

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTOKSEMİK SEPSİS MODELİNDE
OKSİDAN/ANTIOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE D
VİTAMİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(DOKTORA TEZİ)

Celalettin Yusuf TÜRKMEN

Danışman

Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KARS-2020

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ENDOTOKSEMİK SEPSİS MODELİNDE
OKSİDAN/ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİ ÜZERİNE D
VİTAMİNİN ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

(DOKTORA TEZİ)

Celalettin Yusuf TÜRKMEN

Danışman

Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Bu çalışma KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
desteklenmiştir. (Proje no:2015-TS-69)

KARS-2020

ÖNSÖZ

Son yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunduran atom veya atom grupları olarak adlandırılan serbest radikaller ve reaktif oksijen/nitrojen türleri, protein, karbonhidrat, lipid gibi makromoleküllere ve DNA gibi biyolojik açıdan hayati önem taşıyan moleküllere zarar verebilirler. Dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan sepsiste de reaktif oksijen/nitrojen türlerinde aşırı düzeyde artış gözlenir.

Sepsis, immun sistemin enfeksiyona karşı gösterdiği kontrolsüz ve aşırı yanıtın devamında organların zarar görmesiyle ortaya çıkan, tedavi edilememesi durumunda ise çoklu organ yetmezliği sonucu ölüme sebep olan klinik tablodur. Bu tabloyu önlemek veya etkisini azaltmak için immun yanıtın baskılanması ve artan reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak için antioksidan aktivitenin artırılması gerekir.

Son zamanlarda, yağda çözünen bir vitamin olan ve hemen hemen tamamı güneş ışığı ile deride sentezlenen, diyabetten kardiyovasküler hastalıklara, enfeksiyon hastalıklarından nörodejeneratif hastalıklara kadar birçok hastalıkta olumlu etkileri olan D vitamininin immun ve antioksidan sistem üzerindeki etkisini gösteren çalışmalar dikkat çekmeye başlamıştır.

Çeşitli hastalık durumlarında D vitamininin immun yanıt elemanlarını inhibe ettiği ve antioksidan aktiviteyi ise arttırdığı gösterilmiş olsa da anlamlı düzeyde bir etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu amaçla endotoksemik sepsis oluşturulan tavşanlarda D vitamininin, sepsiste önleyici veya tedavi edici bir etkisinin olup olmadığını belirlemek amacıyla çeşitli oksidan ve antioksidan parametrelerin düzeyleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca danışmanlığımı yapan ve çalışmalarım süresince desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, Prof. Dr. Emine ATAKİŞİ ve çalışmanın her aşamasında desteği olan Prof. Dr. Onur ATAKİŞİ'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Tecrübe ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Ayla ÖCAN ve Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şaban MARAŞLI hocalarıma, son olarak da bu çalışmaya destek sağlayan KAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	1
1.1.1. Serbest Radikaller	1
1.1.1.1 Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri	2
1.1.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	3
1.1.1.3. Serbest radikallerin DNA'ya etkileri	4
1.1.2. Oksidatif Stres	5
1.1.2.1 Oksidatif Hasar Biyobelirteçleri	6
1.2. Sepsis	10
1.2.1. Sepsisin Mekanizması	11
1.2.2. Bakteriyel LPS	13
1.3. Antioksidan Sistem	16
1.3.1. Redükte Glutasyon	17
1.3.2. Melatonin	19
1.3.3. D Vitamini	21
1.3.3.1. Yapısı	21
1.3.3.2. Metabolizması	23
1.3.3.3. Kaynakları	27
1.3.4. D Vitamini ve Sepsis	28
2. MATERYAL VE YÖNTEM	32
2.1. Gruplar	33
2.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler	33
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler	33
2.4. Biyokimyasal Analizler	35
2.4.1. Vitamin D Düzeylerinin Ölçümü	35

2.4.2. Redükte Glutasyon Analizi	36
2.4.3. Malondialdehit Analizi:	37
2.4.4. Nitrik Oksit Analizi	37
2.4.4.1. Nitrat Analizi	38
2.4.4.2. Nitrit Analizi	38
2.4.5. 8-OHdG Analizi	39
2.4.6. Melatonin Analizi	40
2.4.7. İstatistiksel analizler	40
3. BULGULAR	41
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	42
5. KAYNAKLAR	52

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

1 α ,25(OH)2D3: 1 α ,25-dihidroksivitamin D3

25OHD: 25-hidroksivitamin D3

7-DHC: 7-dehidrokolesterol

8-OH-dG: 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin

CaBP: Kalsiyum Bağlayıcı Protein

DBP: D Vitamini Bağlayıcı Protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

GR: Glutasyon redüktaz

GSH: Redükte Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

GSSG: Okside Glutasyon

GST: Glutasyon-S-Transferaz

HRP: Horse radish peroxydase

I κ B α : NF-kB inhibitör alfa

KAT: Katalaz

LBP: Lipopolisakkarit Bağlayıcı Protein

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehit

NADPH: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

NO: Nitrik Oksit

NOS: Nitrik Oksit Sentaz

Nrf2: Nükleer Respiratör Faktörü 2

PAMPs: Patojen İlişkili Moleküler Yapılar

PRR: Patern Tanıma Reseptörleri

PTH: Parathormon

ROT: Reaktif Oksijen Türleri

RNT: Reaktif Nitrojen Türleri

RXR: Retinoid X Reseptör

SIRS: Sistemik İnflamatuvar Cevap Sendromu

SOD: Süperoksit dismutaz

SOFA: Ardışık Organ Yetmezliği Skoru

TLR: Toll benzeri Reseptörler

T2DM: Tip 2 Diyabet

VDR: Vitamin D Reseptörü

VDRE: D Vitaminine Yanıt Veren Elementler

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Arjininden nitrik oksit sentezi	7
Şekil 2. MDA oluşum mekanizması	8
Şekil 3. Deoksiguanozinin hidroksilasyonu	10
Şekil 4. Sepsis fizyopatolojisi	12
Şekil 5. LPS'nin molekül yapısı	14
Şekil 6. Lipopolisakkarit sinyalleri ve yüksek organizmada immün aktivasyon mekanizması	15
Şekil 7. Glutamattan GSH sentezi	19
Şekil 8. Melatoninin molekül yapısı	20
Şekil 9. D3 Vitamininin moleküler yapısı	21
Şekil 10. D vitamininin aktivasyonu	24
Şekil 11. D vitamini aktivasyon ve inaktivasyon yolları	27
Şekil 12. LPS ile NF-kB'nin aktivasyonu	29

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri	2
Tablo 2. D vitamini düzeyleri	22
Tablo 3. Yem analizi	32
Tablo 4. Plazma D vitamini düzeyleri	41
Tablo 5. Gruplarda Biyokimyasal parametreler	41

GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. D Vitamini Standart Grafiği	36
Grafik 2. MDA Standart Grafiği.....	37
Grafik 3. Nitrit Standart Grafiği.....	38
Grafik 4. Nitrat Standart Grafiği	38
Grafik 5. 8-OHdG Standart Grafiği	38
Grafik 6. Melatonin Standart Grafiği.....	40

ÖZET

D vitamini, güneş ışığı ile deride sentezlenen, bir kısmı ise diyetle alınan, hormon benzeri bir vitamindir. Çalışmada, tavşanlara Lipopolisakkarit (LPS) uygulanarak oluşturulan endotoksemik sepsis modelinde, D vitamininin oksidasyon ürünleri, serbest radikal metabolizmasında rol alan antioksidan moleküller ve serbest radikal düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada materyal olarak 32 adet Yeni Zelanda cinsi tavşan kullanıldı. 15 günlük adaptasyon döneminden sonra tavşanlar iki gruba ayrıldı. Birinci grup D vitamini eklenmiş standart tavşan yemi ile ikinci grup ise D vitamini eklenmemiş tavşan yemi ile 24 hafta beslendi. 24. haftanın sonunda kan örnekleri alınarak plazmaları elde edildi ve D vitamini tavşana özel ticari ELISA kit ile ölçüldü. Yetersizlik tespit edildikten sonra her iki grup ikişer gruba daha bölünerek dört grup oluşturuldu. **Grup I (Vit D-)** D vitaminininin eksik tavşan yemi ile, **Grup II (Vit D+)** standart tavşan yemi ile 24 hafta beslendikten sonra vena auricularisden tek doz serum fizyolojik verildi. **Grup III (Vit D- (+) LPS)** D vitaminininin eksik tavşan yemi ile, **Grup IV (Vit D+ (+) LPS)** standart tavşan yemi ile 24 hafta beslendikten sonra vena auricularisden tek doz 150 µg/kg LPS verildi. Uygulama sonrasında plazma nitrik oksit (NO), malondialdehit (MDA), redükte glutatyon (GSH) düzeyleri kimyasal yöntemle, 25-hidroksivitamin D3 (25OHD), melatonin ve 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ise ELISA yöntemi ile ölçüldü. Çalışmada GSH düzeyleri Grup II'e göre Grup III ve Grup IV 'de düşük ($p<0,05$), melatonin düzeyleri Grup I'e göre Grup II'de ve Grup III'e göre Grup IV'te yüksek ($p<0,01$), MDA düzeyleri Grup II'ye göre Grup I ve III'de yüksek ($p<0,05$), 8-OH düzeyleri Grup III'de Grup I ve Grup II'ye göre yüksek ($p<0,01$), NO düzeyleri ise Grup I'e göre Grup II ve Grup IV'de düşük, Grup II'ye göre Grup III'de yüksek ($p<0,01$) bulundu. Sonuç olarak, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve NO'nin D vitamininden eksik beslenen grupta yeterli D vitaminine sahip gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulunması, önemli bir antioksidan molekül olan melatoninin ise D vitamininden eksik beslenen grupta yeterli D vitaminine sahip gruba göre istatistiksel olarak düşük bulunması D

vitamininin antioksidan özelliğe sahip olduğunu desteklemektedir. Yeterli D vitaminine sahip gruplarda GSH düzeyleri hariç LPS verilmeden öncesi ile verildikten sonraki değerler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamaması D vitamininin endotoksemik sepsise karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Ancak D vitamininden eksik yemle beslenen gruplarda da 8-OHdG düzeyleri hariç diğer parametreler arasında istatistiksel fark bulunamamıştır. Bu durum D vitaminin GSH düzeyini arttırarak değil de daha çok melatonin düzeyini arttırarak antioksidan sistemi desteklediği kanaatini uyandırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Sepsis, 25-hidroksivitamin D3, tavşan, oksidan, antioksidan, melatonin.

ABSTRACT

Vitamin D is a hormone-like vitamin synthesized at skin with sunlight while some of which is received via diet. The study intends researching impact of vitamin D on oxidation products, antioxidant molecules that take part in free radical metabolism and free radical levels in endotoxemic sepsis model created by applying Lipopolysaccharide (LPS) to rabbits.

We used 32 New Zealand rabbits in the study as material. Following 15-day adaptation period, the rabbits were divided into two groups. For 24 weeks, first group was fed with standard rabbit feed to which vitamin D was added while second group was fed with rabbit feed to which vitamin D was not added. At the end of 24 weeks, blood samples were taken, plasmas were obtained and vitamin D was measured with rabbit-specific commercial ELISA kit. After deficiency was detected, both groups were divided into two further groups and four groups were created. After feeding for 24 weeks **Group I** with rabbit feed deficient in vitamin D (**Vit D-**), **Group II** with standard rabbit feed (**Vit D+**), we administered single dose physiological saline solution through vena auricularis. After feeding for 24 weeks **Group III** with rabbit feed deficient in vitamin D (**Vit D- (+) LPS**), **Group IV** with standard rabbit feed (**Vit D+ (+) LPS**) we administered single dose 150 µg/kg LPS through vena auricularis. Following the application, levels of plasma nitric oxide (NO), malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) were measured with chemical method, levels of 25-hydroxyvitamin D3 (25OHD), melatonin and 8- hydroxy -2- deoxyguanosine (8-OHdG) with ELISA method. During the study, levels of GSH were found low at Group III and Group IV in comparison to Group II ($p<0,05$), levels of melatonin high at Group II in comparison to Group I and at Group IV in comparison to Group III ($p<0,01$), levels of MDA high at Group I and III in comparison to Group II ($p<0,05$), levels of 8-OH high at Group III in comparison to Group I and Group II ($p<0,01$), levels of NO low at Group II and Group IV in comparison to Group I, high at Group III in comparison to Group II ($p<0,01$). In conclusion, presence of MDA and NO, lipid peroxidation products, statistically high at the group fed deficient from vitamin D in

comparison to the group that has sufficient vitamin D, while presence of melatonin, an important antioxidant molecule, statistically low at the group fed deficient from vitamin D in comparison to the group that has sufficient vitamin D supports the fact that vitamin D has antioxidant properties. Lack of statistical difference among values before and after LPS administration, levels of GSH excluded, at groups that have sufficient vitamin D indicates that vitamin D may be protective against endotoxemic sepsis. However, we also did not find any statistical difference among other parameters, except for 8-OHdG levels at groups fed with feed deficient in vitamin D. This forms the opinion that vitamin D supports antioxidant system by increasing level of melatonin rather than level of GSH.

Keywords: Sepsis, 25- hydroxyvitamin D3, rabbit, oxidant, antioxidant, melatonin.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

1.1.1. Serbest Radikaller

En dış yörüngesinde eşleşmemiş elektron bulunduran kararsız yapıdaki oldukça reaktif olan atom veya moleküllere serbest radikaller denir. Yaşam için vazgeçilmez bir element olan oksijenin belirli durumlarda insan vücudu üzerinde zararlı etkileri olabilmektedir. Hücrede metabolizma süreçlerinde ortaya çıkan serbest oksijen radikallerine genel olarak reaktif oksijen türleri (ROT) veya nitrojen radikallerine ise reaktif nitrojen türleri (RNT) denilmektedir (Lobo ve ark., 2010). Serbest radikaller, ROT ve RNT, endojen veya eksojen kaynaklı olarak üretilir. Endojen olarak üretilen serbest radikaller, immün hücre aktivasyonu, inflamasyon, stres, aşırı egzersiz, iskemi, enfeksiyon, kanser ve yaşlanmadan kaynaklıdır. Eksojen olarak üretilen serbest radikaller ise, hava ve su kirliliği, sigara, alkol, ağır metaller, bazı ilaçlar (siklosporin, takrolimus), endüstriyel çözücüler, pişirme ve radyasyondan kaynaklanmaktadır (Lobo ve ark., 2010; Kabel, 2014).

Mitokondride ATP üretimi sürecinde serbest radikaller ortaya çıkar. Bu reaktif ürünler hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak ikili bir rol oynarlar. Düşük veya orta seviyelerde ROT, hücrel tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde faydalı etkiler gösterirken yüksek konsantrasyonlarda, biyomoleküler yapılara zarar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stresin ortaya çıkmasına neden olur (Kabel, 2014).

Serbest radikaller yüksek reaktiviteleri nedeniyle, kararlılık kazanabilmek için diğer bileşiklerden elektron koparabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül elektronunu kaybeder, serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyonu kaskadını başlatmış olur (Phaniendra ve Babu, 2015). Reaktif özelliklerinden dolayı lipidlerden DNA'ya kadar birçok yerde oksidatif hasar oluşturabilen ROT ve diğer oksijen içermeyen serbest radikallerin önemli fizyolojik

fonksiyonları da vardır. ROT hücreler arası sinyal mekanizmalarında görev alır. Örneğin ROT'den biri olan nitrik oksit, transkripsiyon faktör aktivitelerinde ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde bir sinyal molekülü olarak görev yapar. Nitrik oksit gibi bazı radikaller de sitokinler, büyüme faktörleri ve nörotransmitter maddelerin hücre içi sinyal mekanizmalarında ikincil haberci olarak rol alırlar (Nordberg ve Arner, 2001; Kopáni ve ark., 2006).

Tablo 1. Reaktif Oksijen ve Nitrojen Türleri (Nordberg ve Arner, 2001; Pham-Huy ve ark., 2008; Lobo ve ark., 2010).

Reaktif Oksijen Türleri	Sembol	Reaktif Nitrojen Türleri	Sembol
Hidroksil	$\text{OH}\cdot$	Nitrik Oksit radikali	$\text{NO}\cdot$
Süperoksit	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Peroksinitrat	ONOO^-
Nitrik Oksit	$\text{NO}\cdot$	Peroksinitröz Asit	ONOOH
Peroksil	$\text{RO}_2\cdot$	Nitrozil Anyonu	NO^-
Lipid Peroksil	$\text{LOO}\cdot$	Azotdioksit	NO_2
Peroksinitrat	ONOO^-	Diazottrioksit	N_2O_3
Hidrojen Peroksit	H_2O_2	Nitröz Asiti	HNO_2
Singlet Oksijen	O_2^-	Nitril Klorid	NO_2Cl
Hipoklorik asit	HOCl	Nitrozil Katyonu	NO^+

1.1.1.1 Serbest Radikallerin Membran Lipitlerine Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi bütün önemli biyomolekülleri üzerinde etkili olurlar. Bunlar arasında serbest radikallerin olumsuz etkilerine en açık olan biyokimyasal moleküller lipidlerdir. Hücre zarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitlerinin çift bağları, radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (Halliwell, 2007; Song ve ark., 2013; Phaniendra ve Babu, 2015).

Reaktif oksijen radikalleri ile hücre membran fosfolipidlerinin yapısını oluşturan poliansatüre yağ asitleri reaksiyona girerek ve radikal zincir reaksiyonu ile ilerleyerek lipid hidroperoksitlerini oluşturur. Bu olaya lipid peroksidasyonu denir.

Lipid peroksidasyonundan dolayı alkanlar, malondialdehit ve izoprostanlar gibi birçok bileşik oluşur. Bu bileşikler nörojeneratif hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarı ve diyabet gibi birçok hastalıkta lipid peroksidasyonu markırı olarak kullanılmaktadır (Lovell ve ark., 1995; Lobo ve ark., 2010).

Lipid peroksidasyonu, membran işlevinin kaybına, akışkanlığının bozulmasına, zara bağlı enzimlerin ve reseptörlerin etkisizleşmesine neden olur (Phaniendra ve Babu, 2015).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan ürünlerden etan ve pentan hidrokarbonları solunum sırasında vücuttan atılırlar. Oluşan ürünlerden en toksik olanı ise aldehitlerdir. Lipid peroksidasyonu sonucunda, peroksidasyonun derecesiyle en uygun korelasyonu ifade eden molekül malondialdehit (MDA)'tır. (Rahal ve ark., 2014; Nimse ve Pal, 2015).

Malondialdehit genellikle tiobarbiturik asitle reaksiyona sokularak ölçülür. Bu reaksiyon sonucunda tiobarbiturik asit reaktif maddeleri (TBARM) oluşur. TBARM ölçüm yöntemi MDA'ya özel olmasa da TBARM terimi lipid peroksidasyonunun genel belirteci olarak kabul edilen MDA ile eşanlamlı olarak kullanılmaktadır (Nimse ve Pal, 2015).

1.1.1.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Amino asitler de serbest radikallerin hedef moleküllerindendir. Protein oksidasyonu, O_2^- , $OH^\bullet$, peroksil, alkoksil, hidroperoksil gibi radikal türlerin yanı sıra, H_2O_2 , O_3 , $HOCl$, singlet oksijen, $OONO^-$ gibi radikal olmayan türler tarafından indüklenebilir. ROT, proteinlerde bulunan farklı amino asitleri okside eder, protein-protein çapraz bağların oluşumuna neden olur, proteinlerin denatüre ve kaybına, enzim aktivitesinin kaybına ve reseptörlerin fonksiyon kaybına neden olur (Phaniendra ve Babu, 2015).

Proteinlerin oksidatif hasara uğraması sonucu, enzimlerin, reseptörlerin ve membran transportunun aktivitesi etkilenebilir. Oksidatif olarak hasar görmüş protein ürünleri, membrana ve birçok hücresel fonksiyona zarar verebilecek çok reaktif gruplar içerebilir. Peroksil radikalının proteinlerin oksidasyonu için serbest

radikal tür olduğu düşünülmektedir. Proteindeki metiyonin, sistein, arginin ve histidin gibi amino asitler, oksidasyona en savunmasız bölgeler olarak görülmektedir. Sistein ve metiyonin kalıntıları, hemen hemen tüm ROT formları tarafından oksidasyona karşı özellikle duyarlıdır. Düşük ROT seviyelerinde bile sistein kalıntıları disüflitlere ve metiyonin kalıntıları metiyonin sülfoksit kalıntılarına dönüştürülür (Berlett ve Stadtman, 1997).

Protein oksidasyonu, sinyal iletim mekanizmasının, enzim aktivitesinin, ısı stabilitesinin ve yaşlanmaya neden olan proteoliz duyarlılığının değişmesine neden olur (Lobo ve ark., 2010).

Proteinlerdeki karbonil gruplarının varlığı, ROT aracılı protein oksidasyonunun işareti olarak düşünülmüştür. Protein karbonil seviyelerindeki bu artış, alzheimer, parkinson, kas distrofisi, kataraktogenez, romatoid artrit, diyabet gibi patolojik durumlarda gözlenir (Chevion ve ark., 2000).

1.1.1.3. Serbest radikallerin DNA'ya etkileri

Serbest oksijen radikallerinin önemli bir diğer hedefi de DNA molekülüdür. Serbest radikallerin etkisiyle nükleik asit bazlarında modifikasyon ve DNA zincirinde kırılmalar ortaya çıkar. DNA'nın yapısında bulunan timin ve sitozin bazıları hidroksil radikalının meydana getirdiği etkiye en duyarlı olanlarıdır (Gupta ve ark., 2014).

Serbest radikaller, DNA üzerine etki ederek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidrojen peroksit membranlardan kolaylıkla geçer ve çekirdeğe ulaşır. Ardından DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir (Nimse ve Pal, 2015).

ROT, nükleik asitlere oksidatif olarak zarar verebilir. Mitokondriyal DNA, ROT saldırısına nükleer DNA'dan daha savunmasızdır. Mitokondriyal DNA reaktif oksijen türlerine yakınlığı, koruyucu histon eksikliği ve sınırlı onarım kapasitesi nedeniyle nükleer DNA'dan daha kolay okside olabilir. DNA'nın oksidasyonu iplik kopmalarına, DNA-DNA ve DNA-protein çapraz bağlanmasına, transkripsiyon ve

protein translasyonunda değişikliklere yol açabilecek DNA baz modifikasyonuna neden olur (Markesbery ve Lovell, 2007).

Hidroksil radikali, DNA molekülü hasarına neden olan en önemli radikallerden birisidir. Hidroksil radikali, purin ve pirimidin bazları, deoksiriboz omurgası gibi tüm DNA bileşenleriyle doğrudan reaksiyona girer ve DNA'daki tek ve çift sarmallı kopmalar dahil olmak üzere bir dizi değişikliğe neden olur. Bu oksidatif hasar sonucunda meydana gelen genetik materyaldeki kalıcı değişiklikler mutagenesis, karsinogenesis ve yaşlanmanın ilk aşamalarını temsil etmektedir (Phaniendra ve Babu, 2015).

