922.
18. Gedik O. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları. Erdoğan G (editör). Koloğlu Endokrinoloji Temel Ve Klinik. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel yayıncılık, 2005: 367- 383.
19. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, ve ark. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: Current status and future prospect. *Int J Pharm Sci Res* 2010; 3(1): 91-100.
20. Zhang Y, CHEN Z, Girwin M, Wong T. Remifentanil mimics cardioprotective effects of ischemic preconditioning via protein kinase c activation in open chest of rats. *Acta Pharmacol* 2005; 200:446-500.
21. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. *J Diabetes Complications* 2001; 77: 1-18.

22. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
23. Kaneko J , J Harvey, J Bruss, *Clinical biochemistry of domestic animals: 2th Ed.* Philadelphia: Academic Pr. 1997.
24. Kleczkowski, M. Role of the antioxidants in the protection against oxidative stress in cattle-nonenzymatic mechanisms. *Polish J Vet Sci* 2003; 6: 301.
25. Altan N., Dinçel A., Koca C., *Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31 : 51-56.
26. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
27. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of Oxidative Stress in Pancreatic-Cell Dysfunction, *Ann NY Acad Sci* 2004; 65: 168–176.
28. Robertson Rp, Harmon J, Tran Po, Poitout V β -cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative street inn type 2 diabetes. *Diabetes* 2009; 40: 119-124.
29. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8.
30. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 217-223.
31. Rousselot DB, Bastard JP, Jaudon MC. Consequences of the diabetic status on the oxidant /antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism* 2000; 26: 163-176.
32. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stres and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. *Neurosci Res Commun* 1997; 21: 41-48.
33. Stern DM, Yan SD, Yan SF. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and complications of diabetes. *Age Res Rev* 2002; 1: 1-15.
34. Daş EN, King GL. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res* 2007;55: 498-510.

35. Garcia SF, Virag L, Jagtap P et al. Diabetic endothelial dysfunction: the role of poly (ADP-ribose) polymerase activation. *Nature Med* 2001;7: 108-113.
36. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* Vol 2001;414:813-820.
37. Lee AY, Chung SSM. Contributions of polyol pathway to oxidative stress in diabetic cataract. *FASEB J* 1999;13: 23-30.
38. Kuroki T, Isshiki K, King GL. Oxidative stress: The lead or supporting actor in the pathogenesis of diabetic complications. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 216-220.
39. Mansour MA. Aldose reductase in retina. *Current Enzyme Inhibition*. 2007; 3(1): 1-12.
40. Alexiou P, Pegklidou K., Chatzopoulou M. Aldose reductase enzyme and its implication to major health problems of the 21st century. *Current Med Chem* 2009;16: 734- 752.
41. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
42. Rousselot DB, Bastard JP, Jaudon MC. Consequences of the diabetic status on the oxidant /antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism* 2000; 26: 163-176.
43. Yeh LA, Ashton MA. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reversed by oral sorbinil. *Metabolism* 1990; 39: 619-622.
44. De Matia G, Laurenti O, Bravi C. Effect of aldose reductase inhibition on glutathione redox status in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 965-968.
45. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. *Diabetic complications* 2001; 77: 1-18.
46. Zatechka DS JR, Kador PF, Garcia-Castineiras S, Lou MF. Diabetes can alter the signal transduction pathways in the lens of rats. *Diabetes* 2003;52(4):1014-1022.
47. Ramana KV, Chandra D, Srivastava S et al. Aldose reductase mediates mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 277: 32063-32070.

