

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU

“STREPTOZOTOSİNLE OLUŞTURULMUŞ DİYABETTE
D VİTAMİNİNİN ETKİLERİ”

Dr. Humeyra ÇİÇEKLER

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Said Sami Erdem

KONYA
2011

KISALTMALAR	iii
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. DİYABETES MELLİTUS	3
2.1.1. Tanım.....	3
2.1.2. Epidemiyoloji	3
2.1.3. Tanı	4
2.1.4. Diyabetes Mellitus' un Etiyolojik Sınıflandırılması.....	5
2.1.4.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus	7
2.1.4.1.1. Tip 1 Diyabetin Tanımı	7
2.1.4.1.2. Tip 1 Diyabetin Etiyolojisi ve Patogenezi	8
2.1.4.1.3. Tip 1 Diyabetin Kliniği	10
2.1.4.1.4. Tip 1 Diyabetin Tedavisi	10
2.1.4.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus	11
2.1.4.3. Diyabetin Diğer Spesifik Tipleri	11
2.1.4.4. Gestasyonel Diyabetes Mellitus	12
2.1.5. Diyabetin Komplikasyonları	13
2.1.5.1. Diyabetin Akut Komplikasyonları	13
2.1.5.2. Diyabetin Kronik Komplikasyonları	13
2.1.6. Deneysel Diyabet	14
2.2. D VİTAMİNİ	15
2.2.1. D vitamini Sentez ve Metabolizması.....	15
2.2.2. D vitamininin Fonksiyonları.....	17
2.2.2.1. Kalsiyum metabolizması ile ilgili fonksiyonları	17
2.2.2.2. Kalsiyum metabolizması haricindeki fonksiyonları	18
2.2.3. D vitamininin Kaynakları	19
2.2.4. D Vitaminini Düzeyleri	20
2.2.5. D Vitamini ve Diyabet İlişkisi.....	20
2.2.6. Tip 1 Diabette D Vitaminin Etki Mekanizması.....	20
2.2.6.1. Moleküler Seviyede Etkileri.....	20
2.2.6.2. Genomik Etkileri	21
2.2.6.3. İmmün Sistem Üzerine Etkileri	23
2.2.7. Vitamin D Reseptörü (VDR).....	24
2.3. SERBEST RADİKALLER	25
2.3.1. Serbest Radikal Çeşitleri	26
2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-).....	26
2.3.1.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H_2O_2)	27
2.3.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$)	27
2.3.1.4. Singlet (Tekli) Oksijen (1O_2)	27
2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri.....	28
2.3.2.1. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)	28
2.3.2.2. Proteinlere Etkileri.....	28
2.3.2.3. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri	29
2.3.2.4. Karbonhidratlara Etkileri.....	29
2.4. ANTİOKSİDANLAR	29
2.4.1. Antioksidan Etki Tipleri	30
2.4.2. Antioksidan Çeşitleri	31
2.4.2.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar.....	31

2.4.2.1.1. Enzimatik Antioksidanlar	31
2.4.2.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	33
2.4.2.2. Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)	35
2.4.2.3. Gıda Antioksidanları.....	36
2.4.3. Diyabet ve Oksidatif Stres.....	37
2.5. PARAOKSONAZ	40
2.5.1. Tanım.....	40
2.5.2. Tarihçe	40
2.5.3. Kimyasal Yapısı	41
2.5.4. Paraoksonaz 1 Gen Polimorfizmi	42
2.5.5. Substratları.....	43
2.5.6. Sentez ve Sekresyonu	44
2.5.7. Paraoksonaz 1' in Fonksiyonları	44
2.5.8. Paraoksonaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler	45
2.5.9. Paraoksonaz Aktivitesi ve Diyabet.....	46
2.6. IP-10	46
2.6.1. Tanım.....	46
2.6.2. Kemokin Ailesi.....	47
2.6.3. IP-10 ve İlişkili Olduğu Çeşitli Otoimmün hastalıklar.....	47
2.6.4. IP-10 ve Diyabet.....	48
3. MATERYAL VE METOD	51
3.1. MATERYAL	51
3.1.1. Vakaların Oluşturulması, Gruplama ve Deneysel Uygulama İle İlgili Hususlar ...	51
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	53
3.2.METOD.....	53
3.2.1. Total Antioksidan Status (TAS) Analizi	53
3.2.2. Total Oksidan Status TOS) Analizi	54
3.2.3. Paraoksonaz Aktivitesi Tayini	54
3.2.4. IP-10 Ölçümü	54
3.2.5. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü	55
3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi.....	55
4. BULGULAR	56
5. TARTIŞMA.....	63
5.1. Glukoz ve Kilo Parametrelerinin Tartışması	63
5.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Tartışması	66
5.4. Paraoksonaz Parametresinin Tartışması	69
5.5. IP-10 Parametresinin Tartışması	71
6. ÖZET	74
7. ABSTRACT	75
8. KAYNAKLAR.....	76

KISALTMALAR

ADA: American Diabetes Association
AGE: Advanced Glycation End-products
BHA: Butylated hydroxyanisole
BHT: Butylated hydroxylated
cAMP: Siklik adenozin monofosfat
CC: β -kemokinler
CXC: α -kemokinler
CX₃C: ϵ -kemokinler
CXCR3: IP-10 reseptörü
DCCT: The Diabetes Control and Complications Trial
DKA: Diyabetik Ketoasidoz
DM: Diyabetes Mellitus
DMSO: Dimetil sülfoksit
GAD: Glutamik asit dekarboksilaz
GFR: Glomerular filtration Rate
GR=Glutasyon redüktaz
GSH: Redükte glutasyon
GSSG: Okside glutasyon
GSH-Px: Glutasyon peroksidaz
IAA: Insuline autoantibodies
IA-2 ve IA-2 β : Tirozin fosfataz otoantikorları
ICAs: Islet Cell Antibodies
IFG: Impaired Fasting Glucose
IGT: Impaired Glucose Tolerance
ICA512A: Transmembran protein tirozin fosfataz
IPF: İnsulin promoter factor
IP-10: Interferon gama inducible protein
iNOS: İnflamatuvar nitrik oksit sentetaz
HLA: Human leukocyte antigen
HHD: Hiperozmolar hiperglisemik durum
HNF: Hepatosit nükleer Faktör
HO₂: Perhidroksil radikali
H₂O₂: hidrojen peroksid
HOCl: Hipoklorit
LA: Laktik asidoz
LOOH: Lipid hidroperoksit
MDA: Malondialdehit
MODY: Maturity-onset diabetes of young
NFkB: Nükleer faktör kapa B
NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program
NO : Nitrik oksit
NO₂: Azot dioksit
NO₂⁺: Nitronyum İyonu
O₂⁻: Süperoksit Radikali
¹O₂: Singlet (Tekli) Oksijen
OGTT: Oral glukoz tolerans testi
OH: Hidroksil radikali
PKC: Protein kinaz C

PON: Paraoksonaz
RANK: Reseptör activator nucleus factor-Kb
RXR: Retinoik asit X reseptörü
SLE: Sistemik Lupus Eritematozis
SOD: Süperoksit Dismutaz
STZ: Streptozotosin
TOS: Total oksidatif status
TAS: Total antioksidan status
Th1: T helper 1
TNF: Tümör Nekrotizan Faktör
TURDEP: Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu
VDBP: Vitamin D bağlayıcı protein
VDRE: Vitamin D response element
VDR: Vitamin D reseptörü

TABLÖLAR

Tablo 1: Diyabetes Mellitus'un tanı kriterleri	4
Tablo 2: Diyabet için artmış risk kategorileri	4
Tablo 3: Diyabetes mellitus' un etyolojik sınıflaması (ADA 2010)	5
Tablo 4: Grupların başlangıç ve son glukozlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri ...	56
Tablo 5: Grupların başlangıç ve son kilolarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri.....	56
Tablo 5: Grupların glukoz ve kilo parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılması	58
Tablo 6: Grupların başlangıç ve son glukozlarının kendi aralarında istatistiksel karşılaştırılması(ANOVA-Tukey Test Sonuçları).....	57
Tablo 7: Grupların başlangıç ve son glukozlarının grup içi istatistiksel karşılaştırılması (Student t Test Sonuçları).....	58
Tablo 8: Grupların başlangıç ve son kilolarının grup içi istatistiksel karşılaştırılması (Student t Test Sonuçları	58
Tablo 9: Gruplara ait TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri	60
Tablo10: Grupların TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılması (ANOVA-Tukey Test Sonuçları)	60

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Vitamin D	16
Şekil 2: D Vitaminin Metabolik Aktivasyonu	16
Şekil 3: D vitamininin deride sentezi, metabolizması ve kalsiyum homeostazı ile hücrel gelişimi düzenlemesi	17
Şekil 4: D Vitaminin Rankl Aracılı Kemik Resorpsiyonu Üzerine Etkisi	18
Şekil 5: D Vitamininin Kalsiyum Metabolizması Haricindeki Etkileri	19
Şekil 6: 1,25(OH) ₂ D ₃ ' ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine nongenomik etkileri	21
Şekil 7: 1,25(OH) ₂ D ₃ ' ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine genomik etkileri	22
Şekil 8: D vitaminin sitokinler aracılı diyabet üzerine etkisi	23
Şekil 9: Vitamin D' nin hedef hücrede VDR yoluyla transkripsiyon üzerine etkileri	24
Şekil 10: Antioksidan Savunma Sistemler	30
Şekil 11: Glutasyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü	32
Şekil 12: Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması	38
Şekil 13: Paraoksonazın Yapısı	42
Şekil 14: Beta Hücre Hasarı	49
Şekil 15: Beta Hücre Proliferasyonun CXCL10/CXCR3 sistem tarafından Bloke Edilmesi	49
Şekil 16: Ratların kafesleri	52
Şekil 17: Ratlardan intrakardiyak kan alınması	53
Şekil 18: Gruplara ait başlangıç ve son glukozlarının medyan değerlerinin histogramı	59
Şekil 19: Gruplara ait başlangıç ve son kiloların medyan değerlerinin histogramı	59
Şekil 20: Gruplara ait TAS medyan değerlerinin histogramı	61
Şekil 21: Gruplara ait TOS medyan değerlerinin histogramı	62
Şekil 22: Gruplara ait PON medyan değerlerinin histogramı	62
Şekil 23: Gruplara ait IP-10 medyan değerlerinin histogramı	62

1. GİRİŞ

Diyabetes Mellitus; insülin sekresyonu, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, özellikle hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik, metabolik bir hastalıktır.

D vitamini yağda eriyen vitaminlerden biridir. D vitamini klasik bir vitamin olmaktan çok, bir hormon olarak işlev görmektedir. D vitamini kemik, barsak, böbrek ve paratiroid bezler üzerine gösterdiği fizyolojik etkilerle kalsiyum ve fosfor metabolizmasını düzenler.

D vitaminin osteoblastların yanı sıra immün sistem elemanlarında ve pankreas da dahil olmak üzere çeşitli dokularda reseptörlerinin bulunmasından sonra D vitamini otoimmün, inflamatuvar ve neoplastik birtakım hastalıklarda çalışma konusu olmuştur. Tip1 diyabetin etyolojisinde immunitenin ve enflamasyonun rolü açıktır. Hiperglisemiye bağlı tetiklenen oksidatif hasar da gözönünde bulundurulduğunda pankreas dokusunda insülinitis kaçınılmazdır.

Organizmada metabolik ve fizyolojik işlemler sürecinde reaktif oksijen türleri açığa çıkar. Organizmanın sahip olduğu enzimatik ve nonenzimatik antioksidan mekanizmalarla bu oksidan moleküller normalde vücuttan uzaklaştırılır. Oksidatif stres, membranlardaki lipidler ve LDL-kolesterolün peroksidasyonu ile diyabetik komplikasyonların gelişmesinde oldukça önemlidir. Bu peroksitler, beta hücre işlevini bozabilir ve apoptoza sebep olur. Özellikle de antioksidan savunma sistemleri daha zayıf olan diyabetiklerde artan reaktif oksijen metabolitleri üretimi glikasyon ve glikooksidasyon ürünlerinin artmasına yol açmaktadır. Total oksidatif status (TOS) ve Total antioksidan status (TAS) testleri kullanılarak bireyin oksidatif stres durumu tesbit edilir.

Paraoksonaz, LDL ve HDL lipoproteinlerini oksidatif hasara karşı koruyan, antioksidan ve antiaterojenik işleve sahip HDL-liporoteinine sıkıca bağlı bir enzimdir. Paraoksonaz gibi organizmayı oksidatif stresten koruyan enzim seviyeleri tip 1 diyabette düşük olarak bulunmuştur. Fakat D vitaminin bu enzim üzerine etkisini değerlendiren herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Literatürde D vitaminin immünsüpresif ve immunmodülatör etkileri sitokinler aracılığıyla ortaya konmuştur. İnterferon-İndüçible Protein (IP-10) kemokinler olarak bilinen kemotaktik bir sitokindir. İmmün cevabı tetikleyerek pankreas adacık hücrelerinde hasara yol açar. Yapılan çalışmalarda tip 1 diyabette IP-10 seviyesi yüksek bulunmuştur.

Fakat D vitaminin IP-10 düzeyi üzerine etkisini araştıran çok sınırlı sayıda araştırma vardır.

D vitaminin diyabet üzerindeki koruyucu ve iyileştirici etkisini araştırdığımız bu çalışmanın diyabet ve D vitamini arasındaki ilişkiye yeni bakış açıları sunacağını dūřünüyoruz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİYABETES MELLİTUS

2.1.1. Tanım

Diyabetes Mellitus; insülin sekresyonu, insülin aktivitesi veya her ikisindeki kusurlardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize metabolik hastalıklar grubudur (1).

Diyabet, akut komplikasyonları önlemek ve uzun süreli komplikasyonları azaltmak için sürekli tıbbi bakıma ve hasta eğitimine ihtiyaç duyulan kronik bir hastalıktır (2).

2.1.2. Epidemiyoloji

Diyabetli hasta sayısı yaşlanma, obezitede artış, fiziksel inaktivite ve kentselleşme gibi nedenlerden dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Diyabetin prevalansını ve diyabetten etkilenmiş kişi sayısını şimdi ve ilerisi için belirlemek, mantıklı plan yapabilmek ve gerekli kaynakların temin edilebilmesi için önemlidir (3).

Diyabetin dünya genelinde prevalansını saptamak için yapılan çalışmada 1995'te %4 olan olan diyabet prevalansının 2025'te %5.4 e çıkacağı, 1995'te 135 milyon olan rakamın 2025'te 300 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (4).

Türkiye'de ise diyabet taramaları ile ilgili veriler ilk kez 1960'lı yılların başında Türk Diyabet Cemiyeti'nin başlattığı taramalarla bildirilmeye başlamıştır. O dönemde glukozürinin sıklığı ile başlatılan çalışmalarda 18 yaş üstünde ortalama %1.5-2 aralığında bir prevalans bildirilirken; bu rakam ilerleyen dönemlerde sürekli artış göstermiştir. Türkiye' de popülasyona dayalı ilk diyabet taraması 1999–2000 yıllarında Türk Diyabet Epidemiyoloji Çalışma Grubu (TURDEP) tarafından yapılmış ve diyabetin prevalansı erişkin yaş nüfusta %7.2 ve bozulmuş glukoz toleransı prevalansı %6.7 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada Türkiye'de 2,6 milyon civarında diyabet hastası olduğu ve 0,8 milyon kişinin bundan habersiz olduğu ve 2,4 milyon kişinin ise bozulmuş glukoz toleransı olabileceği belirtilmiştir. Obez, hipertansif ve ailesinde diyabet öyküsü bulunanların artmış risk grubunda olduğu belirtilmiştir (5).

2.1.3. Tanı

Diyabetes Mellitus'un tanı kriterleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Diyabetes Mellitus'un tanı kriterleri (1)

1. HbA1c $\geq$ %6.5 Test, NGSP (National Glycohemoglobin Standardization Program) sertifikalı ve DCCT (The Diabetes Control and Complications Trial) çalışmasına standardize edilmiş metodu kullanan bir laboratuarda çalışılmalı.
veya
2. Açlık plazma glukoz değerinin $\geq$ 126 mg/dl olması: En az 8 saatlik açlık sonrası.
veya
3. Oral glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin $\geq$ 200mg/dl olması.
veya
4. Hiperglisemi veya hiperglisemik krizin klasik semptomları olan hastada rastgele ölçülen plazma glukoz değerinin $\geq$ 200mg/dl olması.

Not: Birbirine yakın hiperglisemi değerleri yokluğunda, ilk 3 kriter tekrarlayan ölçümlerle doğrulanmalıdır.

Diyabet için artmış risk kategorileri Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: Diyabet için artmış risk kategorileri (1)

1. IFG (Bozulmuş Açlık Glukozu): Açlık glukoz değerinin 100-125 mg/dl olması.
2. IGT (Bozulmuş Glukoz Toleransı): 75 gr glukozla yapılan oral glukoz testi sonucunda 2. saat glukoz değerinin 140-199 mg/dl olması.
3. HbA1c değerinin% 5.7–6.4 olması.

2.1.4. Diyabetes Mellitus' un Etyolojik Sınıflandırılması

Diyabetes mellitus' un etyolojik sınıflaması Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3: Diyabetes mellitus' un etyolojik sınıflaması (ADA 2010)

I. Tip 1 Diyabet: (pankreas β hücre hasarına bağlı oluşan insülin eksikliği sorumludur)

a) İmmünolojik

b) İdiyopatik

II. Tip 2 Diyabet: (değişken derecede insülin rezistansı, rölatif insülin eksikliği vardır)

III. Diğer Spesifik Tipler

a) Beta hücre fonksiyonunda genetik defekt

- Kromozom 12, HNF-1 α (MODY3)
- Kromozom 7, glikokinaz (MODY2)
- Kromozom 20, HNF-4 α (MODY1)
- Kromozom 13, IPF-1 (MODY4)
- Kromozom 17, HNF-1 (MODY5)
- Kromozom 2, NeuroD1 (MODY6)
- Mitokondriyal DNA
- Diğerleri

b) İnsülin etkisinde genetik defekt

- Tip A insülin rezistansı
- Leprechaunizm
- Rabson-Mendelhall sendromu
- Lipoatrofik diyabet
- Diğerleri

c) Ekzokrin pankreas hastalıkları

- Pankreatit
- Travma / pankreatektomi
- Neoplazm
- Kistik fibrozis

- Hemakromatozis
- Fibrokalküloz pankreas
- Diğerleri

d) Endokrinopati

- Akromegali
- Cushing sendromu
- Glukagonoma
- Feokromasitoma
- Hipertiroidizm
- Somatostatinoma
- Aldosteronoma
- Diğerleri

e) Enfeksiyonlar

- Konjenital rubella
- Sitomegalovirus
- Diğerleri

f) İmmün diyabetin bilinmeyen formları

- “Stiff-man” sendromu
- Anti- insülin antikoru
- Diğerleri

g) İlaç ya da kimyasallara bağlı

- Pentamidin
- Nikotinic asit
- Glikokortikoidler
- Tiroid hormonu
- Diazoksit
- Beta adrenerjik agonistler
- Tiazidler
- Dilantin
- Alfa- interferon
- Diğerleri

h) Diyabetle bazen birlikteliği olan genetik sendromlar

- Down sendromu
- Klinefelter sendromu
- Turner sendromu
- Wolfram sendromu
- Friedreich ataksisi
- Huntington koreası
- Laurence-Moon-Biedl sendromu
- Miyotonik distrofi
- Porfiria
- Prader-Willi sendromu
- Diğerleri

IV. Gestasyonel diyabet

2.1.4.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

2.1.4.1.1. Tip 1 Diyabetin Tanımı

Tip 1 diyabet ciddi insülin eksikliği ile karakterize olup, otoimmün kaynaklı tip 1 diyabet ve idiopatik tip 1 diyabet olmak üzere iki ayrı grupta incelenir.

• Otoimmün Kaynaklı Tip 1 Diyabet

Diyabetlilerin yalnızca %5-10' unu oluşturan diyabetin bu formu, pankreas dokusundaki beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ile karakterizedir ve önceleri insülin -bağımlı diyabet, tip 1 diyabet veya juvenil başlangıçlı diyabet olarak isimlendiriliyordu.

Pankreasın β hücrelerinin immün yıkımının belirleyicileri adacık hücre otoantikorları, insülin otoantikorları, glutamik asit dekarboksilaz (GAD) otoantikorları, tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 β otoantikorlarını içerir. Açlık hiperglisemisi tesbit edildiğinde bu antikorlardan bir veya genellikle daha fazlası bireylerin %85-90' ında saptanır. Pankreas β hücrelerinin yıkımının HLA (Human leukocyte antigen) bölgesindeki genler ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Diyabet gelişimi ile HLA DR bölgesindeki klas 2 antijenleri kuvvetli korelasyon göstermektedir. Tip 1 diyabette β hücre harabiyet hızı son derece değişkendir. İnfant ve çocuklarda genellikle hızlı; yetişkinlerde ise yavaştır. Ketoasidoz bu hastalığın ilk

ortaya çıkış şekli olabilir. Başlayan otoimmün süreç pankreas β hücre kitlesinin tedrici kaybına neden olur. β hücrelerinin otoimmün yıkımının, birçok genetik predispozan ve hala tam olarak tarif edilemeyen çevresel faktörlerle ilişkisi vardır. Bu hastalar Hashimoto tiroiditi, vitiligo, pernisiyöz anemi gibi diğer otoimmün hastalıklara da yatkındır. Otoimmün kaynaklı tip 1 diyabet genellikle çocukluk ve adolesan dönemde ortaya çıkar fakat hayatın 8. ve 9. dekatlarında dahi olsa herhangi bir yaşta da ortaya çıkabilir (1).

- **İdyopatik Tip 1 Diyabet**

Tip 1 diyabetin bazı formlarının etyolojisi bilinmemektedir. İdyopatik tip 1 diyabeti olan hastalardan bazılarında kalıcı insülin azlığı vardır ve bunlar ketoasidoza yatkındırlar fakat otoimmunitenin herhangi bir kanıtı da yoktur. Tip 1 diyabeti olan hastaların az bir kısmı bu forma girse de; bunlardan çoğunluğu Afrika veya Asya kökenlidir. Diyabetin bu formuna sahip hastalar epizodik ketoasidoz ataklarından muzdariplerdir. İdyopatik tip 1 diyabet, güçlü bir şekilde kalıtsaldır, otoimmüniteyle ilgili herhangi bir kanıt yoktur ve HLA ile bağlantılı değildir (1).

2.1.4.1.2. Tip 1 Diyabetin Etiyolojisi ve Patogenezi

Etiyolojide genetik, çevresel ve otoimmün faktörler önemli rol oynamaktadır.

- **Genetik Faktörler**

Çocukluk çağı diyabetinin açık bir genetik geçişi olmadığı bildirilmesine karşın, tip 1 diabetes mellitus' ta görülen bazı genetik belirleyicilerin bazı aile bireylerinde daha sık görüldüğü saptanmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tip 1 diyabet gelişiminde genetik faktörlerin önemli yer tuttuğu bildirilmesine karşın, herhangi bir mendelian kalıtsal faktörün tek başına rol oynamadığı ve gelişiminin kompleks ve multifaktöryel olduğu öne sürülmektedir. Şu ana kadar tip 1 diyabet gelişimi için resesif veya dominant geçiş tanımlanmamıştır. HLA genlerinin tip 1 diyabet gelişiminde önemli rollerinin olduğu bilinmesine karşın; %20' sinde HLA dışındaki genlerin de diyabete yatkınlık sağladığı saptanmıştır. Tip 1 diyabetli bir bireyin birinci derece akrabalarında diyabet gelişme riskinin 15–20 kat daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Tek yumurta ikizlerinin ikisinde de tip 1 diyabet gelişim oranının eşit olmaması, genetik faktörlerin dışında çevresel faktörlerin de önemli rolü olduğunu gösterir (6).

- **Otoimmunité**

Otoimmun süreç ile birlikte pankreasın adacık hücrelerinde insülin sekresyonu azalmaktadır. Otoimmun kaynaklı tip 1 diyabetes mellitus'ta insülin sekresyonundaki azalma iki mekanizma ile olmaktadır. Bunlardan birincisi pankreasın beta hücrelerinin haraplanması iken diğer mekanizma ise ortamdaki sitokinlerin pankreasın beta hücrelerinden insülin sekresyonunu azaltmaları ile olmaktadır. Tip 1 diyabet geliştiren hastalardaki otoimmun yıkım sürecinin bireysel farklılıklar göstermesi nedeniyle balayı süreleri de bireysel değişkenlikler gösterebilmektedir. Hastalarda otoimmun süreç dört fazda gerçekleşmektedir;

1. Çevresel faktörlere maruziyet
2. T hücrelerinin uyarılması
3. T hücrelerinin farklılaşması
4. Beta hücrelerinin haraplanması

Diyabet gelişiminde ilk tanımlanan antikor, adacık hücre antikorı (ICAs=Islet Cell Antibodies) olup, daha sonra yapılan araştırmalarda insülin (IAA=insuline autoantibodies), glutamik asit dekarboksilaz (GAD65A) ve transmembran protein tirozin fosfataz (ICA512A) antikorları da tanımlanmıştır. Radyoimmunoassay yöntemlerle kolaylıkla tanımlanabilen bu antikorların immun kaynaklı tip 1 diyabet tanısında önemli rolü olduğu saptanmıştır (6).