1.1.2. Oksidatif Stres

Oksijenli solunum yapan tüm organizmalarda normal fizyolojik koşullarda, endojen oksidanlar ile enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemi arasında bir denge bulunur. Serbest radikallerin oluşum hızında artış veya serbest radikallerin yok edilme hızında azalma ile dengenin bozulması oksidatif stres olarak tanımlanır. Meydana gelen dengesizlik sonucu, radikaller DNA'ya hasar verir ve bu da yaşlanma, tümör oluşumları ve diğer dejeneratif hastalıkların ortaya çıkmasına neden olur (Kopáni ve ark., 2006; Halliwell, 2007; Lobo ve ark., 2010).

Enfeksiyon, aşırı egzersiz, hipertrofi, toksinlere maruz kalma gibi nedenlerle meydana gelen oksidatif stres sonucu dokular yaralanabilir. Bu hasar gören dokular, ksantin oksidaz, lipogenaz gibi radikal üreten enzimlerin artması, fagositlerin aktivasyonu, demir ve bakır gibi bazı iyonlarının serbest bırakılması veya oksidatif fosforilasyonun elektron transport zincirlerinde meydana gelen bozulmayla aşırı ROT üretir. Kanser tedavisinde uygulanan radyoterapi ve kemoterapinin yan etkileri sonucu aşırı üretilen ROT de, antioksidan savunma sistemi ile oksidanlar arasındaki dengeyi bozabilmektedir (Rao ve ark., 2007).

Oksidatif stres, kanserden otoimmün hastalıklara, kardiyovasküler hastalıklardan nörodejeneratif hastalıklara kadar bir çok hastalığın gelişiminde önemli bir rol oynar. İnsan vücudu, doğal olarak üretilen veya harici olarak gıdalar ya da takviyeler yoluyla tedarik edilen antioksidanlar ile meydana gelen oksidatif stresin

etkilerini azaltmak için çeşitli mekanizmalara sahiptir. Endojen ve eksojen antioksidanlar, ROT'un neden olduğu zararları önleyerek ve onararak serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görürler (Valko ve ark.,2007; Lobo ve ark., 2010; Kabel, 2014).

1.1.2.1 Oksidatif Hasar Biyobelirteçleri

1.1.2.1.1. Nitrik Oksit (NO)

Endotel kaynaklı gevşeme faktörü olarak bilinen NO, ana damarlarda inflamasyonu ve adhezyonu baskılayarak trombozu inhibe eder ve kan akışını hızlandırır. Mikro ve kılcal damarlarda büyüme faktörleri ile birlikte anjiyogenez adı verilen yeni damar oluşumunu destekler (Ghimire ve ark., 2017).

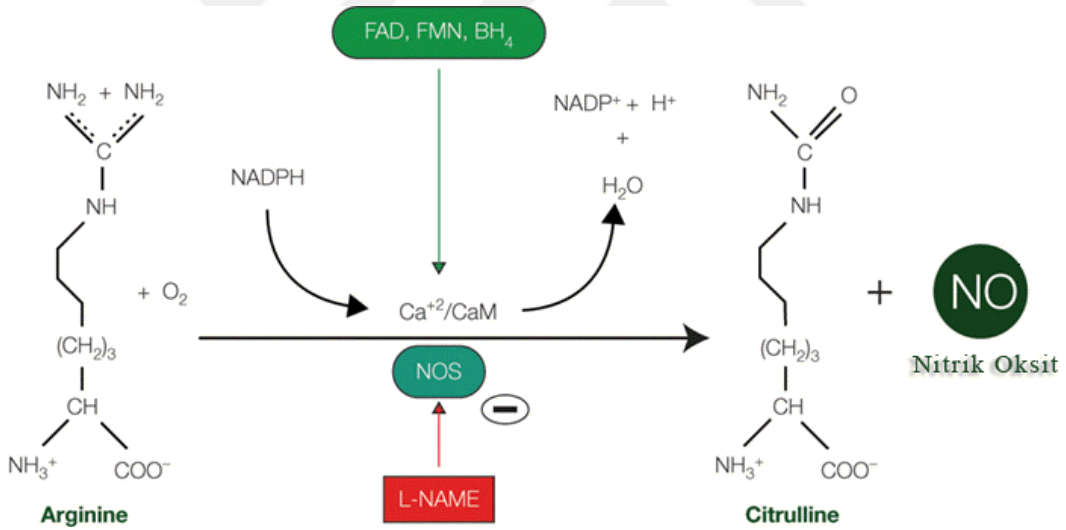
NO birçok farklı dokulardaki çeşitli sinyal yollarını düzenler ve çeşitli fizyolojik rollere sahiptir. NO'nin en iyi bilinen fonksiyonları, bağışıklık, kardiyovasküler ve nöronal sistemdeki rolleri ile ilgilidir. NO, başta makrofajlar olmak üzere farklı bağışıklık hücreleri tarafından üretilir. Bağışıklık ve iltihaplanmanın önemli bir düzenleyicisidir. Bulaşıcı hastalıklarda, bağışıklık hücreleri tarafından salınan NO'nin sitotoksik antimikrobiyal aktiviteleri vardır. Bunun yanında NO, apoptozu destekleyip, sitokin ve kemokin üretimini inhibe ederek T hücre proliferasyonunu ve aktivitesini sınırlandıran immünosüpresif bir ajan olarak işlev görür (Keshet ve Erez, 2018).

L-arginin'den nitrik oksit sentaz (NOS)ın farklı izoenzimleri aracılığı ile sentezlenen NO, çeşitli hastalık süreçlerinde hücrel ve vasküler seviyelerde hem zararlı hem de faydalı etkileri olan sepsis patogeneğinde anahtar rol oynayan bir moleküldür. NO'nin aşırı üretimi, aşırı vazodilatasyona, vasküler geçirgenlikte değişikliklere ve noradrenerjik sinir iletiminin inhibisyonuna ve sonuçta septik şoka neden olmaktadır (Victor ve ark., 2005).

Önemli bir hücrel redoks regülatörü olan NO, vasküler düz kas tonusu kontrolörü olarak bilinir. NO proteinleri nitrozile ederek enzimatik aktiviteyi düzenleyen, kan basıncı regülasyonu, trombosit aktivasyonu, apoptoz, düz kas

gevşemesi, nörotransmisyon, savunma mekanizmaları ve immün regülasyon gibi birçok biyolojik faaliyette rol alan bir moleküldür (Phaniendra ve Babu, 2015).

Bilinen en küçük sinyal molekülü olan NO'nin sentezini sağlayan NOS'un, nöronal nitrik oksit sentaz (nNOS), indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ve endotel nitrik oksit sentaz (eNOS) olmak üzere 3 izoformu vardır (Keshet ve Erez, 2018). Yarı esansiyel aminoasitlerden olan L-arjinini NOS'un substrat olarak kullanması sonucunda NO ve L-sitrülin oluşmaktadır. NO oluşuktan sonra methemoglobin, nitrite (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşerek inaktive olmaktadır. NO, süperoksit anyonları (O_2^-) ile birleşerek peroksinitrite (ONOO^-) dönüşür. Peroksinitrit, hidroksil radikalleri ($\text{OH}^\bullet$) ve tirozinle birleşerek nitrotirozini oluştururlar. NO, guanil siklaz aktivasyonu ile cGMP'yi artırarak düz kas gevşemesine neden olmaktadır (Förstermann ve Sessa, 2012).



Şekil 1. Arjininden nitrik oksit sentezi (Freire ve ark., 2009).

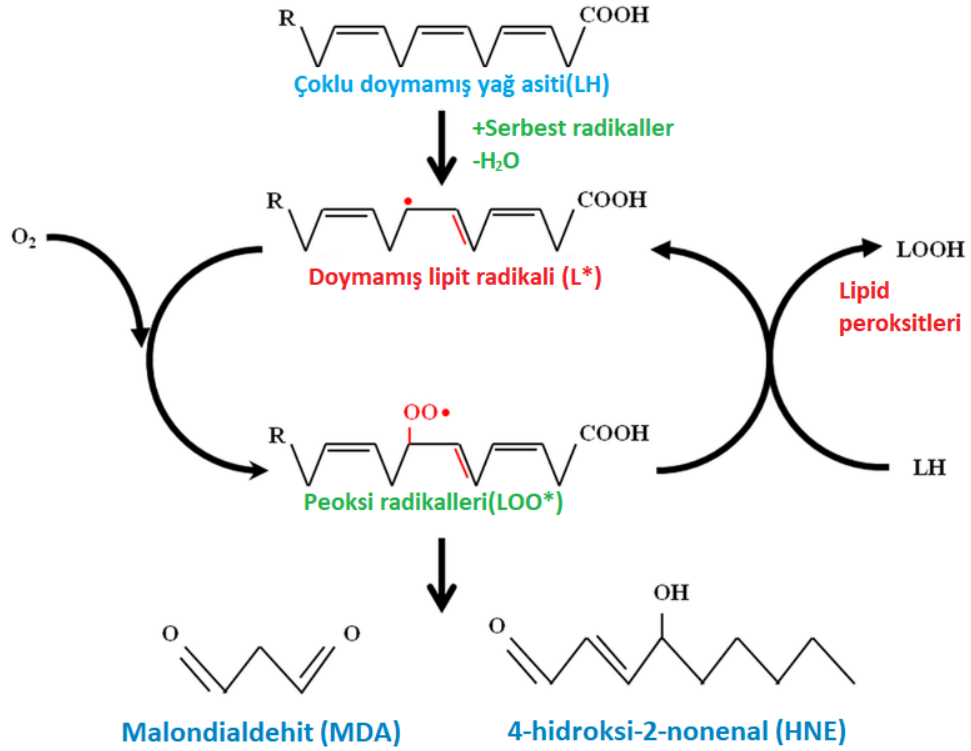
1.1.2.1.2. Malondialdehit

Reaktif oksijen türleri, membranın lipid katmanlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna ve nihayetinde oksidatif stresin toksik habercileri olarak kabul edilen aynı zamanda oksidatif hasarı daha da ilerlemesine neden olan aldehytlerin

oluşumuna yol açar. Bu aldehytlerin başında MDA ve 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) gelmektedir (Barrera ve ark., 2018).

Malondialdehit (MDA), farklı mekanizmalar tarafından üretilen üç karbonlu, düşük moleküler ağırlıklı bir aldehyttir. MDA membran lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir (Grotto ve ark., 2009).

Üç ve daha fazla çift bağ içeren doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunda meydana gelen MDA lipid peroksidasyonunun başlıca ürünü ve peroksidasyonun derecesi ile korelasyon gösteren, yüksek reaktivitesi ile hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki ederek geri dönüşümü mümkün olmayan hasarlara yol açan bir moleküldür.



Şekil 2. MDA oluşum mekanizması (Barrera ve ark., 2018).

MDA hücre zarının geçirgenliğini artırıp, membranın iyon alış verişini etkileyerek hücre içindeki iyon dengesini olumsuz yönde etkiler ve enzim aktivitelerinde bozukluklara, DNA’da ise kırılmalara neden olur. MDA seviyesindeki artış serbest radikal üretimini artırarak ve antioksidan aktiviteyi azaltarak serbest radikal ve antioksidan aktivitesindeki dengesizliğin sonucu oluşan oksidatif strese

neden olur (Erçin ve ark., 2019). Ayrıca membran akıcılığının azalmasına, membran reseptör ve enzimlerinin inaktive olmasına, membran fonksiyonlarının yavaşlamasına neden olur (Del Rio ve ark., 2005).

1.1.2.1.3. 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin

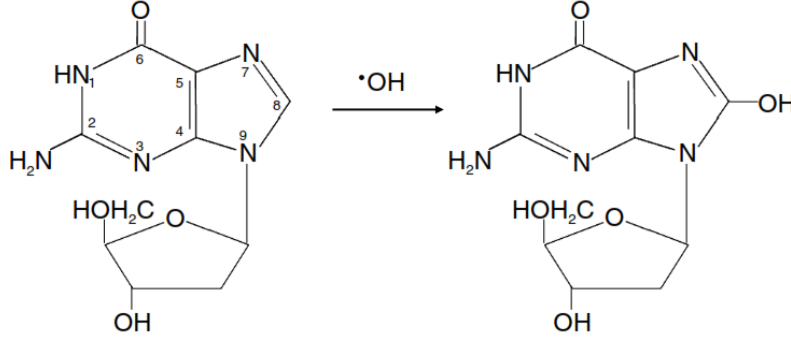
Genetik bilgi taşıyıcısı olarak DNA'nın kimyasal bütünlüğünü korumak, yaşam için çok önemlidir. DNA da lipidler, karbohidratlar ve proteinler gibi oksidatif hasara uğrayabilen bir moleküldür. Oksidatif hasara karşı DNA'nın tamir sistemleri olsa da ROT miktarındaki artış ile beraber antioksidan düzeylerindeki azalma veya DNA onarım sistemlerinin disfonksiyonu oksidatif DNA hasarında artışa sebep olmaktadır. Oksidatif hasar sonucu DNA'da, tek ve çift dal kırıkları meydana gelirken DNA ile protein arasında çapraz bağlanma ve baz modifikasyonları gibi istenmeyen durumlar ortaya çıkabilmektedir (Lobo ve ark., 2010; Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).

DNA sarmalı, adenin, tiamin, sitozin ve guaninden oluşan dört farklı nükleobazdan oluşur. Guanin bazı en düşük iyonlaşma potansiyeline sahip olduğundan en sık rastlanan hasar guanozin biriminde gerçekleşir (Kroese ve Scheffer, 2014). Yani guanozin, bazlar içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşik olduğu için ROT'un başlıca hedefidir (Valko ve ark., 2006).

Normal şartlar altında, ROT'un birçok geni düzenleyen hücre içi sinyal molekülleri olarak önemli bir rolü vardır. Bununla birlikte, inflamatuvar koşullar altında, artan ROT üretimi, DNA oksidasyonu gibi hücre molekülü hasarına yol açar. ROT tarafından oksidatif DNA modifikasyonlarının en belirgin ürünü 8-Hidroksi-2-Deoksiguanozin (8-OHdG)'dir. Mitokondriler ROT oluşumunun ana kaynağı olmasından dolayı mitokondriyal DNA'da 8-OHdG oldukça yüksek düzeylerde (Phaniendra ve Babu, 2015). Bu okside baz, sıklıkla kan, idrar, beyin omurilik sıvısı ve tükürük olmak üzere farklı numunelerde ölçülmüştür (Wu ve ark., 2004; Kroese ve Scheffer, 2014; Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).

Mutasyona yol açan deoksiguanozinin oksidasyonu ile üretilen ve oksidatif DNA hasarının biyolojik markırı olarak kabul edilen 8-OHdG, mutajenez, karsinogenez ve yaşlanma ile ilişkilidir (Barja, 2000; Phaniendra ve Babu, 2015).

Sigara dumanı, asbestozis, x-ışınları, okside olmuş doymamış yağ asitleri, gama ışını, toksik kimyasallar, ultraviyole ışınlar, kısaca oksijen radikalleri üreten tüm ajanlar 8-OHdG miktarında artışa neden olabilirler (Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).



Şekil 3. Deoksiguanozinin hidroksilasyonu (Kroese ve Scheffer, 2014)

8-OHdG, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi (GC-MS), immünohistokimyasal yöntemler ve tek hücreli jel elektroforezi ile yüksek hassasiyetle tespit edilmektedir (Valavanidis ve Vlachogianni, 2017).

1.2. Sepsis

Ağır enfeksiyon ile ilişkili mikrobik hasara karşı cevap olarak immun sisteminin aşırı uyarıldığı, çeşitli sitokinlerin kana salındığı, koagülasyon ve inflamasyon ile birlikte seyreden tıbbi bir durum olan sepsis enfeksiyona karşı konakta gelişen bir yanıt olup, ağır sepsis, septik şok, organ fonksiyon bozukluğu ve organ yetmezliğine kadar giden mortalitesi yüksek bir enfeksiyon hastalığıdır. Bu hastalığın mevcut olan çoklu komorbiditeleri ve altta yatan hastalıklar nedeniyle tanı koymak oldukça güçtür (Chang ve ark., 2010; Zarjou ve Agarwal, 2011; Dellinger, 2015; Rello ve ark., 2017; Evans, 2018).

Sepsis akut organ disfonksiyonunun eşlik ettiği, dünyada en önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan, yoğun bakım ünitelerindeki kritik durumdaki hastalar arasında en yaygın ölüm nedenidir (Mayr ve ark., 2014).

On yıllardır süren araştırmalara rağmen, sepsisin patogenezi ve sepsiste bağışıklık sisteminin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. Gram negatif bakterilerin endotoksini olan LPS gibi patojenik mikrobiyal antijenlere maruziyet sonrası, karmaşık ve düzensiz bir bağışıklık tepkisi başlatılır. Bu tepki, ilk olarak hiperaktif faz ve daha sonra bir latent fazı içerir. Hiperaktif faz sırasında, aktive edilmiş monositlerde, makrofajlarda ve diğer inflamatuvar hücrelerde TNF, IL-1 ve IFN- γ 'yi içeren proinflamatuvar sitokinlerin aşırı salınımı meydana gelir (Watkins ve ark., 2011). Sepsiste ilk başta proinflamatuvar uyarımların gerçekleşmesi olumlu bir durumken bu sürecin uzaması ve aşırı sitokin ekspresyonu olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Sitokin fırtınası olarak ta adlandırılan aşırı sitokin salınımı durdurulamadığı zaman ise hücre ve organlarda hasarlar meydana gelmektedir (Khoo ve ark., 2011). Latent faz ise sepsisin sebep olduğu oksidatif stres ve sitokin fırtınasının sonucu olarak ortaya çıkan, organ disfonksiyonlarının ve çoklu organ yetmezliği sendromlarının gözlemlendiği, ölüme kadar giden süreçtir (Watkins ve ark., 2011).

Center for Disease Control (CDC)'ün yayınladığı son rapora göre sepsisin yıllık olarak yaklaşık 1,5 milyon kişiyi etkilediği, 250.000 kişinin ölümüne neden olduğu ve hastanede yatan hastaların üçte birinin ölümünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Hajj ve ark., 2018).

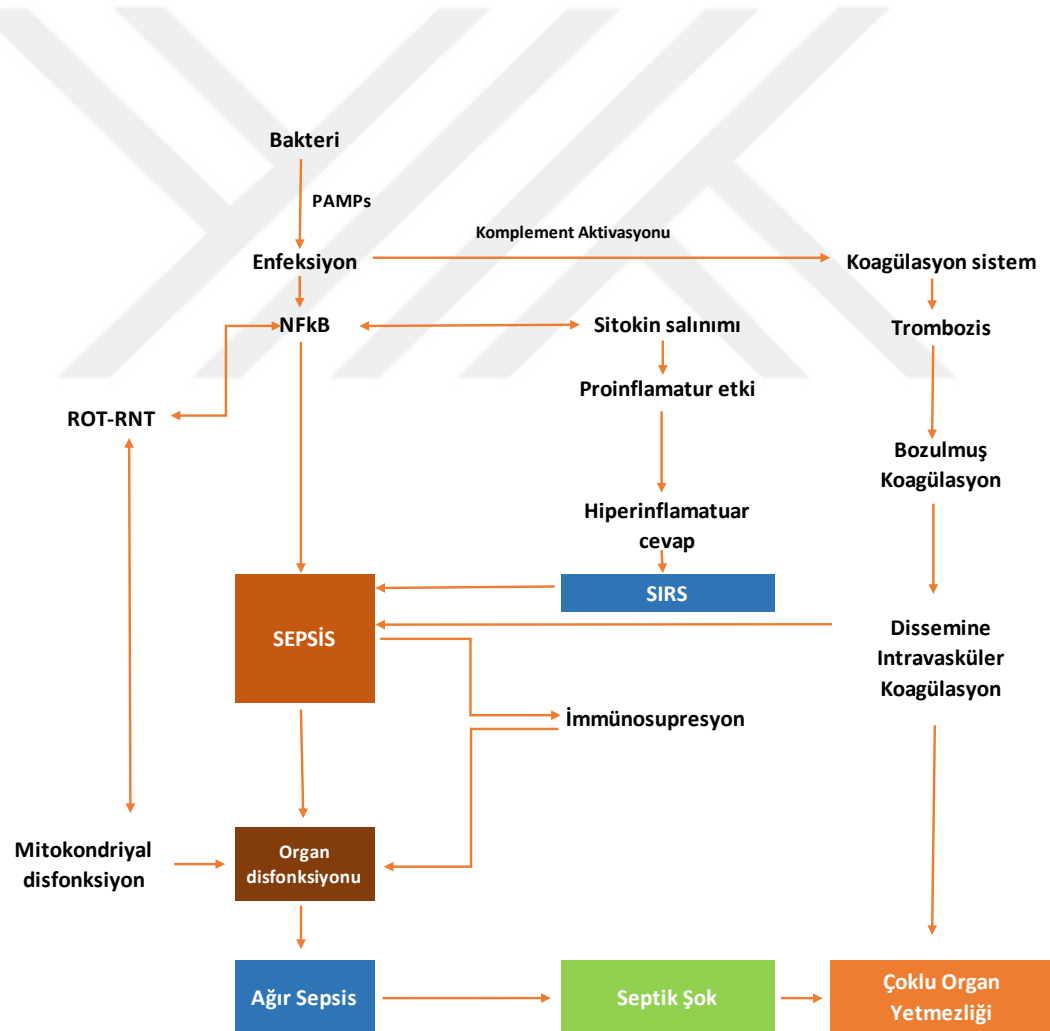
1.2.1. Sepsisin Mekanizması

Sepsiste, makrofajlar, nötrofiller, endotelial ve epitelyal hücreler gibi çeşitli hücreler aktive olurlar. Bu hücrelerin aktivasyonu sonucu sitokinler, kemokinler, trombosit aktive edici faktör, kompleman prostanoitler ve proteazlar dahil olmak üzere bir dizi mediyatörün salınmasına neden olabilir. Bu olaylar dizisi, ROT salınımı ile immün hücre aktivasyonuna yol açar. Bu inflamatuvar mediyatörler patojenleri yok etmek için önemlidir, ancak yanıt aşırı uyarılırsa, organlarda sistemik enfeksiyona neden olabilir ve bu ölüme yol açabilir (Victor ve ark., 2004; Hotchkiss ve ark., 2016).

Sepsise ilk olarak tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 (IL-1) interlökin-6 (IL-6), interferon-gama (IFN- γ) gibi proinflamatuvar sitokinlerin aşırı derecede salgılanarak sitokin fırtınası oluşturması sebep olur. (Victor ve ark., 2005). Bu sitokinlerin salınımının neden olduğu aşırı NO ve ROT salınımının önce septik şok,

sonrasında ise çoklu organ yetmezliği ile sepsis patogenezi tamamlanır (Gyawali ve ark., 2019).