48. Calcutt NA, Freshwater JD, Mizisin AP. Prevention of sensory disorders in diabetic Sprague-Dawley rats by aldose reductase inhibition or treatment with ciliary neurotrophic factor. *Diabetologia* 2004; 47: 718 –724.
49. Hallam K, Gomez T, Li Q. Polyol pathway inhibition improves age-related vascular dysfunction in rats. *Exp Biol* 2006; C276:738.18.
50. Ficher M, Zuckerman M, Fishkin RE, Goldman A, Neeb M, Fink PJ, et al. Do endocrines play an etiological role in diabetic and nondiabetic sexual dysfunctions? *J Androl* 1984; 5: 8-16.
51. Mallidis C, Green BD, Rogers D, Agbaje IM, Hollis J, Migaud M, et al. Metabolic profile changes in the testes of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus. *Int J Androl* 2009;32: 156-165.
52. Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 1987; 138: 190-194.
53. Steger RW. Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35: 577-582.
54. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl* 2006; 29: 482-488.
55. Liu SH, Wang ZS. Study on the expression of androgen receptor in testis, epididymis and prostate of adult rats with diabetes. *Natl J Androl* 2005; 11: 891-894.
56. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH-linked mechanisms. *J Androl* 2004; 25: 706-719.
57. Jain GC, Jangir RN. Modulation of diabetes-mellitus-induced male reproductive dysfunctions in experimental animal models with medicinal plants. *Pharmacogn Rev* 2014; 8(16): 113-121.

58. Alves MG, Martins AD, Rato L et al. Molecular mechanisms beyond glucose transport in diabetes-related male infertility. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(5): 626-635.
59. Hu C, Su Q, Li F et al. Duodenal-jejunal bypass improves glucose homeostasis in association with decreased proinflammatory response and activation of JNK in the liver and adipose tissue in a T2DM ratmodel. *Obes Surg* 2014; 24(9): 1453-1462.
60. Kaneto H, Nakatani Y, Kawamori D, Miyatsuka T, Matsuoka TA. Involvement of oxidative stress and the JNK pathway in glucose toxicity. *Diabet Study* 2004;1(4): 165-174.
61. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW et al. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98(24): 13681-13686.
62. Berdichevsky A, Guarente L, Bose A. Acute oxidative stress can reverse insulin resistance by inactivation of cytoplasmic JNK. *J Biol Chem* 2010; 285(28): 21581-21589.
63. Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J et al. Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucosetoxicity. *Diabetes* 1999; 48(12): 2398-2406.
64. Roessner C, Paasch U, Kratzsch J, Glander HJ, Grunewald S. Sperm apoptosis signalling in diabetic men. *Reprod Biomed* 2012; 25(3): 292-299.
65. Jedlinska-Krakowska M, Bomba G, Jakubowski K, Rotkiewicz T, Jana B, Penkowski AJ. Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins E and C on testes morphology in rats. *Reprod Dev* 2006;52(2): 203-209.
66. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997; 49(4): 508-513.
67. Aitken RJ, Baker MA. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 250(1-2): 66-69.
68. Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl* 1997; 20: 243-253.

69. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000; 28: 342-347.
70. Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 2673-2677.
71. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985; 213: 53-62.
72. Anderson JE, Thliveris JA. Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat* 1987; 180: 41-48.
73. Kumar GK, Trevaskis JL, Lam DD et al. Identification of adropin as a secreted factor linking dietary macronutrient intake with energy homeostasis and lipid metabolism. *Cell Metab* 2008; 8: 468–481.
74. Aydın S. Three new players in energy regulation: Preptin, adropin and irisin. *Peptides* 2014; 56: 94–110.
75. Aydın S, Kuloglu T, Aydın S, Eren MN, Yilmaz M, Kalayci M, et al. Expression of adropin in rat brain, cerebellum, kidneys, heart, liver, and pancreas in streptozotocin-induced diabetes. *Mol Cell Biochem* 2013; 380: 73-81.
76. Kuloglu T, Aydın S. Immunohistochemical expressions of adropin and inducible nitric oxide synthase in renal tissues of rats with streptozotocin-induced experimental diabetes. *Biotech Histochem* 2014; 89: 104-110.
77. Celik E, Yilmaz E, Celik O, Ulas M, Turkcuoglu I, Karaer A, et al. Maternal and fetal adropin levels in gestational diabetes mellitus. *J Perinat Med.* 2013; 41: 375–380.
78. Butler AA, Tam CS, Stanhope KL et al. Low circulating adropin concentrations with obesity and aging correlate with risk factors for metabolic disease and increase after gastric bypass surgery in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: 3783–3791.

79. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-992.
80. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-223.
81. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
82. Hızel N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; 6: 196-197.
83. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-107.
84. Galle PR. Apoptosis in liver disease. *J Hepatol* 1997; 27: 405-412.
85. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology* 1999; 17: 329-338.
86. Öktem S, Özhan M H, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2001; 2 (1): 91-95.
87. Zhang J, Xu M. Apoptotic DNA fragmentation and tissue homeostasis. *Trends in Cell Biology*, 2002; 12 (2): 84-89.
88. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R. A new method to detect apoptosis in paraffin sections; in situ end-labeling of fragmented DNA. *J Histochem and Cytochem* 1993; 41 (1): 7-12.
89. Dayan YB, Kaveri SV, Kazatchkine MD, Shoenfeld Y. Is cancer an autoimmune process dependent on anti-apoptotic autoantibodies? *Medical Hypotheses* 2000; 55 (2): 103-108.
90. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
91. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-faslı bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi* 2003; 4: 165-174.
92. Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve

- DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish J Biochem* 2004; 29 (3): 237-242.
- 93.** Bender LM, Morgan MJ, Thomas LR, Liu ZG, Thorburn A. The adaptor protein TRADD activates distinct mechanisms of apoptosis from the nucleus and the cytoplasm. *Cell Death Differ* 2005; 12: 473–481.
- 94.** Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. *Apoptosis* 2001; 6: 103–116.
- 95.** Staley K, Blaschke AJ, Chun J. Apoptotic DNA fragmentation is detected by a semiquantitative ligation-mediated PCR of blunt DNA ends. *Cell Death Differ* 1997; 4: 66 -75.
- 96.** Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
- 97.** Kaneda K, Kashii S, Kurosawa T et al. Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient ischemia of the rat retina. *Brain Research* 1999; 815: 11-20.
- 98.** Kayıhan E. Akciğer Kanseri tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar. Bursa, Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. 2001; 7: 135-146.
- 99.** Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
- 100.** Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME. Apoptosis Signaling By Death Receptors. *Europ J Biochem* 1998; 254: 439-459.
- 101.** Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sınıgaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacrose R, DI Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacrose S, Simone S, Bucci R, Farber E. Cell death: Apoptosis Versus Necrosis. *Inter J Oncol* 2000; 21(1): 165-70.
- 102.** Elmore S. Apoptosis: A Review Of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
- 103.** Zeiss CJ. The apoptosis-Necrosis Continuum: Insights From Genetically Altered Mice. *Vet Pathol* 2003; 40: 481–495.
- 104.** Cohen GM. Caspases: The Executioners Of Apoptosis. *Biochem J* 1997; 15; 326: 1-16.

- 105.** Saraival L, Silva RD, Pereira G, Gonçaves J, Real M. Specific Modulation Of Apoptosis And Bcl-Xl Phosphorylation In Yeast By Distinct Mammalian Protein Kinase C Isoforms. *J Cell Sci* 2006; 119: 3171-3181.
- 106.** Antar V. Bir Genel Kaspaz İnhibitörü Olan Qvd-Oph' nin Nöroprotektif Etkilerinin Deneysel Spinal Kord Travması Modelinde İncelenmesi. Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği, Tıpta uzmanlık tezi, 2005.
- 107.** Riedl SJ. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *NatRev Mol Cell Biol* 2004; 5: 897- 907.
- 108.** Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 2006; 119: 2036- 2043.
- 109.** Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl* 1998; 19: 487-497.
- 110.** Fujisawa M, Hiramane C, Tanaka H, et al. Decrease in apoptosis of germ cells in the testes of infertile men with varicocele. *World J Urol.* 1999; 17: 296-300.
- 111.** Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
- 112.** Hsueh A, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Celi Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996; 51: 432-457.
- 113.** Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil* 1992; 95: 825-830.
- 114.** Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death, *J Clin Endoc and Metab* 1998; 83: 152-162.
- 115.** Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol* 2000; 86: 598-606.