- **Çevresel Faktörler**

Çevresel faktörler, tip 1 diyabet gelişiminde önemli olan otoimmunitenin başlamasında, süpresyonunda veya başlamış olan otoimmunitenin progresyonunun değişiminde önemli rol oynamaktadırlar. Bilinen en önemli olası çevresel faktörler; diyet, hijyen ve toksinlerdir. Genetik yatkınlığı olan bireylerde tip 1 diyabet gelişimi çevresel faktörlere maruziyet sıklığına ve süresine bağlıdır. Tip 1 diyabet, çevresel ve ırksal faktörlerden etkilenmesinin yanında mevsimsel faktörlerden de etkilenmektedir. Dünyanın, güney ve kuzey yarım küresine yerleşmiş olan dünya ülkelerinde sonbahar ve kış aylarında tip 1 diyabet epidemilerinin daha sık gözlemlendiği saptanmıştır. Tip 1 diyabet, yaz dönemi daha az epidemiler yaparken kış ve sonbahar aylarında viral enfeksiyon sıklığındaki artışla ilişkili olarak epidemi sıklığının daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bunun dışında; perinatal dönemde enfeksiyonlara maruziyetin riski artırdığı öne sürülmüştür (6).

2.1.4.1.3. Tip 1 Diyabetin Kliniği

Çocukluk dönemi diyabetinin klinik gidişi prediyabet, diyabetin ortaya çıkışı, kısmi remisyon (balayı) ve total diyabet evresi olarak 4 evrede sınıflandırılmaktadır. Çocukluk yaş grubunda diyabet tanısı, semptomların akut başlaması nedeniyle kolaylıkla konabilmektedir. Bazen başlangıç bulguları hafif olup aile tarafından fark edilmeyebilir. Bazı ülkelerde ve belirli durumlarda diyabetin klinik bulguları daha yavaş bir başlangıç gösterebilir ve bu durum tanıda güçlükler neden olabilmektedir. Serum glukoz düzeyinin renal eşiğin üzerine çıkması ile birlikte diyabetin klinik bulguları olan poliüri semptomu ortaya çıkmaktadır. Çocuk ve adolesan yaşlarında diyabetin en sık klasik başvuru semptomları poliüri, polidipsi, kilo kaybı, halsizlik ve yorgunluktur. Diyabetin diğer klasik bulgularından olan polifaji semptomu çocukluk döneminde ketozisin anoreksik etkisi nedeni ile sık görülmemektedir. Diyabet gelişmiş hastalarda, kalori kaynağı olan glukozun büyük bir çoğunluğunun idrar yolu ile kaybı ve artan lipolize bağlı olarak subkutan yağ dokusunun azalması kilo kaybına neden olmaktadır (6).

2.1.4.1.4. Tip 1 Diyabetin Tedavisi

Yeni tanılı tip 1 diyabetli olguların eğitimi karmaşık ve zaman alıcıdır. Tedavideki genel amaç metabolik dengeyi sağlayarak kısa dönem (hipoglisemi, diyabetik ketoasidoz) ve uzun dönemde görülen komplikasyonları (retinopati, nefropati, nöropati vs.) en aza indirmektir. İnsülin tedavisinin tipi ve uygulama saatlerinin seçimi hastanın psikososyal gelişimini bozmayacak ve optimal metabolik kontrol sağlayacak şekilde bireyselleştirilmelidir. Bunun için diyabet ekibi tarafından çocuğun yaşı uygun ise çocuk da dahil olmak üzere aileye diyabet eğitimi verilmelidir (6).

Tip 1 diyabetli olgulara yaklaşım algoritması

1. İnsülin tedavisi
2. Nütrisyonel yaklaşım
3. Egzersiz
4. Glisemik kontrolün monitorizasyonu
5. Hastalık durumlarında yaklaşım
6. Diyabet konusunda ailenin eğitimi
7. Hastalara psikososyal açıdan yaklaşım ve değerlendirme
8. Diyabetle ilişkili komplikasyonların takibi ve taraması
9. Diyabet ile ilişkili hastalıkların takibi (Hashimoto tiroidi, Gluten enteropatisi vs.)
10. Diyabet ile ilgili komplikasyonların önlenmesi ve tedavisi

2.1.4.2. Tip 2 Diyabet

Tüm diyabetiklerin yaklaşık %90-95'ini oluşturur. İnsülin rezistansı vardır ve mutlak insülin eksikliğinden ziyade rölatif bir insülin eksikliği mevcuttur.

Vakaların çoğu başlangıçta ve takiplerinde genellikle insülin tedavisine gereksinim göstermezler. Diyabetin bu formuna sahip hastalardan çoğu obezdir ve obezite kendi başına bir miktar insülin rezistansı sebebidir. Geleneksel kilo kriterlerine göre obez sayılmayan bireylerin, karın bölgesinde artmış yağ oranına sahip olma olasılıkları yüksektir. Uzun süre asemptomatik seyretmesi nedeniyle genellikle geç tanı alırlar. Ketoasidoz spontan olarak ortaya çıkabilir ama genellikle enfeksiyon gibi stresli durumlarda daha sık ortaya çıkar. Hastalarda insülin sekresyonu kusurludur ve insülin rezistansını kompanze etmek için yetersiz kalır. Bu diyabet formunun görülme sıklığı yaşla, obeziteyle ve aktivite azlığıyla artar. Yakın zamanda gestasyonel diyabet hikayesi olan bayanlarda, hipertansiyon veya dislipidemisi olan bireylerde daha sık ortaya çıkar. Genetik eğilimle sıkı bir ilişkisi vardır fakat bu form diyabetin genetiği karışıktır ve net bir şekilde tanımlanmamıştır (1).

2.1.4.3. Diyabetin Diğer Spesifik Tipleri

- **Beta Hücresinin Genetik Defektleri**

Pankreasın beta hücrelerinin fonksiyonundaki monogenetik kusurlardan kaynaklanır. MODY (Maturity-onset diabetes of young) olarak bilinir. Diyabetin bu formları erken yaşta (genellikle 25 yaşın altında) başlayan hiperglisemi ile karakterizedir. İnsülin aktivitesinde kusur olmaksızın veya minimal kusurla birlikte olan insülin sekresyon bozukluğundan kaynaklanır. Otozomal dominant geçişlidir. En sık görülen mutasyon 12.kromozom üzerindeki hepatosit nükleer faktör (HNF)-1 α ' dadır. 2. form ise kromozom 7 p üzerindeki glukokinaz genindeki mutasyonla ilişkilidir ve kusurlu bir glukokinazla sonuçlanır. Glukokinaz, beta hücreleri için glukoz sensörü olan ve insülin sekresyonunu uyaran bir enzimdir. Daha az rastlanan form ise HNF-4 α , HNF-1 β , IPF-1 (insulin promoter factor) ve Neuro D1' i içeren transkripsiyon faktörlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır (1).

- **İnsülin Aktivitesindeki Genetik Defektler**

Diyabetin genetik olarak insülin aktivitesindeki anormalliklerden kaynaklanan nadir sebepleri vardır. Metabolik anormallikler; insülin reseptöründeki mutasyonlardan kaynaklanan hiperinsülinemi ve ılımlı hiperglisemiden, şiddetli diyabete kadar uzanır. Bu

mutasyonlara sahip bazı bireylerde akantoziz nigrikans bulunabilir. Bayanlarda kılınma ve büyük, kistik overler bulunabilir. Eskiden bu sendrom tip A insülin rezistansı olarak isimlendirilirdi. Löprochonizm ve Rabson-Mendenhall sendromu bu diyabet formuna uyan iki pediatrik sendromdur (1).

- **Ekzokrin Pankreas Hastalıkları**

Pankreası difüz olarak hasarlayan herhangi bir neden diyabete neden olabilir. Pankreatit, travma, enfeksiyon, pankreataktomi ve pankreas kanseri örnek verilebilir (1).

- **İlaç veya Kimyasalla İndüklenen Diyabet**

Birçok ilaç insülin salgılanmasını bozabilir. Bu ilaçlar diyabete direkt neden olmayabilirler fakat insülin rezistansı olan kişilerde diyabeti alevlendirebilirler. Vacor (rat zehiri) gibi belli toksinler ve i.v.pentamidin pankreasın beta hücrelerinin parçaları. Ayrıca nikotinik asit ve glukokortikoidler gibi insülin aktivitesini bozan pek çok ilaç ve hormon da vardır (1).

- **Enfeksiyonlar**

Konjenital rubella, koksakivirus B, CMV, adenovirus ve kabakulak diyabeti tetikleyebilen virüslerdir (1).

- **İmmünite İle İlişkili Diyabetin Sık Görülmeyen Formları**

Santral sinir sisteminin otoimmün bir hastalığı olan Stiff-man sendromunda hastaların yüksek titrede GAD antikor pozitifliği vardır ve yaklaşık üçte birinde diyabet gelişir.

Anti insülin reseptör antikorlarının bulunabildiği SLE ve diğer otoimmün hadiseler bu kategoriye örnek verilebilir (1).

- **Diyabetle İlişkili Olabilen Diğer Genetik Sendromlar**

Birçok genetik sendromda artmış diyabet insidansı vardır. Down sendromu, Klinifelter sendromu, Wolfram sendromu insülin eksikliği ile giden diyabetle ilişkili sendromlara örnek verilebilir (1).

2.1.4.4. Gestasyonel Diabetes Mellitus

Gestasyonel diyabet ilk olarak gebelik esnasında tanımlanan herhangi bir derecedeki glukoz intoleransıdır. Gebeliğin 26-28' inci haftalarında 50 g glukozun oral yolla

verilmesini takiben 1 saat sonraki glukoz değeri incelenir. Bu değer 140 mg/dl veya üzerinde ise 100 g glukoz ile 3 saatlik OGTT yapılmalıdır. İki ve daha fazla glukoz değerinin aşağıdaki değerlere eşit veya daha yüksek bulunması ile gestasyonel diyabet tanısı konulur (2):

- Açlık kan glukozu: 95 mg/dl,
- 1. saat kan glukozu: 180 mg/dl
- 2. saat kan glukozu: 155 mg/dl
- 3. saat kan glukozu: 140 mg/dl

2.1.5. Diyabetin Komplikasyonları

2.1.5.1. Diyabetin Akut Komplikasyonları

Dört ana başlık altında incelenebilir:

1. Diyabetik Ketoasidoz (DKA)
2. Hiperozmolar hiperglisemik durum(HHD)
3. Laktik asidoz (LA)
4. Hipoglisemi

DKA ve HHD, insülin eksikliği ve ağır hiperglisemi sonucu ortaya çıkan, patogenezi ve tedavisi büyük ölçüde benzeşen, iki önemli metabolik bozukluktur. DKA’ da ön plandaki sorun insülin eksikliği iken; HHD’ de ise dehidratasyondur. Oluşum mekanizması hemen hemen aynıdır. DKA’ da mutlak insülin eksikliği nedeniyle lipoliz baskılanamaz, ketonemi ve ketonüri olur. Halbuki, HHD’ de az miktarda insülinin bulunması lipolizi baskılamak için yeterlidir, keton cisimlerinin oluşumu gerçekleşmez. LA ise daha seyrek görülen, ancak özellikle diyabete eşlik eden diğer ciddi (kardiyak, renal, serebral vb.) nedeniyle mortalitesi oldukça yüksek olan bir tablodur. Diyabetik aciller içinde hızla müdahale edilmesi gereken ve en fazla hayati önem taşıyan durum olan hipoglisemi, verilen antidiyabetik (insülin veya oral antidiyabetik) tedavinin mutlak veya göreceli fazlalığının bir sonucu olarak karşımıza çıkar (7).

2.1.5.2. Diyabetin Kronik Komplikasyonları

- **Makrovasküler Hastalık (Hızlanmış Ateroskleroz)**

Makrovasküler hastalık başlığı altında koroner arter hastalığı, inme ve periferik arter hastalıkları yer almaktadır. Diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalık en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Tip 2 diyabetlilerde özellikle koroner arter hastalığı riski

diyabeti olmayanlara göre 2-4 kat daha yüksektir. Bu hastaların %60-75' i makrovasküler olaylar nedeni ile kaybedilir (7).

- **Mikrovasküler Komplikasyonlar**

a)Retinopati: Erişkin yaştaki diyabetiklerde en önemli körlük nedenidir. Diyabetik retinopati, sonuç olarak erken evrelerde genellikle belirti vermez. Diyabetik retinopatinin erken dönemlerinde görme keskinliği çok iyi olabilir ancak hastalık ilerledikçe; maküler ödem, maküler perfüzyon bozukluğu veya traksiyon retina dekolmanı nedeniyle görme keskinliği azalır (7).

b)Nefropati: Erişkin yaştaki diyabetiklerde en önemli morbidite ve mortalite nedenidir. Hipertansiyon, ödem, proteinüri ve böbrek yetersizliği ile karakterizedir. Erişkinlerde erken dönem nefropatiyi araştırmak için mikroalbuminüri ölçümü ile birlikte GFR (glomerüler filtrasyon hızı)' nin hesaplanması gerekir (7).

c)Nöropati: Vücudun herhangi bir sistemini tutabilir. Özellikle alt ekstremiteleri tutan distal-simetrik duyuşal polinöropati infeksiyon ve iskemi ile birlikte en önemli ayak amputasyonu nedenidir. Distal polinöropatide dengesiz yürüme, ataksik yürüme, el ve ayak kaslarında güçsüzlük görülür. Ağrı ve ısı duyuları da azalmıştır. El ve ayaklarda distalden proksimale 'eldiven-çorap' tarzı tutulum tipiktir (7).

2.1.6. Deneysel Diyabet

Alloksan ve Stresptozotosin diyabet araştırmalarında kullanılan en önemli diyabetojenik kimyasallardır. İkisi de toksik glukoz analoglarıdır. Hücre toksisitesi farklı yollardan gerçekleşse de beta hücresi seçicilik mekanizması aynıdır (8).

Stresptozotosin, tek bir enjeksiyonla, pankreas adacıkları beta hücrelerinde hasar oluşturan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (9). Stresptozotosin, pankreasın beta hücrelerine hücre membranlarında bulunan glukoz taşıyıcıları aracılığıyla ulaşır ve mitokondriye saldırır. Mitokondriyel ATP üretimi inhibe olur ve intraselüler alanda miktarı artan ADP, ksantin oksidaz aktivitesini artırır. Artan enzim aktivitesi sonucunda ürik asit ve O₂ radikali oluşur. Oluşan radikaller aracılığıyla beta hücre hasarı meydana gelir. Ksantin oksidaz inhibitörü allopurinolün Stresptozotosinin diyabetojenik etkisinden deney hayvanlarını koruduğu gözlenmiştir (8).

2.2. D Vitamini

Vitaminler, besinler ile veya ek olarak dışardan alınması zorunlu olan besin öğeleri olarak tanımlanmasına rağmen; D vitamini dokuda üretilerek kan dolaşımına verilmesi, diğer dokular üzerinde etki göstermesi ve bu etkisinin “feedback” mekanizmalarla düzenlenmesi nedeniyle vitaminden çok steroid yapılı bir hormon olarak değerlendirilir (10).

2.2.1. D vitamini Sentez ve Metabolizması

D vitamini yapısal olarak steroid hormonlara benzer. Steroidlerde B halkası kapalıyken, D vitamininde bu halka açıktır. Şekil 1’ de D vitaminin yapısı görülmektedir.

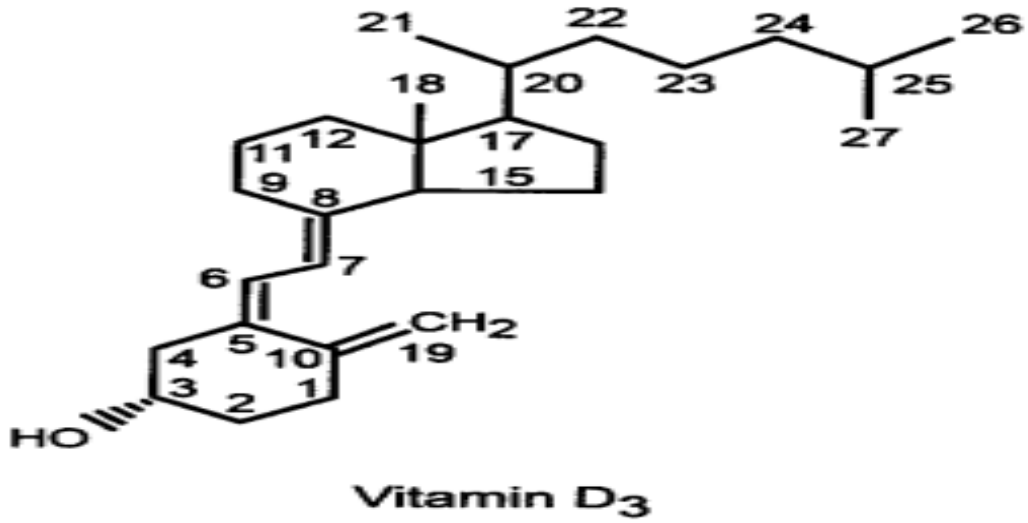
D vitamini kaynakları;

- Bitkisel kaynaklı D vitamini (D2: ergokalsiferol)
- Hayvansal kaynaklı D vitamini (D3: kolekalsiferol)
- Sentez (güneş ışığı)

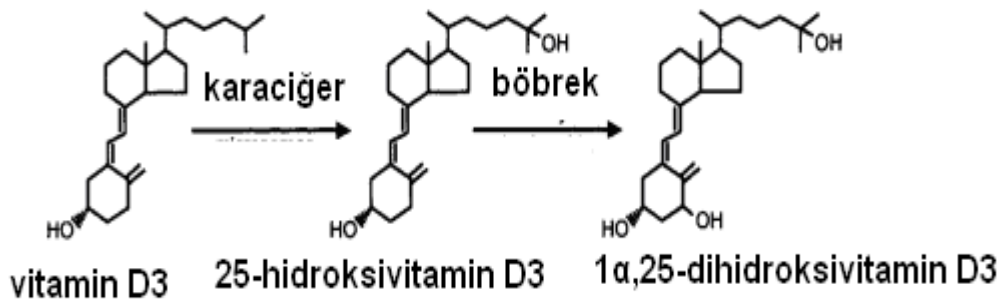
Normal koşullarda insan vücudunda bulunan D vitaminin %90-95’i güneş ışınlarının etkisi ile sentez edilir. Bu sentez fonksiyonuna ülkenin bulunduğu enlem, mevsimler, güneş ışınlarının yeryüzüne geldiği açı (Zenith açısı), deri pigmentasyonu, hava kirliliği düzeyi, deriye sürülen koruyucu kremler, giyinme tipi gibi faktörler etkilidir (11).

7-dehidrokolesterol, ultraviyole B ışınlarının etkisi ile deride önce previtamin D’ ye daha sonra vücut ısı ile hızla D vitaminine dönüşür. Aynı zamanda bu dalga boyundaki güneş, D vitaminini parçalayarak inaktif ürünlere dönüştürür. Bu mekanizma güneşlenmenin neden D vitamini toksisitesine yol açmadığını izah eder (12) .

D vitamini, “Vitamin D Bağlayıcı Protein” (VDBP)’e bağlanarak taşınır. Karaciğerde 25-hidroksilaz ve böbrekte 1- α -hidroksilaz enzimi tarafından hidroksillenerek aktif form olan 1,25-dihidroksivitamin D’ ye dönüşür. 25-hidroksilasyonunun % 90’ ı karaciğerde, %10’ u fibroblast, böbrek, duodenum ve kemik gibi diğer dokularda gerçekleşir. Böbrekte özellikle proksimal tübülüs hücreleri, 1- α -hidroksilaz enzimi açısından zengindir. Ayrıca meme dokusu, prostat, kolon ve makrofajlarda da 25-(OH)D₃’ ün, 1,25-(OH)₂D₃’ e dönüşebildiği gösterilmiştir (13). Şekil-2 ‘de D vitaminin metabolik aktivasyonu görülmektedir.



Şekil 1: Vitamin D (15)



Şekil 2: D Vitaminin Metabolik Aktivasyonu (15)

Oral yoldan alınan D vitamini şilomikronların yapısında kana geçerken, deride sentezlenen D vitamini, vitamin D bağlayıcı protein (VDBP)' e bağlanarak taşınır. Bu protein albumine benzerdir ve vitamin D metabolitleri olan 25-(OH)D₃, 1,25-(OH)₂D₃ ve 24,25-(OH)₂D₃' e yüksek oranda afinite gösterir. VDBP, alfa globülin yapısında olup karaciğerde yapılır. Östrojen kullanımı ve gebelikte VDBP düzeyi artar (14).

D vitamininin katabolize olma yolu hem karaciğer hem de böbrekte hidroksilasyondur. 24,25-(OH)₂D₃ daha polardır. Hızlı olarak böbrekten atılır. 1,25-(OH)₂D₃ ise 24-hidroksilasyonla “kalsitroik aside” dönüşür ve safra yolu ile atılır (14).

2.2.2. D vitamininin Fonksiyonları

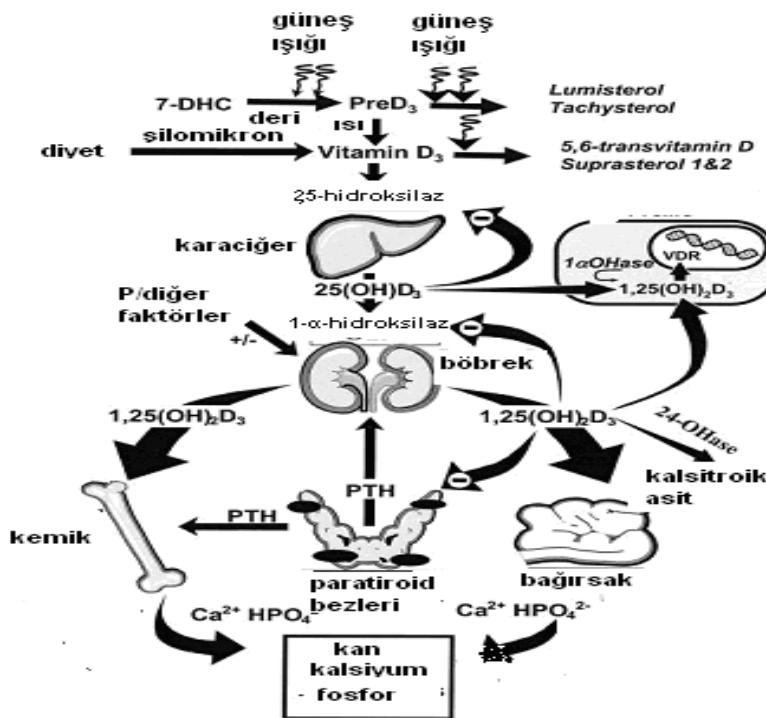
2.2.2.1. Kalsiyum metabolizması ile ilgili fonksiyonları

D vitamini, kalsiyum değerlerini normal sınırlarda tutmak için bağırsak, kemik ve böbreklerde üç farklı mekanizma ile etki eder. Şekil 3'te D vitamininin kalsiyum metabolizması ile ilgili düzenlemeleri özetlenmektedir.

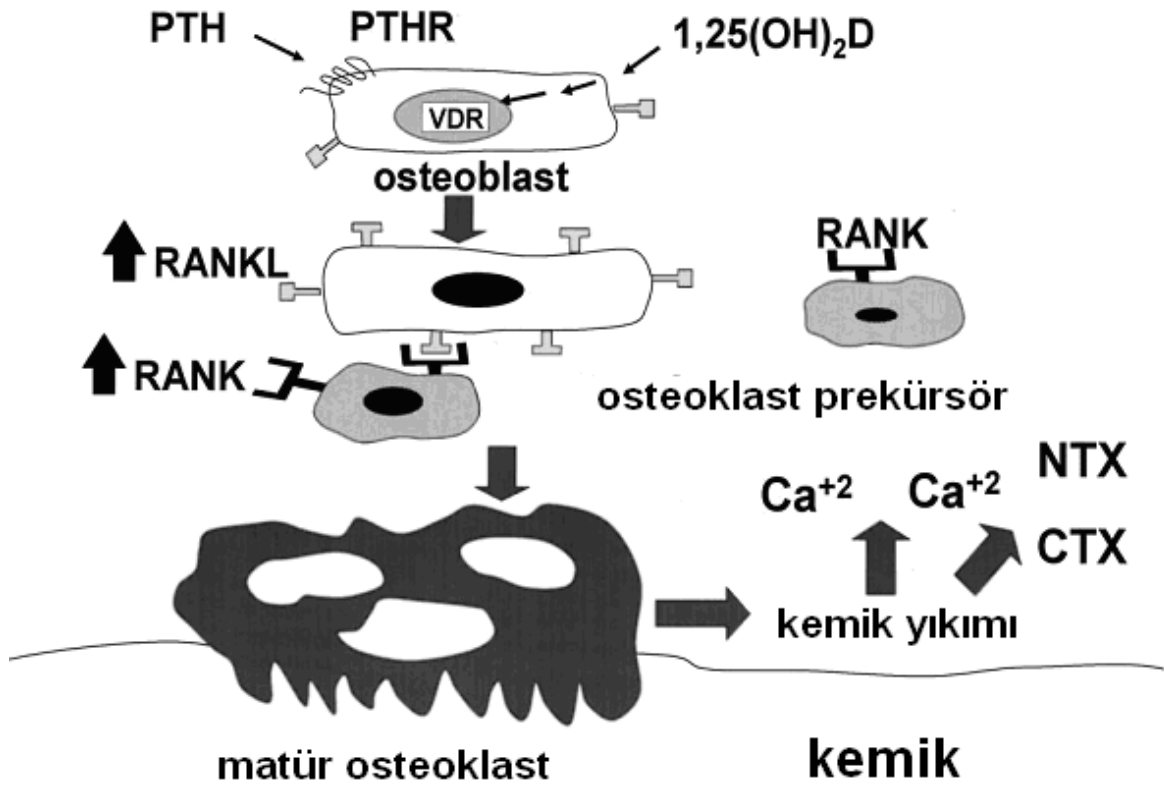
Barsaklarda $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ D vitamininin net etkisi; ince barsak lümeninden dolaşıma kalsiyum ve fosfor transportunu uyarmaktır.