Proinflamatuvar (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IFNy, PAF) ve antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-10) dengesi NF-kB'nin aktivasyonunu düzenler. Denge bozulduğunda ve proinflamatuvar mediyatörlerin salınması aşırı ve uzun sürdüğünde, aşırı inflamatuvar bir yanıt oluşur ve bu yanıt lokal sınırları aştığında SIRS ortaya çıkar ve bu süreç devamında sepsise yol açar. Bunun yanında proinflamatuvar sitokinler aktif makrofajlar ve nötrofillerdeki apoptoz sürecini uzatabilir, böylece inflamatuvar yanıtı artırır ve çoklu organ yetmezliğinin gelişmesine neden olur (Vera ve ark., 2015; Gyawali ve ark., 2019).



Şekil 4. Sepsis fizyopatolojisi (Vera ve ark., 2015).

Sepsis sırasında endotel hücreler, ilk inflamatuvar yanıtın olduğu hücrelerdir. Hücreler arası ve vasküler hücre adhezyon moleküllerinin etkisi ile proinflamatuvar sitokinlerin üretimi arttırılır. Ayrıca enfeksiyon ile salınan kemokinler ve adezyon molekülleri tarafından aktive edilen lökositlerin aktivasyonu, proteazlar, sitotoksik enzimler ve NO gibi reaktif oksijen ve azot türlerinin çevre dokulara yayılmasına sebep olur. Böylece lökositlerin artan aktivasyonu ile endotelial ve vasküler düz hücre yaralanmalarına sebep olan oksidatif stres gelişir (Vera ve ark., 2015).

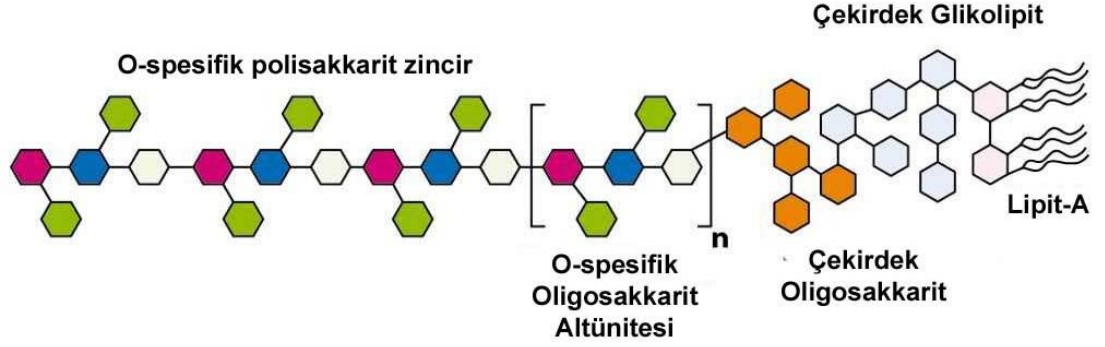
Sepsis patogeneğinde inflamatuvar aktivasyon kadar koagülasyon yollarının aktivasyonu da önem arzeder. Sepsis sırasında, LPS ve ekzotoksinler gibi patojen ilişkili moleküler yapılar nedeniyle salınan proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler, koagülasyon sistemini aktive edebilir ve önemli fizyolojik antikoagülan mekanizmaları baskılar. Bu durum ise pıhtılaşma aktivasyonunun ve bunun sonucu olarak mikrovasküler trombozisin gelişmesine neden olur. Ardından ise çoklu organ yetmezliğine ve sonucunda ölüme kadar varabilecek Dissemine İntravasküler Koagülasyon (DIK) tablosu ortaya çıkar (Tsao ve ark., 2015).

1.2.2. Bakteriyel LPS

Gram-negatif bakteriler sitoplazmik bileşenleri çevreleyen bir iç zar ve hücreyi ortamından ayıran bir dış zar olmak üzere iki membrana sahiptirler. Gram negatif bakterilerde dış zar, çevresel tehditlere karşı ilk savunma hattı olarak görev yapar. Birçok biyolojik zarın aksine, çoğu Gram-negatif bakterinin dış zarı fosfolipit tabakası şeklinde değildir. Bunun yerine iç katman fosfolipid yapıda iken dış katmanda LPS molekülleri içermektedir. LPS'nin yapısı bakteriler arasında değişebilse de, tüm durumlarda bu glikolipid, dış membranın büyük bir kısmını doldurur ve hücreyi antibiyotikler ve safra tuzları gibi toksik moleküllerin girişinden koruyan bir bariyer oluşturur (Bertani, 2018). LPS, enterik bakterilerin tüm dış zarının yaklaşık % 75'ini oluşturur ve her bir bakteri hücre duvarında 4 milyon LPS molekülü bulunur (Opal, 2010).

LPS yapısında bir hidrofobik lipid A alanı, her serotip için farklı antijenik özellik gösteren bir oligosakkarit zinciri ve O-antijen polisakaritinden oluşur (Cavaillon ve ark., 1998; Chiariotti ve ark., 2016). LPS, enterik bakterilerin tüm dış

zarının yaklaşık % 75'ini oluşturur ve her bakteri hücre duvarında 4 milyon LPS molekülü bulunur ve dolaşımdaki LPS güçlü bir sistemik inflamatuvar yanıtı tetiklenmesine neden olur (Opal, 2010).



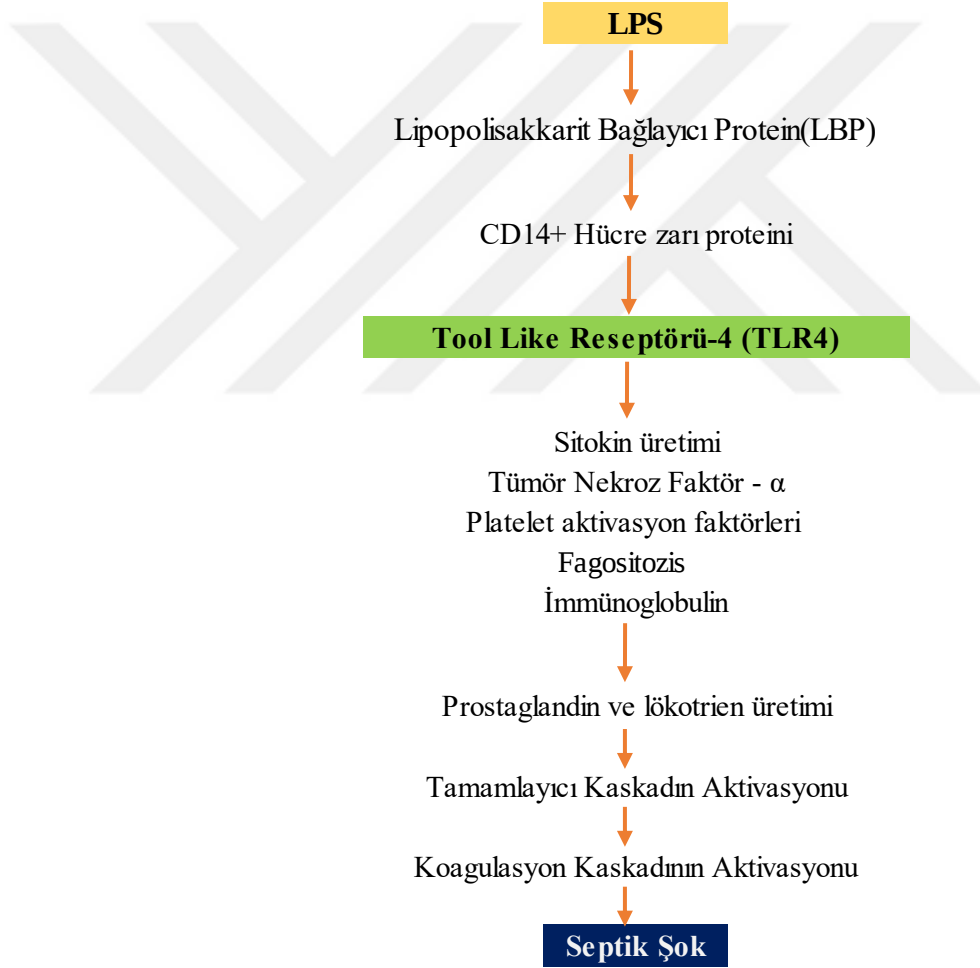
Şekil 5. LPS'nin molekül yapısı (Sun ve Shang, 2015)

Gram-negatif bakteri hücre duvarı bileşenlerinden olan LPS sepsis için en bilinen ve en çok çalışılan ajanların başında gelmektedir. Gram-pozitif bakterilerde ise endotoksin bulunmaz. Fakat bu bakterilerin hücre duvarlarında da hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanma yeteneğine sahip peptidoglikan ve lipoteikoik asit bulunur. Bu yapılarda inflamasyonu arttırıcı etki gösterirler (Yorgancı, 2005).

Septik şok çalışmalarında 026:B6, O55:B5, O111:B4 gibi çeşitli serotiplere sahip E.coli'den elde edilen LPS'ler kullanılmaktadır. Toz halindeki LPS deneysel çalışma protokollerine göre suda çözünerek deney hayvanlarına periton veya damar içine uygulanmaktadır (Leclerc ve ark., 2000; Iskit ve Guc, 2001; Soromou ve ark., 2014).

Saflaştırılmış LPS'nin deneysel hayvanlara enjekte edilmesi sonucu ateş, dissemine intravasküler koagülasyon, hipotansiyon, şok ve ölüm gibi durumlar gelişmektedir. Minimum endotoksin dozu bile çoğu memelide ölümle sonuçlanır. Olayların sırası; gizli dönem, fizyolojik stres dönemi (ishal, halsizlik, şok) ve ölüm şeklinde sıralanmaktadır. Ölümün ne zaman gerçekleşeceği endotoksinin dozu, uygulama şekli ve hayvan türüne göre değişir. Hayvanların endotoksine duyarlılıklarında farklılıklar bulunmaktadır (Sampath, 2018).

LPS uygulamasının ardından lipopolisakkarit bağlayıcı protein (LBP), CD14 ve Toll benzeri reseptörler (TLR), enfeksiyonu kontrol altında tutmak için çok önemli olan anti-inflamatuvar cevabı tetiklemektedirler. LPS'nin LBP ile oluşturduğu kompleks, TLR4 reseptörüne bağlanarak inflamatuvar yanıtın oluşmasını sağlar. Yine LPS-LBP kompleksi membran CD14 reseptörüne bağlanarak monosit ve endotel hücre aktivasyonu ile enfeksiyona cevap verir (Heumann ve Roger, 2002). Bakteri hücre duvarında bulunan antijenik yapılar ve toksinler, endotel hücreler olmak üzere bir çok hücreden çeşitli mediyatörlerin salınımını başlatırlar (Gyawali ve ark., 2019).



Şekil 6. Lipopolisakkarit sinyalleri ve yüksek organizmada immün aktivasyon mekanizması (Sampath, 2018)

1.3. Antioksidan Sistem

Reaktif oksijen türleri ve RNT'ni temizleyen ve bu türleri üreten enzimleri inhibe eden bu şekilde oksidatif hasarın yayılmasını önleyen maddelere antioksidanlar denir. Normal metabolik olaylar ve hastalıklar nedeniyle vücutta sürekli üretilen ROT'a karşı hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar aktif olarak savunma sisteminde rol alırlar. ROT üretimi kontrol edilmediğinde biyolojik sistemlerde hücresel lipid, protein ve DNA hasarı ortaya çıkar (Victor ve ark., 2005; Yeum ve ark., 2004). Canlı organizmalarda, oksidatif hasarın önüne geçilmesi veya yavaşlatılmasını sağlayan koruyucu mekanizmalara antioksidan sistem denir. Oksidanlara karşı korunma, ortaya çıkan radikallerin detoksifikasyonu, radikal reaksiyonların sonlandırılması ve radikal oluşumunun önüne geçilmesi şeklinde gerçekleşir (Bonner ve Arbiser, 2015).

Antioksidan savunmanın, elektrofilik ksenobiyotiklerin detoksifikasyonu, redoks sinyal iletiminin modülasyonu, sistein depolanması ve taşınması, hücre çoğalmasının, immün yanıtların ve deoksiribonükleotid sentezinin düzenlenmesi olmak üzere birçok rolü vardır (Kerksick ve Willoughby, 2005; Lu, 2013).

Oksidatif stres, kanser, artrit, immün bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi rahatsızlıkların gelişiminde büyük rol oynamaktadır. İnsan vücudunun, antioksidan üretmek veya diyetle dışarıdan almak suretiyle oksidatif strese karşı geliştirdiği çeşitli mekanizmalar vardır. Vücutta serbest radikalleri temizleyen birkaç enzim sistemi olmasına rağmen, E vitamini (α - tokoferol), C vitamini (askorbik asit) ve β -karoten gibi antioksidan vitaminler dışarıdan alınarak antioksidan sistem güçlendirilir. Vücut tarafından üretilmediği için bunların diyetle alınmaları gerekir (Lobo ve ark., 2010). Vücutta sentezlenen antioksidanlara endojen antioksidanlar, dışarıdan diyetle alınan antioksidanlara ise eksojen antioksidanlar denir. Endojen ve eksojen antioksidanların her ikisi de ROT'un neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesinde veya onarılmasında görev alırlar (Valko ve ark., 2006).

Organizmada sentezlenen antioksidanlar yapılarına göre enzimatik ve nonenzimatik olarak sınıflandırılmaktadır. Enzimatik antioksidanlara örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GR),

glutatiyon-S-transferaz (GST) ve katalaz (KAT) sayılabilir. Enzimatik olmayan antioksidanlara ise A (karotenoidler), C (askorbik asit), E (tokoferoller) vitaminleri, melatonin, redükte glutatiyon (GSH), flavanoidler, ürik asit, albumin ve bilirubin örnek olarak verilebilir (Pham-Huy ve ark., 2008).

Antioksidan sistemde ilk savunma mekanizması serbest radikallerin oluşumunu baskılayan koruyucu antioksidanlardır. Bu mekanizma tam olarak açıklanamamış olsa da genel olarak metal indüklü ayrışmalar sonucu ortaya çıkan peroksit radikallerinin GSH-Px, GST ve KAT gibi enzimler yardımıyla alkole ve suya indirgendiği antioksidan savunmadır. İkinci savunma mekanizması, zincir reaksiyonlarını daha başlamadan baskılayan veya başlayan zincir reaksiyonlarını kırarak reaksiyonları engelleyen antioksidanlardır. Bazıları hidrofilik, bazıları ise lipofilik olan çeşitli radikal temizleyici antioksidanlar vardır. Bunlardan C vitamini, ürik asit, bilirubin, albümin ve tiyoller hidrofilik gruba girerken, E vitamini ve ubikinol ise lipofilik radikal temizleyici antioksidanlar grubunda yer alırlar. Bunlardan E vitamini, bilinen en güçlü radikal temizleyici lipofilik antioksidan olarak kabul edilir. Üçüncü savunma mekanizması, onarım ve *de novo* antioksidanlarıdır. Sitozolde ve memeli hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan proteolitik enzimler, proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar bu sınıfa girer. Oksidatif hasara uğrayan proteinleri tanır ve uzaklaştırarak okside proteinlerin birikmesini önler. DNA tamir sistemleri de ayrıca antioksidan savunma sisteminde oksidatif hasara karşı önemli bir rol oynamaktadır. Glikosilazlar ve nükleazlar gibi çeşitli enzimler hasarlı DNA'ları tamir ederek antioksidan savunmaya destek olurlar (Lobo ve ark., 2010).

1.3.1. Redükte Glutatiyon

Redükte glutatiyon, sırasıyla γ -glutamil sistein sentetaz ve glutatiyon sentetaz enzimleri ile katalize edilen ardışık iki reaksiyonla glutamat, sistein ve glisin adı verilen üç prekürsör amino asitten sentezlenen bir antioksidandır. GSH, GSH-Px ile peroksitlerin detoksifikasyonunda serbest radikallerle reaksiyona girerek bir elektron donörü olarak davranır. Bu reaksiyon sonucunda GSH, okside glutatiyon (GSSG)'a dönüşürken, indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) sayesinde glutatiyon redüktaz (GR) tarafından tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH, hücre dışına

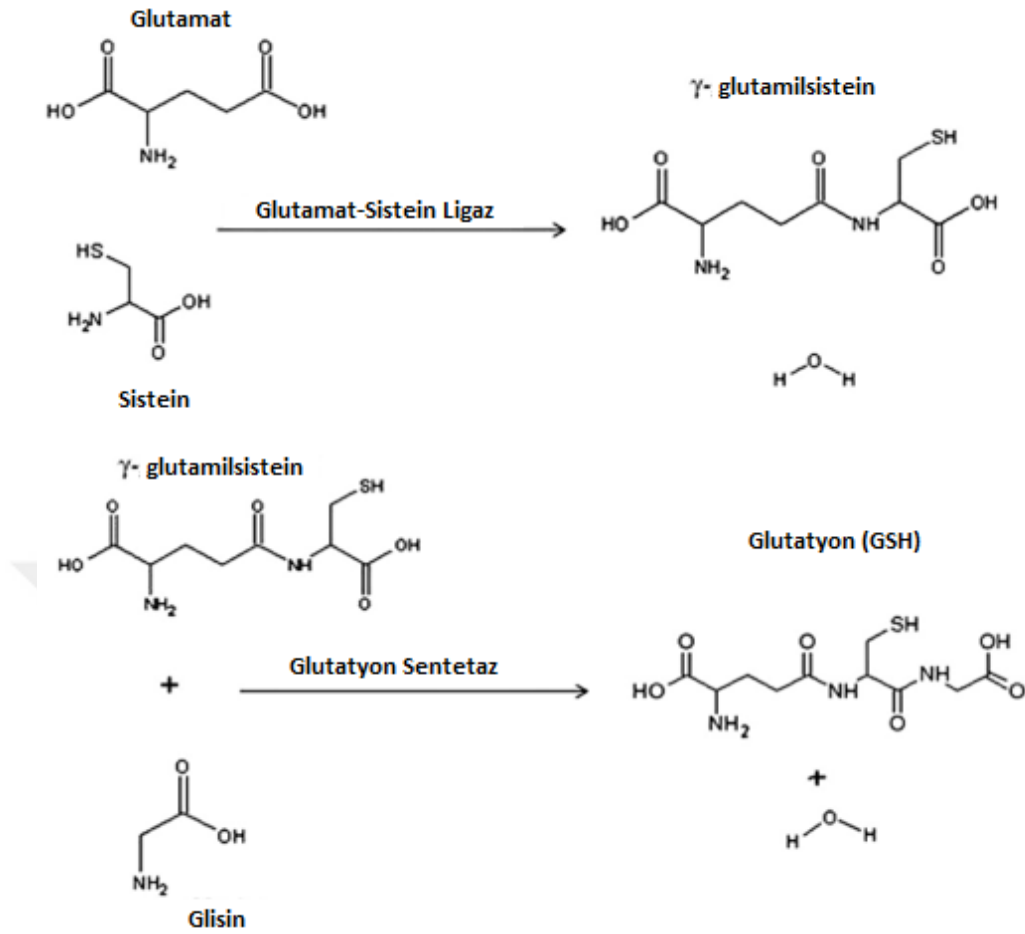
salındığında ise kendisini oluşturan aminoasitlere metabolize edilir (Morris ve ark., 2013; Carvalho ve ark., 2014).

GSH, protein yapılarının stabilizasyonu, katlanması, DNA transkripsiyon faktörünün bağlanması ve redoks reaksiyonları sonucu oluşan H_2O_2 'nin temizlenmesinde görev alır. Hücresel GSH'nin çoğu (% 85-90) sitozolde bulunur. GSH redoks döngüsünde yer alan GSH-Px ve GST için birincil bir substrattır (Ithayaraja, 2011).

Bir tripeptit tiyol olan GSH, sayısız biyolojik fonksiyona sahip sülfhidril bileşiğidir. Bu tiyol, eksojen ve endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda ve hücre içi redoks durumunu korumada önemli bir rol oynar. Karaciğerde sentezlenen ve başlıca görevi hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşümünü engellemek olan GSH, proteinlerdeki sülfhidril gruplarını indirgenmiş halde tutarak bu grupları oksidasyona karşı korur. Bu sayede proteinlerin ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller (Kerksick ve Willoughby, 2005). Hayvansal dokularda, selenyum içeren antioksidan bir enzim olan GSH-Px, GSH'ı GSSG'ye dönüştürerek hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin indirgenmesine aracılık eder. Buna karşılık, GSSG, esas olarak pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH varlığında GR ile azaltılır (Adeoye ve ark., 2018).

GSH çok sayıda hücresel süreçte önemli bir rol oynar ve eksikliği, kardiyovasküler, bağışıklık, yaşlanma hastalıkları ve diyabet dahil olmak üzere bir dizi hastalığın etiolojisi ve ilerlemesinde rol oynar. GSH, oksijen radikallerinin ve ilaçların detoksifikasyonunda rol oynayan birçok enzimin substratıdır. GSH eksikliği, insülin direnci ve diyabet de dahil olmak üzere kronik hastalıkların ilerlemesinde etkilidir (Jain ve Micinski, 2013).

Çekirdekteki GSH, DNA onarımı ve ekspresyonu için gerekli olan kritik protein sülfidrillerin redoks durumunu korur. Oksitlenmiş glutatyon, hücrelerin içinde biriktirilir ve GSH/GSSG oranı, bir organizmanın oksidatif stresinin iyi bir ölçüsüdür. Çok yüksek GSSG konsantrasyonu oksidatif olarak birçok enzime zarar verir (Valko ve ark., 2007).



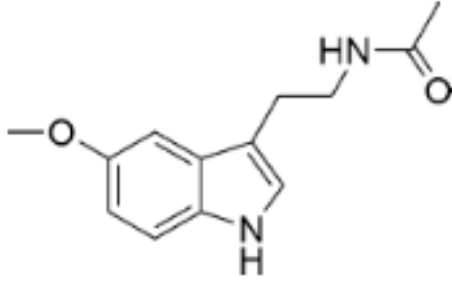
Şekil 7. Glutamattan GSH sentezi (Morris ve ark., 2013).

1.3.2. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak 1956'da pineal bezden izole edilmiş ve kısa bir süre sonra yapısı tam olarak tespit edilmiştir. Melatonin esas olarak pineal bez tarafından üretilse de, retina, serebellum, cilt, yumurtalık, karaciğer, pankreas, böbrekler gibi birkaç ekstra pineal organda da bulunmaktadır. Melatonin uyku ve sirkadiyen ritim düzenleme, immünoregülasyon, antioksidan ve mitokondriyal koruyucu fonksiyonlar, üreme kontrolü ve ruh halinin düzenlenmesinde önemli bir fizyolojik rol oynar (Srinivasan ve ark., 2010). Bunların dışında melatoninin bir antioksidan gibi davrandığını, reaktif oksijen türleri ve lipid peroksidasyon ürünlerini temizleme kapasitesinin olduğunu gösteren çalışmalar artmaktadır (Taysi ve ark., 2003; Longoni ve ark., 2017).