- 116.** Barisic K, Petrik J, Rumora L. Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm.*2003;53: 151-164.
- 117.** Brouckaert G, Kalai M, Krysko DV et al. Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Mol Biol Cell* 2004;15: 1089-1100.
- 118.** Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999; 47(9): 1101-1109.
- 119.** Karaboğa F. Deneysel Diyabetik Fare Beyin Dokusundaki Apoptotik Değişiklikler Üzerine D₃ Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Noroloji Anabilim Dalı, 2010.
- 120.** Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest* 2006; 116(8): 2062-2072.
- 121.** Bellan M, Guzalloni G, Rinaldi M et al. Altered glucose metabolism rather than naive type 2 diabetes mellitus (T2D) is related to vitamin D status in severe obesity. *Card Diabetol* 2014; 13(57): 1-10.
- 122.** Lim S, Kim MJ, Choi CS et al. Association of vitamin D deficiency with incidence of type 2 diabetes in high-risk Asian subjects. *Am J Clin Nutr* 2013; 97(3): 524-530.
- 123.** Lim S, Shin H, Kim MJ et al. Vitamin D inadequacy is associated with significant coronary artery stenosis in a community-based elderly cohort: the Korean Longitudinal Study on Health and Aging. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(1): 169-178.
- 124.** Webb, A. R., Kline, L., ve Holick, M. F., Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D₃: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D₃ synthesis in human skin. *J Clin Endocrinol Metab* 1988. 67(2): 373-378.
- 125.** Palomer X, Gonzales-Clemente JM, Blanco Vaca F, Mauricio D. Role of Vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diab Obes Metab* 2008; 10(3): 185-197.
- 126.** Mezza T, Muscogiuri Sorice GP, Prioletta A et al. Vitamin D Deficiency: A New Risk Factor For Type 2 Diabetes? *Ann Nutr Met* 2012; 61(4): 337-348.

- 127.** Alvarez JA, Ashraf A. Role of Vitamin D in Insulin Secretion and Insulin Sensitivity for Glucose Homeostasis. *Int J Endocrinol* 2010; 2010: 351-385.
- 128.** Lee BK, Park S, Kim Y. Age- and genderspecific associations between low serum 25-hydroxyvitamin D level and type 2 diabetes in the Korean general population: analysis of 2008-2009; Korean National Health and Nutrition Examination Survey data. *Asia Pac J Clin Nutr* 2012; 21(4): 536-546.
- 129.** Belkız Öngen CK, Zuhul Parıldar. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2008: 23- 31.
- 130.** Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006; 371(1-2): 1-12.
- 131.** Gedik O, Akalin S. Effects of Vitamin D deficiency and repletion on insulin and glucagon secretion in man. *Diabetologia* 1986; 29(2): 142-145.
- 132.** Cangoz S, Chang Y-Y, Chempakaseril SJ et al. Vitamin D and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Pharm Therap* 2013; 38(2): 81-84.
- 133.** Stivelman E, Retnakaran R. Role of Vitamin D in the Pathophysiology and Treatment of Type 2 Diabetes. *Curr Diab Rev* 2012; 8(1): 42-47.
- 134.** George PS, Pearson ER, Witham MD. Effect of vitamin D supplementation on glycaemic control and insulin resistance: a systematic review and meta- analysis. *Diab Med* 2012; 29(8): 42-50.
- 135.** Mitri J, Muraru MD, Pittas AG. Vitamin D and type 2 diabetes: A Systematic Review. *Eur J Clin Nutr* 2011; 65(9): 1005-1015.
- 136.** Atak N, Karagöla N, Atakba N. D vitamini ve Tip 2 diyabet. *Turk J Public Health.* 2016; 14(3):167.
- 137.** Pittas AG, Lau J, Hu F, Dawson-Hughes B. The role of Vitamin D and Calcium in type 2 diabetes. A systematic Review and Meta- Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92(6): 2017-2029.
- 138.** Rucker RB. Handbook of vitamins. Marcel Dekker. Inc 2001; 3: 616.