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ D vitamininin kemik rezorpsiyonunu arttırıcı etkisi PTH ile sinerjistikdir. Hem PTH hem de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ D vitamini osteoblastlar veya stromal fibroblastlar üzerindeki spesifik reseptörlerine bağlanarak osteoblast hücresinin yüzeyinde RANK (reseptör activator nucleus factor-Kb) ligandının üretimini uyarır. RANK ligandı immatür osteoklastların üzerinde bulunan RANK reseptörüne bağlanarak immatür osteoklast prekürsörlerinin matür osteoklastlara değişimini uyarır. Şekil 4'te D Vitaminin Rankl aracılı kemik resorbsiyonu üzerine etkisi özetlenmektedir.

Üçüncü olarak ise; distal renal tübülde filtre olmuş kalsiyumun %1'lik son kısmının reabsorbsiyonundan sorumludur. D vitamini ve PTH bu %1'lik son kısmın reabsorbsiyonunu birlikte stimüle ederler (15).



Şekil 3. D vitamininin deride sentezi, metabolizması ve kalsiyum homeostazı ile hücre gelişimi düzenlemesi (20)

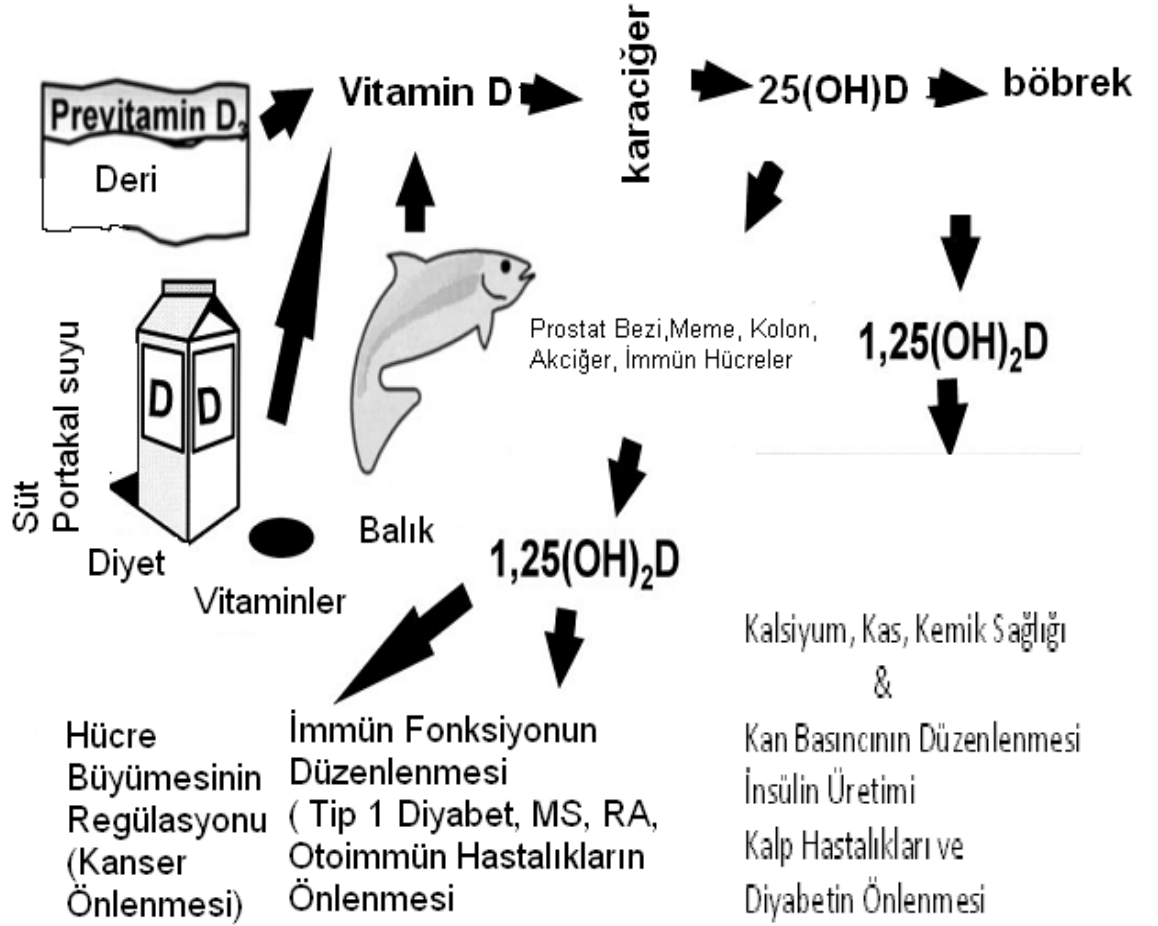


Şekil 4: D Vitaminin RANKL Aracılı Kemik Resorpsiyonu Üzerine Etkisi (17)

2. 2. 2. 2. Kalsiyum metabolizması haricindeki fonksiyonları

1980’li yılların başına kadar D vitamininin yalnızca kalsiyum, fosfor ve kemik mineralizasyonu ile ilgili araştırmaları yürütülmekte iken son 20-25 yılda yapılan çalışmalarda kemik metabolizması dışında da fonksiyonları olduğu görülmüştür. Bugün D vitamininin optimal sağlık için gerekli olduğu bilinen bir gerçek olup, birçok hastalığın gelişmesini engellemekte veya bulguların hafıflemesine neden olduğu bildirilmektedir. Bunlardan otoimmün hastalıklar, inflamatuvar barsak hastalığı, romatoid artrit, multipl skleroz, diyabet, birçok kanser çeşidi, kalp hastalıkları, osteoporoz, enfeksiyöz hastalıklar gibi birçok hastalıkta etkili olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (13,15-17). Enterosit, osteoblast ve distal renal tubulusların hücre nükleuslarına ilaveten birçok dokuda VDR reseptörlerinin gösterilmesi en önemli buluşlardan birisidir (18). D vitamini immün sistem modülatörüdür. T hücrelerinde, antijen sunan hücrelerde ve makrofajlarda D vitamini reseptörü bulunur. Ayrıca makrofajlar 25-hidroksivitamin D 1- α - hidroksilaz aktivitesine de sahiptir. D vitamini makrositlerin maturasyonunu sağlar. Aktive T lenfosit

proliferasyonunu ise inhibe eder (19). Şekil 5'te D vitamininin kalsiyum metabolizması haricindeki etkileri görülmektedir.



Şekil 5: D Vitamininin Kalsiyum Metabolizması Haricindeki Etkileri (17)

2. 2. 3. D vitamininin Kaynakları

Somon balığı, uskumru, ton balığı, sardalya gibi yağlı balık türleri, karaciğer, tereyağı, yumurta sarısı, süt, brokoli, yeşil soğan, maydanoz, su teresi ve mantar D vitamini yönünden zengindir.

Ancak, şu unutulmamalıdır ki hiçbir gıda maddesi günlük ihtiyacı karşılayacak kadar D vitamini içermez. En önemli kaynak güneş ışınları etkisi ile deride sentez edilen D vitaminidir. Anne sütündeki D vitamini 10-60 IU/L düzeyindedir ve tam olarak ihtiyacı karşılayamamaktadır (11).

2. 2. 4. D Vitaminini Düzeyleri

Kişide vitamin D düzeyini belirlemek için 25-(OH)D₃ düzeyine bakılmalıdır. 25-(OH)D₃ yarı ömrü 2-3 hafta olan major sirkülatuar formdur. Biyolojik aktif form 1,25-(OH)₂D₃ ise ideal ölçüm için uygun değildir. Çünkü yarı ömrü 4-6 saat kadar kısa ve sirkülatuar düzeyleri 25-(OH)D₃' den 1000 kat düşüktür. En önemlisi de 1,25-(OH)₂D₃ düzeyi, D vitamini eksikliği gelişmiş bir kişide yükselmiş PTH nedeniyle normal veya yüksek ölçülerek hekimi yanıltabilir (20). 25-(OH)D₃ için vücutta bulunması gereken alt limit konusunda 30 ng/ml'nin vücudun vitamin D gereksinimini sağlayabileceği düşünülmektedir (20).

2.2.5. D Vitamini ve Diyabet İlişkisi

Tip 1 diyabet ile D vitamini eksikliği arasındaki ilişki, pek çok çalışmaya konu olmuştur. Çevresel ve genetik benzer faktörlerin Tip 1 diyabet ve D vitamini eksikliğinin etyolojisinde beraber rol oynaması bu ilişkiyi güçlendirmektedir. Her iki hastalığın da, sıklıkla sonbahar ve kış aylarında tanı alması ve coğrafi olarak ekvatordan uzak enlemlerde görülmesi, yüksek tahıl içerikli beslenme ile raşitizm ve osteomalazi arasında güçlü bir ilişki saptanması ve yine benzer şekilde infantlarda tahıl ve gluten içeren yiyeceklerin tüketilmesi ile adacık otoantikör gelişme riskini artması, her iki hastalıkta benzer çevresel faktörlerin rol oynadığını düşündürmektedir. Genetik olarak da, vitamin D reseptöründeki belli allelik varyasyonların Tip 1 diyabet için risk faktörü olabileceği düşünülmektedir (21).

Yeni tanı almış Tip 1 diyabetli hastalarda sağlıklı kontrol grubuna göre serum 25-(OH)D₃ seviyelerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (22).

Avrupadan 7 ülkede yapılan geniş çaplı vaka-kontrol çalışmasında ise yaşamın erken dönemindeki maruziyetler ve tip 1 diyabet riski araştırıldı ve vitamin D takviyesinin, tip 1 diabet insidansını düşürdüğü bulundu. Sonuç olarak bu geniş çaplı, farklı Avrupa ülkelerini içeren çok merkezli çalışma bebeklik döneminde D vitamini takviyesinin koruyucu etkisini gösterdi (23).

2.2.6. Tip 1 Diyabette D Vitaminin Etki Mekanizması

2.2.6.1. Moleküler Seviyede Etkileri

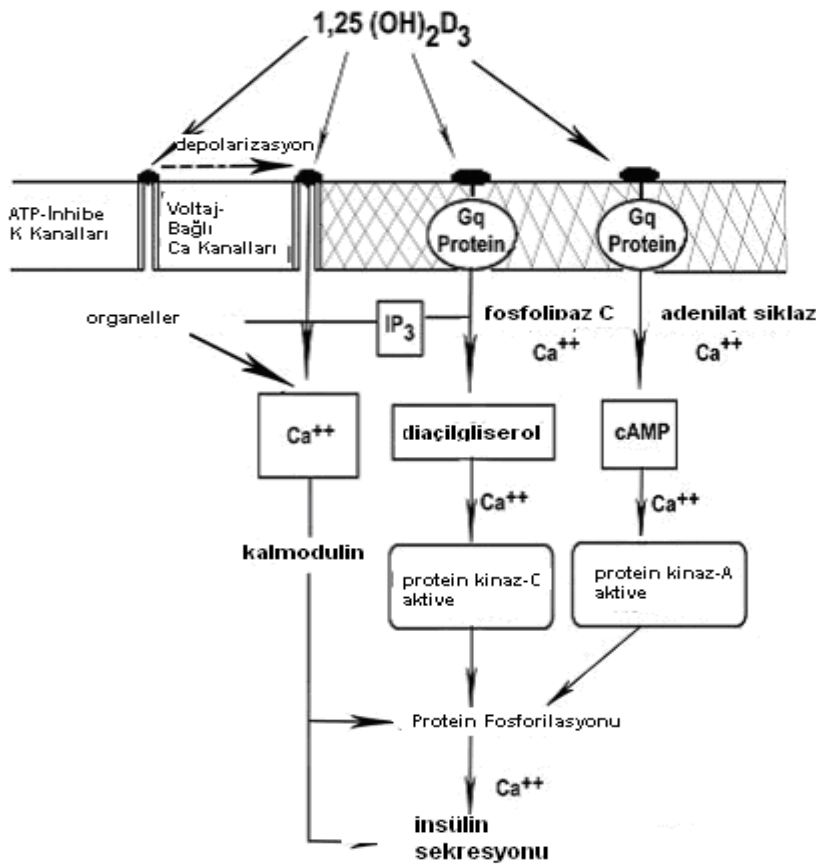
D vitamininin pankreasın endokrin düzenlenmesinde rolünü aydınlatmaya yönelik çalışmalar D vitamini ve metabolitlerinin hem plazma kalsiyum seviyesi aracılığıyla hem de direkt beta hücrelerinin üzerine etki ederek işlev gördüğünü ortaya koydu.

Yapılan bir çalışmada, 1,25(OH)₂D₃ analogu olan 1,25-dihidroksiluminesterol' ün membran vitamin D reseptörüne bağlanarak, intrasellüler Ca⁺² konsantrasyonunu artırdığı

ve nongenomik sinyal iletimi yoluyla rat pankreatik hücrelerden insülin salınımına yol açtığı gösterilmiştir (21).

D vitaminin Protein kinaz A aktivasyonu yoluyla da, insülin salınımı üzerine stimulan etkileri vardır (21).

1,25(OH)₂D₃ fosfolipid metabolizması, protein kinaz C aktivasyonu ve Ca⁺² kanallarıyla Ca⁺² girişi gibi intrasellüler sinyal süreçlerini düzenleyerek β hücresine kalsiyum sağlayabilir (21). Şekil 6'ta 1,25(OH)₂D₃' ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine nongenomik etkileri özetlenmektedir.



Şekil 6: 1,25(OH)₂D₃' ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine nongenomik etkileri (21)

2.2.6.2. Genomik Etkileri

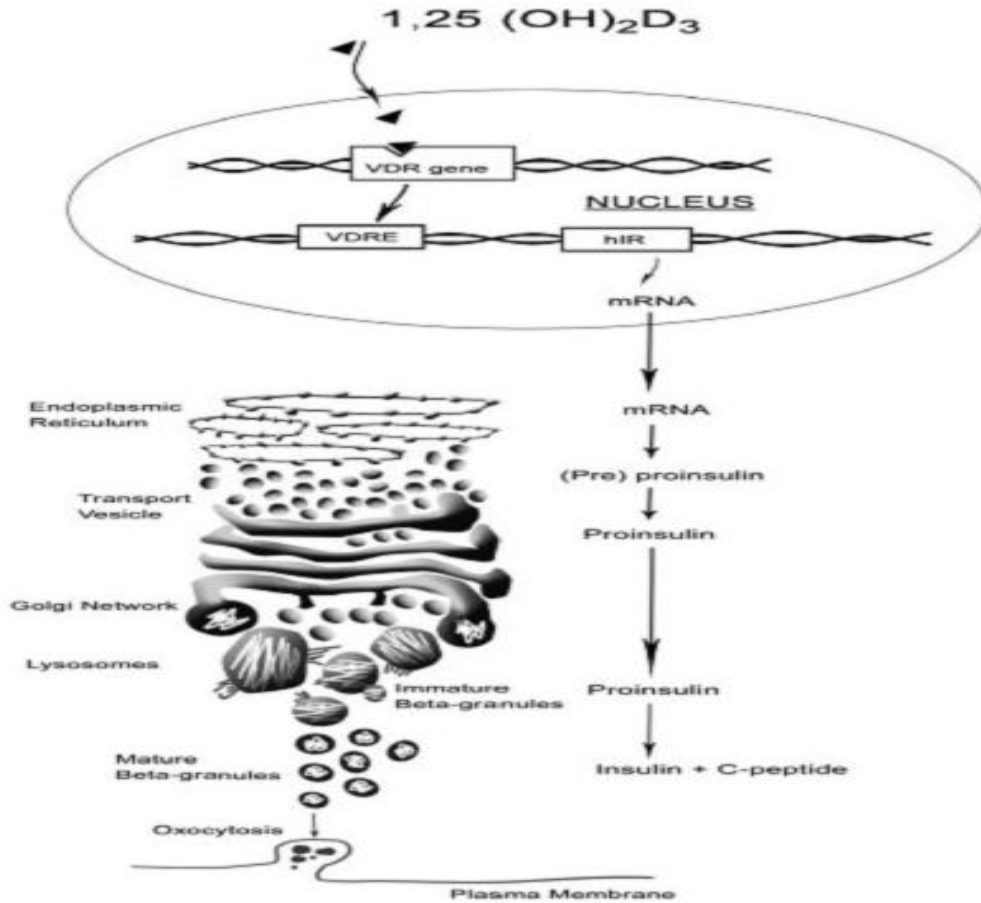
1,25(OH)₂D₃' ün β hücrelerinde genomik etkileri olduğu da bildirilmiştir. U-937 insan promonositik hücrelerinde, 1,25(OH)₂D₃' ün insülin reseptör geninin transkripsiyonel aktivasyonuna neden olduğu gösterilmiştir (21).

1,25(OH)₂D₃ tedavisi ile insülin reseptör ve preproinsülin mRNA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Vitamin D reseptörü (VDR), insülin reseptör (hIR) gen promotörünün

vitamin D response elementlerden (VDRE) oluşan transkripsiyonel bölgesine bağlanır. VDR kompleksi tarafından transkripsiyon indüksiyonu, yeni insülin mRNA düzeyini artırır. Yeni sentezlenen proinsülin düz endoplazmik retikulumda oluşturulur ve daha sonra golgi aygıtına transfer edilir ve burada immatür β granüller oluşur. Proinsülin daha sonra β -granül kompartmanında insülin ve c-peptide dönüşür (21). Şekil 7’de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ’ ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine genomik etkileri görülmektedir.

D vitamini eksikliğinde langerhans adacıklarında pek çok proteinin denovo sentezinin azaldığı ve D vitamini takviyesiyle bunun kademeli olarak arttığı gözlenmiştir.

Böbrek ve bağırsakta kalsiyum difüzyonunu kolaylaştıran bir kalsiyum bağlayıcı protein olan Calbindin D28K düzeyinin de D vitamini aracılığıyla düzenlendiği bilinmektedir. Calbindin D28K insülin içeriğinde artışa yol açar (21).



Şekil 7: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ’ ün β hücrelerinde insülin sekresyonu üzerine genomik etkileri (21)

2.2.6.3. İmmun Sistem Üzerine Etkileri

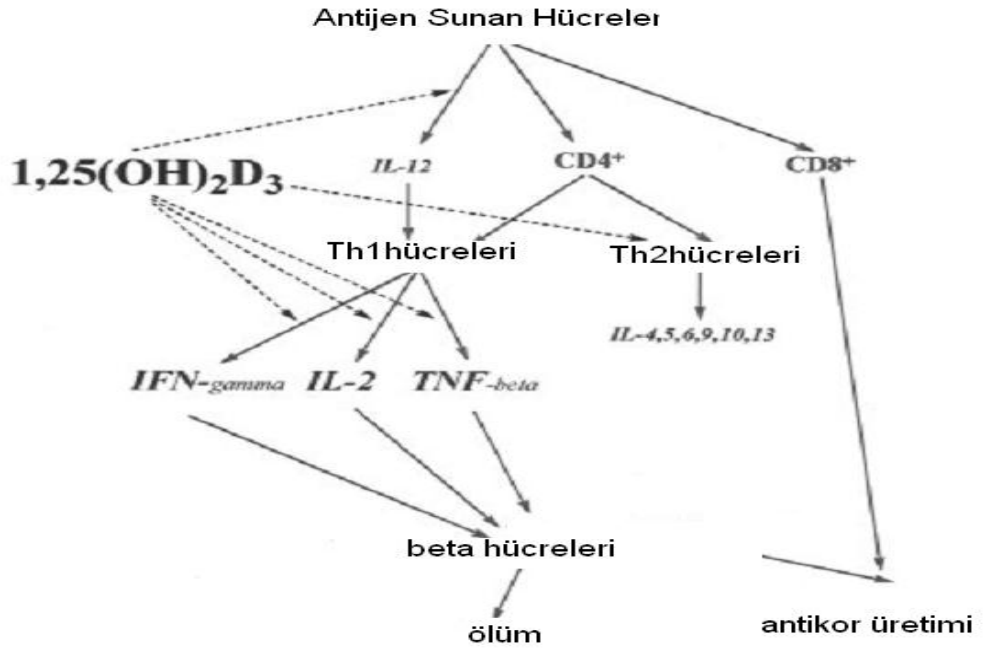
İmmun sistem hücrelerinde, özellikle antijen sunan hücrelerde ve aktive T hücrelerinde VDR' nin bulunması, Vitamin D ile immün sistem arasında bir ilişki olabileceğini düşündürmüştür (21).

Ayrıca immün hücrelerin kendileri de, özellikle aktive makrofajlar ve dentritik hücreler 1- α -hidroksilaz enzimini içerirler, böylece 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 'ü sentez ve sekrete edebilmektedirler. Sitokinler ve diğer inflamatuvar ajanlar tarafından direkt β hücre hasarı Tip 1 diyabet patogeneğinde önemli bir basamaktır. Vitamin D, bu basamakta hücre proliferasyonu ve diferensiyasyonunu, lenfosit aktivasyonunu ve sitokin üretimini düzenleyen potent bir immunomodülatör olarak görev almaktadır (24).

D vitamini,

Th1 hücrelerinden IL-2, IFN- γ üretimini inhibe ederken, Th2 sitokini olan IL-4'ün üretimini uyarır ve böylece Th dengesinin Th2 yolağına kaymasına neden olur (24). Şekil 8'te D vitaminin sitokinler aracılı diyabet üzerine etkisi görülmektedir.

Gerek hayvanlarda gerekse insanlarda Vitamin D ve diyabet ilişkisini inceleyen pek çok çalışma vardır. Yetişkin NOD farelerde yapılan çalışmada vitamin D' nin dentritik hücre olgunlaşmasını engellediği, lipopolisakkaritle indüklenen IL-12 ve interferon-gama üretimini azalttığı, Th1 hücre infiltrasyonunu önleyerek insülinitis oluşumunu ve diyabetin ilerlemesini önlediği gözlenmiştir (25).



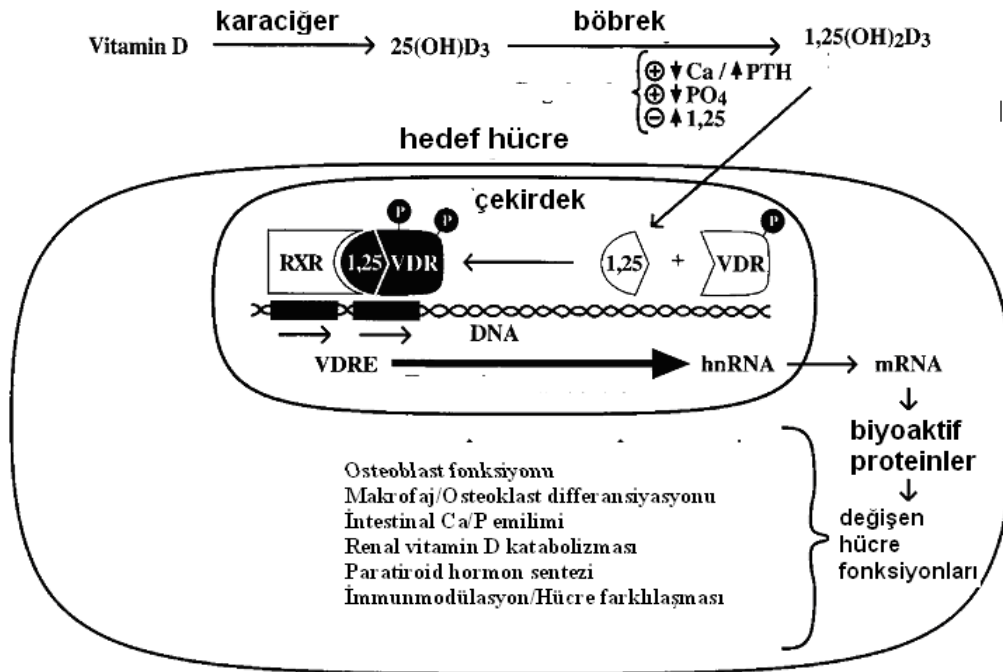
Şekil 8: D vitaminin sitokinler aracılı diyabet üzerine etkisi (21)

2.2.7. Vitamin D Reseptörü (VDR)

D vitaminin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, fonksiyonunu Vitamin D Reseptörü (VDR) aracılığıyla yapar. VDR, tiroid hormon reseptörü, retinoik asit reseptörü ve peroksizom proliferatör aktivatör reseptörünü de içeren nükleer reseptör süper ailesine mensuptur. İnsanlarda VDR'yi kodlayan gen 12cen-q12 üzerindedir ve çeşitli polimorfizmler içerir.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün VDR ye bağlanması D vitamini tarafından regüle edilen genlerin transkripsiyonunu sağlar (24).