Vücutta geniş ölçüde dağılmış olması, yeterli konsantrasyonda bulunması, hem yağda hem suda iyi çözünebilmesi nedeniyle hücrel membranlar arasında kolayca taşınır olabilmesi, minimal toksisiteye sahip olması, metabolitlerinin de antioksidan olarak davranması melatoninin iyi bir serbest radikal temizleyicisi olduğunu göstermektedir (Galano ve ark., 2011).

Hayvanların sabit ışığa maruz bırakılarak endojen melatonin döngüsünün engellenmesiyle melatoninin fizyolojik seviyelerinde meydana gelen değişiklik antioksidan enzim aktivitesinde azalma, melatoninin bir antioksidan olarak kabul edilme fikrini desteklemektedir (Rodriguez ve ark., 2004).



Şekil 8. Melatoninin molekül yapısı (Srinivasan ve ark., 2010).

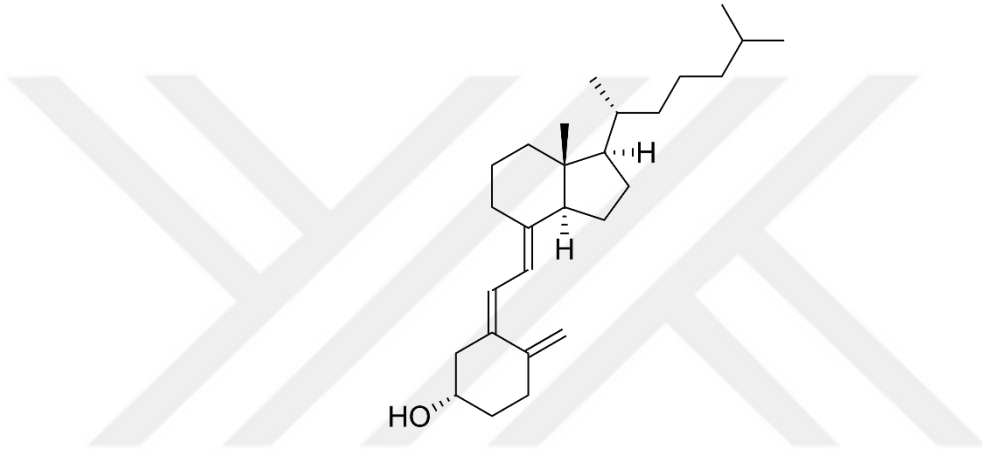
Melatoninin çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonlarla mücadele ettiği için sepsis hayvan modellerinde de etkili bir anti-inflamatuar ajandır. Anti-inflamatuar etkisiyle, nitrik oksit sentazın inhibe edilmesine neden olmakta ve çeşitli antioksidan enzimlerin uyarılmasına katkıda bulunmaktadır. Melatonin ayrıca antioksidan savunmada, mitokondriyal fonksiyonlarda ve apoptozu önlemede koruyucu etkiler gösterdiği için antiapoptotik bir molekül olduğu kabul edilmektedir (Srinivasan ve ark., 2010). Septik şok hayvan modellerinde melatoninin hücrel hasarı ve çoklu organ yetmezliğini durdurmak için faydalı etkiler gösterdiği, septik şok semptomlarının tersine çevrilmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (Escames ve ark., 2006).

Ratlarda LPS kaynaklı çoklu organ fonksiyon bozukluğu sendromunda melatoninin akciğer ve karaciğerde NOS'ı inhibe ederek NO oluşumunu engellediği gösterilmiştir (Crespo ve ark., 2018).

1.3.3. D Vitamini

1.3.3.1. Yapısı

D vitamini, başlıca kemik-mineral metabolizmasında önemli rolü olan, bunun dışında immuniteden psikiyatrik hastalıklara kadar etkileri olduğu bilinen, güneş ışığı ile deride 7-dehidrokolesterolden (7-DHC) sentezlenen, yağda eriyen hormon benzeri bir vitamindir (Wagner ve Greer, 2008; Wacker ve Holiack, 2013; Sara ve ark., 2014; Gil ve ark., 2018).



Şekil 9. D3 Vitamininin moleküler yapısı (Gil ve ark., 2018).

D vitamininin, kimyasal olarak ergokalsiferolün lumisterol ile oluşturduğu moleküler bir bileşik olan D1, besinlerle alınan ergokalsiferol (D2), deride UVB ışını ile 7-dehidrokolesterolden sentezlenen kolekalsiferol (D3), 22-dihidroergokalsiferol (D4) ve sentetik olarak 7-dehidrositosterolden üretilen sitokalsiferol (D5) olmak üzere beş formu bulunmaktadır (Nair ve Maseeh, 2012; Sara ve ark., 2014).

D3 vitamini, insan derisinde sentezlenir ve çoğunlukla balık yağları olmak üzere hayvansal gıdalardan alınırken, D2 vitamini ise bitkisel kaynaklıdır. D vitaminin D2 ve D3 formları yalnızca yan zincir yapılarında farklılık gösterir. Farklılıklar metabolizmayı etkilemez ve her iki form da prohormon fonksiyonuna sahiptir (Gil ve ark., 2018).

Dolaşımdaki D vitamini formu olan $1\alpha,25$ -dihidroksivitamin D3 ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)'ün yarı ömrü 4-15 saat aralığındayken, 25OHD_3 'ün yarı ömrü 21-30

gün aralığındadır (Fraser ve Milan, 2013). Bu yüzden ister güneş ışığından ister diyetle alınmış olsun 25OHD₃, plazma D vitamini seviyesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. Biyolojik olarak aktif formu olan 1 α ,25(OH)₂D₃'ün dolaşımdaki düzeyi 25OHD₃'e göre yaklaşık 1000 kat düşüktür (Wacker ve Holick, 2013). 25OHD₃ nanomol/l iken, 1 α ,25(OH)₂D₃ picomol/l düzeyinde bulunur (Fraser ve Milan, 2013). Vitamin D düzeyinin kontrolü için hem eksojen alımı hemde endojen yapımı gösteren 25OHD düzeyine bakılmaktadır (Bouillon, 2017).

D vitamini eksikliği çoğu zaman asemptomatiktir. Bunun yanında, genel zayıflık, yorgunluk, kas ağrıları, kas fasikülasyonları, osteoporoz, osteomalazi ve depresyon gibi belirtiler D vitamini eksikliğini akla getirmelidir. Çocuklarda ise sinirlilik, uyuşukluk, gelişimsel gecikme, kemik değişiklikleri veya kırıklar D vitamini eksikliğinin diğer önemli belirtileridir. D vitamini eksikliğinin şiddeti hafif, orta ve ağır olarak sınıflandırılmıştır. 20 ng/mL'den düşük 25OHD seviyeleri eksiklik olarak kabul edilirken, 5 ng/mL'den daha düşük 25OHD seviyesi ciddi derecede eksiklik, 5-10 ng/mL aralığı orta derece, 10-20 ng/mL aralığı hafif şiddette eksiklik olarak kabul edilir (Gani ve How, 2015).

Tablo 2. D vitamini düzeyleri (Gani ve How, 2015).

25OHD (ng/mL)	Durum
< 5 ng/ml	Ciddi derecede eksiklik
5 - 10 ng/ml	Orta derecede eksiklik
10 - 20 ng/ml	Hafif şiddette eksiklik
20 - 29 ng/ml	Yetersizlik
> 30 ng/ml	Normal
>100 ng/ml	Aşırı
>150 ng/ml	İntoksikasyon

Kemirgenlerde ise D vitamini değerleri insanlara göre hem farklılık göstermekte hem de daha geniş bir aralıkta seyretmektedir. Örneğin tavşanlarda bazal değerler yaklaşık 30 ila 70 ng/ml aralığında değişmektedir (Brommage ve ark., 1988).

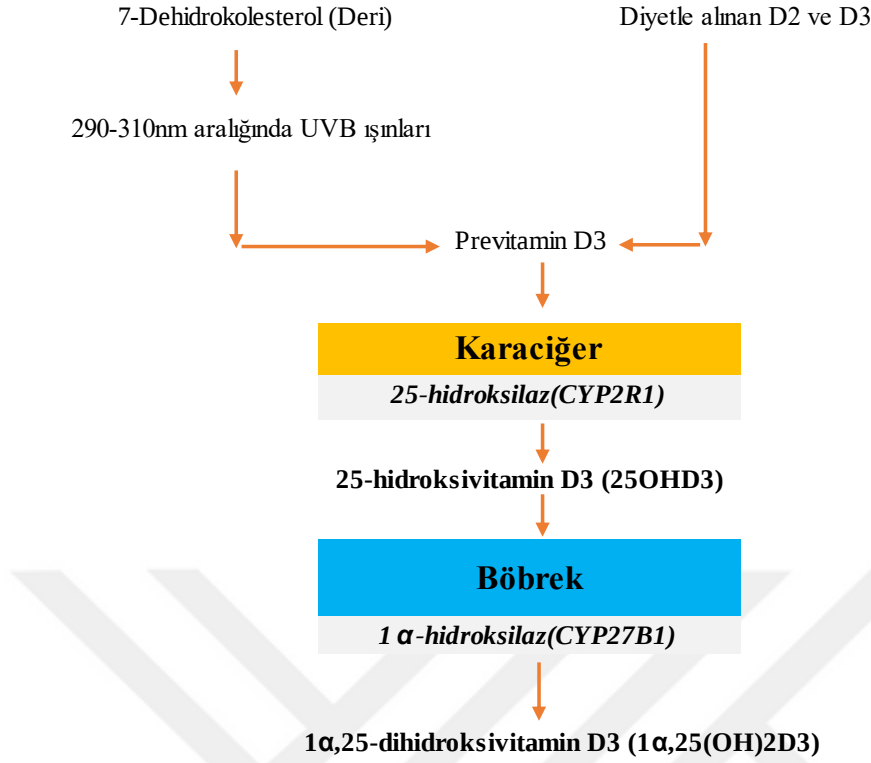
D vitamini yetersizliği olan kişilerde intestinal kalsiyum emiliminin azalmasıyla iyonize kalsiyum düzeylerinde düşme gözlenirken, parathormon (PTH) sentezi ve salınımı ise artar. PTH salınımı ile beraber böbrekte Ca'un geri emilimi artarken, 25(OH)D₃'ün hidroksilasyonu da hızlanır. Böylece D vitamini düzeylerinde bir eksiklik olsa bile PTH salınımından kaynaklı 1 α ,25(OH)₂D₃ değerleri normal düzeylerde bulunacaktır. Bu yüzden D vitamini düzeylerinin tespitinde 1 α ,25(OH)₂D₃ değerlerine bakmak doğru sonuçlar vermeyecektir (Öngen ve ark., 2008).

1.3.3.2. Metabolizması

UVB ışınları (290-320nm), deri altı yağ dokusunda bulunan 7-DHC'den D₃ vitamininin kutanöz sentezini uyarır. Sentezlenen D₃ vitamininin dolaşıma girmesinden itibaren birkaç saat içinde karaciğere taşınır. Karaciğere taşınan prekalsiferol, bir sitokrom P450 enzimi olan 25-hidroksilaz (CYP2R1) tarafından hızla hidroksile edilerek 25OHD₃'e dönüştürülür. Sentezlenen 25OHD₃ D vitamini bağlayıcı protein (VDBP)'e bağlanarak kana geçer ve böbreğe taşınır. Böbrekte 1 α -hidroksilaz (CYP27B1) enzimi ile tekrar hidroksile edilerek D vitamininin fonksiyonel olan, aynı zamanda hormonal olarak ta aktif formu olan 1 α ,25(OH)₂D₃ meydana gelmiş olur (Wei ve Christakos, 2015; Caccamo ve ark., 2018; Gil ve ark., 2018; Takeuti, 2018).

Besinlerle alınan ergosterol ise ilk olarak deri altlarına taşınır. Derinin Stratum Bazal ve Stratum Spinozum tabakalarında ergokalsiferole çevrilerek miçel yapısına katılıp enterositler tarafından absorbe edilir. Daha sonra şilomikronlara bağlanarak kana karışır ve karaciğere taşınır (Prosser ve Jones, 2004).

1 α -hidroksilaz ağırlıklı olarak böbrekte olmak üzere bağırsak, pankreas, prostat ve bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere birçok hücre tipinde de eksprese edilen bir enzimdir (Wei ve Christakos, 2015). Bu böbrek yetmezliği olan hastalarda dolaşımdaki düşük 1 α ,25(OH)₂D₃ seviyelerinin regüle edilmesi için önemlidir (Zittermann, 2003).

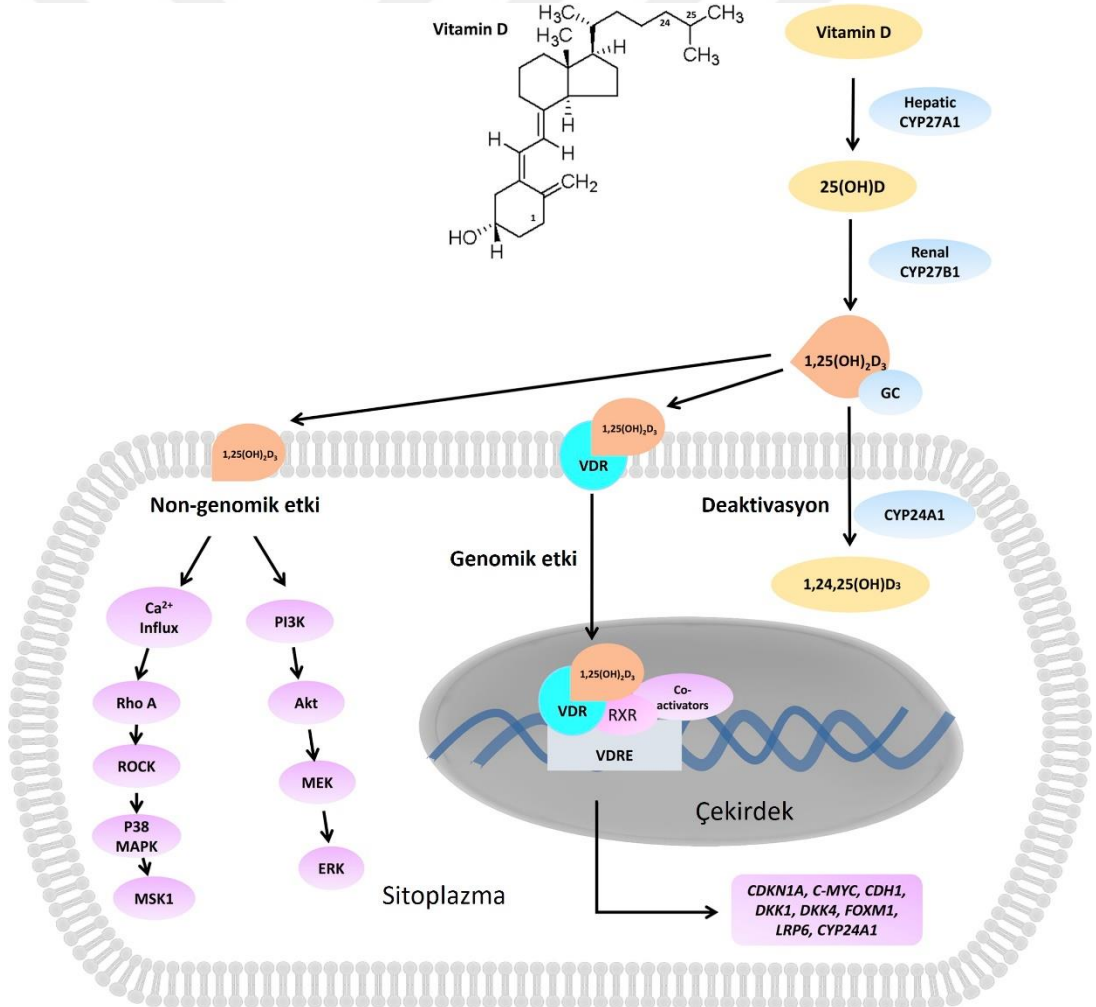


Şekil 10. D vitamininin aktivasyonu (Bordelon ve ark., 2009).

1 α -hidroksilaz'ın dışında 24-hidroksilaz (CYP24A1) ise kemik hücrelerinde D vitamini metabolizmasının otokrin aktivitelerinde rol alan başlıca enzimlerinden birisidir. 24-hidroksilaz'ın Vitamin D Reseptörü (VDR) aracılı transkripsiyonel regülasyonu klasik endokrin negatif feed back döngüsüyle, hedef dokularda 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün aktivitesinin inhibe edilmesini sağlarken, 25OHD $_3$ 'ü 24.C'undan hidroksile edip 24,25(OH) $_2$ D $_3$ 'e de dönüştürerek katabolik süreçlere katılır. (Wei ve Christakos, 2015; Anderson ve Anderson, 2017).

Vitaminin D $_3$ 'ün karaciğere taşınarak 25OHD $_3$ 'e dönüştürülmesi, oradan böbreğe taşınarak 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 'e dönüştürülmesi ve 1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ün böbrekten hedef hücreye taşınması, plazma D vitamini bağlayıcı protein (VDBP) tarafından gerçekleştirilir. 600-kDa ağırlıklı transmembran proteini ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör süper ailesinin bir üyesi olan VDBP epitelyal hücrelerde 25OHD $_3$ 'ü bağlayarak hücre yüzey reseptörü olarak görev yapar. D vitamini metabolitleri dolaşımında esas olarak VDBP'ye ve az oranda da (%1'den az), serbest formda dolaşan albumin ve lipoproteinlere bağlanarak hareket eder (Prosser ve Jones, 2004; Pilz ve ark., 2019).

D vitamininin genomik etkilerine nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan nükleer VDR (VDRn) aracılık eder. VDBP ile hedef hücreye ulaşan ve difüzyonla hücre içine alınan $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ daha sonra sitoplazmada bulunan VDR'ne bağlanır. $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün VDR'ne bağlanması ile aktive olan Retinoid X Reseptörü (RXR) de, VDR-Ligand kompleksine bağlanarak VDR-Ligand-RXR kompleksine dönüşür. Bu kompleks sitoplazmadan nükleusa geçerek DNA'nın VDRE olarak adlandırılan promotör sekanslarına bağlanır. Bu etkileşim sonucu oluşan kompleks, spesifik haberci RNA'nın uyarılması veya inhibe edilmesi ile sonuçlanan genetik bir transkripsiyonu uyarır. Oluşan üçlü kompleks osteokalsin, 24-hidroksilaz gibi bazı genlerin transkripsiyonunu arttırırken inflamatuvar genler gibi bazılarını ise azaltır (Christakos ve ark., 2016; Zafalon ve ark., 2020).

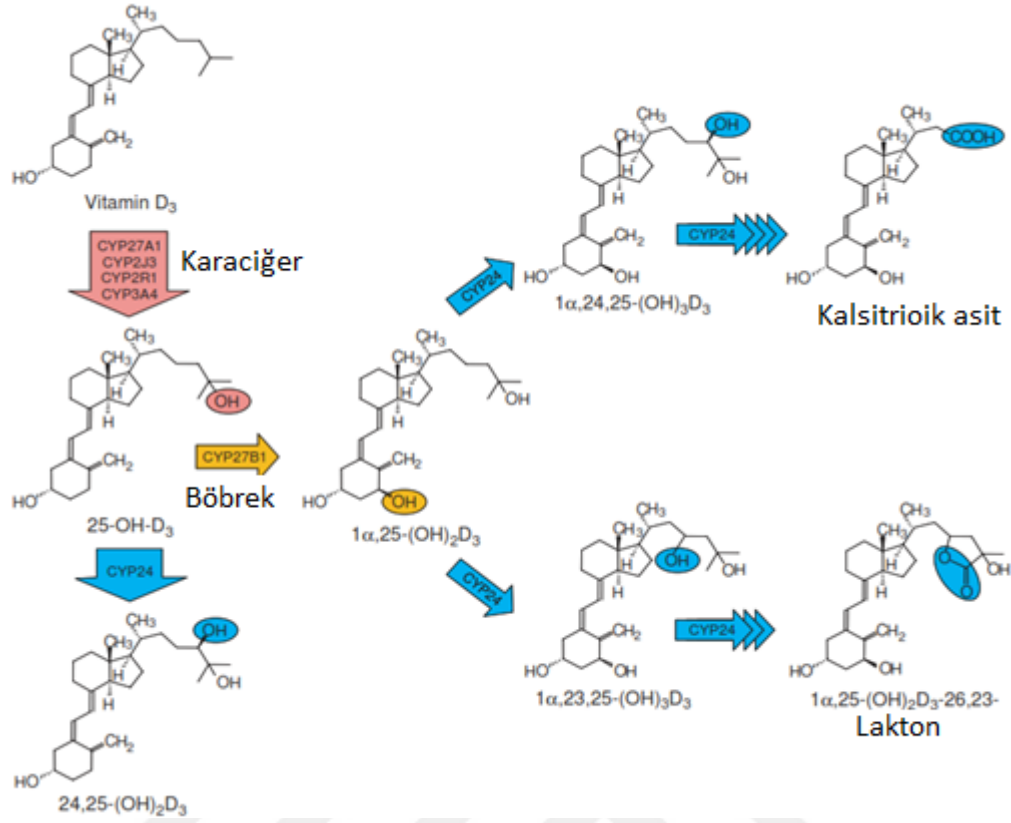


Şekil 10. D vitamininin genomik ve non-genomik etki mekanizması (Wu ve ark., 2019).

Non-genomik yolakta ise D vitamini, hücre yüzeyinde bulunan VDR'ne bağlanarak sitoplazma içindeki sekonder mesaj yolaklarını aktive eder. Non-genomik yolağın daha aktif olduğu hücreler, pankreas β hücreleri, düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri ve monositlerdir (Hii ve Ferrante, 2016).

$1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyinin regülasyonu 1α -hidroksilaz ve 24-hidroksilaz aktiviteleri arasındaki dengeye bağlıdır. Her iki enzim de serumdaki kalsiyum, kalsitriol ve fosfat seviyeleri ile ilişkili olarak düzenlenir. Düşük serum kalsiyum veya D vitamini seviyelerinde, paratiroid bezleri tarafından salgılanan PTH, 1α -hidroksilaz sentezini uyarak $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ aktivasyonunun artmasına neden olur (Adams ve ark., 2007; Gil ve ark., 2018).

D3 vitamini ve başlıca metabolitleri üç şekilde düzenlenir. Bunlardan ilki D3 vitamininin aktivasyonu için gerçekleşen hidroksilasyon işlemi iken diğer ikisi katabolik süreçlerdir. D3 Vitamini, C-23 ve C-24 oksidasyon yolu ile kalsitroik asit ya da $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3-26,23$ -lakton'a dönüştürülerek katabolize edilir (Prosser ve Jones, 2004). Oksidasyonda, 24-hidroksilasyonu takiben oluşan $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, inaktif ve daha polar bir molekül olduğundan safra yoluyla ve böbreklerden hızla ve kolayca atılabilir hale gelmiş olur. Bazen de vitaminin glukuronik asit ile konjugasyonu ile devam eden bir süreç sonrasında safra yoluyla atılabilecek metabolitler oluşur (Gil ve ark., 2018). Kısacası D vitamini katabolizması, 24-hidroksilasyon ile başlayıp nihayetinde safra ve idrarla atılan bir süreçtir (Pilz ve ark., 2019).