- 139.** Aydın S. Sıçan Akciğer ve Karaciğerinde Formaldehit Maruziyetiyle Oluşan Oksidatif Hasar ve İrisin Hormon Değişimlerine Karşı Karnozinin Etkisinin Biyokimyasal, Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi, doktora tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı, 2015.
- 140.** Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem* 2004; 37: 277-285.
- 141.** Aydın S. A comparison of ghrelin, glucose, alpha-amylase and protein levels in saliva from diabetics. *J Biochem Mol Biol* 2007; 40: 29-35.
- 142.** Hasselbaink DM, Glatz JFC, Luiken JJ, Roemen THM, Vusse, GJV. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem. J* 2003; 371: 753-760.
- 143.** Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol.* 2005; 523: 151– 161.
- 144.** Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1–40.
- 145.** Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992; 50: 335-339.
- 146.** Agbaje IM, Rogers DA, Mcvicar CM, McClure N, Atkinson AB, Mallidis C et al. Insulin dependent diabetes mellitus: implications for male reproductive function. *Human Reproduction* 2007; 22: 1871-1877.
- 147.** Steger RW, Rabe MB. The effect of diabetes mellitus on endocrine and reproductive function. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 1-11.
- 148.** Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 2-11.

- 149.** Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Ceribasi AO, Yuce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008; 89: 1474-1481.
- 150.** Koksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 95-99.
- 151.** Ganesh Kumar K, Zhang J, Gao S, Rossi J, McGuinness OP, Halem HH, et al. Adropin deficiency is associated with increased adiposity and insulin resistance. *Obesity (Silver Spring)* 2012; 20: 1394–1402.
- 152.** Cho WC, Yip TT, Chung WS, Leung AW, Cheng CH, Yue KK. Differential expression of proteins in kidney, eye, aorta, and serum of diabetic and non-diabetic rats. *J Cell Biochem.* 2006; 99: 256 – 268.
- 153.** Kuloglu T, Dabak DO. Determination of ghrelin immunoreactivity in kidney tissues of diabetic rats. *Renal Fail.* 2009; 31: 562 – 566.
- 154.** Lovren F, Pan Y, Quan A, Singh KK, Shukla PC, Gupta M, Al-Omran M, Teoh H, Verma S. Adropin is a novel regulator of endothelial function. *Circulation* 2010; 122: 185 – 192.
- 155.** Albayrak F. Tip 2 diabetes mellitus'lu hastalarda HbA1c konsantrasyon düzeylerine göre serum adropin seviyesi tayini. Uzmanlık Tezi. Fırat Üni. Tıp Fak. İç Hastalıkları Anabilim Dalı. Elazığ,2014.
- 156.** Lian W, Gu X, Qin Y, Zheng X. Elevated plasma levels of adropin in heart failure patients. *Intern Med* 2011; 50: 1523-1527.
- 157.** Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC et al. 1, 25(OH)₂-Vitamin D₃, a steroid hormone that produces biological effects via both genomic and nongenomic pathway. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 231–240.
- 158.** Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980–991.

- 159.** Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant: ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol, and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS J* 1993; 326: 285–288.
- 160.** Garcion E, Thanh XD, Bled F, Teissier E, Dehouck MP, Rigault F, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of γ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 859–866.
- 161.** Dalgard C, Skaalum Peterson M, Weihe P, Grandjean P. Vitamin D status in relation to glucose metabolism in septuagenarians. *Diabetes Care* 2011; 34(6): 1284-1288.
- 162.** Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N, Elfeki A. Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D₃ and *Ajuga iva* extract on oxidative stress, toxicity, and hypo-fertility in diabetic rat testes. *J Physiol Biochem* 2008; 64: 231-239.
- 163.** Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 2699-2706.
- 164.** Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004; 81: 1578-1584.
- 165.** Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 418-421.

6. ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Elazığ'da doğdum. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimimi 1992-2003 yılları arasında Elazığ'da tamamladım. 2003-2009 yılları arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimimi aldım. 2009-2011 yılları arasında Erzurum ili Olur ilçesinde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2012 yılından bu yana Üroloji Tıpta Uzmanlık Eğitimimi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı'nda sürdürmekteyim.