Aktif D vitamini VDR' nin ligand bağlayıcı bölgesine bağlanır, bunun sonucunda VDR hiperfosforile olur. Daha sonra, VDR DNA bağlayıcı bölgesi ile hedef gende bulunan vitamin D response elementlerine (VDREs) bağlanarak transkripsiyonu aktive eder. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için, VDR proteininin öncelikle transkripsiyon başlangıç faktörlerinin bir araya toplanmasını sağlayan retinoik asit X reseptörü (RXR) ile kompleks oluşturması gereklidir. Şekil 9'ta Vitamin D' nin hedef hücrede VDR yoluyla transkripsiyon üzerine etkileri görülmektedir. VDR proteininin paratiroid hücrelerde, pankreas adacık hücrelerinde, hemopoetik hücrelerde, keratonositlerde, üreme organları ve immun sistem dâhil vücutta birçok dokuda etkileri olduğu bilinmektedir (26).



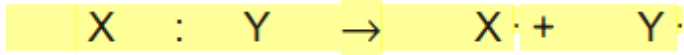
Şekil 9: Vitamin D' nin hedef hücrede VDR yoluyla transkripsiyon üzerine etkileri (26)

2.3. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur (27).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (27):

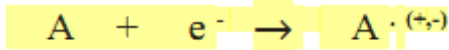
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar. (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır)



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron, atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.



Hücrelerde Serbest Radikal Kaynakları (28)

Endojen Kaynaklar:

- Mitokondriyal elektron transport zinciri
- Mikrozomal elektron transport zinciri
- Oksidan enzimler
- Ksantin oksidaz
- Endolamin dioksijenaz
- Galaktoz oksidaz
- Siklooksijenaz
- Lipoksijenaz
- Monoamin oksidaz
- Fagositik hücreler
- Nötrofiller
- Monositler ve makrofajlar
- Eozinofiller

- Endotelyal hücreler
- Otooksidasyon reaksiyonları (ör, Fe^{+2})

Ekzojen Kaynaklar:

- Redoks siklus bileşikleri (örn; paraquat, doksorubisin)
- İlaç oksidasyonları (örn; parasetamol)
- Sigara
- Güneş
- Isı şoku
- Okside glutasyon

ROS hücrelerde 3 yolla ortaya çıkar (29):

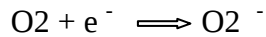
- 1- Normal aerobik metabolizma ile (Elektron transport zincirinde),
- 2- Bakteri, virüs ve antijenlerin yok edilmesi sırasında fagositlerce,
- 3- Toksik maddelerin detoksifasyonu sırasında.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikali biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijenin kendisi, süperoksit, hidrojen peroksit, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir (30).

2.3.1. Serbest Radikal Çeşitleri

2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu, serbest süperoksit radikal anyonu (O_2^-) meydana gelir.

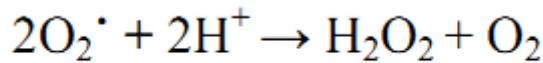


Bu molekül bir serbest radikal olarak bilinmesine rağmen, biyolojik dokularda fazla hasar oluşturmaz. Hidrojen peroksidin kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olması bakımından önemlidir (30).

Süperoksitin, fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO) ile birleşmesi sonucu reaktif bir oksijen türevi olan peroksinitrit meydana gelir. Böylece NO'nın normal etkisi inhibe edilir. Ayrıca, peroksinitritlerin doğrudan proteinlere zararlı etkileri vardır ve azot dioksit (NO_2), hidroksil radikali (OH) ve nitronyum iyonu (NO_2^+) iyonu gibi daha başka toksik ürünlere dönüşür. Süperoksit radikali, ortam pH 'sının düşük olduğu durumlarda bir proton alarak daha reaktif olan perhidroksil radikaline (HO_2^-) dönüşür. Ancak, ortam pH'sı fizyolojik sınırlarda iken oluşan perhidroksil formu %1'in altındadır (30).

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit Radikali (H₂O₂)

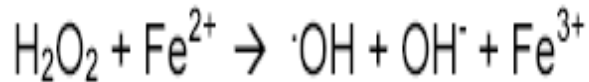
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden 2 elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit oluşur. Peroksit molekülü 2 hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H₂O₂) meydana getirir. H₂O₂ membranlardan kolayca geçebilen uzun ömürlü bir oksidandır. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi süperoksidin dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar (30).



Hidrojen peroksit, bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü süperoksit ile reaksiyona girerek, en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali oluşturmak üzere kolaylıkla yıkılabilir (30).

2.3.1.3. Hidroksil Radikali (·OH)

Hidroksil radikali (·OH), hidrojen peroksidin geçiş metallerinin varlığında indirgenmesiyle meydana gelir. Suyun, yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da, hidroksil radikali oluşur. Son derece reaktif bir oksidan radikaldir. Yarılanma ömrü çok kısadır. Oluştugu yerde büyük hasara sebep olur (4).



Yukarıda ifade edilen reaksiyon, demir iyonlarının katalizlediği Haber-Weiss (Fenton) reaksiyonu olarak da bilinmektedir (30).

2.3.1.4. Singlet (Tekli) Oksijen (¹O₂)

Bu molekül gerçekte bir serbest radikal değildir. Ancak serbest radikal reaksiyonları esnasında üretilmesinden dolayı serbest oksijen radikalleriyle birlikte değerlendirilen reaktif oksijen türüdür. Oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitale yer değiştirmesiyle oluşur (30).

2.3.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (30).

2.3.2.1. Membran Lipidleri Üzerine Etkileri (Lipid Peroksidasyonu)

Biyomoleküllerden lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olanlardır. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Poliansatüre yağ asitleri (PUFA)'nin oksidatif yıkımı, lipid peroksidasyonu olarak bilinir ve oldukça zararlıdır. Çünkü kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerlerler. Lipid peroksidasyonu ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür (30).

Üç veya daha fazla çift bağ ihtiva eden yağ asitlerinin peroksidasyonunda, tiyobarbutirik asitle ölçülebilen malondialdehit (MDA) meydana gelir. Bu metod, lipid peroksit seviyelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılır. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir, fakat lipid peroksidasyonun derecesiyle iyi korelasyon gösterir. Lipid peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyonudur. Direkt olarak membran yapısına, indirekt olarak da reaktif aldehytler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna sebep olur. Bu da deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intrinsik membran özelliklerini değiştirir. Bu etkiler MDA'nın niçin mutajenik, genotoksik ve karsinojenik olduğunu açıklar (30).

2.3.2.2. Proteinlere Etkileri

Proteinler serbest radikallerin etkilerine karşı, lipidlerden daha az hassastırlar ve başlayan zarar veren zincir reaksiyonlarının hızlı ilerleme ihtimali daha azdır. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve sülfür ihtiva eden moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğundan triptofan, tirozin fenil alanin, histidin, metionin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden rahatlıkla etkilenirler. Özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyonlar sonucu, Ig G ve albümin gibi fazla sayıda disülfik bağ bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur. Hem proteinleri de serbest radikallerden önemli ölçüde zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin

süperoksit radikali veya hidrojen peroksit ile reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur (30).

2.3.2.3. Nükleik Asit ve DNA'ya Etkileri

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Sitotoksiste, büyük oranda, nükleik asit baz modifikasyonlarından doğan kromozom değişikliklerine veya DNA'daki diğer bozukluklarına bağlıdır. Hidroksil radikali, deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit membranlardan geçip hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna hatta hücre ölümüne yol açabilir. Bu yüzden, DNA serbest radikallerden kolay zarar görebilen önemli bir hedeftir (30).

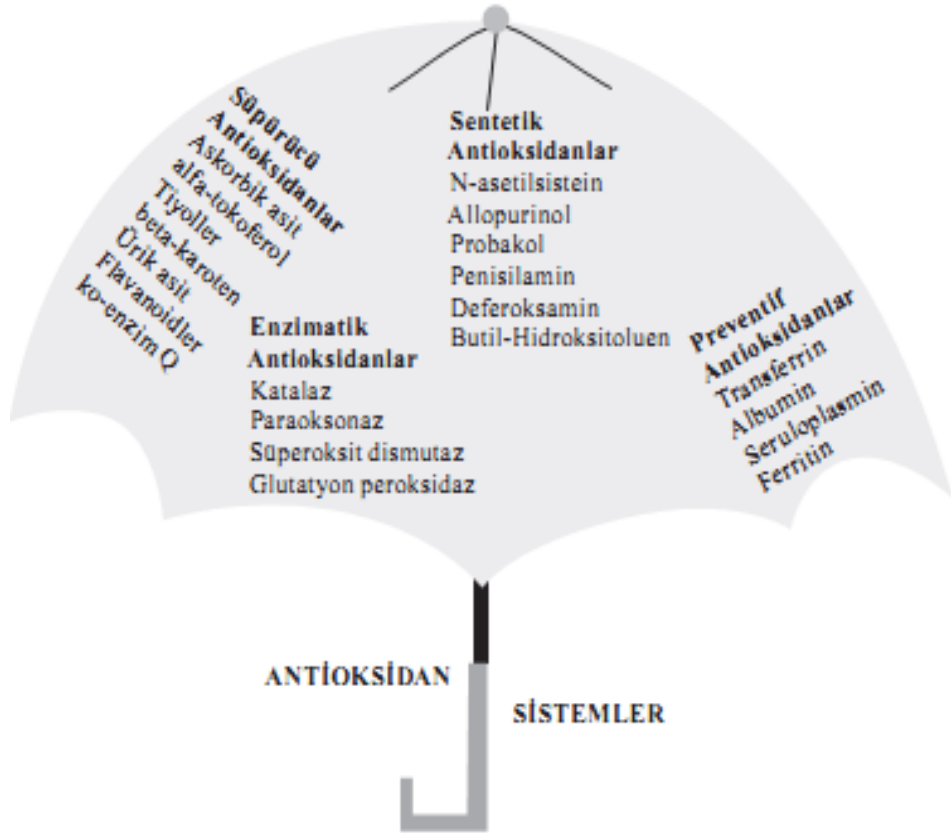
2.3.2.4. Karbonhidratlara Etkileri

Serbest radikallerin karbonhidratlar üzerine de etkileri vardır. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu, hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelirler. Bunlar, diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıklar gibi patolojik olaylarda önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler; DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilme ve aralarında çarpaz bağlar oluşturabilme özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler. Böylece, kanser ve yaşlanma olaylarında rol oynarlar.

İnflamatuvar eklem hastalıklarında, sinoviyal sıvıya geçen lökositlerden ekstrasellüler sıvıya salınan hidrojen peroksit ve süperoksit radikali, buradaki mukopolisakkarit olan hyaluronik asiti parçalar. Gözün vitröz sıvısında da bol miktarda hyalüronik asit bulunur. Bunun da oksidatif hasarı, katarakt oluşumuna katkıda bulunur (30).

2.4. ANTİOKSİDANLAR

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. 'Oksidatif stres' olarak adlandırılan bu durum özetle serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır. Şekil 10' da antioksidan savunma sistemleri gösterilmiştir (27).



Şekil 10: Antioksidan Savunma Sistemler (27)

2.4.1. Antioksidan Etki Tipleri

1- Süpürücü Etki (Scavenging Etki): Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine denir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller böyle bir etki gösterir.

2- Bastırıcı Etki (Quencher Etki): Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya denir. Vitaminler, flavonoidler ve trimetazidin bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3- Onarıcı Etki (Repair Etki): Bu grupta DNA tamir enzimleri, metiyonin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

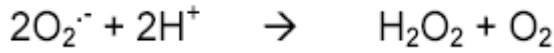
4- Zincir Kırıcı Etki (Chain Breaking Etki): Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye denir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (27,30).

2.4.2. Antioksidan Çeşitleri

2.4.2.1. Doğal (Endojen) Antioksidanlar

2.4.2.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz: Süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler.



İnsanda bu enzimin iki tipi vardır. Bunlar sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu-Zn SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik Mn ihtiva eden izomerdirler. (MnSOD)

1. Cu-Zn SOD: Cu ve Zn içeren dimerik tip sitozolde bulunur, siyanitle inhibe olur. Hücrede en fazla miktarda bulunan izomerdir.

2. Mn SOD: Mn içeren tetramerik tip mitokondride bulunur, siyanidle inhibe olmaz. Cu-Zn SOD 21 nolu kromozomda, Mn-SOD 6 nolu kromozomda lokalizedir.

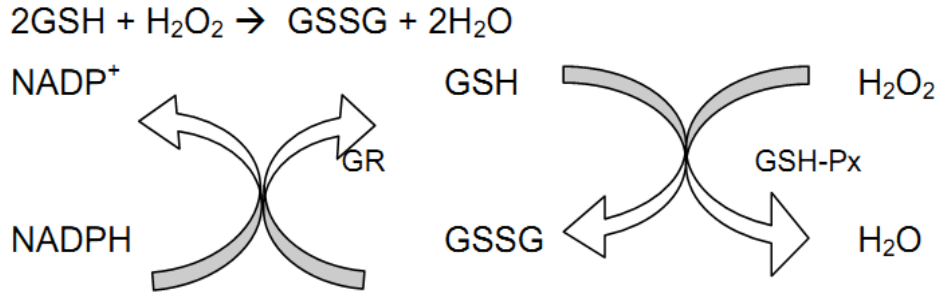
SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanımı olan dokularda özellikle eritrositlerde fazladır. SOD fagosite edilmiş bakterilerin intrasellüler öldürülmesinde de rol oynar. Bu sebepten dolayı SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (30).

Glutatyon peroksidaz: Bu enzim de, bir metal olan selenyumu yapısında bulundurduğu için metalloenzim grubunda değerlendirilir. Tetramerik yapıdadır ve dört selenyum atomu içerir.

Sitozol ve mitokondride bulunabilir. Diyetteki selenyum desteği enzim aktivitesini modüle eder. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'a bağımlıdır. Düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 , öncelikle glutatyon peroksidaz tarafından temizlenir. Bu enzim, redükte glutatyonun okside glutatyona çevrildiği in vitro ortamda gerçekleşen reaksiyonda hidrojen peroksidi yüksek spesifite ile kullanarak onu detoksifiye etmektedir (30).

Redükte glutatyon (GSH) 'un, okside glutatyon (GSSG) haline dönüştüğü reaksiyonda, glutatyon peroksidaz enzimi, hidrojen peroksiti suya indirger. Daha sonra glutatyon redüktaz enziminin katalizlediği reaksiyon ile NADPH harcanarak okside glutatyon, tekrar redükte hale dönüştürülebilir (30).

Reaksiyon şu şekildedir;



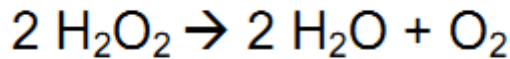
Şekil 11: Glutatyonun okside ve redükte formları arasındaki dönüşümü.

(GSH=Redükte glutatyon, GSSG=Okside glutatyon, GSH-Px=Glutatyon peroksidaz, GR=Glutatyon redüktaz, H₂O₂=Hidrojen peroksit)

GSH-Px'in fagositik hücrelerde önemli fonksiyonları vardır. Diğer antioksidanlar birlikte GSH-Px, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmelerini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidan strese karşı en etkili antioksidandır (30,31). GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açar. Aynı zamanda bu enzim, lipid peroksitlerinin indirgenmesini de katalizlemektedir (30).

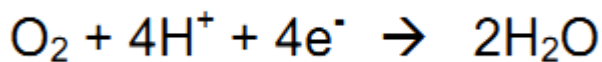
Katalaz: 4 tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Görevi hidrojen peroksiti oksijen ve suya parçalamaktır. Peroksizomlarda lokalizedir.

Katalaz enziminin katalizlediği reaksiyon şu şekildedir;



Katalazın indirgeyici aktivitesi, hidrojen peroksit ve metil, etil, hidroperoksitleri gibi küçük moleküllere karşıdır. Büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerine ise etki etmez (30).

Mitokondrial Sitokrom Oksidaz: Süperoksit radikali in vivo olarak başlıca mikrozomal ve mitokondrial elektron transport sistemlerinde üretilmektedir. Mitokondrial elektron transport sisteminde normal şartlarda bir O₂ molekülüne 4 elektron aktarılarak 2 molekül su oluşturulur:



Sitokrom oksidaz, bu elektronlanmış oksijen moleküllerini kendi aktif merkezinde sıkıca tutarak elektronların ortama sızmasını engeller. Elektron sızıntısını önleyerek ortamdaki diğer moleküllerin oksidasyona uğramasına engel olarak antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (30).

Glutatyon Redüktaz: Okside haldeki glutatyonun, indirgenmiş glutatyona dönüşümünü katalizler. Böylece, redükte glutatyon kullanan antioksidan enzimlerin redükte glutatyon ihtiyacını karşılayarak, indirekt yolla antioksidan etki göstermektedir (30).

Glutatyon-S-transferaz: Herbiri iki alt birimden oluşmuş (dimerik) bir enzim ailesi olup ilk defa 1961 yılında tanımlanmışlardır. Bu grup enzimlerin, ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda aktif rolleri vardır. Bu enzimler de aynen glutatyon peroksidaz enziminin yaptığı gibi lipid peroksitlerini redükte ederek antioksidan etki gösterirler. GSH-Px enzimi aktivite gösterebilmek için selenyuma ihtiyaç duyarken, bu enzim selenyumdan bağımsız olarak antioksidan aktivite gösterebilmektedir.

Katalizlediği reaksiyon aşağıdaki gibidir:



Glutatyon-S-transferazlar antioksidan fonksiyonları yanında, karaciğerde sitokrom p-450 enzim sistemi ile detoksifikasyona katkıda bulunur. Ayrıca hücre içi bağlayıcısı ve taşıyıcısı, prostoglandin izomeraz etkisi, lökotrien C4 sentezi ve genotoksik ajanların detoksifikasyonu gibi rolleri vardır (30).

2.4.2.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Glutatyon: Tripeptid yapısında olan bu molekül, genetik bilgiye gerek olmadan karaciğerde sistein, glisin ve glutamattan sentezlenebilmektedir. Bir antioksidan olarak önemli görevleri olan glutatyon, peroksitlerle ve serbest radikallerle reaksiyona girerek onları zararsız ürünlere çevirir. Bu sayede, hücreleri serbest radikallerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı koruyabilmektedir. Glutatyon ayrıca, proteinlerdeki -SH gruplarını da indirgenmiş halde tutarak, onların okside olmasını engellemiş olur. Böylece fonksiyonel proteinler ve enzimlerin inaktivasyonunu engeller. Yabancı bileşiklerin detoksifikasyonunu ve aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar. Biyokimyasal olaylarda önemli rolü vardır. Glutatyon eritrositleri, lökositleri ve göz lenslerini oksidatif strese karşı korur.

Eritrosit zarını hidrojen peroksitten, lökositleri fagositozdaki oksidan ajanlardan korur. Glutasyon non- katalitik olarak da serbest radikallerle direkt reaksiyona girebilir (30).

C Vitamini: Ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır. Güçlü indirgeyici aktivitesinden dolayı, aynı zamanda güçlü bir antioksidandır. Hidroksil ve süperoksit radikallerini direkt olarak temizleme yeteneği vardır. C vitamini ayrıca antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller, okside olmuş E vitaminini rejenere eder, yani tokoferoksil radikalinin, a-tokoferole redüklenmesini sağlar. C vitamini antioksidan etki yanında oksidan etki de gösterir. C vitamininin oksidasyonu ile H_2O_2 meydana gelebilir veya ferro demir sentezinde rol alarak, Fenton reaksiyonuna, yani serbest radikal üretimine katkıda bulunur. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda (0,2 mM'dan az) görüldüğü, daha yüksek konsantrasyonlarda ise, güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Ayrıca diyetle C vitamini alınmasının, akut sigara içimi ile oluşan LDL oksidasyonunu azalttığı tespit edilmiştir (30).

E Vitamini: Hücre membranlarının lipid kısımlarında ve ekstrasellüler sıvılarda bulunarak lipid peroksitlerinin inaktivasyonunu sağlar. Lipid peroksit zincirini kırarak zincirleme olarak devam eden lipid peroksidasyonu reaksiyonlarını durdurur (30).

Melatonin: En zararlı radikal olan hidroksil radikalini ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin antioksidan olarak diğer bir özelliği de lipofilik olmasıdır. Dolayısıyla hücrenin hemen bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gib kan-beyin bariyeri gibi bariyerleri de kolayca geçer (30).

Seruloplazmin: SOD enziminin benzeri bir etki gösterdiği düşünülmektedir. +2 değerli demirin +3 değerli demire yükseltgenmesini sağlayarak Fenton reaksiyonunu inhibe eder. Bu sayede serbest radikal oluşmasını inhibe eder (30).

Transferrin ve Laktoferrin: Dolaşımda serbest halde bulunan demiri bağlayarak antioksidan özellik gösterirler (30).

Ferritin: Dokudaki demiri bağlar (30).

Bilirubin: Hemoprotein katabolizma ürünüdür. Yüksek düzeyde bir doku toksini olmasına rağmen, zincir kırıcı bir antioksidan olarak görev yapabilir. Serbest radikalleri tutma yeteneği vardır. Hidroksil ve süperoksit radikallerinin temizleyicisidir. Bilirubin bazı dokularda β -karotenlerin aktivitesini artırır (30).

Ürik asit: Plazmada normal konsantrasyonlarda bulunduğu, hidroksil, peroksil, süperoksit radikallerini ve singlet (tekli) oksijeni temizleme yeteneği vardır (30).

Albümin: Geçiş metallerini bağlama özelliği vardır. Lipid hidroperoksit (LOOH) ve hipoklorit (HOCl) toplayıcısıdır (30).

Probukol: Kolesterol düşürücü olan bu ilaç, lipit peroksidasyonunun zincir kırıcı kuvvetli bir antioksidanıdır (30).

2.4.2.2. Ekzojen Antioksidanlar (İlaçlar)

Ksantin oksidaz inhibitörleri:

- Tungsten
- Allopürinol: Lipid peroksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eder.
- Oksipürinol: OH ve HOCL radikallerini azaltıcı yönde etki eder.
- Folik asit
- Pterin aldehit

Soya fasülyesi inhibitörleri: Ksantin dehidrogenazın protolitik etki sonucu ksantin oksidaza dönüşümünü inhibe ederler.

NADPH Oksidaz inhibitörleri:

- Adenozin
- Lokal anestezikler
- Kalsiyum kanal blokerleri
- Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar
- Cetiedil
- Diphenylene iodonium

Trolox-C: E vitamininin suda eriyebilen analogudur.

Endojen antioksidan aktiviteyi artıran maddeler: Glutasyon peroksidaz aktivitesini arttırmırlar.

- Ebselen: GSH-Px aktivitesini arttırması yanında lipooksijenaz yolunu da inhibe eder.
- Asetilsistein: Molekülün kendisi deasetile olurken, intraselüler glutasyonun redükte forma dönüşmesini sağlar. Radikal toplayıcı özellik gösterir.

Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları:

- Mannitol
- Albumin
- Dimetil sülfoksit (DMSO)

Demir redoks döngüsünün inhibitörleri:

- Desferroksamin: Serbest Fe³⁺ ü bağlar.
- Seruloplazmin

Nötrofil adezyon inhibitörleri

Sitokinler: Başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler. Ancak bu faydalı etkileri yanında proteolitik enzimleri aktive ettiklerinden dolayı, zararlı da olabilirler.

- TNF(Tümör Nekrotizan Faktörü)
- İnterlökin-I

Barbituratlar

Demir şelatörleri: H₂O₂, proteoinlerin yapısındaki demiri serbestleştirerek Fenton reaksiyonunu hızlandırır. Böylece OH üretimi artar. Demir şelatörleri ise hücre içersine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler. Bu özelliklerin dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir (30).

2.4.2.3. Gıda Antioksidanları

- Butylated hydroxylated (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodium benzoate
- Ethoxyquin

- Propylgalate
- Fe-superoxyde dismutase

2.4.3. Diyabet ve Oksidatif Stres

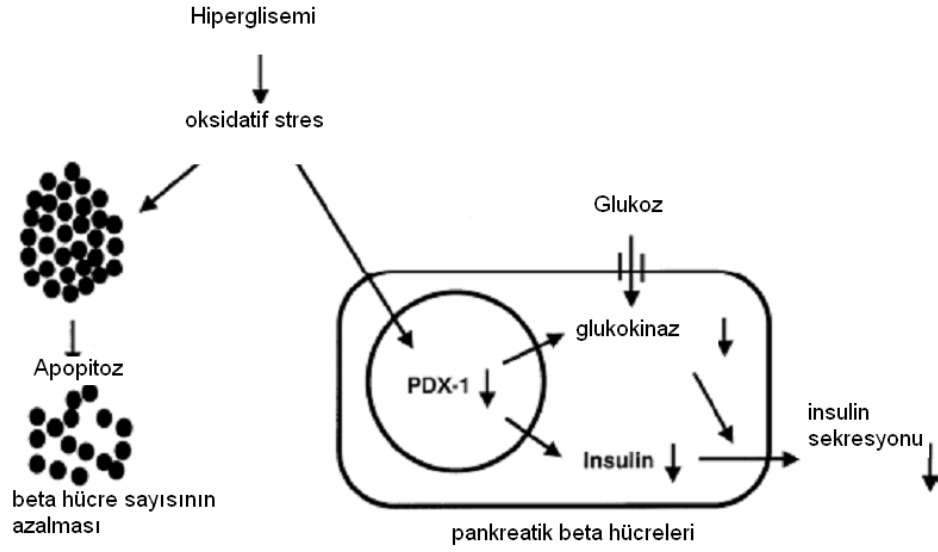
Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir. Diyabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir . Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıktığı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (27).