Şekil 11. D vitamini aktivasyon ve inaktivasyon yolları (Prosser ve Jones, 2004; Wei ve Christakos, 2015).

1.3.3.3. Kaynakları

D vitamini, UVB'ye bağlı endojen üretim, diyetle alım ve takviye ürünlerle alım olmak üzere üç potansiyel kaynaktan elde edilebilir. Bu kaynaklar arasından % 90-95 kadarı UVB'ye bağlı olarak deride sentezlenen endojen üretim mekanizmasından sağlanır (Izadpanah ve Khalili, 2013).

Günde 15 ila 20 dakika güneş ışınlarının dik olarak geldiği 11:00-15:00 saatleri arasında açık havada UVB ışınına maruz kalan tüm vücut 250 µg D vitamini (10.000 IU) üretebilmektedir. Yani uygun şartlarda güneşe maruz kalınarak günlük tavsiye edilen D vitamini miktarının tamamı karşılanabilir. (Zittermann ve Gummert, 2010).

D vitamini endojen olarak güneş ışığı ile deride, eksojen olarak da diyetlerle alınmaktadır. Dışarıdan gıdalarla alınan D vitamini günlük D vitamini gereksinimini karşılamamakla beraber, balıklardan somon, ton balığı, uskumru, ringa, sardalya

türleri, morina karaciğeri yağı, diğer gıdalardan ise, yumurta sarısı, süt brokoli, maydanoz, su teresi D vitaminince zengin gıdalardır. Bunların dışında anne sütü de D vitamini açısından zengin bir besin maddesidir (Wagner ve Greer, 2008; Mazahery ve von Hurst, 2015).

1.3.4. D Vitamini ve Sepsis

Bağışıklık sistemi, bakteri, virüs, protozoa ve mantar gibi enfeksiyona neden olan mikroorganizmalara karşı ilk savunma bariyeri görevi görür. Doğal bağışıklık sisteminin ilk görevi, bu organizmaları tanımak, uzaklaştırmak veya yok edilmesine yol açan olaylar zincirini başlatmaktır (Kamen ve Tangpricha, 2010).

D vitamini üzerinde yapılan çalışmalar, D vitamininin, hem doğal hem de adaptif bağışıklık sistemlerini düzenlediğini, aşırı proinflatuar sitokin salınımını inhibe ettiğini, antiinflatuar mediatörlerin üretimini arttırdığını ve antimikrobiyal peptid üretiminde etkili olduğunu göstermiştir (Adorini ve Penna, 2009; Trongtrakul ve Feemuchang, 2017).

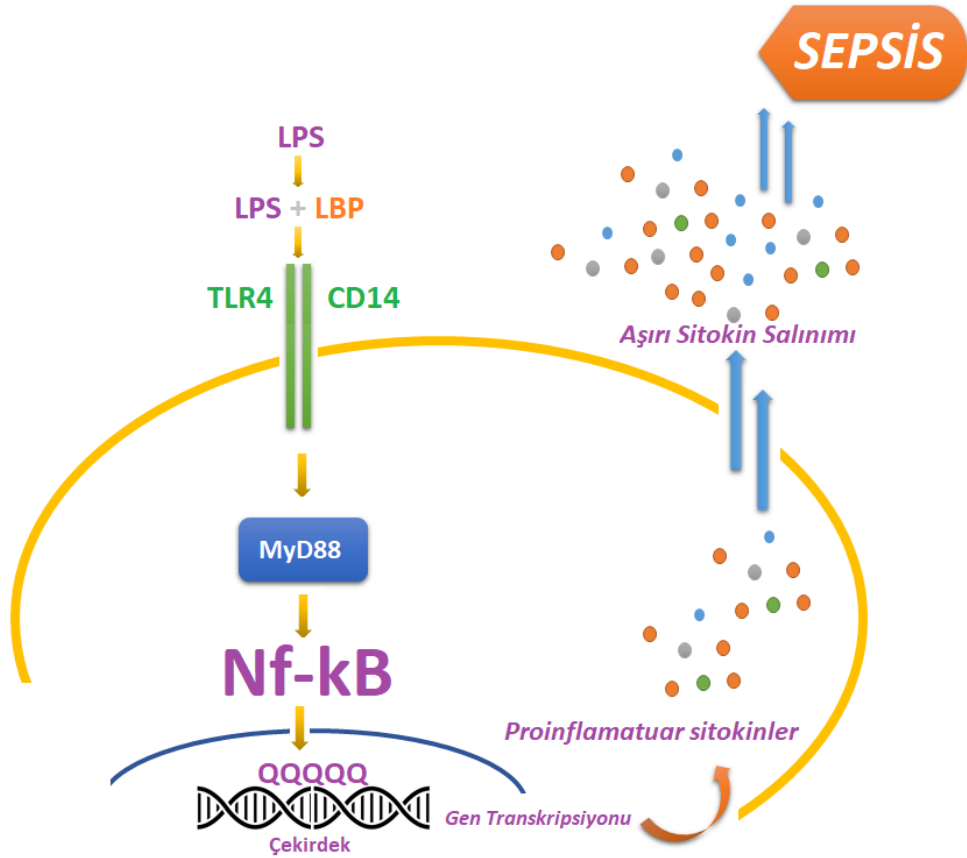
Hücrede inflammatuar yanıtın oluşmasını sağlayan çeşitli sinyal yolları bulunmaktadır. Sepsis gibi aşırı inflammatuar yanıtın olduğu durumlarda bu sinyal yollarının inhibe edilmesi gerekir. Bunlardan birisi enfeksiyona karşı immun cevabın düzenlenmesinde etkin olan NF-kB transkripsiyon faktörünün inhibisyonudur. NF-kB, sepsisin neden olduğu organ yetmezliğinin gelişiminde rol oynayan birçok immünomodülatör aracı maddenin transkripsiyonunun düzenlenmesinde rol oynar. Septik şoka neden olan endotoksin gibi patojenlerin TLR4 resöptörlerine bağlanmasıyla başlatılan kinaz yolları NF-kB aktivasyonu gerçekleştirir. Oksidatif stres durumunda NF-kB bir taraftan sitokin salınımını uyarırken, diğer taraftan sitokinler ile aktive edilir (Abraham, 2003; Freedman ve ark., 2007).

Tavşanlarda akut enfeksiyon ile oluşturulan üriner sepsis modelinde sepsis grubunda TNF- α , IL-10 ve NF-kB düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014).

LPS ile oluşturulan sepsis modelinde tavşan duodenumunda NF-kB'nin aktivasyonunun ROT ve sitokin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. LPS'nin,

duodenumun düz kas tabakasında NF-kB'nin aktivasyonunu, translokasyonunu ve DNA'ya bağlanmasını indüklediği sonucuna varılmıştır (Hernández ve ark., 2011).

Yüksek NF-kB düzeyi, daha yüksek mortalite oranı ve daha kötü klinik sonuç ile ilişkili olup NF-kB yolunun blokajı septik anormallikleri düzeltir. Enfeksiyonla birlikte oluşan aşırı immün yanıtın önüne geçmek için, TNF, IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin salınımını uyaran NF-kB'nin inhibe edilmesi gerekmektedir. NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu hipotansiyonu düzenler, septik miyokardiyal disfonksiyonu ve vasküler düzensizliği iyileştirir, çoklu proinflamatuvar gen ekspresyonunu inhibe eder, mikrovasküler endotelial sızıntıyı önler, intravasküler pıhtılaşmayı ve doku nötrofil akışını azaltır. Sonuç olarak NF-kB aktivasyonunun inhibisyonu, çoklu organ hasarını engeller (Liu ve Malik, 2006).



Şekil 12. LPS ile NF-kB'nin aktivasyonu (Liu ve Malik, 2006).

NF- κ B'nin aktivasyonunun bir sonucu ise iNOS enziminin uyarılmasıdır. Bu uyarılma sonucu vazodilatasyon, nörotransmisyon ve bağışıklık yanıtlarına aracılık etmek gibi bir çok olumlu fizyolojik özelliklere sahip olan fakat yüksek konsantrasyonlarda ise oksidatif stres tablosunun ilerlemesine neden olan NO üretimi gerçekleşir. LPS'nin etkisi ile aktive olan NF- κ B'nin inhibisyonu, oksidatif strese neden olan NO üretimini azaltır (Helmer ve ark., 2002; Fırat ve ark., 2008).

NF- κ B inhibitör alfa ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$), NF- κ B transkripsiyon faktörünü inhibe etme işlevi gören hücre protein ailesinin üyelerinden biridir. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, NF- κ B proteinlerinin nükleer lokalizasyon sinyallerini engelleyerek NF- κ B'yi inhibe eder. D vitamini ise, $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 'nın fosforilasyonunu azaltarak $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ seviyelerinde artışa neden olur. $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ seviyelerindeki artış, NF- κ B'nin nükleer translokasyonunu azaltır ve böylece aktivitesini düşürür (Cohen-Lahav, 2005).

İnflamatuvar yanıtın oluşmasına aracılık eden önemli sinyal iletim ağlarından bir diğeri ise mitojenle aktifleştirilen protein kinazlar (MAPK)'dır. LPS ile uyarılan MAPK yollarının aktivasyonu ile ROT, NO, sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere inflamatuvar mediyatör üretiminde artış gözlenir (Huang ve ark., 2015). D vitamininin etkisiyle MAPK'in MAPK-fosfat1 ile fosforilasyonu sonucu sinyal iletim yolu inhibe edilerek aşırı immun yanıtın önüne geçilmiş olur (Zhang ve ark., 2012).

D vitamininin etki gösterebilmesi için gerekli olan VDR'leri, endotel hücreleri, vasküler düz kas hücreleri ve kardiyomyositler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm dokularda eksprese edilir. Ligand-bağlı VDR, hedef genlerin promoter bölgesindeki VDRE'ye bağlanarak spesifik genlerin ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyonel bir faktör olarak çalışır. Ligand bağlı VDR, eNOS biyoaktivasyonu ile NO sentezini düzenlemede önemli bir rol oynar. D vitamini, bir taraftan NO'nin biyoyararlılığını sağlayacak şekilde NOS enzim aktivitelerini düzenlerken diğer taraftan ROT üreten NADPH-oksidazın aktivitesini azaltarak ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif enzimlerin aktivitesini arttırarak toplam antioksidan kapasiteyi arttırır (Kim ve ark., 2020).

D vitamininin etkilediği bir diğer transkripsiyon faktörü de nükleer respiratör faktörü 2 (Nrf2)'dir. Nrf2 düzeyi ile mitokondriyal ROT üretimi sonucu oksidatif stresteki artış ters orantılıdır. D vitamini ile uyarılan Nrf2 düzeyindeki artış, ROT oluşumunu baskılar ve antioksidatif enzimlerin ekspresyonunu düzenler (Wimalawansa, 2019).

Doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin bir başka önemli bileşeni antimikrobiyal peptitler (AMP)'dir. AMP'lerin antimikrobiyal, antiviral ve antifungal rolleri vardır. Bu peptitler bakteri hücre membranında bulunan porların yapısını etkileyerek bakterisidal etki gösterirler (Yim ve ark., 2007; Watkins ve ark., 2011).

LPS'in TLR'ne bağlanması sonucu, hücre içi 25OHD'nin lokal hidroksilasyonu ile 1,25(OH)₂D₃ oluşur. Reseptörü ile birleşen 1,25(OH)₂D₃, DNA sekanslarında spesifik VDRE'ye bağlanarak AMP üretmek üzere gen transkripsiyonunu başlatır. AMP'lerin sentezini takiben hem hücre içinde hem de hücre yüzeyinde patojen yıkımı başlar. AMP'lerin bu etki sistemi, hücre içi lokal 25(OH)D konsantrasyona bağlıdır (Schauber ve Gallo, 2008).

D vitamininin etkisi ile üretilen AMP'ler, LPS'yi bağlayarak, LPS'nin LBP'ye bağlanmasını engellerler. AMP'lerin LPS ile bağlanması, dolaşımdaki endotoksinlerin nötralize edilmesi demektir. Bu bağlanma sonucu septik şoka yol açabilecek NO ve TNF- α üretimi azaltılarak kontrolsüz inflamatuvar yanıtın önüne geçilmiş olur (Pulido ve ark., 2012).

Bakterileri, mayaları, mantarları, virüsleri ve hatta kanser hücrelerini doğrudan öldürmek dahil geniş bir aktiviteye sahip olan AMP'ler immünomodülatör aktivite de göstermektedir AMP'ler monosit ve makrofajlarda IL-1, TNF- α , IL-8 gibi proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonunu inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterir (Sun ve Shang, 2015).

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan (KAÜ-HADYEK/2015-043) izin alındıktan sonra, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden 32 adet 2 aylık Yeni Zelanda cinsi tavşan temin edildi. Hayvanlar ilgili kurumlardan izinler alınarak Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne getirildi ve çalışma boyunca burada barındırıldı. Tavşanların barındırılması süresince 12 saat gece 12 saat gündüz uygulaması yapıldı. Hayvanlara tavşan yemi ve içme suyu *ad libitum* olarak verildi. Günlük olarak kafes temizliği ve bulundukları odanın temizliği yapıldı. Yem ve içme suyu kapları düzenli olarak temizlendi.

Tablo 3. Yem analizi

Standart tavşan yemi				D vitamini eksik yem			
KİMYASAL ANALİZ		VİTAMİNLER		KİMYASAL ANALİZ		VİTAMİNLER	
Kuru madde	90%	Vitamin A (IU /kg)	24000	Kuru madde	90%	Vitamin A (IU /kg)	24000
Ham protein	18%	Vitamin D3 (IU /kg)	3000	Ham protein	18%	Vitamin D3 (IU /kg)	---
Ham selüloz	11,20%	Vitamin E (mg /kg)	300	Ham selüloz	11,20%	Vitamin E mg /kg)	300
Ham kül	6,80%	Vitamin K3 (mg /kg)	30	Ham kül	6,80%	Vitamin K3 (mg /kg)	30
Ham yağ	4,50%	Vitamin B1 (mg /kg)	20	Ham yağ	4,50%	Vitamin B1 (mg /kg)	20
Kalsiyum	1%	Vitamin B2 (mg /kg)	20	Kalsiyum	1%	Vitamin B2 (mg /kg)	20
Fosfor	0,62%	Vitamin B6 (mg /kg)	12	Fosfor	0,62%	Vitamin B6 (mg /kg)	12
Lisin	0,98%	Vitamin B12 (µg /kg)	100	Lisin	0,98%	Vitamin B12 (µg /kg)	100
Metiyonin	0,58%	Nikotinik asit (mg /kg)	100	Metiyonin	0,58%	Nikotinik asit (mg /kg)	100
Meth+Cys	0,85%	Pantotenik asit (mg /kg)	41	Meth+Cys	0,85%	Pantotenik asit (mg /kg)	41
Sodyum	0,24%	Biyotin (mg /kg)	6,3	Sodyum	0,24%	Biyotin (mg /kg)	6,3
Enerji(kkal/kg)	2650	Kolin (mg /kg)	1000	Enerji(kkal/kg)	2650	Kolin (mg /kg)	1000
Kullanılan ham maddeler: Yağlı tohum küspeleri, kepek, razmol, hububat, yonca unu, Kalsiyum karbonat, yağ, tuz, pelet bağlayıcı, lisin, metiyonin, vitamin mineral premiksi, antioksidan.				Kullanılan ham maddeler: Yağlı tohum küspeleri, kepek, razmol, hububat, yonca unu, Kalsiyum karbonat, yağ, tuz, pelet bağlayıcı, lisin, metiyonin, vitamin mineral premiksi, antioksidan.			

2.1. Gruplar

15 günlük adaptasyon döneminden sonra öncelikle her grupta 16 tavşan olacak şekilde 2 grup oluşturuldu. Grup I D vitamini eklenmiş standart tavşan yemi ile Grup II ise D vitamini eklenmemiş tavşan yemi ile 24 hafta beslendi. 24 haftanın sonunda kan örnekleri heparinli tüplere alınarak plazmaları elde edildi ve D vitamini tavşana özel ELISA yöntemiyle ölçüldü. Yetersizlik tespit edildikten sonra her iki grup ikişer gruba daha bölünerek dört grup oluşturuldu.

Grup I (Vit D-): 24 hafta D vitamini ilave edilmemiş tavşan yemi ile beslendikten sonra *vena auricularis*den serum fizyolojik verildi.

Grup II (Vit D+): 24 hafta D vitamini ilave edilmiş tavşan yemi ile beslendikten sonra *vena auricularis*den serum fizyolojik verildi.

Grup III (Vit D- (+) LPS): 24 hafta D vitamini ilave edilmemiş tavşan yemi ile beslendikten sonra *vena auricularis*den 150 µg/kg LPS verildi (Knudsen ve ark., 2016).

Grup IV (Vit D+ (+) LPS): 24 hafta D vitamini ilave edilmiş tavşan yemi ile beslendikten sonra *vena auricularis*den 150 µg/kg LPS verildi.

Tavşanlara uygulanan LPS kaynağı olarak *E.Coli Type 0111:B4* kullanıldı. Numuneler, LPS uygulamasından 24 saat sonra *vena auricularis*den antikoagülanlı tüplere alındı. Bir kısmı GSH ölçümü amacıyla tam kan olarak ayrılırken, geriye kalanlar 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Numuneler analiz edilinceye kadar -20°C’de derin dondurucuda saklandı. Analizler ve alınan kan numunelerinin işlenmesi Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2.2. Kullanılan Alet ve Malzemeler

ELISA cihazı (Microplate Reader Epoch-Biotek, Shimadzu UV-1201)

Deiyonize su cihazı (Nüve)

Ayarlanabilir otomatik pipetler (Eppendorf 5-1000 µl)

Soğutmalı santrifüj (Heraeus)

Manyetik karıştırıcı (Labinco)

Buzdolabı (Bosch)

Su banyosu (Nüve)

Hassas terazi (Scaltec)

pH metre (inoLab)

Vorteks (Labinco)

Taşınabilir terazi

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Kitler

1,1,3,3-Tetraetoksipropan (Sigma)

3-Nitropropiyonik Asit (Sigma-Aldrich)

5,5'-(2-Ditoyobis Nitrobenzoik Asit) (DTNB) (Sigma)

Sodyum sitrat (Merck)

Çinko Sülfat ($ZnSO_4$) (Merck)

Disodyum Hidrojen Fosfat (Fluka)

Etanol (Sigma-Aldrich)

Etilendiamin Tetra Asetik Asit (Merck)

Hidroklorik Asit (Merck)

Kalsiyum Klorür (Sigma-Aldrich)

Metafosforik Asit (Merck)

Monosodyum Hidrojen Fosfat (Fluka)

N- Bütanol (Merck)

N-(1-Naftil) Etilendiamin Dihidroklorür (NEDD) (Merck)

P-Dimetil Amino Benzaldehid (Merck)

Rabbit Vitamin D ELISA Kit (Uscn)

Rabbit Melatonin ELISA Kit (SunRed)

Rabbit 8-OHdG ELISA Kit (Uscn)

Redükte Glutasyon (GSH) (Merck)

Sodyum Hidrojen Fosfat (Merck)

Sodyum Hidroksit (Sigma-Aldrich)

Sodyum Klorür (Sigma-Aldrich)

Sodyum Nitrat (Sigma-Aldrich)

Sodyum Nitrit (Sigma-Aldrich)

Sodyum Sitrat (Merck)

Sülfanilamid (Alfa-Aesar)

Tiyobarbütirik Asit (Merck)

Triklor Asetik Asit (Merck)

Tris-HCL (Sigma-Aldrich)

Vanadyum (III) Klorür (VCl₃) (Merck)

2.4. Biyokimyasal Analizler

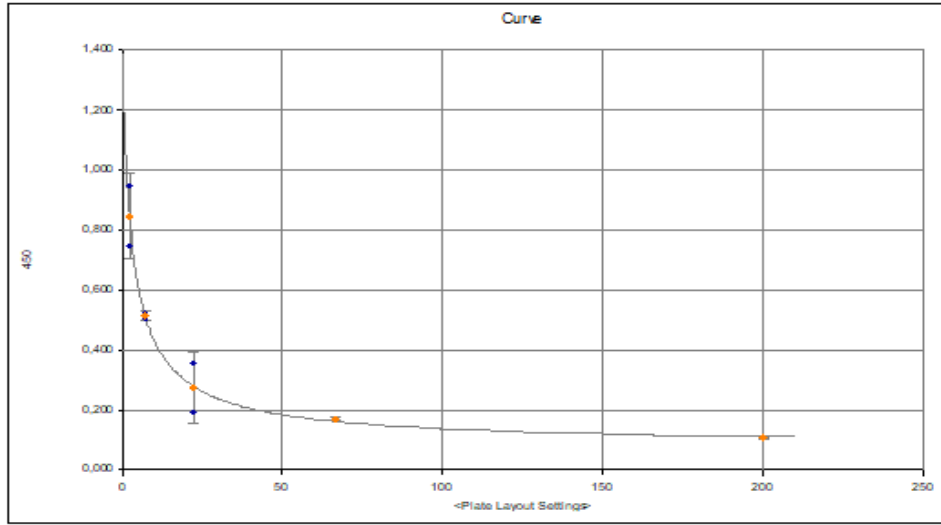
2.4.1. Vitamin D Düzeylerinin Ölçümü

Plazma vitamin D düzeyleri tavşana özel ticari ELISA kiti (USCN life, China) kullanılarak ölçüldü.

Prensip: Bu testin analizi yarışmalı inhibisyon enzim immunoassay tekniğine dayanır. Vitamin D₃ spesifik monoklonal bir antikorla mikropate önceden kaplanmıştır. Yarışmalı inhibisyon reaksiyonu biyotinle işaretlenmiş vitamin D₃

analoğu ile önceden kaplanmış antikorla işaretlenmemiş antijen (standartlar ya da numuneler) arasında başlar.

İnkübasyondan sonra bağlanmamış konjugat yıkanarak uzaklaştırılır. Sonra Horseradish Peroxidase (HRP)'a bağlı avidin her bir mikropate kuyucuğuna eklenir ve inkübe edilir. Bağlanmış HRP konjugatının miktarı numunedeki vitamin D3 konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substrat solüsyonunun ilave edilmesinden sonra meydana gelen rengin yoğunluğu numunedeki D3 konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Numunelerdeki D vitamini konsantrasyonu standart grafiğinden hesaplanır.