Diyabette reaktif oksijen türlerinin rolü 1980 'li yıllardan beri geniş çapta tartışılan bir konu olmuştur. Diyabet ve komplikasyonlarının reaktif oksijen türleri ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (31).

Süperoksit dismutaz, katatalaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir. Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu da bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (32,33).

Buna bağlı olarak oksidatif strese maruz kalan beta hücrelerinde insülin gen ekspresyonunun düştüğü belirtilmektedir. Bunun nedeni ise oluşan oksidatif stres sonucu insülin ve glikokinaz gibi karbonhidrat metabolizması için çok önemli olan enzim ve hormonların gen ekspresyonlarını uyaran transkripsiyon faktörü PDX-1'in DNA'ya bağlanma potansiyelindeki azalma olduğu belirtilmektedir. Şekil 12'de görüldüğü gibi

PDX-1'in aktivitesinin değişmesine bağlı olarak c-Jun N-terminal kinaz yolunun aktive olması ile insülin gen ekspresyonunun baskılandığı ifade edilmektedir (34).



Şekil 12: Diyabette glukoz toksisitesine bağlı olarak gelişen oksidatif stresin beta hücrelerindeki moleküler mekanizması (34)

Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır.

1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalının hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile sonuçlanır. Hücre içi glukoz oksidasyonu NADH'ın açığa çıkmasına yol açar. NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali ortaya çıkar. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi artar. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyel ROS üretimi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (27).

2. Proteinlerin Glikasyonu ve AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) Oluşumu

Proteinler yüksek glukoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glukoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur. Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir. AGE'ler, endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açtığı gibi, kompleks biyokimyasal mekanizmalarla serbest radikal üretebilme kapasitesine de sahiptirler. Yine AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta nükleer faktör kapa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin -1, adhezyon molekülü, VCAM- 1 gibi) ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (27).

3. Poliol Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'nin yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir.

Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya ya çıkışında rol oynar. Vazodilatatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımının azalmasına dolayısıyla endonöronal hipoksi veya iskemiye yol açmaktadır. Bu olayın sonucunda nöronal hücre, schwann hücrelerde hasar meydana gelmektedir.

Glukozun sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola çevrilmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerinde azalma ve bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde düşme olduğu gözlenmiştir ki bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önem

taşımaktadır. Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopatati, nöropati, katatarakt, nefropati ve kalp hastalığı patatogenezinde rolü olduğu düşünülmektedir (27).

2.5. PARAOKSONAZ

2.5.1.Tanım

Paraoksonaz hem arilesteraz, hem de paraoksonaz (arildialkil fosfataz; E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip, karaciğerde sentezlenen, organik fosforlu bir insektisit olan parationun aktif metaboliti olan paraoksonu hidroliz etme yeteneğine sahip bir serum esterazdır (35-38).

Paraoksonaz; gerek HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisine katkıda bulunarak, gerekse lipoprotein peroksidasyonunu ve LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek, aterosklerotik süreçte koruyucu bir role sahip olduğu düşünülen antioksidan bir enzimdir (35-40).

Önceleri organofosfat bileşiklerini hidrolize etme özelliği nedeniyle toksikolojide üzerinde çalışılan paraoksonaz, son yıllarda HDL ile olan ilişkisi ve antioksidan özelliğiyle dikkatleri üzerine çekmiştir.

2.5.2.Tarihçe

1946 yılında Abraham Mazur, hayvan dokusunda organofosfat içeriklerini hidrolize edebilen bu enzimin varlığını bildiren ilk kişidir. İnsektisid olan paratiyonun toksik bir metaboliti olan paraoksonu hidrolize edebilme yeteneğinden dolayı paraoksonaz ismini aldı. Fenilasetat gibi aromatik esterleri de hidroliz edebildiği için (arilesteraz aktivitesi EC 3.1.1.2) bu enzime A-esteraz ismi de verildi (41).

1953 yılında Aldridge organofosfat bileşikleriyle olan etkileşimlerine göre esterazları sınıflandırdı. Organofosfatları hidrolize edenlere A-esterazlar; organofosfatlar tarafından inhibe edilenlere ise B-esterazlar denildi. Buna göre A-esterazlar arildialkilfosfatazlar (paraoksonazlar) ve diisopropilflorofosfatazlar (DFPazlar)'dan oluşuyordu. B-esterazlar ise karboksil esterazlar ve kolin esterazlardan oluşuyordu (35).

Paraoksonaz insan serumunda 1960' da ilk olarak Uriel tarafından elektroforezden sonra HDL immunopresipitatlarında saptandı. Ardından özellikle saflaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipitlerle ilişkili olduğu ve HDL kompleksi ile aynı moleküler kütesinin olduğu ileri sürüldü. Koyunlarda enzim aktivitesinin çoğu apo A1 içeren partiküllerde

HDL ile birlikte idi ve insan serumunun ultrasantrifüjlenmesi ile birlikte Mackness ve ark. paraoksonazın kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koydu. Son immunaafinite kromatografi çalışmaları, insan serum paraoksonazının gerçekte apo A1 ve apo J içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve paraoksonaz içeren HDL' nin total HDL'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu gösterdi (35,42).

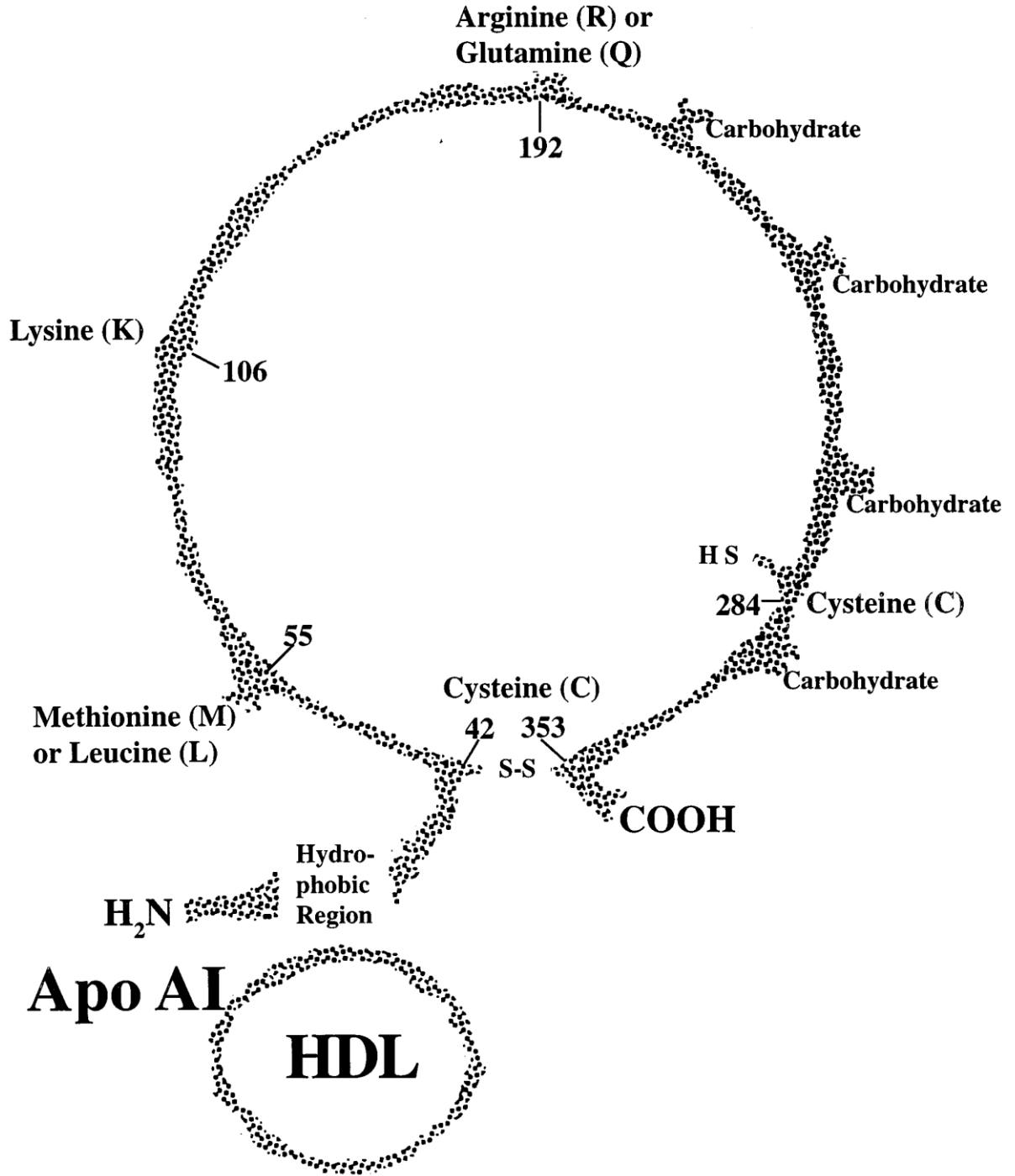
2.5.3.Kimyasal Yapısı

Paraoksonaz, ağırlığının %15,8'ini karbonhidrat zincirlerinin oluşturduğu 43-45 kDa ağırlığında 354 tane aminoasitten oluşan glikoprotein yapıda bir moleküldür. Aminoasit bileşimi incelendiğinde, lösin içeriğinin yüksek olduğu görülür. Yapısında bulunan üç sistein kalıntısından 284' teki serbest iken; diğer ikisi arasında (Cys 42-352) tek disülfid bağı bulunur. Bununla beraber 42, 284 ve 353. konumlarda yer alan sistein artıklarının, paraoksonazın yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunduğu söylenebilir. Çünkü paraoksonaz aktivitesi, sülfidril reaktifleri tarafından inhibe edilir ve bu inhibisyon sistein tarafından önlenir. Sistein rezüdüğü bu nedenden dolayı aktif merkez için şarttır (35,42).

N-terminal hidrofobik sonlanma, diğer lipoproteinlere ve lipit içeren partiküllere bağlanmasını sağlar (35). Şekil 13'de paraoksonazın yapısı görülmektedir.

Paraoksonazı bağlayan HDL alt birimleri, Apolipoprotein A1(Apo A1) ve Apo J (klusterin) proteinlerini de içerdiğinden, Apo A1 ve Apo J'nin bağlanmada rol oynayabileceği düşünülmektedir (35,43).

Enzim aktivitesi için kalsiyum iyonu gereklidir. Kalsiyumun iki önemli fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki; katalitik bölgenin stabilizasyonu, ikincisi ise paraoksonun P=O bağı polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlayarak dietilfosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırmasıdır (35,38,43). Kalsiyumun öneminden dolayı; EDTA ve sitrat kalsiyum şelatörleri olduğu için, lityum ise paraoksonazın inhibitörlerinden olduğu için enzim aktivitesi tayininde plazma kullanılmamalıdır (44).



Şekil 13: Paraoksonazın Yapısı (38).

2.5.4. Paraoksonaz 1 Gen Polimorfizmi

Paraoksonaz 1, 2 tipte genetik polimorfizm gösterir (35,38,43).

192-polimorfizmi: mRNA yapısında 192. konumda bulunan aminoasit (glutamin-Q-veya arginin-R-)’in cinsine göre, enzimin Q (Tip A) veya R (Tip B) izozimleri oluşmaktadır.

55-polimorfizmi: 55. konumda bulunan aminoasit, Lösin (L) ya da metiyonin (M) olabilmektedir.

Bu Q/R polimorfizmi, kişilerin çeşitli substratlara karşı verdikleri farklı cevaplarla ilgilidir. Örneğin R tipi paraoksonaz 1, paraoksani hidrolize etme konusunda Q tipine göre daha iyidir (38,45). Fakat çoğu organofosfatlar Q tipi tarafından R tipine göre daha iyi hidrolize edilmektedir. Fenilasetatı hidrolize etme konusunda ise her iki tip de yaklaşık aynı hızlara sahiptir. Bu nedenle organofosfatlara karşı enzimin koruyuculuğu sadece doku veya kandaki enzim miktarına değil, mevcut enzim izoenzimine de bağlıdır (38) .

Paraoksonaz 1 Q'nun, LDL'yi oksidasyondan korumada R alloenzimine göre daha etkili olduğu bildirilmiştir (46).

Paraoksonaz 1 genindeki 55.pozisyonadaki polimorfizmin etkisinin araştırıldığı çalışmada L aleli için homozigotluğun koroner arter hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olduğu ve MM varyantına sahip bireylerin koroner arter hastalığı gelişimine en az yatkın olduğu gösterildi (47).

Gen polimorfizmine bakıldığında en yaygın görülen form homozigot-QQ, ikincisi heterozigot –QR, en az olanı ise homozigot-RR'dir. Farklı popülasyonlardaki polimorfik dağılım bireyler arasında varyasyona da neden olur. Türklerde R alel sıklığı doğu popülasyonlarından düşük, Avrupa ırkına yakın değerler gösterir (42).

2.5.5. Substratları

Paraoksonazın başlıca substratları arasında, organofosfat bileşikler, somon, sarin gibi sinir gazları, aromatik karboksilik asit esterler, doymamış alifatik esterleri ve laktonlar sayılabilir (35,38,43).

Paraoksonaz Reaksiyonu: Organofosfat bileşiklerinden paratiyonun aktif katabolik metaboliti olan paraokson (o,o-dietil-o-p-nitrofenil fosfat), enzime adını verdiği gibi, aktivite tayininde de en çok kullanılan substratlardan birisidir.

Paraoksonazın hidrolik aktivitesiyle açığa çıkan p-nitrofenol veya fenolün konsantrasyonu üzerinden, Paraoksonaz aktivitesi spektrofotometrik olarak tayin edilebilmektedir (43).

Arilesteraz Reaksiyonu: Aromatik karboksilik asit esterlerinden fenil asetat, enzimin arilesteraz aktivitesinin tayininde sıklıkla kullanılmaktadır (43).

Son yıllarda paraoksonazın laktonaz aktivitesi üzerinde de durulmaktadır. Endojen bileşiklerin lakton formları ile spironolakton, mevastatin, simvastatin ve lovastatin gibi lakton içeren ilaçların t paraoksonaz tarafından hidroliz edildiği gösterilmiştir (45).

Okside fosfolipitler ile kolesterol esterlerinin ana substratlar olduğu düşünülmesine karşın fizyolojik substrat tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (35,48).

2.5.6. Sentez ve Sekresyonu

Memeli türleri arasında geniş bir dağılıma sahip olan paraoksonaz proteinleri, balıklarda, kuşlarda ve eklembacaklılar gibi omurgasızlarda mevcut değildir (37). Memelilerde aynı kromozom üzerinde birbirine komsu üç ayrı paraoksonaz geni (PON1, 2, 3) bulunmaktadır. Paraoksonaz genlerinin, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize oldukları bildirilmektedir (35,36,49).

İnsanlarda PON1 mRNA ekspresyonu sadece karaciğerle sınırlıdır . Farelerde yapılan çalışmalarda karaciğer, akciğer, kalp, beyin, ince bağırsak ve böbrek dokusunda da PON1 mRNA'sı gösterilmiştir (35).

PON1 serum aktivitesi, yeni doğanlarda ve prematürlerde erişkin düzeyin yarısı kadardır. Erişkin düzeyine doğumdan 1 yıl sonra ulaşılır ve yaşam boyunca aynı kalır (35).

PON3 ise başlıca karaciğerden olmak üzere bir miktar böbrekten de eksprese edilmektedir. Bunların aksine PON2 mRNA'nın kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plesanta, ince bağırsak, dalak, mide ve testisleri içeren çok geniş bir doku dağılımına sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca PON2, diğer üyelerden farklı olarak HDL ve LDL ile ilişkili değildir (49).

Son yıllarda tavşan KC'i ve serumundan saflaştırılan ve bir laktonaz olduğu tanımlanan PON3 gen ürününün; en çok plazmada, HDL yapısında bulunduğu bildirilmektedir (50).

2.5.7. Paraoksonaz 1'in Fonksiyonları

Organofosfatlara Karşı Koruma (Hidrolitik Aktivite): Paraoksonaz 1'in en iyi bilinen fonksiyonu, hidroliz yoluyla, organofosfat türevi sinir gazlarını ve insektisitleri zararsız hale getirmesidir (35-38). Paraokson, asetilkolini yıkan kolinesterazların potent inhibitörüdür, ardışık nöron uyarılması ile sinaptik bileşkelerde asetilkolin birikimine yol açar. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson organofosfat etki alanına ulaşmadan önce kanda Paraoksonaz 1 enzimi tarafından hidrolize edilebilir. Paraoksonaz eksikliği gösteren böcekler organofosfatlar için hedef organizmalardır (42).

Bakteriyel Endotoksinlerden Kaynaklanan Toksikiteye Karşı Koruma: Paraoksonaz organizmayı bakteriyel endotoksinlerden ve lipopolisakkarit toksisitesinden korur. Son yıllarda HDL kompleksinin gram(-) bakteriyel enfeksiyondan kaynaklanan endotoksemiye

karşı koruyucu olduğu bulunmuştur. HDL, bazı bilinmeyen yollarla makrofaj hücre yüzeyindeki spesifik bağlayıcı protein (Cd14) ile bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakkaritin etkileşimini önleyerek sitokin kaskat salınımını önlemiş olur. La Du ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada yetişkin fareye lipopolisakkarit verilmeden 2 saat öncesinde saflaştırılmış paraoksonaz enzimi verildiğinde farelerin %60'ı yaşamaya devam etmiştir. paraoksonaz verilmediğinde ise hepsinin öldüğü gözlenmiştir (38).

LDL ve HDL Oksidasyonunun Önlenmesi: 1991 yılında Mackness grubu heterozigot familial hiperkolesterolemi ve diyabetli hastalarda genetik değişiklikten bağımsız olarak kontrolden düşük paraoksonaz aktivitesi saptadı. Fish eye ve Tangier hastalığı olanlarda ise çok düşük, saptanamayacak düzeyde paraoksonaz aktivitesi ile karşılaşıldı. Bu hastalıklarda ateroskleroz gelişimine yatkınlıktaki artış, yine paraoksonaz-ateroskleroz ilişkisini ve olasılıkla HDL'nin antiaterojenik özelliklerinde paraoksonazın önemini ortaya koydu. Mackness, serum paraoksonazının ateroskleroz sürecinin başlangıç evresi olan LDL fosfolipitlerinin oksidasyonuna karşı korunmasında önemli olduğunu gösteren ilk araştırmacıdır (42). Mackness ve arkadaşları HDL'nin bakırla inkübe edilen LDL' de lipit peroksit oluşumunu %90 inhibe ettiğini, HDL'den saflaştırılan paraoksonazın TBARS düzeylerini ve lipoperoksit oluşumunu önlediğini gösterdi.

Paraoksonaz 1 LDL'nin yanı sıra lipit peroksitlerinin taşıyıcısı HDL'yi de korur, böylece makrofajlardan kolesterol çıkışındaki etkinliğini artırır. Paraoksonaz 1 lipit peroksitlerinin yanı sıra hidrojen peroksit üzerine de etkilidir. Aterogenez sırasında arter duvar hücrelerince üretilen major toksik oksijen metaboliti olan hidrojen peroksit, oksidatif koşullarda daha potent ürünlere dönüşerek LDL oksidasyonuna neden olur. Paraoksonazın ox-LDL'deki kolesterol linoleat, hidroperoksitler ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesinin de olduğu düşünülmektedir (48).

2.5.8. Paraoksonaz Aktivitesini Etkileyen Faktörler

Diyet, sigara, akut faz proteinleri ve gebelik serum paraoksonaz 1 düzeylerini ve aktivitelerini etkiler (35,37,52). Yapılan çalışmalarda diyabet, hiperkolesterolemi ve kardiyovasküler hastalıklar gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda bazı hasta gruplarında paraoksonaz 1 aktivitesi düşük bulunmuştur (40,48,51) . Paraoksonaz aktivitesi ve yaşın incelendiği çalışmada Jaouad ve arkadaşları, paraoksonaz aktivitesinin yaşlanmayla azaldığını ortaya koymuşlardır. Aynı çalışmada yaşlılarda HDL'nin antioksidan kapasitesi de gençlerle kıyaslandığında düşük bulunmuştur. Paraoksonaz aktivitesindeki düşüklüğün

muhtemelen yaşlanmanın neden olduğu artmış oksidatif stresin Cys-284 teki yapmış olduğu değişikliklerle ilgili olabileceği sonucuna varıldı. Yaşlılardaki paraoksonaz enziminin sülfidril grup sayısı, gençlerdekine göre anlamlı derecede düşüktü ve bu, yaşla birlikte paraoksonaz enziminin aktivitesindeki düşüşü ve HDL' nin antioksidan aktivitesindeki azalmayı açıklıyordu. Sigaraya bağlı paraoksonaz aktivitesindeki azalmanın da benzer şekilde enzimin serbest tyol gruplarındaki değişikliğe bağlı açıklanabileceği sonucuna varıldı (40).

Apo E eksikliği gösteren farelerde kırmızı şarap ve polifenollerin (kuersetin, kateşin) paraoksonaz aktivitesini artırdığı bulunmuştur (42).

HDL'nin biyolojik varyasyonunun paraoksonazın biyolojik varyasyonu üzerine etkisinin olup olmadığının araştırıldığı çalışmada Tuncel ve arkadaşları, paraoksonaz 1'in düşük birey-içi ve yüksek bireyler arası varyasyona sahip olduğunu, HDL'nin ise her iki biyolojik varyasyon komponentinin göreceli olarak daha düşük olduğu için, paraoksonaz 1'in yüksek varyasyonunda HDL' nin katkısının az olduğu sonucuna vardılar. Paraoksonaz 1'in bireyler arası yüksek varyasyonunda genetik ve çevresel faktörler rol oynamaktadır (52). Enzim aktivitesi bireyler arasında 40 kata kadar değişkenlik gösterebilir (53).

2.5.9. Paraoksonaz Aktivitesi ve Diyabet

Yapılan çalışmalarda diyabet gibi oksidatif stresin arttığı durumlarda paraoksonaz aktivitesi düşük bulunmuştur (35,40,51,53) . Bu düşüşün HDL ve/veya paraoksonazdaki glikasyondaki değişiklik, sentezdeki azalma, katabolizmada artma veya artmış oksidatif stresin etkisiyle olabileceği düşünüldü (53). Paraoksonaz genlerinin, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda, q 21.3 ile q 21.1 bölgesinde lokalize olduğu ve paraoksonaz 1 genine komşu bir genin piruvat kinazlardan birini kodlayarak, paraoksonaz genotipleri ile diyabetik glisemik kontrol arasındaki ilişkiyi açıklayabileceği belirtilmektedir (36).

2.6. IP-10

2.6.1. Tanım

IP-10 (Interferon gama inducible protein), CXCL10 olarak da bilinen kemotaktik bir sitokindir. Monositlerden, nötrofillerden, endotel hücrelerinden, keratinositlerden, fibroblastlardan, mezenkimal hücrelerden, dentritik hücrelerden ve astrositlerden sekrete edilir. İnflamatuvar bir kemokindir (54).

2.6.2. Kemokin Ailesi

Kemokinler, yaklaşık 8-14 kDa ağırlığında bir grup kemotaktik sitokinlerdir. Proteindeki korunmuş sistein rezidüsünün pozisyonuna göre 4 gruba ayrılırlar. Bunlar CXC(α -kemokinler), CC(β -kemokinler), C(γ -kemokinler) ve CX₃C(ϵ -kemokinler)' den oluşmaktadır. Fonksiyonlarına göre ise kemokinler iki gruba ayrılabilirler. İnflamasyon aracılı periferik dokularda sentezleri artan inflamatuvar sitokinler ve lökosit trafiğinde destekleyici olan ve koruyucu fonksiyon gören immün sistem veya diğer adlarıyla temel kemokinler olarak tanımlanabilir (55).

Kemokinler kan damarlarının endotel hücre yüzeylerinde bulunan proteoglikanlara bağlanırlar. Lökositler bu kemokinlerle reseptörleri aracılığıyla etkileşime girerler ve bu sayede adezyonu sağlayan integrin aktivasyonu sağlanmış olur. (55).

Kemokin reseptörleri daha çok Th1 ve Th2 hücrelerini de içeren lökosit hücre tiplerinde salgılanırlar. İnsanlarda Th1 hücresinden CXCR3 (CD183, IP-10 reseptörü) ve CCR5 (CD195, MIP-1a, MIP-1b, ve RANTES reseptörü) salgılanırken; Th2 hücresinden ise CCR3, CCR4 ve CCR8 salgılanır (55).

2.6.3. IP-10 ve İlişkili Olduğu Çeşitli Otoimmün hastalıklar

Sistemik Lupus Eritematozis (SLE)

SLE, sebebi tam olarak bilinemeyen kronik inflamatuvar bir otoimmün hastalıktır. Th1 ve IFN- γ ' nın SLE'nin gelişmesinde çok önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. IP-10 düzeyinin SLE hastalarında arttığı ve bu artışın hastalık aktivitesiyle de orantılı olduğu bulunmuştur (54).

Romatoid Artrit

Romatoid Artrit, eklem inflamasyonu, sinovial hiperplazi ve aşırı kemik yıkımı ile karakterize kronik inflamatuvar bir artritir. Sinoviyuma olan T hücre infiltrasyonun düzenlenmesi hastalığın kontrol altında tutulmasında çok önemlidir. IP-10 bu hastaların sinovial sıvılarında ve dokularında yüksek olarak bulunmuştur (54).

Sjögren Sendromu

Sjögren Sendromu, ağız ve göz kuruluğu, tükürük ve gözyaşı bezlerindeki inflamasyonla karakterize bağ doku hastalığıdır. Tükürük ve gözyaşı bezlerine olan hücre

infiltrasyonu epitelium hücrelerinin yıkımına neden olur. Kemokinler hastalığın ilerlemesinde önemlidir. Yapılan çalışmalarda Th1-ilişkili kemokinlerin (CXCL9, CXCL10, ve CXCL11), özellikle de IP-10' un submandibular bezde önemli oranda arttığı bulunmuştur (54).

Sistemik Skleroz

Sistemik Skleroz, reynoud fenomeni ve ilerleyici cilt incilmesi ile giden nispeten nadir görülen bir otoimmün hastalıktır. Hastalığın patogeneğinde kemokinlerin lökosit kemotaksisini artırdığı ve lökositlerle fibroblastların ilişki kurarak doku fibrozisine neden olduğu gösterilmiştir. MCP-1 (CCL2)' nin bu hastalığın patogeneğinde kritik rolü olduğu gösterilmiştir. Son çalışmalarda IP-10 düzeyi bu hastalığı olanlarda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (54).

İdiopatik İnflamatuvar Myopati

İdiopatik İnflamatuvar Myopati, proksimal kas güçsüzlüğü, yükselmiş kas enzimleri, kas dokusundaki inflamasyonla karakterize nadir bir otoimmün hastalıktır. Bu hastalarda IP-10' un makrofajlarda ve T hücrelerinden aşırı miktarda salgılandığı görülmüştür (54).

2.6.4. IP-10 ve Diyabet

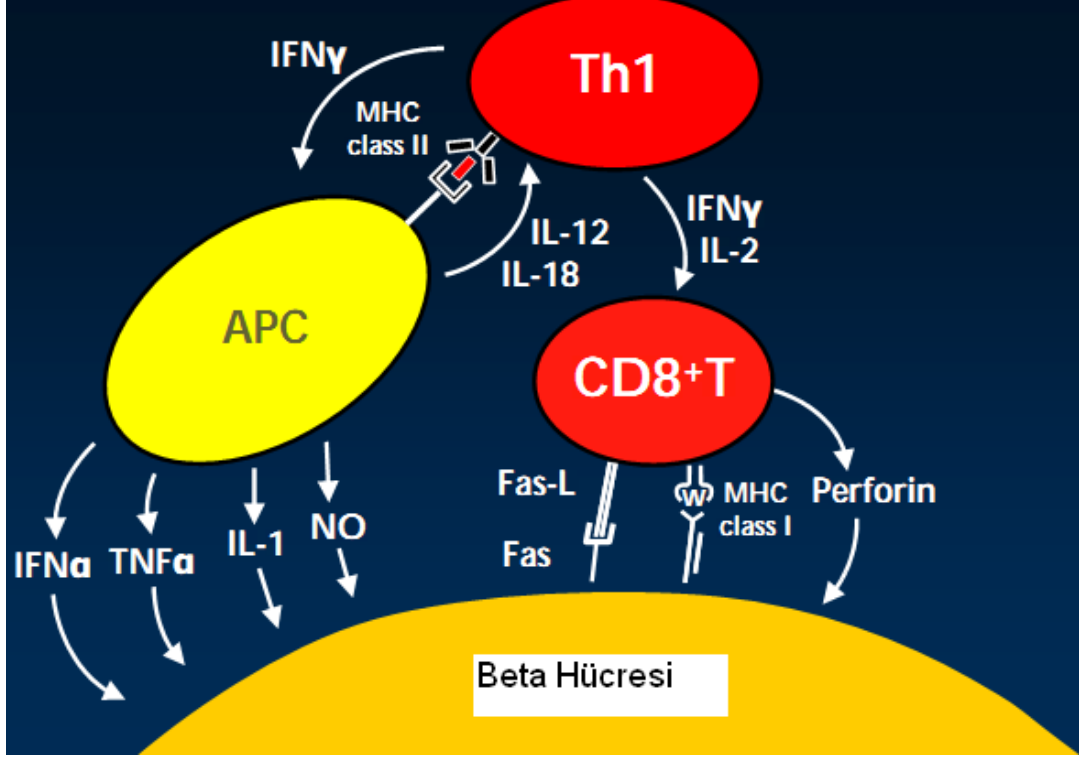
Tip 1 diyabet, insidansı giderek artan kronik bir hastalıktır. Hem insan hem de hayvan çalışmalarında pankreasın immün hücrelerle saldırıya uğrayarak insülitis geliştiği gözlenmiştir. Makrofaj ve lenfositler bu hasarda en önde gelen ajanlardandır (56).

Yapılan hayvan çalışmalarında farelerde IP-10 'un yüksek seviyelerde salgılandığı ve immün hücreleri pankreasa topladığı görülmüştür. Ayrıca yapılan hayvan çalışmasında IP-10' un NOD fare pankreaslarında daha 2 haftalıkken ve insülitis dahi olmadan bulunduğu ve diyabetin başlangıcında salgılandığı gözlenmiştir. IP-10' un başlangıçta kendi başına insülitis oluşturacak kadar yüksek seviyelerde olmasa da sonrasında diğer immün hücrelerin pankreasa göçünü etkileyerek insülitisi oluşturduğu görülmüştür (56).

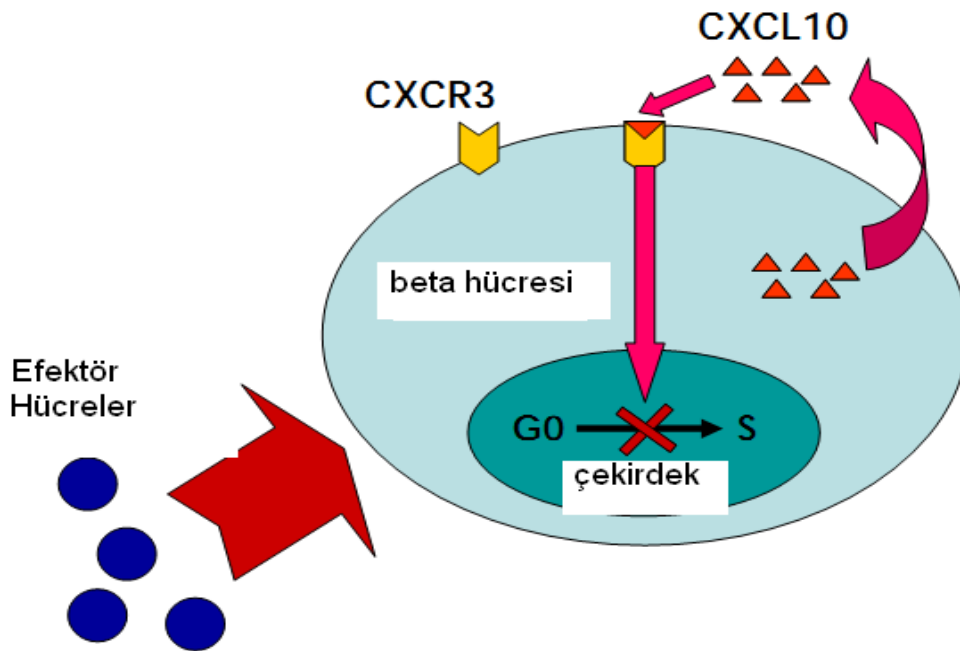
Viral enfeksiyonlar ve IL-1, interferon- γ gibi sitokinler tip 1 diyabetin gelişiminde önemlidir. Virüslerin, IP-10 salınımını artırarak ve sonrasında da diğer immün hücrelerin göçüyle pankreasa zarar verebileceği düşünülmektedir (56). Şekil -14 ve Şekil-15 'de sitokin aracılı hücre hasarı görülmektedir.

IP-10 salınımını indükleyen Interferon (IFN)-gama, interleukin (IL)-1beta ve TNF-alfa ile sinerjik etki ederek inflamatuvar nitrik oksit sentetaz (iNOS) sentezini artırır, apoptozisi

indükler, pankreasın adacık hücrelerinde glukozla stimüle edilmiş insülin salınımı bozar. Tüm bu etkiler tip 1 diyabetin gelişmesinde, pankreatit modellerinde ve adacık hücre naklinde önemlidir (57).



Şekil 14 : Beta Hücre Hasarı (58).



Şekil 15: Beta Hücre Proliferasyonun CXCL10/CXCR3 sistem tarafından Bloke Edilmesi (58).

Tip 1 diyabetli çocuklardaki IP-10, pankreas adacık antikorları ve tirozin fosfataz seviyelerinin değerlendirildiği alışma, IP-10 seviyelerinin diyabetik grupta kontrol grubuna göre yüksek olduğunu ortaya koymuştur (59).

Ayrıca IP-10 salınımının doku düzeyinde değerlendirildiği bir başka çalışmada ise IP-10 ve reseptörü CXCR3, tip 1 diyabeti olan hastalarda double-immunflresans yöntemiyle ölçülmüştür ve pankreas adacık hücrelerinde tespit edilmiştir (60).

3. MATERYAL VE METOD

3.1.MATERYAL

3.1.1.Vakaların Oluşturulması, Gruplama ve Deneysel Uygulama İle İlgili Hususlar

Deneysel çalışma projesi ile ilgili Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (31.05.2010 tarih ve 2010-057 sayılı) etik kurul izni alındı. BAP (Bilimsel Araştırma Projeleri, Proje No: 10102012) tarafından maddi desteğin sağlanmasını takiben çalışmaya başlandı. Bu çalışma, 250-300 gram ağırlığında toplam 50 adet Wistar cinsi dişi rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar, Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edildi. Çalışma süresince ratlar, diüurnal ışık şartlarını (12 saat sürekli aydınlık, 12 saat sürekli karanlık) sağlayan bir ortamda tutuldu. Ratlar, standart pelletle beslendi. Çalışmanın başında ve sonunda kiloları tartılarak kaydedildi.

Grup 1 Kontrol Grubu

Grup 2 Diyabet Grubu: 50mg/kg dozunda Streptozotosinle diyabet oluşturuldu ve herhangi bir tedavi verilmedi..

Grup 3 Diyabet + D vitamini Tedavi Grubu: Diyabet Oluşturulduktan Sonra D Vitamini Başlanan Grup: (Streptozotosinle diyabet oluşturulduktan sonra 12.5 µgr/kg dozunda D vitamini oral yoldan 14 gün süreyle verildi.)

Grup 4 Diyabet + D vitamini Önleyici Grup: Diyabet Oluşturulmadan Önce D Vitamini Başlanan Grup: (Streptozotosinle diyabet oluşturulmadan 14 gün önce 12.5 µgr/kg dozunda D vitamini oral yoldan verildi ve diyabet oluştuktan sonra D vitamini takviyesine 14 gün devam edildi.)

Grup 5 D Vitamini Kontrol Grubu: 12.5 µgr/kg dozunda D vitamini oral yoldan 14 gün boyunca verildi.

Diyabet Oluşturulması: Sodyum sitrat tamponunda çözülmüş Streptozotosin 50 mg/kg dozunda intraperitoneal yoldan verildi. 5 gün sonra kan glukoz seviyeleri kuyruk veninden alınan bir damla kandan şeker ölçüm cihazı ile ölçüldü. Kan glukoz seviyesi 300 mg/dl ve üstü olanlar diyabetik olarak kabul edildi.

Sitrat Tamponun Hazırlanması: 2,1 g (10 mmol) sitrik asit monohidrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) bir miktar saf suda çözdürülüp üzerine 2,94 g (10 mmol) trisodyum sitrat dehidrat ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) eklenenerek son hacim 1 litreye tamamlandıktan sonra pH 4,5'e ayarlanmıştır.

D Vitaminin Hazırlanışı: 12.5 µgr/kg kolekalsiferol (C-9756 Sigma, St. Louis, MO) 0.3 ml mısırözü yağında çözüldü. Grup 4' e diyabet oluşturulmadan 14 gün önce başlanarak toplam 28 gün boyunca, grup 3 ve grup 5 'e ise 14 gün boyunca oral gavaj yoluyla verildi.

Çalışmanın sonunda grup 2' den 2, grup 3 ve grup 4'den 1'er rat öldü. Deney süresinin bitiminde, ketamin anestezisi altında kardiyak ponksiyonla kan alınarak servikal dislokasyonla sakrifikasyon yapıldı. Alınan kan 4 °C'ye ayarlı soğutmalı santrifüjde 1000 x g'de 15 dakika çevrilerek serumu ayrıldıktan sonra, elde edilen serum biyokimyasal analizler için plastik ve kapaklı ependorf tüplere transfer edilerek -80 °C'de derin dondurucuda saklandı. Ratların deney süresince muhafaza edildiği kafesler ve deney sonunda ketamin anestezisi altında intrakardiyak kan alınması Şekil 16 ve Şekil 17' den görülmektedir.



Şekil 16: Ratların kafesleri



Şekil 17: Ratlardan intrakardiyak kan alınması

3.1.2.Kullanılan Cihazlar

- Otomatik ELISA okuyucusu (ELx 800 marka)
- Otomatik ELISA yıkayıcısı (ELx 50 marka)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler
- Vortex (NÜVE)
- Shaker (BIOSAN orbital shaker)
- Santrifüj (EPPENDORF)

3.2.METOD

3.2.1. Total Antioksidan Status (TAS) Analizi:

Ölçüm Erel (2004)'in geliştirdiği metoda göre (61), Rel Assay Diagnostics Total Antioxidant Status kiti kullanılarak numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 10 dakika sonra spektrofotometrede kinetik okuma yapılarak gerçekleştirildi. Metot; numunede bulunan antioksidanların, kullanılan ayıraçlardaki koyu yeşil renkli 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS+)'in radikal katyonunu indirgeyerek ABTS molekülüne dönüştürmesi esasına dayanır. Numunede bulunan antioksidan miktarına bağlı olarak değişebilen, ABTS+ radikalinin ABTS'ye indirgenme oranı attıkça, koyu yeşil olan renk açılmaya, beyazlaşmaya başlamaktadır. Spektrofotometrede 660 nm'de okunan absorbans değerlerinin değişimi, numunede bulunan total antioksidan düzeylerine bağlıdır.

Ölçüm genelde TAC analizlerinde kullanılan, bir vitamin E analogu olan ve Trolox Equivalent olarak adlandırılan standart antioksidan solüsyonu kullanılarak kalibre edilmiş ve ölçülen TAC düzeyleri mmol Trolox Equivalent/L olarak ifade edilmiştir.

3.2.2. Total Oksidan Status (TOS) Analizi:

Ölçüm yine Erel (2005)'in geliştirdiği metoda göre (62), Rel Assay Diagnostics Total Oxidant Status kiti kullanılarak numune ve ayıraçlar karıştırıldıktan 10 dakika sonra spektrofotometrede end-point okuma yapılarak gerçekleştirilmiştir. Metot; numunede bulunan oksidanların analizde kullanılan ayıraçtaki ferrous (Fe+2) iyon komplekslerini okside ederek ferrik (Fe+3) forma dönüştürme esasına dayanır. Oksidasyon reaksiyonu sonucu miktarı artan ferrik iyonlar, reaksiyonun asidik ortamında bulunan kromojen ile renkli bir kompleks oluştururlar. Oluşan rengin yoğunluğu numunede bulunan oksidan maddelerin toplam miktarına bağlı olarak değişmektedir. Bu değişimler spektrofotometrede 560 nm'de okuma yapılarak belirlenmiştir. TOC analizi hidrojenperoksit (H₂O₂) ile kalibre edilmiş ve sonuçlar hidrojenperoksit equivalent litre (μmol H₂O₂ Equiv./L) olarak ifade edilmiştir.

3.2.3. Paraoksonaz Aktivitesi Tayini:

Paraoksonaz aktivitesi, Rel Assay Diagnostics Paraoksonaz kiti kullanılarak; 412 nm'de substrat paraoksonan'ın hidrolizi ile oluşan p-nitrofenolden kaynaklanan absorbans artışının ölçülmesiyle değerlendirildi. Paraoksonaz aktivitesi U/L olarak ifade edildi.

3.2.4. IP-10 Ölçümü

ELISA yöntemi ile çalışan CUSABİO marka kit kullanılarak ölçüldü. Testin çalışma şekli kısaca şu şekildeydi: Standartlar, kontrol örnekleri ve rat serum numuneleri antikorla kaplanmış kuyucuklarda inkübe edildi. İnkübasyonun ardından aspirasyon yapıldı ve biotin ile işaretli antikor, kuyucuklara ilave edildi. İnkübasyon ve yıkamanın ardından Streptavidin-HRP konjugatı eklendi. Son yıkamanın ardından substrat solüsyonu (TMB) eklendi ve reaksiyon asidik solüsyon eklenerek durduruldu. Oluşan rengin absorbansı 30 dakika içerisinde 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Absorbanslar aranan madde konsantrasyonu ile doğru orantılıydı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri ile standart eğrisi çizildi. Bu standart eğrisi kullanılarak numunelerin IP-10 konsantrasyonları pg/ml cinsinden hesaplandı.

3.2.5. Diğer Biyokimyasal Parametrelerin Ölçümü

Glukoz Beckman Coulter DXC marka otoanalizörde orijinal Beckman marka ticari kitleri kullanılarak enzimatik kolorimetrik yöntemle ölçüldü.

3.2.6. Verilerin İstatistiksel Analizi

Elde edilen veriler SPSS™ (Statistical Package for the Social Sciences) ver. 16.0 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların normal dağılım gösterip göstermediğini anlamak için One-Sample Kolmogorov-Smirnov Testi uygulandı. Testler normal dağılım gösterdiği için parametrik ANOVA-Tukey Test uygulandı. Glukoz ve kilo parametrelerinin başlangıç ve son değerlerinin grup içi karşılaştırmasında ise Student-T Test uygulandı. P değerinin 0,05 altında olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızdan elde edilen bulgular ve bu bulguların istatistikî analizleri aşağıda tablolar halinde sunulmuştur.

Glukoz ve kilo parametrelerine ait bulguların ortalama $\pm$ standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 4 ve Tablo 5’ de; istatistiksel karşılaştırmaları ise Tablo 6’ da verilmiştir.

Gruplar şu şekildedir:

1. Grup (Kontrol Grubu), 2. Grup (Diyabet Grubu), 3. Grup (Diyabet + D vitamini Tedavi Grubu) , 4. Grup (Diyabet + D vitamini Önleyici Grup) ve 5.Grup (D vitamini Kontrol Grubu)

Tablo 4: Grupların başlangıç ve son glukozlarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

Parametreler	GRUP 1 (Kontrol)	GRUP 2 (Diyabet)	GRUP 3 (Diyabet+Tedavi)	GRUP 4 (Diyabet+Önleyici)	GRUP 5 (D vit Kontrol)
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=10
Başlangıç Glukoz (mg/dl)	87,7 $\pm$ 3,8	423,3 $\pm$ 44,7	429,0 $\pm$ 60,5	372,5 $\pm$ 24,2	82,6 $\pm$ 7,5
Son Glukoz (mg/dl)	91,6 $\pm$ 3,5	431,5 $\pm$ 36,2	416,6 $\pm$ 50,7	348,0 $\pm$ 26,1	86,1 $\pm$ 6,8

Tablo 5: Grupların başlangıç ve son kilolarının ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

Parametreler	GRUP 1 (Kontrol)	GRUP 2 (Diyabet)	GRUP 3 (Diyabet+Tedavi)	GRUP 4 (Diyabet+Önleyici)	GRUP 5 (D vit Kontrol)
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=10
Başlangıç Kiloları (gr)	261,6 $\pm$ 12,7	264,7 $\pm$ 33,5	273,2 $\pm$ 16,4	266,1 $\pm$ 23,3	272,8 $\pm$ 23,8
Son Kiloları (gr)	272,8 $\pm$ 11,9	245,8 $\pm$ 34,8	260,1 $\pm$ 18,9	260,3 $\pm$ 27,3	289,4 $\pm$ 25,3

Tablo 6: Grupların glukoz ve kilo parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılması

Gruplar	Başlangıç Glukoz (mg/dl)	Son Glukoz (mg/dl)	Başlangıç Kilo (g)	Son Kilo (g)
1-2-3-4-5	P=0,001	P=0,001	P=0,743	P=0,014
1-2	P=0,001	P=0,001	AD	AD
1-3	P=0,001	P=0,001	AD	AD
1-4	P=0,001	P=0,001	AD	AD
1-5	AD	AD	AD	AD
2-3	AD	AD	AD	AD
2-4	P=0,032	P=0,001	AD	AD
2-5	P=0,001	P=0,001	AD	P=0,010
3-4	P=0,010	P=0,001	AD	AD
3-5	P=0,001	P=0,001	AD	AD
4-5	P=0,001	P=0,001	AD	AD

AD: Anlamlı değil; p>0,05

Tablo 4 ve 6’da görüldüğü gibi Streptozotosin verildikten sonra 5. günde diyabet tanısını koymak için bakılan başlangıç glukoz değerleri açısından; diyabet gruplarının (grup 2, grup 3, grup 4) glukoz değerleri, kontrol gruplarına (grup 1, grup 5) göre anlamlı derecede yüksektir. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında ise; diyabet grubuyla (grup 2), diyabet + tedavi grubunun (grup 3) başlangıç glukozları açısından istatistikî açıdan anlamlı fark yoktur. Diyabet + önleyici grubun (grup 4) başlangıç glukoz değeri ise; grup 2 ve grup 3’ün başlangıç glukoz değerlerinden istatistikî açıdan anlamlı oranda düşüktür. Diyabet tanısı konduktan sonra 14 gün süren D vitamini takviyesinin ardından deneyin sonlandırıldığı gün bakılan son glukoz değerleri açısından ise; diyabet gruplarının (grup2, grup 3, grup 4) glukoz değerleri kontrol gruplarına (grup 1, grup 5) göre anlamlı derecede yüksektir. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında ise; diyabet grubu (grup 2) ve diyabet + tedavi grubunun (grup 3) glukozları arasında istatistikî açıdan anlamlı fark yokken; diyabet + önleyici grubun (grup 4) son glukoz değeri, grup 2 ve grup 3’e göre anlamlı derecede düşüktür.

Tablo 4 ve 6’da görüldüğü gibi; çalışmanın başlangıcında kaydedilen başlangıç kiloları açısından gruplar arasında istatistikî açıdan anlamlı fark yoktur. Çalışmanın bitiminde kaydedilen son kilolar açısından ise diyabet grubunun (grup 2) kilosu, D vitamini kontrol grubuna (grup 5) göre istatistikî açıdan anlamlı azalmıştır. D vitamini alan diyabet

gruplarının (grup 3 ve grup 4) kiloları açısından ise kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı fark olmamıştır.

Tablo 7’de Grupların başlangıç ve son glukozlarının grup içi istatistiksel karşılaştırılması verilmektedir.

Tablo 7: Grupların başlangıç ve son glukozlarının grup içi istatistiksel karşılaştırılması

Parametreler	GRUP 1 (Kontrol G)	GRUP 2 (Diyabet G)	GRUP 3 (Diyabet+Tedavi)	GRUP 4 (Diyabet+Önleyici)	GRUP 5 (Dvit Kontrol)
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=10
Başlangıç Glukoz(mg/dl)	87,7±3,8	423,3±44,7	429,0±60,5	372,5±24,2	82,6±7,5
Son Glukoz(mg/dl)	91,6±3,5	431,5±36,2	416,6±50,7	348,0±26,1	86,1±6,8
P Değeri	AD	AD	AD	0,001	AD

AD: Anlamlı değil; p>0,05

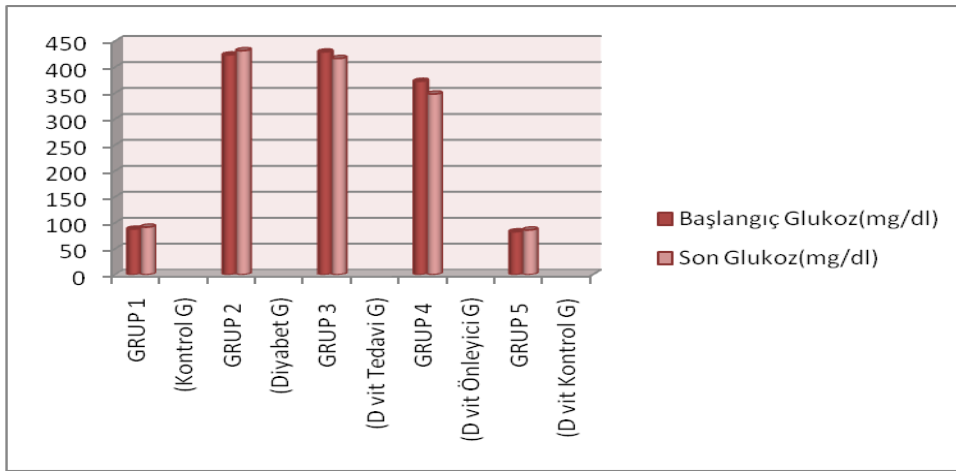
Tablo 7’de görüldüğü gibi kontrol ve D vitamini kontrol grubunda (grup 1, grup 5) çalışmanın sonunda glukoz seviyeleri değişmezken; D vitamini tedavisi almayan diyabet grubunda (grup 2) glukoz seviyesi istatistikî açıdan önemli olmayacak şekilde artmıştır. D vitamini verilen gruplarda (grup 3, grup 4) ise glukoz seviyesi azalmıştır. Fakat bunlardan, D vitamini diyabet oluşturulduktan sonra başlanan tedavi grubundaki (grup 3) glukoz düşüşü istatistikî açıdan anlamlı değil iken, D vitamini diyabet oluşturulmadan önce başlanan sonra da devam edilen önleyici gruptaki (grup 4) düşüş ise istatistikî açıdan anlamlıdır.