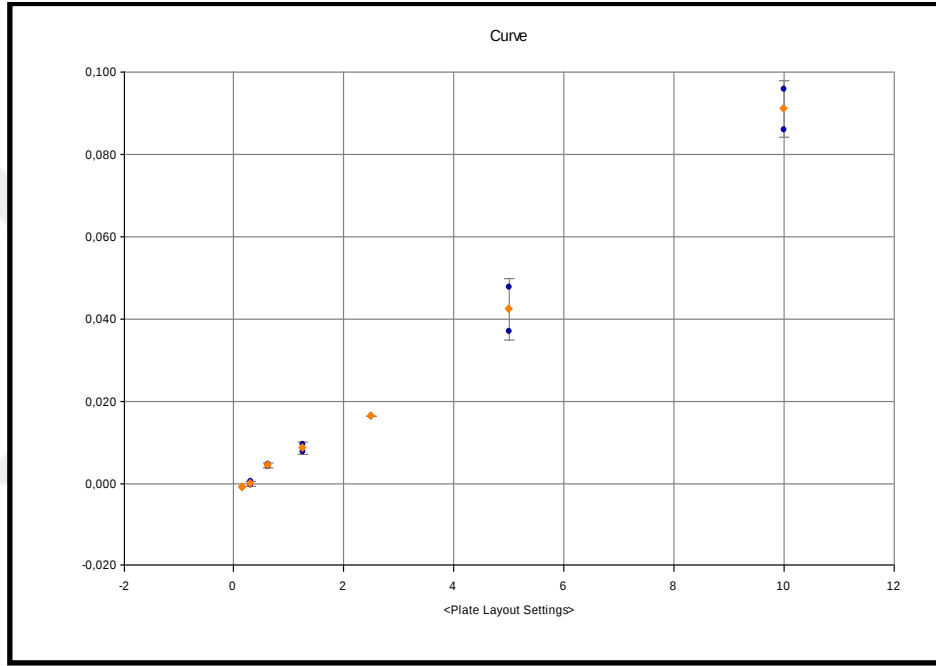
Grafik 1. D Vitamini Standart Grafiği ($Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$, $r^2=1$).

2.4.2. Redükte Glutasyon Analizi

Beutler ve ark.(1963)'nın bildirdiği yöntemle yapılmıştır. Bu yöntemde heparinli kanın distile su ile hazırlanan hemolizatında, -SH taşımayan tüm proteinler çöktürülmektedir. Elde edilen berrak sıvıda -SH gruplarının 5,5'-(2-ditiobis nitrobenzoik asit) (DTNB) ile oluşturduğu sarı renkli kompleks, 412 nm dalga boyunda kolorimetrik olarak ölçülmektedir.

2.4.3. Malondialdehit Analizi:

Yoshioka ve ark.(1979)'nın bildirdiği yönteme göre yapılmıştır. Lipit içerik, düşük pH ve TBA varlığında ısıtıldığında MDA molekülü ile iki TBA molekülünün birleşmesi sonucu oluşan kromojenden dolayı 532-535 nm'de absorbans veren stabil kırmızı pembe renk meydana gelmektedir. Standart için 2,5- 5-10 ve 20 mmol/L derişimlerinde olacak şekilde, alkolde çözünmüş 1.1.3.3-tetraetoksipropan kullanılmıştır.



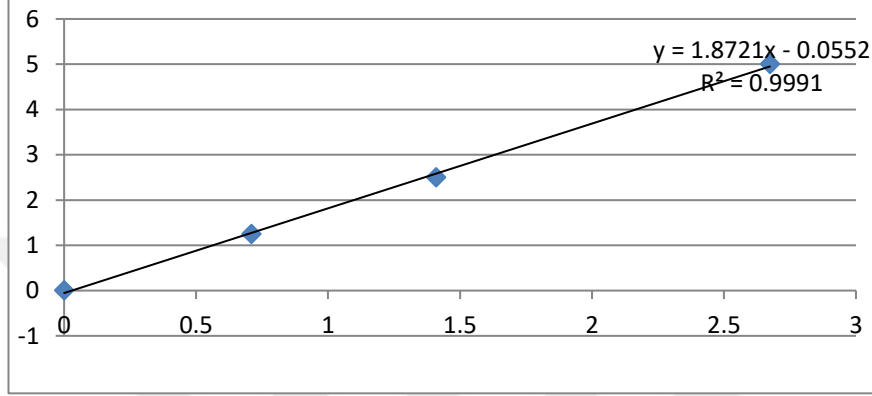
Grafik 2. MDA Standart Grafiği ($Y=A*X+B$ A:0,00932 B:-0,00329 $R^2:0,997$).

2.4.4. Nitrik Oksit Analizi

Nitrik oksit düzeyleri, *Miranda ve ark.(2001)*'nın bildirdikleri yöntemle tayin edildi. Bu yöntemde nitrat, Vanadyum (III) klorür ile nitrite dönüştürüldü. Nitritle sülfanilamidin asidik ortamda N-(1-Naftil) etilendiamine dihidroklorür ile reaksiyonu sonucu kompleks diazonyum bileşiği oluştu. Oluşan bu renkli kompleks 540 nm' de ölçüldü. Nitrat ve nitrit düzeyleri ayrı ayrı belirlendikten sonra ikisinin toplamı NO miktarını gösterir.

2.4.4.1. Nitrat Analizi

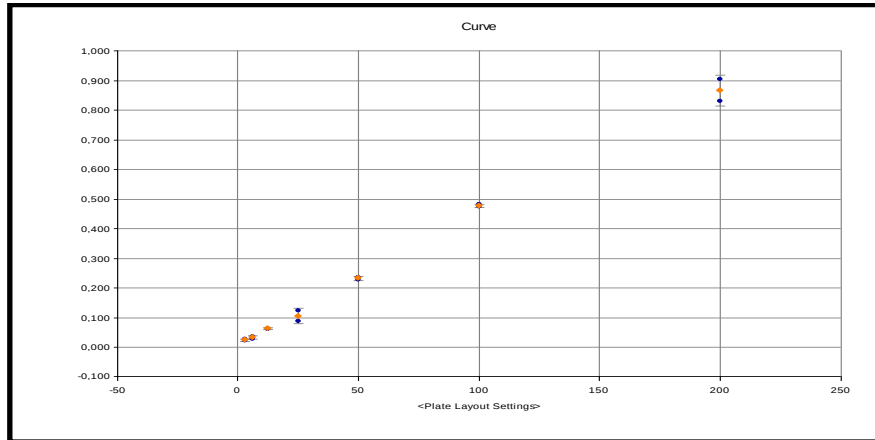
Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Tüm kuyucuklara 100 µl $VaCl_3$ konuldu. Hemen arkasından da 100 µl griess ayırıcı pipetlendi. 30 dakika 37°C’de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrat standart grafiğinden yararlanarak sonuçlar hesaplandı.



Grafik 3. Nitrit Standart Grafiği ($y=1,8721x-0,0552$, $R^2 = 0,9991$)

2.4.4.2. Nitrit Analizi

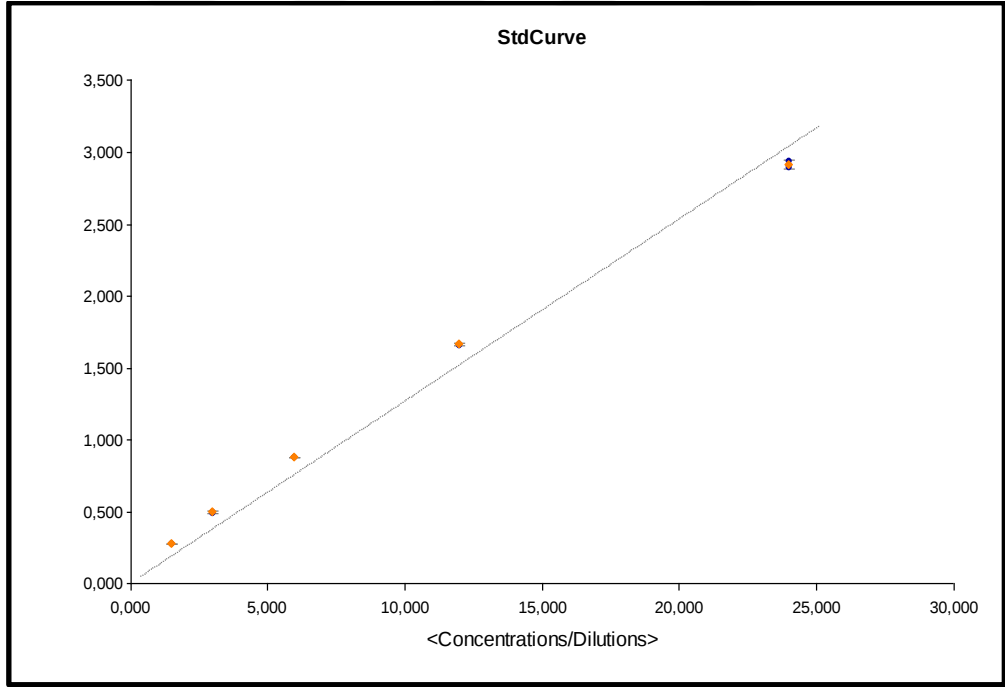
Mikroplak kuyucuklarına 100 µl numune pipetlendi. Hemen arkasından da 100 µl griess ayırıcı pipetlendi. 30 dakika 37°C’de etüvde inkübe edildikten sonra absorbanslar 540 nm dalga boyunda okundu. Nitrit standart grafiğinden yararlanarak sonuçlar hesaplandı.



Grafik 4. Nitrat Standart Grafiği ($Y=A \cdot X+B$ A: 0,00436 B: 0,0103 $R^2: 0,997$)

2.4.5. 8-OHdG Analizi

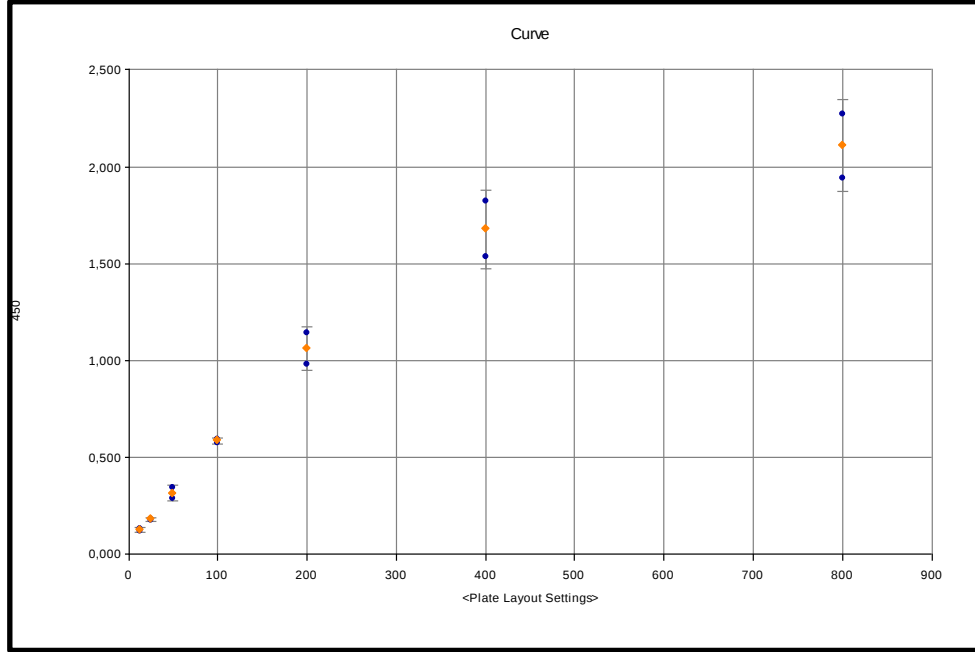
DNA hasar belirteci olan 8-OHdG düzeylerinin ölçümü, tavşana özel ELISA kit kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçülmek istenen antijenle, işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikora birleşmek üzere aynı anda ortama konularak antikora karşı yarışmaları sağlanır. Bağlanamayan antijenler uzaklaştırılır. Bağlanmayan enzim işaretli sekonder antibody'ler yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. Enzimle işaretli sekonder antikolar mikro kuyucukların kaplı olduğu 8- OHdG'lere bağlanmış monoklonal antikora bağlanması amacıyla mikro kuyucuklara ilave edilir. Bağlanmayan sekonder antikolar tekrar yıkama işlemi ile ortamdan uzaklaştırılır. 3,3',5,5'tetramethylbenzidine solüsyonunun mikro kuyucuklara ilavesiyle renkli bir bileşik meydana gelir. Reaksiyon fosforik asit eklenerek sonlandırılır. Oluşan renklenmenin absorbansı 450 nm dalga boyunda ölçülür. Oluşan renk yoğunluğu örnek içerisinde bulunan 8-OHdG konsantrasyonu ile ters logaritmik orantılıdır.



Grafik 5. 8-OHdG standart grafiği ($Y=A \cdot X+B$, $A:0,117$ $B:0,16$, $R^2=0,996$).

2.4.6. Melatonin Analizi

Triptofan aminoasitinden pineal bezde üretilen melatonin hormon düzeylerinin ölçümü tavşana özel ELISA kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tavşan melatonin antijeni ile kaplanmış mikroplyetlerin kullanıldığı yöntemde, yuvalara standart çözeltileri ve plazma örnekleri eklendikten sonra biotinle işaretlenmiş tavşan melatonin antikoru ve Horse radish peroxydase (HRP) ile birlikte inkube edilir. İnkubasyon sonrası pleytler yıkanarak bağlanmamış HRP'ler uzaklaştırılır, yıkanan pleytlere substrat eklenerek inkube edilir ve inkubasyon sona erince stop solusyonu ile enzim reaksiyonu durdurulur, 10 dakika içinde 450 nm absorbanslar okunur.



Grafik 6. Melatonin standart grafiği ($Y=(A-D)/(1+(X/C)^B)+D$, $R^2=1$).

2.4.7. İstatistiksel analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS for Windows 20.0 istatistik paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar ANOVA testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalarda Duncan testi kullanıldı. $p<0.05$ seviyesindeki sonuçlar anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Biyokimyasal bulgular Tablo 4 ve 5'te sunulmuştur. LPS enjeksiyonundan önce alınan numunelerden elde edilen bulgulara plazma D vitamini düzeyleri D vitamininden eksik yemle beslenen grupta, standart tavşan yemi ile beslenen gruba göre önemli derecede düşük ($p<0,05$) bulundu. LPS enjeksiyonlarının yapılmasından sonra ayrılan 4 grup karşılaştırıldığında, GSH düzeyleri Grup II'ye göre Grup III ve IV 'de önemli derecede düşük ($p<0,05$) bulundu. MDA düzeyleri ise Grup II'ye göre Grup I ve III'de önemli derecede yüksek ($p<0,05$) bulundu. 8-OHdG düzeyleri ise Grup III'de Grup I ve Grup II'ye göre önemli derecede yüksek ($p<0,01$) bulundu. NO düzeyleri Grup I'e göre Grup II ve Grup IV de düşük, Grup II'ye göre Grup III'de yüksek ($p<0,01$) bulundu. Melatonin düzeyleri Grup I'e göre Grup II'de ve Grup III'e göre Grup-IV'te önemli derecede yüksek ($p<0,01$) bulundu.

Tablo 4. Plazma D vitamini düzeyleri (ortalama $\pm$ Standart hata ($X \pm SX$) olarak verilmiştir.)

Parametre	Vit D (-) grup	Vit D (+) grup	P değeri
D vitamini (ng/ml)	22,15 $\pm$ 1,7 ^b	44,2 $\pm$ 6,09 ^a	<0,05

Tablo 5. Gruplarda biyokimyasal parametreler (ortalama $\pm$ Standart hata ($X \pm SX$) olarak verilmiştir.)

Parametreler	Grup I (Vit D -)	Grup I (Vit D +)	Grup III (Vit D-LPS)	Grup IV (Vit D+LPS)	P
GSH (mg/dl)	9,90 $\pm$ 2,6 ^{ab}	13,16 $\pm$ 4,9 ^a	7,39 $\pm$ 3,9 ^b	7,17 $\pm$ 4,3 ^b	0,05
MDA (mmol/L)	1,16 $\pm$ 0,3 ^a	0,85 $\pm$ 0,16 ^b	1,18 $\pm$ 0,23 ^a	1,07 $\pm$ 0,2 ^{ab}	0,05
8-OHdG (ng/ml)	2459,2 $\pm$ 332,9 ^b	2338,8 $\pm$ 225,6 ^b	2942,8 $\pm$ 415,1 ^a	2739,4 $\pm$ 83 ^a _b	0,01
NO(mmol/L)	10,12 $\pm$ 1,7 ^a	7,20 $\pm$ 1,4 ^c	9,13 $\pm$ 2,5 ^{ab}	7,99 $\pm$ 0,7 ^{bc}	0,01
Melatonin (pg/ml)	0,143 $\pm$ 0,005 ^b	0,169 $\pm$ 0,01 ^a	0,142 $\pm$ 0,006 ^b	0,165 $\pm$ 0,006 ^a	0,01

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Gram (-) bakteri hücre duvarının ana bileşenlerinden biri olan LPS hücre duvarının yıkılması ile ortaya çıkar ve endotoksik şok sürecini başlatır. LPS ile oluşturulan deneysel sepsis modellerinde periton içi veya damar içi uygulamalar yapılmaktadır. Kullanılan doz ise uygulama şekline ve hayvan türüne göre farklılık göstermektedir. Tavşanlarda intravenöz lethal doz uygulaması 500µg/kg düzeylerinde iken (Kassim ve ark., 2012), Yeni Zelanda ırkı tavşanların kullanıldığı çalışmamızda 150µg/kg dozu kullanılmıştır (Knudsen ve ark., 2016).

LPS uygulaması ile bir taraftan ROS artarken diğer taraftan antioksidan sistem harekete geçer ve endojen antioksidan düzeylerinde artış gözlenir. Rat ve tavşan karaciğerlerinde LPS kaynaklı oksidatif hasarın incelendiği bir çalışmada, sıçanlara 10mg/kg (%30 mortalite), tavşanlara 0,1mg/kg (%30 mortalite) ve 0,6mg/kg (%60 mortalite) dozlarında periton içi LPS enjeksiyonu sonrası hayvanlarda endojen antioksidan enzim sisteminde önemli değişiklikler olmuştur. Ratlarda, LPS enjeksiyonundan 24 saat sonra, kontrole kıyasla GSH-Px aktivitesi %60 ve SOD aktivitesi %120 artış göstermiştir. Bununla birlikte, tavşanlarda bu aktivitelerdeki artış nispeten daha azdır. Ayrıca, tavşanda süperoksit radikali üreten NADPH-oksidaz aktivitesi, LPS enjeksiyonundan 15 saat sonra yaklaşık iki kat artmıştır. LPS enjeksiyonundan sonra tavşan karaciğerinde, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA yaklaşık 3 kat artmıştır (Ben-Shaul Varda, 1999).

LPS indüklü oksidatif stresin ilerlemesiyle gelişen sepsis durumunda vitaminlerin antioksidan özellikleri ile ilgili etkileri araştırılmıştır (Forni, 2017; Kuhn ve ark., 2018). Antioksidan vitamin dendiğinde ilk akla gelen vitaminler E ve C vitaminleri iken son yıllarda D vitamininin de iskelet dışı etkilerinden biri olarak antioksidan özelliği dikkat çekmeye başlamıştır (Mokhtari ve ark., 2017; Tagliaferri ve ark., 2019).

D vitamininin antioksidan özeliği ilk olarak Wiseman (1993)'ın yaptığı çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmada D vitamininin demire bağlı lipid peroksidasyonunu azaltarak, bir kanser ilacı olan Tamoxifen'e benzer şekilde hareket ettiği gösterilmiştir.

D vitamininin oksidatif stresi azalttığı, eksikliğin hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda oksidatif stresi indüklediği bildirilmiştir (Foroozanfard ve ark., 2015; Ke ve ark., 2016; Lin ve ark., 2005). Ratlarda egzersize bağlı ROT'ların neden olduğu oksidatif stresle ilişkili olarak ortaya çıkan doku hasarı ve lipid peroksidasyonunun D vitamini ile azaltıldığı gösterilmiştir (Ke ve ark., 2016). Ratlarda yüksek doz çinko ile oluşturulan oksidatif stres üzerine D vitamininin, E vitamini, melatonin ve β -estradiol'den daha yüksek bir antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Lin ve ark., 2005).

D vitamini, oksidatif stresi düzenleyerek diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kronik böbrek hastalıkları gibi kronik hastalıkların önlenmesinde etkilidir. GSH, GSH-Px ve SOD dahil olmak üzere antioksidan savunma sisteminde yer alan birçok molekülün ekspresyonunu indükler ve NADPH oksidaz ekspresyonunu baskılar. Bu yüzden D vitamini, bir membran antioksidanı gibi davranır (Mokhtari ve ark., 2017). Diyabet oksidatif stresinde D3 vitamininin antioksidan aktivitesini destekleyen çalışmalar vardır. Bazı deneysel çalışmaların sonuçları, diyabetik farelerde vit D3 uygulamasının, NADPH oksidazın gen ekspresyonunun baskılanmasıyla ROS oluşumunu azaltmaya yardımcı olduğu ifade edilmiştir (Kono ve ark., 2013; Labudzynski ve ark., 2015).

D vitamininin retinal pigment epitel hücrelerinde H_2O_2 ile indüklenen oksidatif stres ve inflamasyon üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, H_2O_2 'ye maruz kalınması sonucu ROT üretiminin arttığı, antioksidan enzimlerin ekspresyonunu düştüğü ve sitokin salınımının arttığı gösterilmiştir. D vitaminin, retinal pigment epitel hücrelerinde TNF- α , IL-1, IL-8 sitokin salınımını inhibe ederek immun yanıtı baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca Nrf2 protein aktivasyonunda ve SOD, KAT, GSH antioksidan düzeylerindeki artışa bağlı olarak ta ROT'larda istatistiksel olarak önemli derecede azalma olduğu gösterilmiştir (Tohari ve ark., 2019).

Yapılan bu çalışmada ilk olarak D vitamini yetersizliği oluşturulması amaçlanmıştır. D vitamini eksikliğinde ilk akla gelen parametre Ca düzeyleridir. D vitaminin CaBP'nin eksprese edilmesini sağladığı için D vitamini eksikliğinde Ca düzeylerinin düşmesi beklenmektedir. Bu yüzden insanlarda D vitamini düzeyini kontrol etmek amacıyla Ca düzeylerine bakılması D vitamini düzeyi hakkında bilgi

verirken tavşanlardaki metabolizma diğer memelilere göre farklı olduğu için Ca düzeyi anlamlı sonuçlar vermeyecektir. Tavşanlar normalde serum kalsiyum konsantrasyonunda, diğer türlerde ölçülebilir bir hiperkalseminin bulunduğu hastalıklarda bir gösterge olarak kullanımını geçersiz kılan geniş dalgalanmalara sahiptir. Tavşanda kalsiyum homeostazının düzenlenmesinde böbrekler bağırsaktan daha önemlidir (Cheeke ve Amberg, 1973). Bu nedenle tavşan kalsiyum değerleri, insandaki genel kalsiyum metabolizması ile ilgili D vitamini deneyleri için uygun olmayabilir. Tavşanların serum kalsiyum düzeyindeki büyük değişiklikler $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyinin belirlenmesinde anlamlı sonuçlar vermemektedir (Lindgren ve ark., 1984).

Çoğu memelide, kandaki kalsiyum seviyeleri farklıdır. Nispeten stabil olmasına rağmen memelilerde 5.0-6.4 mg/dL arasında değişmekle birlikte, tavşanlarda ise bu düzey 13-15 mg/dL'dir (Brommage ve ark., 1988; Eckermann-Ross, 2008). Birçok memeli türü arasında, tavşanlardaki plazma kalsiyum seviyelerinin nispeten yüksek olduğu bildirilmiştir (Kubota ve ark., 2014).

Brommage ve ark.(1988)'nın tavşanlarda D vitamini eksikliğinin iskelet sistemindeki kronik etkilerini araştırdıkları çalışmada D vitamini eksikliğinde tavşanların PTH düzeylerinde artma gözlenirken Ca düzeylerinde her hangi bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir.

Çoğu memelideki barsak kalsiyum emilimi, öncelikle vitamin D3 ile düzenlenmiş aktif transportu içerir. Bununla birlikte, tavşanda, kan ve bağırsak lümeni arasındaki konsantrasyon gradyanına göre pasif emilim baskındır. Emilen kalsiyum miktarı diyetteki kalsiyum miktarı ile orantılı olarak artar ve D vitaminden nispeten bağımsızdır (Eckermann-Ross, 2008).

Tavşanlarda D vitamini yetersizliği oluşturmak için özel olarak bir firmaya D vitamini ilave edilmemiş tavşan yemi hazırlattırılmıştır. Hazırlatılan yemde tüm bileşenler aynı kalmak üzere sadece D vitamini eklenmemiştir. D vitamini eksik yemle en az 6 ay beslenen tavşanlarda D vitamini düzeylerinde yetersizlik durumu ortaya çıktığı tespit edilmiştir.

Kemirgenlerde D vitamini düzeyleri türe ve diyet içeriklerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Kemirgenlerle yapılan deneysel çalışmalarda standart bakım diyetleri kullanılır. Bu standart diyetlerin D vitamini içerikleri önemli ölçüde değişkenlik gösterebilmektedir. Bu diyetlerde D vitamini düzeyleri genellikle 1IU/g ila 5IU/g aralığında değişmektedir. Çalışmamızda kullandığımız tavşan yeminde de D vitamini 3IU/g oranında bulunmaktadır.

Tavşanlarda D vitamininin bazal değeri geniş bir aralıkta seyretmektedir. Tavşanlarla yapılan çalışmalar incelendiğinde 25OHD düzeyleri 27 ng/ml ile 68 ng/ml arasında değişmektedir (Nyomba ve ark., 1984; Brommage ve ark., 1988; Rajasree ve ark., 2002; Eckermann-Ross, 2008; Lin ve ark., 2012). Bunların dışında tavşanlarda çok daha düşük serum 25OHD düzeylerinin tespit edildiği çalışmalar da vardır (Emerson ve ark., 2014; Hünerel ve Altınışık, 2019).

D vitamini yetersizliği oluşturmak için tavşanlar 6 ay boyunca D vitamininden eksik yemle beslenmiştir. 6 ay boyunca belirli zaman aralıklarıyla tavşanların D vitamini düzeyi ölçülmüştür. Çalışmada D vitamini içeren yemle beslenen grupların plazma 25OHD düzeyi 44 ng/ml ölçülürken, yetersizlik oluşturulan tavşanlarda 22 ng/ml olarak ölçülmüştür. Daha uzun süre bu şekilde beslenmeyle daha düşük dozların elde edilip edilemeyeceği daha sonraki çalışmalarda araştırılabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada LPS ile oluşturulan endotoksemik sepsiste D vitamini yetersizliğinin MDA, NO ve 8-OHdG oksidan parametreleri ve GSH ve melatonin antioksidan parametreleri üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Optimum konsantrasyonlardaki D vitamini, MDA'nın plazma seviyesini düşürdüğü, plazmadaki toplam antioksidan kapasiteyi arttırdığı, böylece hücrelerin oksidatif stres ve buna bağlı hasardan korunmasında çok önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir (Foroozanfard ve ark., 2015).

D vitamini eksikliği oluşturulan ratların kaslarında hafif şiddette oksidatif stres meydana gelmiş olup, oksidatif stresin neden olduğu protein oksidasyonu ile protein karbonillerinin arttığı gösterilmiştir. D vitamini ile birlikte lipid peroksidasyonunun göstergesi olan MDA ve NO düzeyinde düşüş gözlenirken, SOD, KAT aktivitesinin

arttığı ve böylece D vitamini tedavisi ile oksidatif stresle ilgili araştırılan tüm parametrelerin düzeldiği gösterilmiştir (Bhat ve Ismail, 2015).

Yakın zamanda yapılan, ratlarda LPS'nin neden olduğu bilişsel bozulmanın araştırıldığı çalışmada D vitamini takviyesinin lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA düzeylerini düşürürken, SOD ve KAT antioksidan enzimlerinin aktivitesinde önemli bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (Mokhtari-Zaer ve ark., 2020).

Ratlarda LPS'nin neden olduğu nöroinflamasyona D vitamininin etkisinin araştırıldığı başka bir çalışmada D vitamininin MAPK sinyal iletim yolunu inhibe ederek NO, proinflamatuvar sitokin ve ROT üretimini azalttığı gösterilmiştir (Huang ve ark., 2015).

Kolesterolce zenginleştirilmiş diyetle beslenerek ateroskleroz oluşturulan tavşanlara 4.haftasında kas içi yüksek doz D vitamini uygulamasının MDA düzeylerinde azalmaya neden olduğu serum CRP ve adezyon moleküllerinde önemli bir azalma sağladığı ve lipid profilini düzelttiği gösterilmiştir (Malek ve Shata, 2014).

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, kolekalsiferol verilen sıçanlarda hepatik GSH miktarındaki artış ve MDA düzeylerindeki azalmanın sonucu olarak D vitamininin aynı zamanda bir antioksidan olduğu tezini desteklemiştir. Hatta çalışma sonuçlarına göre D vitamininin antioksidan etkisinin aynı zamanda güçlü bir antioksidan olan E vitamini ile aynı hatta daha da fazla olduğu tespit edilmiştir (Sardar ve ark., 1996).

D vitamininin sepsis kaynaklı akut böbrek hasarında renal oksidatif hasar üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada farelere periton içi LPS (LPS, 2.0 mg/kg) uygulamasından önce 1., 24. ve 48.saatlerde üç doz D vitamininin oral olarak verilmesi ile 25OHD düzeylerindeki artışın lipid peroksidasyonunu azalttığı ve iNOS inhibisyonunu sağlayarak NO düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (Xu ve ark., 2015).

Bu verilerin aksine D vitamininin antioksidan savunmayı etkilemediğini gösteren bir çalışmada, diyabetik rat karaciğer ve böbrek dokularında, insülinin yanında D vitamini tedavisinin antioksidan savunmayı arttırmadığı gösterilmiştir. Hatta lipid peroksidasyonunu gösteren MDA düzeyinin insülinle beraber D vitamini

tedavisi uygulandığında daha da yükseldiği, SOD, KAT ve GSH-Px düzeylerinin ise düştüğü gösterilmiştir (Noyan ve ark., 2005).

Yapılan çalışmada MDA düzeyleri karşılaştırıldığında Grup-II'de Grup-I'e göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Grup-III ve Grup-4 karşılaştırıldığında ise fark tespit edilememiştir.

MDA düzeyleri, Grup-II de Grup-I'e göre yüksek olması D vitamininin lipid peroksidasyonunu azalttığı böylece antioksidan özelliği gösterdiği yönündeki çalışmaları desteklemektedir. Benzer şekilde NO düzeyleri arasında Grup-I ve Grup II de anlamlı bir fark bulunurken, LPS uygulanan gruplarda fark bulunamamıştır. Özetle, Grup I ve Grup II'de ki MDA ve NO sonuçlarına göre D vitamininin antioksidan özelliği desteklenirken, LPS uygulanan gruplarda D vitamininin antioksidan özelliği tespit edilmemiştir.

Yapılan çalışmada değerlendirilen bir diğer parametre ise DNA hasarının en önemli göstergesi olan, kanda ve idrarda tespit edilebilen 8-OHdG düzeyleri olmuştur. Oksidatif stresin neden olduğu DNA hasarının sonucu olarak ortaya çıkan 8-OHdG düzeylerinin sepsis ve D vitamini eksikliği ile ilişkisi araştırılmıştır.

DNA, endojen oksidanlardan dolayı sürekli oksidatif hasara maruz kalmaktadır. Oksidasyona uğrayan DNA sürekli olarak tamir edilmektedir ve okside olan bazlar idrarla atılmaktayken kandaki düzeyleri de değişmektedir.

Reaktif oksijen türleri, peroksit ve serbest radikal üretebilen ara maddelerin oluşmasına neden olur. Bu ajanların detoksifiye edilmemesi oksidatif hasara yol açabilir. Bu da pürin veya pirimidin oksidasyonuna ve DNA iplik kopmalarına sebep olur. Bu problem çözülmezse hücrelerde oksidatif stresin artması kanser gibi birçok hastalıklara yol açabilir. Düşük serum D vitamini düzeyleri, oksidatif DNA hasarının bir belirteci olan 8-OHdG seviyelerinde yükselme ile ilişkilidir (Nair-Shalliker ve ark., 2012).

Diyabetik hastalarla yapılan bir çalışmada D vitamini eksikliği olan hastalardaki 8-OHdG seviyesinin sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu, D vitamini tedavisinin 8-OHdG düzeylerini istatistiksel olarak önemli derecede

değiştirmemiş olsa da DNA hasarını % 13,7 oranında azalttığı gösterilmiştir (Ali ve Altimimi, 2019).

Chauhan ve ark.(2019)'nın yaptığı çalışmada D vitamini düzeyi düşük olan prediyabetli olgularda DNA hasarının yaygın olduğu, D vitamini takviyesinin, diyabetik durumun ilerlemesinin önlenmesi ve makrovasküler ve mikrodamar komplikasyonlarının gelişmesi için etkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Koloretik adenomlu hastalarda yapılan randomize bir çalışmada, D vitamini desteğini takiben 8-OHdG'de %25'lik düşüş D vitamininin DNA hasarını önlemede etkili olduğu fikrini desteklemektedir. Çalışmada normal kolorektal mukozada kalsiyum ve D vitamininin 8-OHdG üzerine etkisi araştırılmıştır. 2 g kalsiyum ve 800 IU D vitamini içeren takviye ile kolorektal adenomlu 90 hasta 6 ay boyunca tedavi edilmiş olup oksidatif stres yaklaşık %25 oranında azalmıştır. Aynı çalışmada D vitamininin, GR enzim aktivitesini azalttığı, SOD ve GSH-Px aktivitesindeki artışa bağlı olarak GSH'ı arttırdığı gösterilmiştir (Fedirko ve ark., 2010).

2 ay boyuca günlük 100 µg D vitamini takviyesi yapılan T2DM hastalarında oksidatif stresin yönetimi üzerinde olumlu sonuçların ortaya çıktığı buna bağlı olarak 8-OHdG ve 3-nitrotirosin konsantrasyonlarında azalma tespit edildiği bildirilmektedir (Damghanian ve ark., 2019).

Yapılan çalışmada da yukarıda bahsedilen literatür verilerine benzer olarak sepsiste 8-OHdG düzeylerinde Grup-III'te Grup-IV'e göre anlamlı derecede artış tespit edilmiştir. Bu bulgular endotoksemik sepsiste yeterli D vitamininin DNA kırıklarının oluşumunu azaltabileceğini göstermektedir.

Çalışmada ayrıca güçlü bir antioksidan olan GSH ve melatonin düzeylerinin endotoksemik sepsis durumunda D vitamini düzeyi ile ilişkisi araştırılmıştır.

D vitamini ve kalsiyum kombinasyonunun oral takviyesinin streptozotosin (STZ) kaynaklı diyabetik sıçanlarda antioksidan enzimlerin aktivitelere ve lipid peroksidasyonuna etkisinin araştırıldığı çalışmada SOD, KAT ve GSH-Px aktiviteleri incelenmiştir. Bu enzimler, ROT'ların aşırı üretimini ortadan kaldırmak için birbirini tamamlayıcı şekilde etki etmektedirler. Bu enzim gruplarının aktivitelere veya

sentezlerindeki herhangi bir eksiklik oksidatif strese neden olmaktadır. Çalışmada, KAT ve GSH-Px aktivitelerinin, diyabetik ratlarda önemli ölçüde azaldığı, bununla birlikte, D vitamini ve kalsiyum takviyesinin, KAT (% 287) ve GSH-Px (% 331) aktivitelerinde önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir. Bu sonuçlar, diyabet patogeneziindeki komplikasyonların oksidatif stresten kaynaklandığını ve D vitamini ve kalsiyum kombinasyonunun oral takviyesi ile hastalığın önlenemese bile sınırlandırılabilirliğini göstermektedir (Alatawi ve ark., 2018).

Deneyisel omurilik hasarı oluşturulan ratlarda yapılan bir çalışmada 1,25(OH)₂D₃ tedavisi (i.p. 2µg/kg.gün) ile oksidatif stres azalmış olup, SOD aktivitesi ve GSH düzeyleri artmış, MDA düzeyi azalmıştır. Ayrıca ratlarda 1,25(OH)₂D₃ ile apoptoz inhibe edilmiştir. 1,25(OH)₂D₃ tedavisi gören ratlarda omurilik hasarı oluşturulması sonrası histolojik hasar ve nöron kaybı azalmış ve 1,25(OH)₂D₃ grubunda kontrol grubuna kıyasla fonksiyonel iyileşme gerçekleşmiştir (Zhou ve ark., 2016).

Başka bir çalışmada, 5 hafta boyunca D vitamini uygulamasının, yüksek yağlı diyetle beslenerek oluşturulan obez sıçanların kalp dokusunda ve serum lipidlerinde inflamasyon ve oksidatif stres belirteçlerini modüle ederek potansiyel kardiyokoruyucu etkileri olduğunu gösterilmiştir. Çalışmada, D vitamini uygulamasının, SOD ve GSH-Px aktivitesindeki artış ile kardiyak oksidatif strese karşı koruyucu etki gösterdiği bunun yanında TNF-α konsantrasyonunu düşürerek kardiyak doku inflamasyonunu azalttığını gösterilmiştir (Farhangi ve ark., 2017).

Pineal hormon melatonin, hücreleri hidroksil radikal ve lipid peroksidasyon ürünleri dahil olmak üzere çeşitli oksidanların neden olduğu hasardan koruyan güçlü bir serbest radikal temizleyicidir. Ratlarda renal iskemi - reperfüzyon hasarının üzerine melatonin, D vitamini ve Melatonin+D vitamini kombinasyonunun ROT üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Hem melatonin hem D vitamini hem de Melatonin+D vitamini kombinasyonunun NO üretimini azalttığı, SOD aktivitesini ve GSH düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (Sezgin ve ark., 2013).

LPS kaynaklı hasar üzerine melatoninin etkisi ilk defa Sewerynek ve ark.(1995) tarafından ratlarda yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, melatoninin

GSH-Px aktivitesini arttırdığı, LPS ile oluşturulan rat beyin ve karaciğerindeki serbest radikal hasarını azalttığı gösterilmiştir. LPS uygulanan ratlara verilen Melatoninin (4 mg/kg), bazal seviyelerin üzerinde GSH'yi arttırdığı ve GSH-Px'in aktivitesini uyarırken GSSG konsantrasyonlarını düşürdüğü gösterilmiştir. Bu, melatoninin antioksidan savunma sisteminde etkili olabileceğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak, melatoninin serbest radikallerinin neden olduğu hastalık durumlarının hem başlangıcında hem de ilerlemesine karşı önemli bir koruyucu rol oynayabileceği ileri sürülmüştür.

Yapılan bir başka çalışmada ratlara periton içi 10 mg/kg(vücut ağırlığı) LPS uygulanmış olup uygulama öncesinde ve sonrasında olmak üzere 10mg/kg dan 60mg/kg'a kadar 6 doz melatonin periton içi verilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre melatoninin akciğerde ortaya çıkan lipid peroksidasyonunu önemli ölçüde azalttığı, akciğerlerde ve karaciğerde LPS kaynaklı NO düzeyindeki artışı doza bağlı bir şekilde engellediği gösterilmiştir (Crespo ve ark., 2018).

Yapılan çalışma sonuçlarına göre GSH düzeylerinde hem Grup-I ile Grup-II arasında hemde Grup-III ile Grup-IV arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Melatonin düzeylerinde ise hem Grup-I ile Grup-II arasında hemde Grup-III ile Grup-IV arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Karşılaştırılan gruplarda D vitamini ile melatonin düzeyleri anlamlı derecede yükselmiştir.

Özetle çalışmamızda öncelikle D vitamini yetersizliği oluşturulmaya çalışılmıştır. Yetersizlik oluşturulduktan sonra bakteriyel bir endotoksin olan LPS i.v. olarak uygulanmış ve hücre içi önemli bir antioksidan molekül olan GSH ve pineal bir hormon olmasının yanında antioksidan özellik te gösteren melatonin, serbest radikallerin etkisi ile meydana gelen lipid peroksidasyon ürünü MDA, hem oksidatif stresin hem de DNA kırıklarının bir belirteci olan 8-OHdG, paramedikal bir serbest radikal olan NO düzeyleri üzerine D vitamininin etkisi araştırılmıştır.

Sonuç olarak, lipid peroksidasyon ürünü olan MDA ve NO'nun D vitamininden eksik beslenen grupta yeterli D vitaminine sahip gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulunması, önemli bir antioksidan molekül olan melatoninin ise D vitamininden eksik beslenen grupta yeterli D vitaminine sahip gruba göre istatistiksel olarak düşük

bulunması D vitamininin antioksidan özelliğe sahip olduğunu desteklemektedir. Yeterli D vitaminine sahip gruplarda GSH düzeyleri hariç LPS verilmeden öncesi ile verildikten sonraki değerler arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamaması D vitamininin endotoksemik sepsise karşı koruyucu olabileceğini göstermektedir. Ancak D vitamininden eksik yemle beslenen gruplarda da 8-OHdG düzeyleri hariç diğer parametreler arasında istatistiksel fark bulunamamıştır. Bu durum D vitaminin GSH düzeyini arttırarak değil de daha çok melatonin düzeyini arttırarak antioksidan sistemi desteklediği kanaatini uyandırmaktadır.



5. KAYNAKLAR

Abraham E: Nuclear Factor – κ B and Its Role in Sepsis- Associated Organ Failure. *J. Infect. Dis.* 187, 364–369, 2003.

Adams JS, Chen H, Chun R, Ren S, Wu S, Gacad M, Nguyen L, Ride J, Liu P, Modlin R, Hewison M: Substrate and Enzyme Trafficking as a Means of Regulating 1,25-Dihydroxyvitamin D Synthesis and Action: The Human Innate Immune Response 22, 20–24, 2007.

Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O: Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. *JBRA Assist Reprod.* 22, 61–66, 2018.

Adorini L, Penna G: Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol.* 70, 345–352, 2009.

Alatawi FS, Faridi UA, Alatawi MS: Effect of treatment with vitamin D plus calcium on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Saudi Pharm J.* 26, 1208–1213, 2018.

Ali AF, Altimimi DJ: DNA Damage and Vitamin D Status among Type 2 Diabetic Patients. *J Clin. Diag. Res.* 13, 21–24, 2019.

Anderson PH, Anderson PH: Vitamin D Activity and Metabolism in Bone. *Curr Osteoporos Rep* 15, 443–449, 2017.

Barja, G: The flux of free radical attack through mitochondrial DNA is related to aging rate. *Aging Clin. Exp. Res.* 12, 342–355, 2000.

Barrera G, Pizzimenti S, Daga M, Dianzani C, Arcaro A, Cetrangolo GP, Giordano G, Cucci MA, Graf M, Gentile F: Lipid peroxidation-derived aldehydes, 4-hydroxynonenal and malondialdehyde in aging-related disorders. *Antioxidants* 7, 1–17, 2018.

Ben-Shaul V, Sofer Y, Bergman M, Zurovsky Y, Grossman Y: Lipopolysaccharide-induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. *Shock* 12, 288–293, 1999.

Berlett BS, Stadtman ER: Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem.* 272, 20313–20316, 1997.

Bertani B: Function and biogenesis of lipopolysaccharides. *EcoSal Plus.* 8, 1–33, 2018.

Bhat M, Ismail A: Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152, 171–179, 2015.

Bonner MY, Arbiser JL: The antioxidant paradox: what are antioxidants and how should they be used in a therapeutic context for cancer Michael. *Futur. Med Chem. Author* 6, 1413–1422, 2015.

Bordelon P, Ghetu MV, Langan R: Recognition and management of vitamin D deficiency. *Am. Fam. Physician* 80, 841–846, 2009.

Bouillon R: Comparative analysis of nutritional guidelines for vitamin D. *Nat Rev Endocrinol.* 13, 466–479, 2017.

Brommage R, Miller SC, Langman CB, Bouillon R, Smith R, Bourdeau JE: The effects of chronic vitamin D deficiency on the skeleton in the adult rabbit. *Bone* 9, 131–139, 1988.

Caccamo D, Ricca S, Currò M, Ientile R: Health risks of hypovitaminosis D: A review of new molecular insights. *Int J Mol Sci.* 19, 1–18, 2018.

Carvalho AN, Lim JL, Nijland PG, Witte ME, Van Horssen J: Glutathione in multiple sclerosis: More than just an antioxidant? *Mult Scler.* 20, 1425–1431, 2014.

Cavaillon NH, Carreno M, Aussel L, Caro M: Nephrology Dialysis Transplantation Molecular aspects of endotoxins relevant to their biological functions. *Nephrol Dial Transpl.* 14, 853–860, 1998.

Chang HJ, Lynn C, Glass RM: Sepsis. *J Amer Med Assoc* 303, 804, 2010.

Cheeke PR, Amberg W: Comparative Calcium Excretion By Rats And Rabbits. *J. Anim. Sci.* 37, 450–454, 1973.

Chen X, Xu W, Wang Y, Luo H, Quan S, Zhou J, Yang N, Zhang T, Wu L, Liu J, Long X, Zhu N, Xie H, Luo Z: Hydrogen sulfide reduces kidney injury due to urinary-derived sepsis by inhibiting NF- κ B expression, decreasing TNF- α levels and increasing IL-10 levels. *Exp. Ther. Med.* 8, 464–470, 2014.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER: Human studies related to protein oxidation: Protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res.* 33, 99–108, 2000.

Chiariotti L, Coretti L, Pero R, Lembo F: Alterations in Host Cells. *Adv Exp Med Biol.* 879, 91–105, 2016.

Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G: Vitamin D : Metabolism , Molecular Mechanism of Action , and Pleiotropic Effects Vitamin D Analogs. *Physiol Rev* 96, 365–408, 2016.