Tablo 8: Grupların başlangıç ve son kilolarının grup içi istatistiksel karşılaştırılması

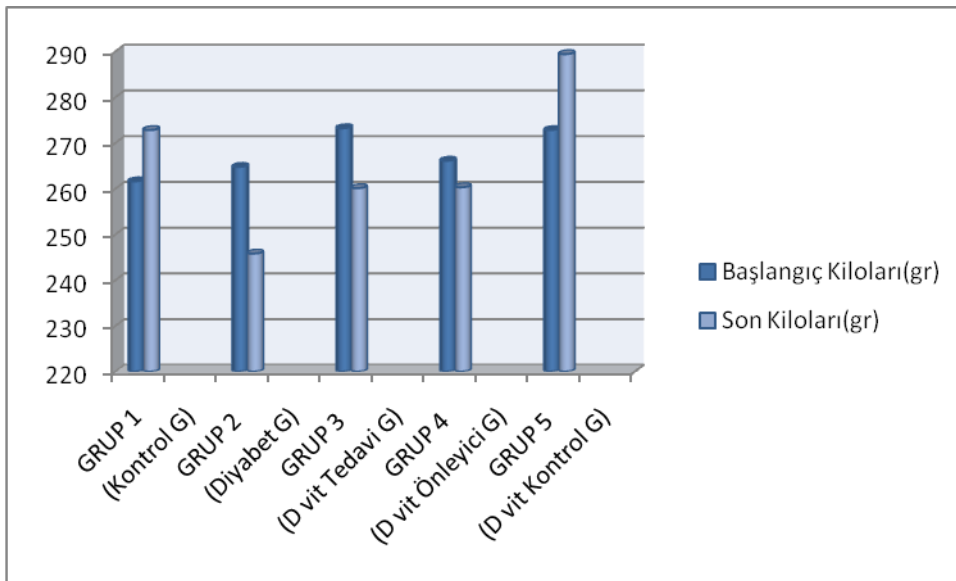
Parametreler	GRUP 1 (Kontrol G)	GRUP 2 (Diyabet G)	GRUP 3 (Diyabet+Tedavi)	GRUP 4 (Diyabet+Önleyici)	GRUP 5 (D vit Kontrol)
	n =10	n=8	n=9	n=9	n=10
Başlangıç Kiloları (gr)	261,6±12,7	264,7±33,5	273,2±16,4	266,1±23,3	272,8±23,8
Son Kiloları(gr)	272,8±11,9	245,8±34,8	260,1±18,9	260,3±27,3	289,4±25,3
P Değeri	0,001	0,001	0,002	AD	0,001

AD: Anlamlı değil; p>0,05

Tablo 8’de görüldüğü gibi kontrol ve D vitamini kontrol grubunda (grup 1, grup 5) çalışmanın sonunda istatistikî açıdan anlamlı derecede ağırlık artışı olurken; her üç diyabet grubunda (grup 2, grup 3, grup 4) ağırlık azalması olmuştur. Bunlardan D vitamini almayan diyabet grubu (grup 2) ve D vitamini diyabet oluşturulduktan sonra başlanan tedavi grubundaki (grup 3) ağırlık azalmaları istatistikî açıdan anlamlı iken; D vitamini diyabetten önce başlanan önleyici gruptaki (grup 4) ağırlık azalması ise istatistikî açıdan anlamlı değildir. Gruplara ait başlangıç ve son glukozlarının medyan değerlerinin histogramı Şekil 18’ de, başlangıç ve son kilolarının medyan değerlerinin histogramı ise Şekil 19’da verilmiştir.



Şekil 18: Gruplara ait başlangıç ve son glukozlarının medyan değerlerinin histogramı



Şekil 19: Gruplara ait başlangıç ve son kiloların medyan değerlerinin histogramı

Grupların TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerine ait bulguların ortalama $\pm$ standart sapma değerleri Tablo 9’ da, istatistikî karşılaştırmaları ise Tablo 10’ da verilmiştir.

Tablo 9: Gruplara ait TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerinin ortalama $\pm$ standart sapma değerleri

Parametreler	GRUP 1 (Kontrol)	GRUP 2 (Diyabet G)	GRUP 3 (Diyabet+Tedavi)	GRUP 4 (Diyabet+Önleyici)	GRUP 5 (D vit Kontrol)
	n=10	n=8	n=9	n=9	n=10
TAS (mmol Trolox Equiv./L)	2,25 $\pm$ 0,15	2,17 $\pm$ 0,11	2,21 $\pm$ 0,12	2,31 $\pm$ 0,17	2,29 $\pm$ 0,20
TOS (μ mol H2O2 Equiv./L)	17,66 $\pm$ 1,74	18,71 $\pm$ 1,86	18,49 $\pm$ 2,51	18,00 $\pm$ 1,14	17,70 $\pm$ 3,79
PON (U/L)	184,1 $\pm$ 58,6	136,5 $\pm$ 33,09	163,4 $\pm$ 37,0	170,6 $\pm$ 22,1	186,3 $\pm$ 33,3
IP-10 (pg/ml)	3532,5 $\pm$ 751,1	5505,1 $\pm$ 1475,0	4796,9 $\pm$ 421,9	3679,0 $\pm$ 612,2	3455,87 $\pm$ 586,2

Tablo 10: Grupların TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerinin istatistiksel karşılaştırılması

Gruplar	TAS (mmol Trolox Equi- valent/L)	TOS (μ mol H2O2 Equi- valent/L)	PON (U/L)	IP-10 (pg/ml)
1-2-3-4-5	P=0,413	P=0,853	P=0,079	P=0,001
1-2	AD	AD	AD	P=0,001
1-3	AD	AD	AD	P=0,015
1-4	AD	AD	AD	AD
1-5	AD	AD	AD	AD
2-3	AD	AD	AD	AD
2-4	AD	AD	AD	P=0,001
2-5	AD	AD	AD	P=0,001
3-4	AD	AD	AD	P=0,047
3-5	AD	AD	AD	P=0,008
4-5	AD	AD	AD	AD

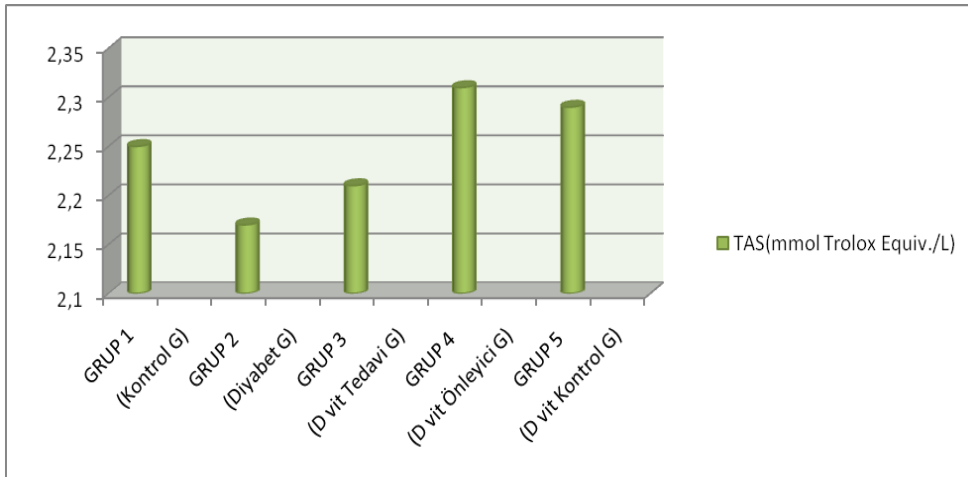
AD: Anlamlı değil; p>0,05

Tablo 9 ve Tablo 10’da görüldüğü gibi; diyabet gruplarında (grup2, grup 3, grup 4) TOS değerleri, kontrol gruplarına (grup 1, grup 5) göre artmıştır. TAS değerleri ise; diyabet grubu (grup2) ve diyabet+tedavi grubunda (grup 3) kontrol gruplarına göre düşük, diyabet+ önleyici grupta(grup 4) ise kontrol gruplarına göre yüksektir. Fakat gruplardaki tüm bu değişiklikler istatistikî açıdan anlamlı değildir.

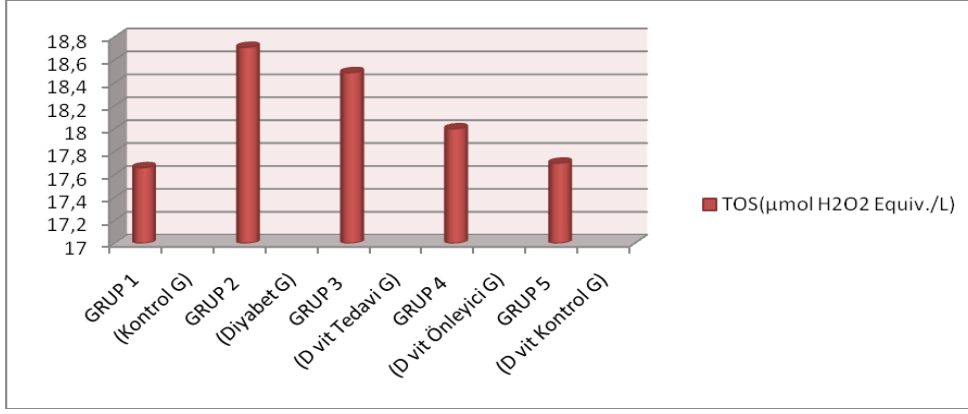
Tablo 9 ve Tablo 10’da görüldüğü gibi PON seviyeleri, diyabet grubunda (grup 2) en yüksek olmak üzere; diğer diyabet gruplarında da (grup 3, grup 4) kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı olmayacak derecede düşüktür. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında ise; D vitamini alan diyabet gruplarında (grup3, grup 4) , D vitamini almayan diyabet grubuna (grup 2) göre PON seviyeleri istatistikî açıdan anlamlı olmayacak derecede artmıştır.

IP-10 seviyeleri diyabet grubunda (grup 2) ve diyabet+tedavi grubunda (grup 3) kontrol gruplarına (grup1, grup 5) göre istatistikî açıdan anlamlı derecede artmıştır. Diyabet+önleyici grupta (grup 4) ise Ip-10 seviyesi kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı farklılık göstermemektedir. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında ise; D vitamini verilen grupların (grup 3, grup 4) IP-10 seviyeleri, D vitamini verilmeyen diyabet grubuna (grup 2) göre düşmüştür. Fakat D vitamini tedavi grubundaki (grup 3) düşüş istatistikî açıdan anlamlı değilken; D vitamini önleyici gruptaki (grup 2) düşüş istatistikî açıdan anlamlıdır.

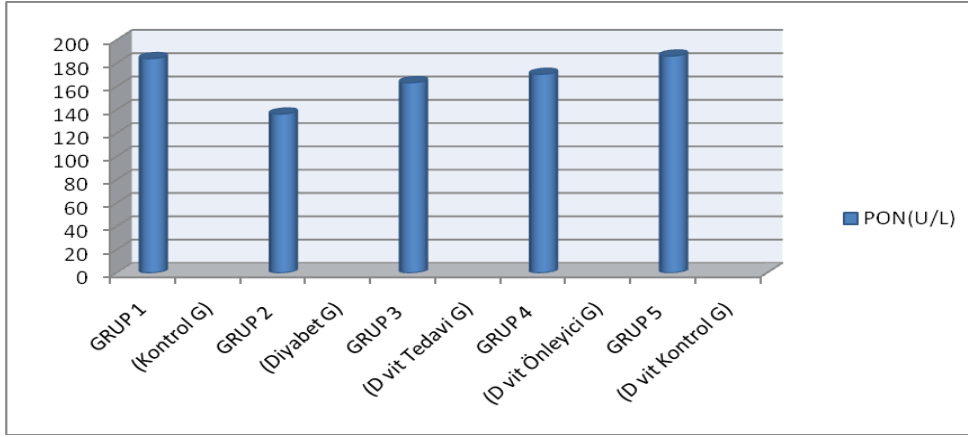
Grupların TAS, TOS, PON, IP-10 parametrelerine ait medyan değerlerinin histogramı sırasıyla Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22 ve Şekil 23’de gösterilmektedir.



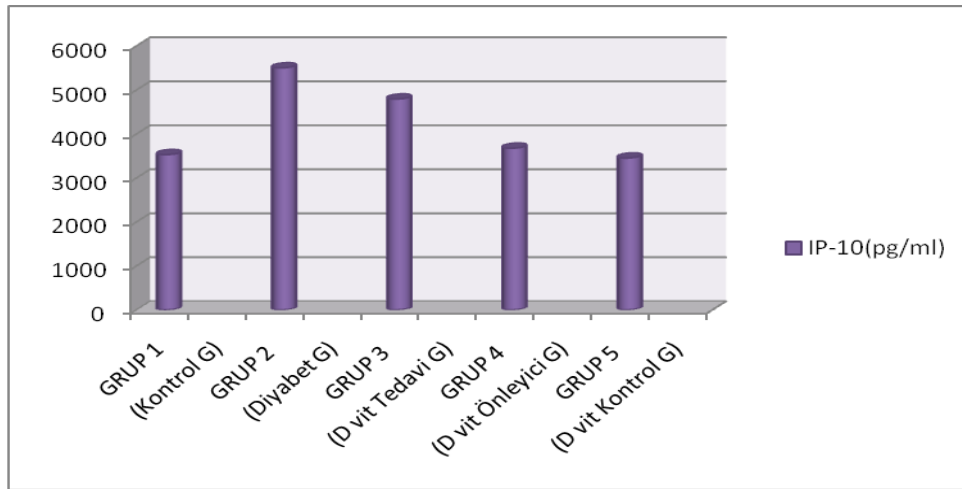
Şekil 20: Gruplara ait TAS medyan değerlerinin histogramı



Şekil 21: Gruplara ait TOS medyan değerlerinin histogramı



Şekil 22: Gruplara ait PON medyan değerlerinin histogramı



Şekil 23: Gruplara ait IP-10 medyan değerlerinin histogramı

5. TARTIŞMA

5.1. Glukoz ve Kilo Parametrelerinin Tartışılması

Diyabet, ciddi morbidite ve artmış mortalite ile ilişkili kronik bir hastalıktır. Gerek hayvan gerek insan çalışmaları D vitamini eksikliğinin diyabet için önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir. Çevresel ve genetik benzer faktörlerin Tip 1 diyabet ve D vitamini eksikliğinin etyolojisinde beraber rol oynaması bu ilişkiyi güçlendirmektedir. Her iki hastalığın da, sıklıkla sonbahar ve kış aylarında tanı alması ve coğrafi olarak ekvatordan uzak enlemlerde görülmesi, her iki hastalıkta benzer çevresel faktörlerin rol oynadığını düşündürmektedir (21).

Tip 1 diyabet, pankreas beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu mutlak insülin eksikliğine bağlıken; tip 2 diyabet pankreas beta hücrelerinin fonksiyon bozukluğu, insülin rezistansı ve sistemik inflamasyonla karakterizedir. D vitamininin tüm bu mekanizmalara yönelik etki yaptığına dair bir çok delil vardır (63,64).

Pankreasın beta hücrelerinde VDR' nin bulunması, bu hücrelerde 25(OH)D' yi 1,25-dihidroksivitamin D' ye çeviren 1- α -hidroksilaz enziminin salgılanması, insülin gen promotorunda vitamin D response elementinin varlığı ve iskelet kasında VDR varlığı, Pittas ve arkadaşlarının D vitamininin diyabet üzerindeki etkilerini açıklayan mekanizmaları olarak sayılabilir (64).

D vitamini eksikliği ile diyabet arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik pek çok popülasyon çalışması yapılmıştır. Avrupadan 7 ülkede yapılan vaka-kontrol çalışmasında yaşamın erken dönemindeki maruziyetler ve tip 1 diyabet riski araştırılmıştır 825 hasta ve 2335 kontrol grubu analiz edilmiştir. Sorular perinatal olayları ve D vitaminini de içeren beslenme alışkanlıklarını içermekteymiş. Vitamin D takviyesi alan grupta, tip 1 diyabet insidansı düşük bulunmuştur. Sonuç olarak bu geniş çaplı, farklı Avrupa ülkelerini içeren çok merkezli çalışma bebeklik döneminde D vitamini takviyesinin diyabet üzerindeki koruyucu etkisini göstermiştir (23). Women Health Study çalışmasının sonuçlarına göre günlük 511 U ve üstü D vitamini alanlarda tip 2 diyabet insidansı, günlük 159 U ve altı D vitamini alanlara göre daha düşüktür (65) . Benzer şekilde kadınlar arasında yapılan Nurses Health Study çalışmasına göre de D vitamini ve kalsiyum alma açısından en yüksek grupta bulunan (800 IU/Vit D ve 1200 mg/gün Ca) kişiler, tip 2 diyabet riski açısından en düşük riske sahiptirler (66). Erkekler arasında yapılan Mini-Finland Health Survey cohort çalışmasında ise D vitamini seviyesi yüksek olan bireylerin düşük diyabet riskine sahip oldukları bildirilmiştir (67).

Biz bu çalışmamızda D vitamininin diyabet üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisini oksidatif stres ve immunité aracılığıyla incelemeye çalıştık. 50 mg/kg dozunda streptozotosin ile oluşturduğumuz tip 1 diyabet modelinde ve 5 grup olarak düzenlediğimiz çalışmada glukoz, TAS, TOS, paraoxonaz ve IP-10 düzeylerini ölçtük.

D vitaminin diyabette glukoz düzeyine etkisini araştıran çalışmalarda verilen D vitaminin türü ($1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ veya 25-hidroksivitamin D3), veriliş şekli (oral veya intraperitoneal), veriliş dozu ve veriliş süresi gibi nedenlerden dolayı literatürde farklı sonuçlar vardır (68-71) Biz, D vitaminin $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ şeklini 12,5 mikrogram/kg dozunda oral gavaj yoluyla verdik. D vitaminin önleyici etkisini araştırdığımız gruba (grup 4) diyabet oluşturmadan 14 gün önce başlayıp, sonrasında da 14 gün devam ederek toplamda 28 gün boyunca; D vitaminin tedavi etkisini araştırdığımız gruba (grup 3) ise diyabet oluşturduktan sonra 14 gün boyunca verdik. Streptozotosin verildikten sonra 5. günde diyabet tanısını koymak için baktığımız glukoz değerini, diyabetten önce D vitaminini başladığımız grupta (grup 4) diğer diyabet gruplarına göre (grup 2, grup 3) anlamlı derecede düşük bulduk. Diyabet tanısını koyduktan sonraki 14 günlük D vitamini takviyesinin ise; önleyici grupta (grup 4) glukoz seviyesini anlamlı derecede düşürdüğünü, tedavi grubunda (grup 3) ise glukoz seviyesinde düşme olmasına rağmen; istatistikî açıdan bunun anlamlı olmadığını bulduk.

Literatürde yöntem, doz ve süre açısından bizimkiyle aynı olan herhangi bir çalışmaya rastlamadık. Fakat doz ve süre açısından bizimkiyle uyumlu olan, fakat yöntem olarak tip 2 diyabet modeli oluşturularak yapılan ve sadece tedavi etkisinin değerlendirildiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışma Santos ve ark.'nın (68) spontan hipertansif (SHR) ve Wistar ratlarda D vitaminin glisemik yanıt üzerine etkisini araştırdıkları çalışmadır. Bu çalışmada hiperkalorik ve hiperlipidemik (490 kcal/100 g) diyetle 2 hafta boyunca obeziteye indüklenen ratlara bu diyetin ikinci haftasında SHR ratlara 40 mg/kg, Wistar ratlara ise 20 mg/kg dozunda STZ enjeksiyonu yapılmıştır. Bu şekilde diyabet oluşturulan ratlara 12,5 mikrogram/kg dozunda kolekalsiferol 14 gün boyunca oral yoldan verilmiştir. SHR ratlardaki kolekalsiferol desteği, tüm ratlarda glukoz üzerine etki gösterememiştir.. Ratlardan %40'ında tedaviye yanıt alınırken; geri kalan ratların glukoz seviyelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Wistar ratların tümünde ise glukoz konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görülmüştür. TNF- α gibi adipositokinlerin indüklediği hiperglisemi ve insülin rezistansının beta hücre fonksiyonuna neden olduğu ve bunun gliko-lipo-toksisite olarak adlandırılabilceği ve D vitamininin bu mekanizmada etkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Tedavi etkisi açısından değerlendirdiğimizde, bu çalışmada wistar ratlara 20

mg/kg dozunda verilen streptozotosine karşılık; bizim 50 mg/kg dozunda verdiğimiz streptozotosin sonucu çok daha fazla harap olan adacık hücrelerinin azalan insülin rezervleri sonucunda çok daha yüksek glukoz değerleri üzerine aynı 12,5 mikrogram/kg D vitamini dozunun eksik kalmış olabileceği kanaatindeyiz. Önleyici grupta tedavi grubunun glukozuna kıyasla diyabet tanısı koyduran başlangıç glukoz değerlerinin daha düşük olması (önleyici grup glukoz ort: 372,5 mg/dl, tedavi grubu glukoz ort: 429,0 mg/dl) ve önleyici gruptaki ratların tedavi grubuna göre toplamda daha uzun süre D vitamini almış olmaları, 12,5 mikrogram/kg D vitamini dozunun bu grup için etkili oluşunu açıklamaktadır.

Çalışma grupları açısından bizim çalışmamıza benzer 5 grup şeklinde düzenlenen, fakat verilen D vitamininin dozu ve süresiyle bizden farklı olan çalışma Hamden ve ark.'nın (69) yapmış oldukları çalışmadır. Bu çalışmada alloxanla oluşturulan diyabet modelinde $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$, 5000 IU/kg/gün dozunda oral yoldan 2 ay boyunca verilmiştir. D vitamini verilen diyabetik gruplarda insülin seviyesinin yükseldiği, glukoz seviyesinin ise D vitamini verilmeyen diyabetik gruba göre düştüğü görülmüştür. Önleyici gruptaki glukoz seviyesindeki iyileşme, tedavi grubuna göre bizimkini destekler şekilde daha iyidir.

Literatürde glukoz seviyelerinde anlamlı iyileşme bulunamayan çeşitli çalışmalar da bulunmaktadır. Örneğin, Noyan ve ark.'nın (70) streptozotosin ile oluşturdukları tip 1 diyabet modelinde, glukoz düzeyi üzerine tek başına insülin verilmesine karşılık, kombinasyon tedavisinin (D vitamini ve insülin) üstün olup olmadığını araştırdıkları çalışmada D vitamini 25-hidroksivitamin D3 formunda 1 mg/kg/gün dozunda peroral yoldan 1 ay süreyle verilmiştir. Kombinasyon tedavisi alan ratların glukoz seviyelerinde sadece insülin alan ratlarına göre anlamlı bir düşüş bulunamamıştır..

Literatürde, D vitaminin diyabet üzerindeki etkilerini genomik düzeyde gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, Calle ve ark.'nın (71) 65 mg/kg dozunda streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların böbrek, karaciğer ve yağ dokularında D vitaminin insülin reseptör gen ekspresyonu, insülin reseptör sayısı ve insülin aktivitesi üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada 150 IU/kg (3,75 mikrogram/kg) dozunda $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitamini 15 gün boyunca intraperitoneal yolla verilmiştir. Çalışmanın sonunda D vitamininin diyabetik ratların glukoz değerlerinde anlamlı iyileşme sağlamadığı görülmüş, fakat D vitamini alan diyabetik grubun Ca ve P değerlerinde artış olmuş ve kalsiyumun insülin sekresyonundaki öneminden dolayı glukoz intoleransının düzeltilmesinde katkısı olabileceği düşünülmüştür. D vitamini ketonüri ve glukozüri üzerine etkili olmamış fakat lökositüriyi azaltıcı etkisi görülmüştür. Bunun, D vitaminin antienflamatuar ve antiproliferatif etkisinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. Genomik düzeyde ise D vitamininin, karaciğer ve

yağ dokusunda RNA düzeyindeki insülin reseptör ekspresyonunu düzenlediği ve bunun diyabette iyileşme sağlayabileceği bulunmuştur. Ayrıca D vitamininin diyabetik ratların yağ dokularındaki insülin cevabını iyileştirdiği gözlenmiştir. D vitamininin tüm bu genomik etkilerinin muhtemelen insülin reseptör geninin direkt transkripsiyonel aktivitesine etki ederek sağladığı sonucuna varılmıştır.

Literatürden de görüldüğü üzere; D vitamininin diyabette glukoz üzerine olan etkisinde; verilen vitamin formunun, dozunun ve veriliş süresinin standardize olmadığı görülmektedir. Kısa süreli çalışmalarda tedavi etkisini gözlemlemenin zor olduğu, hem doz hem de süre açısından bu konunun standardize edilmesi gerektiği kanaatindeyiz.

Kilo üzerine etkilerine baktığımızda ise; çalışmamızda gruplar arasında başlangıç kiloları açısından istatistikî açıdan anlamlı fark yoktu. Çalışmanın bitiminde kaydedilen son kilolar açısından ise diyabet grubunun (grup 2) kilosu, D vit kontrol grubu (grup 5) e göre istatistikî açıdan anlamlı azalmıştı. D vitamini alan diyabet gruplarının (grup 3 ve grup 4) kiloları açısından ise kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı fark yoktu. Literatür bulguları kilo konusundaki iyileşme konusunda bizi desteklemektedir (69,71). Örneğin; bizim çalışmamıza benzer 5 grup şeklinde düzenlenen Hamden ve ark.'nın (69) yapmış oldukları çalışmada, 5000 IU/kg/gün dozunda oral yoldan 2 ay süre boyunca verilen $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün önleyici grupta daha fazla olmak üzere tedavi grubunda da kiloda iyileşme sağladığı görülmüştür.