Cohen-Lahav M: Vitamin D decreases NF B activity by increasing I B levels. *Nephrol. Dial. Transplant.* 21, 889–897, 2005.

Crespo E, Macias M, Pozo D, Escames G, Miguel M, Vives F: Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Faseb J.* 13, 1537–1546, 2018.

Damghanian P, Javanbakht MH, Honarvar NM, Yousefirad E, Mohammadi H, Zarei M, Djalali M: Effects of Vitamin D supplementation on 8-hydroxydeoxy guanosine and 3-nitrotyrosine in patients with type 2 diabetes: A randomized clinical trial. *Prog Nutr.* 21, 138–146, 2019.

Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N: A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 15, 316–328, 2005.

Dellinger RP: The surviving sepsis campaign: Where have we been and where are we going? *Cleve Clin J Med.* 82, 237–244, 2015.

Eckermann-Ross C: Hormonal Regulation and Calcium Metabolism in the Rabbit. *Vet Clin North Am Exot Anim Pr.* 11, 139–152, 2008.

Emerson JA, Whittington JK, Allender MC, Mitchell MA: Effects of ultraviolet radiation produced from artificial lights on serum 25-hydroxyvitamin D concentration in captive domestic rabbits. *Am J Vet Res.* 75, 380–384, 2014.

Erçin U, Bilgihan A, Erkan AF, Yücel H: Koroner Arter Hastalığı'nda Yeni Parametreler : Oksidatif Stres Belirteçleri. *Türk Klin. Biyokim. Derg* 17, 48–55, 2019.

Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC, Maldonado MD, Sánchez-Hidalgo M, León J, Reiter RJ: Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock : experimental and clinical evidence. *J Pharm Pharmacol.* 58, 1153–1165, 2006.

Evans T: Diagnosis and management of sepsis. *Clin. Med. (Northfield. Il).* 18, 146–149, 2018.

Farhangi MA, Nameni G, Hajiluian G, Mesgari-Abbasi M: Cardiac tissue oxidative stress and inflammation after vitamin D administrations in high fat-diet induced obese rats. *BMC Cardiovasc Disord.* 17, 1–7, 2017.

Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, Sidelnikov E, Daniel CR, Rutherford RE, Shaikat A: Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: A randomized clinical trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19, 280–291, 2010.

Fırat SŞ, Canacankatan N, Korkmaz B, Yıldırım H, Tamer L: Endotoksemik Sıçanların Karaciğerinde Artan Oksidatif Stres Üzerinde İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz İnhibisyonunun Etkisi. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg* 1, 28–35, 2008.

Forni LG: Metabolic resuscitation in sepsis: Could antioxidants be the answer? *Signa Vitae* 13, 16–19, 2017.

Foroozanfard F, Jamilian M, Bahmani F, Talaee R, Talaee N, Hashemi T, Nasri K, Asemi Z, Esmailzadeh A: Calcium plus vitamin D supplementation influences biomarkers of inflammation and oxidative stress in overweight and vitamin D-deficient women with polycystic ovary syndrome: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 83, 888–894, 2015.

Förstermann U, Sessa WC: Nitric oxide synthases: Regulation and function. *Eur. Heart J.* 33, 829–837, 2012.

Fraser WD, Milan AM: Vitamin D Assays: Past and Present Debates , Difficulties , and Developments. *Calcif Tissue Int.* 92, 118-127 , 2013.

Freedman DM, Looker AC, Chang SC, Graubard BI: Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 99, 1594–1602, 2007.

Freire MAM, Guimarães JS, Gomes-Leal W, Rosa MG: Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. *Front Neurosci.* 3, 175–181, 2009.

Galano A, Tan DX, Reiter RJ: Melatonin as a natural ally against oxidative stress : a physicochemical examination. *J. Pineal Res* 51, 1–16, 2011.

Gani LU, How CH: Vitamin D deficiency. *Singapur Med J* . 56, 433–437, 2015.

Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, Isenberg JS: Nitric oxide: What's new to NO? *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 312, 254–262, 2017.

Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa D: Vitamin D : Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab* 72, 87–95, 2018.

Grant WB: Lower vitamin-D production from solar ultraviolet-B irradiance may explain some differences in cancer survival rates. *J. Natl. Med. Assoc.* 98, 357–364, 2006.

Grotto D, Maria LS, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia C: Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nov.* 32, 169–174, 2009.

Gul M, Ayan M, Seydanoglu A, Cander B, Girisgin S, Erayman I, Erdem S: The effect of N-acetyl cysteine on serum glutathione, TNF- α and tissue malondialdehyde levels in the treatment of sepsis. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 17, 293–297, 2011.

Gupta RK, Patel AK, Shah N, Chaudhary AK, Jha UK, Yadav UC, Gupta PK, Pakuwal U: Oxidative stress and antioxidants in disease and cancer: A review. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 15, 4405–4409, 2014.

Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS: Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *Sage Open Med.* 7, 1–13, 2019.

Hajj J, Blaine N, Salavaci J, Jacoby D: The “Centrality of Sepsis”: A Review on Incidence, Mortality, and Cost of Care. *Healthcare* 6, 1–11, 2018.

Halliwell B: Biochemistry of Oxidative Stress. *Biochem Soc Trans.* 35, 1147–1150, 2007.

Helmer KS, Chang L, Cui Y, Mercer DW: Induction of NF- κ B, I κ B- α , and iNOS in rat gastric mucosa during endotoxemia. *J. Surg. Res.* 104, 46–52, 2002.

Hernández LV, Gonzalo S, Castro M, Arruebo MP, Plaza MA, Murillo MD, Grasa L: Nuclear factor κ B is a key transcription factor in the duodenal contractility alterations induced by lipopolysaccharide. *Exp. Physiol.* 96, 1151–1162, 2011.

Heumann D, Roger T: Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin. Chim. Acta* 323, 59–72, 2002.

Hii CS, Ferrante A: The non-genomic actions of vitamin D. *Nutrients* 8, 135–149, 2016.

Hotchkiss RS, Moldawer LL, Opal SM, Reinhart K, Turnbull IR, Vincent JL: Sepsis and septic shock HHS Public Access. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2, 1–47, 2016.

Huang Y, Ho Y, Lai C, Chiu C, Wang J: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 attenuates endotoxin-induced production of inflammatory mediators by inhibiting MAPK activation in primary cortical neuron-glia cultures. *J. Neuroinflammation* 12, 1–12, 2015.

Hünerel T, Altınışık HB: The effects of sugammadex on Vitamin D levels in rabbits under general anesthesia. *Turk Osteoporoz Derg.* 25, 88–92, 2019.

İnci İ: Erken evre Parkinson Hastalarında D Vitamini Düzeylerinin Değerlendirilmesi. *Park. Hast. ve Hareket Bozuklukları Derg.* 15, 7–11, 2012.

Iskit AB, Guc MO: The timing of endothelin and nitric oxide inhibition affects survival in a mice model of septic shock. *Eur. J. Pharmacol* 414, 281–287, 2001.

Ithayaraja CM: Mini-review: Metabolic functions and molecular structure of glutathione reductase. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 9, 104–115, 2011.

Izadpanah M, Khalili H: Potential benefits of vitamin D supplementation in critically ill patients. *Immunotherapy* 5, 843–853, 2013.

Jain SK, Micinski D: Biochemical and Biophysical Research Communications Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase , and GSH formation , and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 437, 7–11, 2013.

Kabel AM: Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World J. Nutr. Heal.* 2, 35–38, 2014.

Kamen DL, Tangpricha V: Vitamin D and molecular actions on the immune system: Modulation of innate and autoimmunity. *J. Mol. Med.* 88, 441–450, 2010.

Kassim M, Mansor M, Al-Abd N, Yusoff KM: Gelam honey has a protective effect against lipopolysaccharide (LPS)-induced organ failure. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 6370–6381, 2012.

Ke CY, Yang FL, Wu WT, Chung CH, Lee RP, Yang WT, Subeq YM, Liao KW: Vitamin D3 reduces tissue damage and oxidative stress caused by exhaustive exercise. *Int. J. Med. Sci.* 13, 147–153, 2016.

Kerksick C, Willoughby D: The Antioxidant Role of Glutathione and N-Acetyl- Cysteine Supplements and Exercise-Induced Oxidative Stress. *J. Int. Soc. Sports Nutr.* 2, 38–44, 2005.

Keshet R, Erez A: Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. *Dis. Model. Mech.* 11, 1-11, 2018.

Khoo AL, Chai LY, Koenen HJ, Sweep FC, Joosten I, Netea MG, Van der Ven AJ: Regulation of cytokine responses by seasonality of vitamin D status in healthy individuals. *Clin. Exp. Immunol.* 164, 72–79, 2011.

Kim DH, Meza CA, Clarke H, Kim JS, Hickner RC: Vitamin D and endothelial function. *Nutrients* 12, 1–17, 2020.

Knudsen C, Combes S, Mousavikhorshidi H, Oswald I, Gidenne T: An LPS-based method to stimulate the inflammatory response in growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 24, 55–65, 2016.

Kono K, Fujii H, Nakai K, Goto S, Kitazawa R, Kitazawa S, Shinohara M, Hirata M, Fukagawa, M, Nishi S: Anti-oxidative effect of vitamin d analog on incipient vascular lesion in non-obese type 2 diabetic rats. *Am. J. Nephrol.* 37, 167–174, 2013.

Kopáni M, Celec P, Danišovič L, Michalka P, Biró C: Oxidative stress and electron spin resonance. *Clin. Chim. Acta* 364, 61–66, 2006.

Kroese LJ, Scheffer PG: 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine and Cardiovascular Disease: a Systematic Review. *Curr. Atheroscler. Rep.* 16, 1–8, 2014.

Kubota M, Ohno J, Shiina Y, Suda T: Vitamin D Metabolism in Pregnant Rabbits : Differences between the Maternal and Fetal Response to Administration of Large Amounts of Vitamin D 3 110, 1950–1956, 2014.

Kuhn SO, Meissner K, Mayes LM, Bartels K: Vitamin C in sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol* 31, 55–60, 2018.

Labudzynski DO, Zaitseva OV, Latyshko NV, Gud Kova OO, Veliky MM: Vitamin D3 contribution to the regulation of oxidative metabolism in the liver of diabetic mice. *Ukr. Biochem. J.* 87, 75–90, 2015.

Leclerc J, Pu Q, Corseaux D, Haddad E, Decoene C, Bordet R, Six I, Jude B, Vallet B: A single endotoxin injection in the rabbit causes prolonged blood vessel dysfunction and a procoagulant state. *Crit Care Med* 28, 3672–3678, 2000.

Lin AMY, Chen KB, Chao PL: Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 319–29, 2005.

Lin Y, Ubels JL, Schotanus MP, Yin Z, Pintea V, Hammock BD, Watsky MA: Enhancement of vitamin D metabolites in the eye following vitamin D3 supplementation and UV-B irradiation. *Curr. Eye Res.* 37, 871–878, 2012.

Lindgren JU, Deluca HE, Mazess RB: Effects of 1, 25 (OH)₂D₃ on Bone Tissue in the Rabbit: Studies on Fracture Healing, Disuse Osteoporosis, and Prednisone Osteoporosis. *Calcif Tissue Int* 25, 591–595, 1984.

Liu SF, Malik AB: NF-κB activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* 290, 622–645, 2006.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N: Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn. Rev.* 4, 118–126, 2010.

Longoni A, Kolling J, Siebert C, dos Santos JP, da Silva JS, Pettenuzzo LF, Meira-Martins LA, Gonçalves CA, de Assis AM, Wyse ATS: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents deleterious effects of homocysteine on mitochondrial function and redox status in heart slices. *Nutr. Res.* 38, 52–63, 2017.

Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesbery WR: Elevated thiobarbituric acid-reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. *Neurology* 45, 1594–1601, 1995.

Lu SC: Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta* 1830, 3143–3153, 2013.

Malek HA, Shata A: Effect of a high dose of vitamin d on a rabbit model of atherosclerosis 27, 195–201, 2014.

Mallya SM, Corrado KR, Saria EA, Yuan FF, Tran HQ, Saucier K, Atti E, Tetradis S, Arnold A: Modeling vitamin D insufficiency and moderate deficiency in adult mice via dietary cholecalciferol restriction. *Endocr. Res.* 41, 290–299, 2016.

Markesbery WR, Lovell MA: Damage to Lipids, Proteins, DNA, and RNA in Mild Cognitive Impairment. *Am. Med. Assoc.* 64, 954–956, 2007.

Mayr FB, Yende S, Angus DC: Angus-Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5, 4–11, 2014.

Mazahery H, von Hurst PR: Factors affecting 25-hydroxyvitamin D concentration in response to vitamin D supplementation. *Nutrients* 7, 5111–5142, 2015.

Mokhtari Z, Hekmatdoost Z, Nourian M: Antioxidant efficacy of vitamin D. *J. Parathyr. Dis.* 5, 11–16, 2017.

Mokhtari-Zaer A, Hosseini M, Salmani H, Arab Z, Zareian P: Vitamin D 3 attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in rats by inhibiting inflammation and oxidative stress. *Life Sci.* 253(117703), 1-8, 2020.

Morris D, Morris D, Khurasany M, Nguyen T, Kim J, Guilford F, Mehta R: GSH and infection. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3329–3349, 2013.

Nair R, Maseeh A: Vitamin D: The “ sunshine ” vitamin. *J. Pharmacol. Pharmacother.* 3, 118–127, 2012.

Nair-Shalliker V, Armstrong BK, Fenech M: Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutat. Res.* 733, 50–57, 2012.

Nimse SB, Pal D: Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Adv.* 5, 27986–28006, 2015.

Nordberg J, Arner ESJ: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1287–1312, 2001.

Noyan T, Balaharoğlu R, Kömüroğlu U: The oxidant and antioxidant effects of 25-hydroxyvitamin D3 in liver, kidney and heart tissues of diabetic rats. *Clin. Exp. Med.* 5, 31–36, 2005.

Nyomba BL, Bouillon R, Moor PDE: Influence of Vitamin D Status on Insulin Secretion and Glucose Tolerance in the Rabbit. *Endocrinology* 115, 191–197, 1984.

Opal SM: Endotoxins and other sepsis triggers. *Contrib Nephrol.* 167, 14–24, 2010.

Öngen B, Kabaro C, Par Z: D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. *Türk Klin. Biyokim. Derg* 6, 23–31, 2008.

Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C: Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int. J. Biomed. Sci.* 4, 89–96, 2008.

Phaniendra A, Babu D: Free Radicals : Properties , Sources , Targets , and Their Implication in Various Diseases. *Ind J Clin Biochem* 30, 11–26, 2015.

Pilz S, Pilz S, Zittermann A, Trummer C, Theiler-schwetz V, Lerchbaum E, Keppel MH, Grübler MR, März W, Pandis M: Vitamin D testing and treatment : a narrative review of current evidence. *Endocr. Connect.* 8, 27–43, 2019.

Praag EV: Vitamin D deficiency in rabbits [WWW Document]. *medirabbit.com*. URL http://www.medirabbit.com/Safe_medication/Vitamins/VitD_results_en.pdf (erişim 7.12.17) , 2014.

Prosser DE, Jones G: Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem. Sci.* 29, 664–673, 2004.

Pulido D, Nogús MV, Boix E, Torrent M: Lipopolysaccharide neutralization by antimicrobial peptides: A gambit in the innate host defense strategy. *J. Innate Immun.* 4, 327–336, 2012.

Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K: Oxidative Stress , Prooxidants , and Antioxidants : The Interplay. Biomed Res Int. 2014, 1–19, 2014.

Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sankara SP, Kartha CC: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. Life Sci. 70, 1777–1788, 2002.

Rao LG, Mackinnon ES, Josse RG, Murray TM, Strauss A, Rao AV: Lycopene consumption decreases oxidative stress and bone resorption markers in postmenopausal women. Osteoporos Int. 18, 109–115, 2007.

Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodriguez M, Moyano S: Sepsis: A Review of Advances in Management. Adv. Ther. 34, 2393–2411, 2017.

Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Herrera F, Antoli I: Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. J. Pineal Res. 36, 1–9, 2004.

Sampath VP: Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. Agric. Nat. Resour. 52, 115–120, 2018.

Sara SMF, Raj BSS, Mouli VSC: Study of Vitamin D Deficiency in Patients with Diffuse Body Pains. J. Med. Sci. Clin. Res. 2, 1274–1293, 2014.

Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M Comparative effectiveness of vitamin D3 and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in sprague - Dawley rats. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 66, 39–45, 1996.

Schauber J, Gallo RL: The vitamin D pathway: a new target for control of the skin's immune response? Exp Dermatol. 17, 633–639, 2008.

Sezgin G, Öztürk G, Güney Ş, Sinano O, Tunçdemir M: Protective Effect of Melatonin and 1 , 25-Dihydroxyvitamin D3 on Renal Ischemia – Reperfusion Injury in Rats 35, 374–379, 2013.

Song EJ, Thomson C, Cole L, Stern H, Halliday GM, Damian DL, Reeve VE, Mason RS: $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ reduces several types of UV-induced DNA damage and contributes to photoprotection. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 136, 131–138, 2013.

Soromou LW, Jiang L, Wei M, Chen N, Huo M, Chu X, Zhong W, Wu Q, Baldé A, Deng X, Feng H: Protection of mice against lipopolysaccharide-induced endotoxic shock by pinocembrin is correlated with regulation of cytokine secretion. *J Immunotoxicol* 11, 56–61, 2014.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Spence DW, Kato H, Cardinali DP: Melatonin in septic shock: Some recent concepts. *J. Crit. Care* 25, 656.e1–656.e6, 2010.

Sun Y, Shang D: Inhibitory Effects of Antimicrobial Peptides on Lipopolysaccharide-Induced Inflammation. *Mediators Inflamm.* 1, 1-8, 2015.

Tagliaferri S, Porri D, De Giuseppe R, Manuelli M, Alessio F, Cena H: The controversial role of Vitamin D as an antioxidant: results from randomised controlled trials. *Nutr Res Rev* 32, 99–105, 2019.

Takeuti FAC: Applications of Vitamin D in Sepsis Prevention. *Discov Med.* 25, 291–297, 2018.

Taysi S, Koç M, Büyükokuroğlu ME: Melatonin reduces lipid peroxidation and nitric oxide during irradiation-induced oxidative injury in the rat liver. *J. Pineal Res.* 34, 173–177, 2003.

Tohari AM, Alhasani RH, Biswas L, Patnaik SR, Reilly J, Zeng Z, Shu X: Vitamin D attenuates oxidative damage and inflammation in retinal pigment epithelial cells. *Antioxidants* 8, 1–14, 2019.

Trongtrakul K, Feemuchang C: Prevalence and association of vitamin D deficiency and mortality in patients with severe sepsis. *Int. J. Gen. Med.* 10, 415–421, 2017.

Tsao CM, Ho ST, Wu CC: Coagulation abnormalities in sepsis. *Acta Anaesthesiol. Taiwanica* 53, 16–22, 2015.

Valavanidis A, Vlachogianni T: 8-OHdG: A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *J. Environ. Sci. Heal.* 27, 120–139, 2017.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39, 44–84, 2007.

Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1–40, 2006.

Van Etten E, Mathieu C: Immunoregulation by 1,25-dihydroxyvitamin D₃: Basic concepts. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 97, 93–101, 2005.

Vera S, Mart R, Gormaz JG, Gajardo A, Galleguillos F: Novel relationships between oxidative stress and angiogenesis-related factors in sepsis: New biomarkers and therapies. *47(4)*, 289–300, 2015.

Victor V, Rocha M, Esplugues J, Fuente M: Role of Free Radicals in Sepsis: Antioxidant Therapy. *Curr. Pharm. Des.* 11, 3141–3158, 2005.

Victor VM, Rocha M, De La Fuente M: Immune cells: Free radicals and antioxidants in sepsis. *Int. Immunopharmacol.* 4, 327–347, 2004.

Wacker M, Holick MF: Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 5, 111–148, 2013.

Wacker M, Holick M: Vitamin D—Effects on Skeletal and Extraskeletal Health and the Need for Supplementation. *Nutrients* 5, 111–148, 2013.

Wagner CL, Greer FR: Prevention of rickets and vitamin D deficiency in infants, children, and adolescents. *Am. Acad. Pediatr.* 122, 1142–1152, 2008.

Watkins RR, Yamshchikov AV, Lemonovich TL, Salata RA: The role of vitamin D deficiency in sepsis and potential therapeutic implications. *J. Infect.* 63, 321–326, 2011.

Wei R, Christakos S: Mechanisms underlying the regulation of innate and adaptive immunity by vitamin D. *Nutrients.* 7(10), 8251–8260, 2015.

Wimalawansa SJ: Vitamin D Deficiency: Effects on Oxidative Stress, Epigenetics, Gene Regulation, and Aging Sunil. *Biology (Basel).* 8, 1–15, 2019.

Wu LL, Chiou C, Chang P, Wu JT: Urinary 8-OHdG : a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer , atherosclerosis and diabetics. *Clin. Chim. Acta* 339, 1–9, 2004.

Wu X, Hu W, Lu L, Zhao Y, Zhou Y, Xiao Z, Zhang L, Zhang H, Li X, Li W, Wang S, Cho CH, Shen J, Li M: Repurposing vitamin D for treatment of human malignancies via targeting tumor microenvironment. *Acta Pharm. Sin. B* 9, 203–219, 2019.

Xu S, Chen YH, Tan ZX, Xie DD, Zhang C, Xia MZ, Wang H, Zhao H, Xu DX, Yu DX: Vitamin D3 pretreatment alleviates renal oxidative stress in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 152, 133–141, 2015.

Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G: Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch. Biochem. Biophys.* 430, 97–103, 2004.

Yim S, Dhawan P, Ragunath C, Christakos S, Diamond G: Induction of cathelicidin in normal and CF bronchial epithelial cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Cyst. Fibros.* 6, 403–410, 2007.

Yorgancı K: Sepsis Patofizyolojisi. *Yoğun Bakım Derg.* 5(2), 80–84, 2005.

Zafalon RVA, Risolia LW, Pedrinelli V, Vendramini THA, Rodrigues RBA, Amaral AR, Kogika MM, Brunetto MA: Vitamin D metabolism in dogs and cats and its relation to diseases not associated with bone metabolism. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 104, 322–342, 2020.

Zarjou A, Agarwal A: Sepsis and Acute Kidney Injury. *J Am Soc Nephrol* 22, 999–1006, 2011.

Zhang Y, Leung DYM, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E: Vitamin D Inhibits Monocyte/Macrophage Proinflammatory Cytokine Production by Targeting MAPK Phosphatase-1. *J. Immunol.* 188, 2127–2135, 2012.

Zhou K, Chen D, Jin H, Wu K, Wang X, Xu H, Zhang X: Effects of calcitriol on experimental spinal cord injury in rats. *Spinal Cord*. 54, 510–516, 2016.

Zittermann A: Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br. J. Nutr.* 89, 552–572, 2003.

Zittermann A, Gummert JF: Nonclassical Vitamin D Actions. *Nutrients* 2, 408–425, 2010.