Calle ve ark.'nın (71) 150 IU/kg (3,75 mikrogram/kg) dozunda $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ vitaminini 15 gün boyunca intraperitoneal yolla verdikleri çalışmanın sonunda D vitamini alan diyabetik ratların kilolarında, almayan diyabetik gruba göre iyileşme görülmüştür.

5.3. Oksidatif Stres Parametrelerinin Tartışması

Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etyolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir. Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (27).

Biz çalışmamızda oksidatif stres durumunu diyabetin oluşumundan 14 gün sonra TAS ve TOS parametrelerini ölçerek değerlendirdik. Diyabet gruplarında (grup2, grup 3, grup 4) TOS değerlerini, kontrol gruplarına (grup 1, grup 5) göre artmış bulduk. TAS değerlerini ise; diyabet grubu (grup2) ve diyabet+tedavi grubunda (grup 3) kontrol gruplarına göre düşük, diyabet+ önleyici grupta ise kontrol gruplarına göre yüksek bulduk. Fakat gruptaki tüm bu değişiklikler istatistikî açıdan anlamlı değildi. Literatürde bizi destekler şekilde diyabetin süresine ve komplikasyon gelişip gelişmemesine bağlı olarak çeşitlilik arz eden oksidatif stres bulguları vardır. (72-75)

Aslan ve ark.'nın (72) nefropatisi olan diyabetik hastaların TAS ve TOS düzeylerini, nefropatisi olmayan diyabetik hastalarla ve kontrol grubuna göre karşılaştırdıkları ve mikroalbuminüri seviyesi ile korelasyonunu inceledikleri çalışmada, nefropatisi olan diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre TOS yüksekken; TAS düşük bulunmuştur.. Nefropatisi olmayan diyabetik hastalarda ise TOS ve TAS düzeyleri bizim sonuçlarımızı destekler şekilde kontrol grubundan farklı bulunmamıştır Nefropatisi olan diyabetik hastaların TOS seviyeleri nefropatisi olmayan diyabetik gruba göre anlamlı yüksekken; TAS seviyeleri bakımından iki grup arasında anlamlı fark bulunamamıştır. TOS ve TAS düzeyleri ile mikroalbuminüri seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır..

Whiting ve ark.'nın (73) oksidatif stres düzeyinin diyabet süresi ile ilişkisini araştırdıkları çalışmada, diyabetik hastalar 2 yıldan daha az süredir diyabeti olanlar ve 6-8 yıldır diyabeti olanlar olarak ikiye ayrılmıştır. Oksidatif stres düzeyini gösteren idrar TBARS düzeyleri, kronik hiperglisemisi olan grupta daha yüksek olmak üzere her iki diyabet grubunda da kontrole göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Uzun süredir diyabeti olan grupta idrar TBARS düzeyleri ile HbA1c düzeyleri arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Total antioksidan düzeyleri açısından ise; 2 yıldan daha az süredir diyabeti olanlarla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Uzun süredir diyabeti olan grubun TAS düzeyleri ise kısa süreli diyabeti olan gruba ve kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük bulunmuştur.

Willems ve ark.'nın (74) iyi kontrollü tip 1 diyabetik hastalarda yaptıkları çalışmada ortalama diyabet süresi 5 yıl olan tip 1 diyabetik hastalar çalışmaya alınmıştır. TAS, vitamin A ve vitamin E düzeyleri ölçülmüştür. TAS, vitamin A ve vitamin E düzeyleri kontrol grubuna göre farklı bulunmamıştır.

Valabhji ve ark.'nın (75) retinopati, nöropati, mikroalbuminüri, koroner arter hastalığı gibi diyabetin komplikasyonlarına sahip ve ortalama diyabet süreleri 19 yıl olan tip 1 diyabetik hastalarda yaptıkları çalışmada TAS düzeyleri kontrol grubuna göre düşük

bulunmuştur ve TAS seviyesi HbA1c düzeyiyle ters; diyabetin süresi ile doğru orantılı bulunmuştur.

D vitaminin diyabette oksidatif stres üzerine etkisini araştıran çalışmalarda ise D vitaminin dozu, veriliş süresi, çalışılan parametre ve dokuya göre çeşitlilik arz eden sonuçlar elde edilmiştir.

Noyan ve ark.'nın (70) streptozotosin ile diyabet yapılan ratlarda oksidatif stres üzerine tek başına insülin verilmesine karşı, kombinasyon tedavisinin (D vitamini ve insülin) üstün olup olmadığını araştırdıkları çalışmada bir gruba sadece insülin verilirken; diğer gruba ise insüline ilaveten D vitamini de vermiştir. Ratların kalp, karaciğer ve böbrek dokularında oksidatif marker olarak lipid peroksidasyon ürünü tiyobarbitürik asit ile reaksiyon veren ürünler ölçülürken; antioksidan düzey ise GSH-Px, SOD, ve katalaz aktivitesi ile değerlendirilmiştir. İnsülin 3 IU/gün dozunda subkutan, D vitamini ise 25-hidroksivitamin D3 formunda 1 mg/kg/gün dozunda peroral verilmiştir. 1 ay süren çalışmanın sonunda diyabet yapılan her iki grupta da TBARS düzeyi her üç dokuda da kontrol grubuna göre yüksekken; böbrek MDA seviyesi kombinasyon tedavisi alan grupta sadece insülin verilen gruba göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Kalp dokusundaki SOD ve katalaz düzeyleri ise sadece insülin alan grupta kombinasyon tedavisi alan gruba ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. GSH-Px aktivitesi açısından gruplar arasında fark bulamamışlardır. 25-hidroksivitamin D3 ve insülininden oluşan kombine tedavinin diyabetik karaciğer ve böbrek dokusunda sadece insüline göre daha etkili olmadığı sonucuna varmışlardır..

Çetinkalp ve ark.'nın (76) streptozotosin ile oluşturdukları diyabet modelinde 0,5 mikrogr/kg dozunda 1α , 25(OH)₂D3 ratların içme suyuna eklenerek 1,5 ay boyunca verilmiştir. Diyabetik ketosidozdan kaynaklanan ölümleri önlemek için sabah-akşam insülin de subkutan yolla verilmiştir. Eritrosit SOD aktivitesi gruplar arasında çalışmanın sonunda başlangıca göre farklı bulunamamıştır. Eritrosit katalaz aktivitesi ise D vitamini verilmeyen diyabetik grupta başlangıca göre farklı bulunmuştut. İnsülinitis seviyeleri bakımından ise D vitamini almayan diyabetik grupta maximum insülinitis gözlenmiştir..

Hamden ve ark.'nın (69) 1α , 25(OH)₂D3'ü 5000 IU/kg/gün dozunda oral yoldan 2 ay süre boyunca vermiş oldukları çalışmada D vitamini verilen diyabetik gruplarda SOD, CAT ve GSH-PX aktiviteleri, D vitamini verilmeyen diyabetik gruba göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ve diyabet oluşturulmadan önce D vitamini başlanan grupta her 3 antioksidan enzim seviyesi, diyabet oluşturulduktan sonra D vitamini başlanan gruba göre daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak; D vitamininin diyabette oksidatif stres üzerine etkisini izlemede 14 günlük bir diyabet süresinin yetersiz olduğu kanaatindeyiz.

5.4. Paraoksonaz Parametresinin Tartışması

Paraoksonaz; gerek HDL'nin aterosklerozdan koruyucu etkisine katkıda bulunarak, gerekse lipoprotein peroksidasyonunu ve LDL kolesterolün oksidasyonunu önleyerek, aterosklerotik süreçte koruyucu bir role sahip olduğu düşünülen antioksidan bir enzimdir (35-37). Önceleri organofosfat bileşiklerini hidrolize etme özelliği nedeniyle toksikolojide üzerinde çalışılan PON, son yıllarda HDL ile olan ilişkisi ve antioksidan özelliğiyle dikkatleri üzerine çekmiştir.

Çalışmamızda diyabet oluşturduktan 14 gün sonra ölçtüğümüz paraoksonaz aktivitelerini D vitamini almayan diyabet grubunda (grup 2) en düşük olmak üzere; diğer diyabet gruplarında da (grup 3, grup 4) kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı olmayacak derecede düşük bulduk. Grupların kendi aralarında karşılaştırmasında ise; D vitamini alan diyabet gruplarında (grup3, grup 4) , D vitamini almayan diyabet grubuna (grup 2) göre PON seviyelerini istatistikî açıdan anlamlı olmayacak derecede artmış bulduk.

Literatürde diyabette paraoksonaz aktivitesini değerlendiren pek çok insan çalışması varken; hayvan çalışması kısıtlı sayıdadır. Bunlardan Patel ve ark.'nın (77) streptozotosin ile oluşturdukları diyabet modelinde, paraoksonazın zamanla azaldığı ve 6 ayın sonunda kontrol grubuna göre ancak %36 düştüğü bulunmuştur. Kıyıcı ve ark.'nın (78) yapmış oldukları çalışmada ise 1,5 ay sonunda diyabetik ratların paraoksonaz seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Diyabette paraoksonaz aktivitesindeki azalma, genellikle glikasyon ve oksidatif inaktivasyonla açıklanmaktadır (79-82). Çalışmamızda 14 günlük sürenin oksidatif stres düzeyini değiştirememiş olması, beraberinde oksidatif inaktivasyonla aktivitesi değişen paraoksonaz aktivitesinde anlamlı olmayan bir azalışı da açıklamış olur.

Literatürde D vitamininin diyabette paraoksonaz üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma yoktur. Çalışmamız bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Bilindiği üzere; paraoksonaz enziminin aktivitesi için kalsiyum iyonu gereklidir. Kalsiyumun iki önemli fonksiyonu vardır. Bunlardan ilki; katalitik bölgenin stabilizasyonu, ikincisi ise paraoksonun P=O bağıını polarize ederek fosforun nükleofilik saldırıya yatkınlığını sağlayarak dietilfosfatın aktif alandan ayrılmasını kolaylaştırmasıdır. (35,38,43) Bundan dolayı; paraoksonaz

aktivitesi ve D vitamini ilişkisinin üzerinde durulması gereken bir konu olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde paraoksonaz enzim aktivitesinin değerlendirildiği insan çalışmaları ise aşağıda özetlenmiştir.

Paraoksonaz enzim aktivitesinin; miyokard enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, ve kronik renal bozukluklarda azaldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (83-86). Literatürde paraoksonaz ve diyabet ilişkisini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Çalışmalarda HDL- ilişkili PON1 enzim aktivitesi tip1 diyabetlilerde (87-89) ve tip 2 diyabetlilerde (88,90-92) düşük bulunmuştur.

Ayrıca literatürde paraoksonaz düzeyini hem tip 1 hem de tip 2 diyabetiklerde ölçen , paraoksonaz ile HDL, inflamasyon ve ateroskleroz ilişkisini inceleyen çalışmalar da vardır. Mackness ve ark.'nın (93) paraoksonaz, CRP ve ateroskleroz ilişkisini araştırdıkları çalışmada Tip 1 diyabetli, Tip 2 diyabetli, diyabeti olmayan koroner kalp hastaları ve kontrol grubu çalışmaya dahil edilmiştir. Paraoksonaz aktivitesi şu şekilde bulunmuştur: Kontrol> Tip 1 DM> Tip 2 DM> diyabetik olmayan koroner kalp hastaları. CRP düzeyleri ise sırasıyla şu şekilde bulunmuştur: Kontrol< Tip 1 DM< Tip 2 DM< diyabetik olmayan koroner kalp hastaları. İnflamasyon ve ateroskleroz gelişimi arasındaki bağlantıyı destekler şekilde yüksek CRP düzeylerinin düşük paraoksonaz aktivitesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Ferretti ve ark.'nın (94) Tip 1 diyabetik hastalarda HDL'nin antioksidan rolünü ve HDL-Paraoksonaz aktivitesini araştırmak için yaptıkları çalışmada ise Tip 1 diyabetik hastalarda kontrollere göre HDL-Paraoksonaz aktivitesi düşük bulunurken; lipid hidroperoksitleri yüksek bulunmuştur. Tip 1 diyabetik hastalardaki HDL'nin, kontrollere göre eritrosit membranlarını oksidatif hasara karşı daha az koruduğu gözlenmiştir. HDL'nin eritrosit membranlarını koruyabilme yeteneğinin paraoksonaz aktivitesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır. Diyabeti olan hastalarda azalmış paraoksonaz aktivitesinin ve düşük HDL düzeylerinin tip 1 diyabetteki aterosklerozun ilerlemesi ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda D vitamini alan gruplarda, tedavi almayan diyabetik gruba göre 14 gün içinde anlamlı olmayan bir artış bulduk ve bu konunun daha uzun süreli çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği fikrindeyiz.

5.4. IP-10 Parametresinin Tartışması

Son yıllarda D vitamininin kalsiyum metabolizması haricindeki rollerinin anlaşılmasından sonra immunité ve otoimmun hastalıklar üzerindeki etkilerine yönelik araştırmalar yoğunlaşmıştır. D vitamini reseptörünün (VDR) osteoblastların yanısıra immün sistem elemanlarında ve pankreas da dahil olmak üzere çeşitli dokularda reseptörlerinin bulunmasından sonra D vitamini otoimmun, inflamatuvar ve neoplastik birtakım hastalıklarda çalışma konusu olmuştur (18).

Çalışmalar D vitaminin Romatoid artrit, SLE, inflamatuvar bağırsak hastalıkları ve tip 1 diyabet gibi otoimmun hastalıkları önlediği ve önemli ölçüde progresyonlarını yavaşlattığını göstermektedir (18).

T lenfositlerde, makrofajlarda ve timus dokusunda önemli miktarda saptanan VDR nedeniyle D vitaminin immunité üzerinde nasıl bir rol oynadığı en çok üzerinde durulan konudur. Lenfosit popülasyonundan en çok hangi grubun VDR içerdiğine yönelik çalışma sonrasında ise CD-8 lenfositlerin en yüksek oranda VDR içerdiği gözlenmiştir. CD-4 lenfositlerin ve makrofajların da CD-8 lenfositlere nazaran daha az fakat önemli ölçüde VDR içerdiği bulunmuştur. Tüm bunlar T hücre aracılı immunitenin kontrolünde D vitamininin de etkili olduğunu göstermektedir ve otoimmun hastalıkların patogeneğinde D vitaminin rolünü açıklar (18). Literatürde D vitaminin sitokinler aracılığıyla diyabet üzerindeki etkisini araştıran çeşitli araştırmalar aşağıda sunulmuştur.

Deluca ve ark.'nın (18) D vitamininin sitokin gen ekspresyonu üzerine etkisini araştıran çalışmalarında, D vitamini verilen ratların lenf nodlarındaki lenfositlerin TGFβ-1 ve IL-4 düzeylerinde kontrol grubuna nazaran artış olurken; IFN-γ ve TNF-α düzeylerinde ise düşüş olduğu tesbit edilmiştir. D vitaminin immünsüpresan etkisini TGFβ-1 ve IL-4 aracılığıyla inflamatuvar T hücrelerini bastırarak gerçekleştirdiği sonucuna varılmıştır (18).

Gregori ve ark.'nın (25) D vitaminin immünmodülatör etkilerini araştırdıkları çalışmada NOD farelere D vitamini takviyesinin, dentritik hücre matürasyonunu engellediğini, tip 1 diyabetin gelişmesinde sorumlu olan lipopolisakkaritle indüklenen IL-12 ve interferon-γ üretimini azalttığını, T heper 1 hücre infiltrasyonunu önleyerek insülitisin ilerlemesini durdurduğunu bulmuşlardır (25).

Riachy ve ark.'nın (95) yaptıkları çalışmada pankreas adacık hücreleri izole edilmiş ve IL-1β, TNF-α ve interferon-γ dan oluşan inflamatuvar sitokinlerle D vitamini varlığında ve yokluğunda muamele edilmiştir. Metabolik aktivite, hücre canlılığı ve insülin içeriği ile, oksidatif stres düzeyi MnSOD aktivitesi, HSP-70 ve nitrit salınımı ile; inflamasyon düzeyi ise IL-6 üretimi ile değerlendirilmiştir. Sitokinlerle muameleden 48 saat sonra insülin

içeriğinde %40 oranında azalma olurken; NO ve IL-6 düzeyinde ise önemli oranda artış meydana gelmiştir. MnSOD ve HSP-70 düzeyinde ise anlamlı fark bulunamamıştır. D vitamini verilen grupta IL-6 ve nitrit salınımı azalırken ve insülin içeriğinde iyileşme olmuştur. Tüm bunlar sonucunda D vitamininin pankreas adacık hücrelerini sitotoksik T lenfositlerin etkilerine karşı dayanıklı hale getirdiğini ve D vitamininin Tip 1 diyabetin önlenmesinde ve adacık hücre naklinde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

IP-10 (Interferon gama inducible protein), CXCL10 olarak da bilinen kemotaktik bir sitokindir. Monositlerden, nötrofillerden, endotel hücrelerden, keratinositlerden, fibroblastlardan, mezenkimal hücrelerden, dentritik hücrelerden ve astrositlerden sekrete edilir (54).

IP-10 salınımını indükleyen Interferon (IFN)-gama, interleukin (IL)-1beta ve TNF-alfa ile sinerjik etki ederek inflamatuvar nitrik oksit sentetaz (iNOS) sentezini artırır, apoptozisi indükler, pankreasın adacık hücrelerinde glukozla stimüle edilmiş insülin salınımını bozar. Tüm bu etkiler tip 1 diyabetin gelişmesinde, pankreatit modellerinde ve adacık hücre naklinde önemlidir (57).

Biz çalışmamızda IP-10 seviyelerini diyabet grubunda (grup 2) ve diyabet+tedavi grubunda (grup 3) kontrol gruplarına (grup1, grup 5) göre istatistikî açıdan anlamlı olacak derecede artmış bulduk. Diyabet+önleyici grupta (grup 4) Ip-10 seviyesi ise kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan anlamlı farklılık göstermemekteydi. Ayrıca D vitamini verilen grupların (grup 3, grup 4) IP-10 seviyelerini, D vitamini verilmeyen diyabet grubuna (grup 2) göre düşük bulduk. Fakat D vitamini tedavi grubundaki (grup 3) düşüş istatistikî açıdan anlamlı değilken; D vitamini önleyici gruptaki (grup 2) düşüş istatistikî açıdan anlamlı idi. D vitamininin erken dönemde başladığında çok daha etkin olduğu ve bunu pankreas adacık hücrelerinden sitokin salınımını azaltarak gerçekleştirdiği sonucuna vardık.

Literatürde bizi destekler şekilde IP-10 seviyesinin tip 1 diyabetliklerde arttığına ve pankreaslarında gösterildiğine dair buluşlar vardır. Örneğin; Xin ve ark.'nın (59) Tip 1 diyabet tanılı hastalarda serum IP-10 düzeyini araştırdıkları çalışmada IP-10 seviyeleri diyabetik grupta kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca IP-10 seviyeleri yeni tanı alan diyabetik hastalarda, 2 yıldan fazla süredir hastalığı olanlara göre daha yüksek ölçülmüştür (59).

Li ve ark.'nın (56) IP-10' un fare pankreasından salınımını ve tip 1 diyabet patogenezindeki rolünü araştırmak için yaptıkları çalışmada, pankreas adacık hücrelerinde IP-10 yerleşimini göstermede immünelektron mikroskopundan faydalanılmıştır. NOD

farelerin tümünde pankreas adacıkları pozitif boyanmıştır. Fare 4 haftalıkken insülinitis tesbit edilmiştir. İmmun elektron mikroskobu sayesinde IP-10' un pankreas adacık hücrelerinin stoplazmalarında depolandığını görülmüştür. IP-10' un pankreas hücrelerine immün elemanların saldırısına neden olarak tip 1 diyabetin patogenezinde rol oynayabileceği sonucuna varılmıştır.

Literatürde D vitaminin IP-10 aracılığıyla diyabet üzerindeki etkisini gösteren sadece bir çalışmaya rastladık.

Gysemans ve ark.'nın (96) D vitaminin beta hücre gen ekspresyonunda ve beta hücre ölümünde rolünü araştırdıkları çalışmada NOD farelere 1,25(OH)D₃ 5 microgr/kg dozunda 2 günde bir verilmiştir. Adacık hücrelerinde IP-10 ve IL-15 düzeyinde azalma ve bunla bağlantılı olarak insülinitiste de azalma tesbit edilmiştir. D vitamini aracılı kemokin salınımının inhibisyonunun , diyabet insidansını düşürdüğü bulunmuştur. D vitamini, ratlar 3-14 haftalıkken başlandığında diyabet insidansı %30'dan fazla düşerken; geç dönemde 14 haftadan sonra ve insülinitis çoktan başlamışken verildiğinde ise diyabeti önleme konusunda başarısız olduğu bulunmuştur..

Sonuç olarak; D vitamininin diyabet üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisini incelemeye çalıştığımız bu çalışmamızın sonucunda; diyabetten önce koruyucu amaçlı başlanan D vitaminin, glukoz seviyesi üzerine iyileştirici etki yaptığını, D vitamininin erken dönemde başlandığında çok daha etkin olduğunu ve bunu pankreas adacık hücrelerinden sitokin salınımını azaltarak gerçekleştirdiği fikrindeyiz..

6.ÖZET

Streptozotosinle Oluşturulmuş Diyabette D Vitamininin Etkileri

Amaç: Çalışmamızın amacı streptozotosinle oluşturulmuş diyabette D vitaminin koruyucu ve tedavi edici etkilerinin gösterilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Çalışma 50 adet Wistar cinsi dişi rat üzerinde gerçekleştirildi. Ratlar 5 gruba ayrıldı. 1. Grup (Kontrol G), 2. Grup (Diyabet G), 3. Grup (Diyabet+D vitamini Tedavi G) , 4. Grup (Diyabet+D vitamini Önleyici G) ve 5.Grup (D vitamini Kontrol G). Diyabet gruplarına 50mg/kg dozunda Streptozotosin intraperitoneal yoldan verildi ve 5.günde 300mg/dl üzeri glukoz seviyeleri ile diyabet tanısı kondu. Grup 4'e D vitamini 12.5 µgr/kg dozunda diyabet tanısı konmadan 14 gün önce başlayıp, sonrasında 14 gün daha devam ederek toplamda 28 gün, grup 3'e ise diyabet tanısı konduktan sonra 14 gün boyunca oral gavaj yoluyla verildi. Çalışmanın sonunda ratlardan ketamin anestezisi altında kardiyak ponksiyonla kan örnekleri alındı. Alınan kanların serum örneklerinde IP-10 düzeyleri ELİZA tekniği ile; TAS, TOS, Paraoksonaz ve glukoz spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü.

Bulgular: Diyabet+D vitamini Önleyici grubun (grup 4), glukoz seviyeleri, diyabet grubuna (grup 2) ve Diyabet+D vitamini Tedavi grubuna (grup 3) göre anlamlı derecede düşük bulundu. TAS, TOS, Paraoksonaz aktiviteleri açısından gruplar arası anlamlı fark bulunamadı. IP-10 seviyesi diyabet (grup 2) ve Diyabet+D vitamini Tedavi (grup 3) grubunda kontrol gruplarına göre anlamlı yüksek bulunurken; Diyabet+D vitamini Önleyici (grup 4) grubun IP-10 seviyesi kontrol gruplarına göre istatistikî açıdan farklı değildi.

Sonuç: D vitamininin diyabet üzerine koruyucu ve tedavi edici etkisini incelemeye çalıştığımız bu çalışmamızın sonucunda; D vitamininin erken dönemde başladığında çok daha etkin olduğu ve bunu pankreas adacık hücrelerinden sitokin salınımını azaltarak gerçekleştirdiği düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: diyabet, D vitamini, oksidatif stres, IP-10

7. ABSTRACT

The Effect of Vitamin D3 in Streptozotocin Induced Diabetes

Aim: The aim of our study was to investigate preventive and therapeutic effects of vitamin D on streptozotocin-induced diabetes.

Materials and Methods: This study was performed on 50 Wistar female rats. The rats were separated into five groups. The groups were formed as follows: Control group (group 1), diabetes group (group 2), diabetes+ vitamin D therapeutic effect group (group 3), diabetes + vitamin D preventive effect group (group 4) and vitamin D control group (group 5). Streptozotocin was intraperitoneally administered at a dose of 50mg/body weight. Blood glucose was measured 5 days after the injection of streptozotocin. The diabetic state was confirmed when the glucose concentration exceeded 300mg/dL. Group 4 rats received 12,5µg//w/day vitamin D3 for 14 days before streptozotocin injection and for 14 days after streptozotocin injection via oral gavage. Group 3 received 12,5 µg //w/day vitamin D3 for 14 days after streptozotocin injection via oral gavage. After that period, rats were killed under ketamine anesthesia and blood samples were obtained via cardiac puncture. IP-10 was determined with ELISA technique, TAS, TOS, IP-10 and glucose levels were determined with spectrophotometric methods.

Findings: Serum glucose level was significantly lower in group 4 than group 2 and group 3. There was no significant difference between serum TAS, TOS, Paraoxonase levels of the groups. Serum Ip-10 levels were higher in group 2 and group 3 than in the control groups. But, there was no significant difference between serum IP-10 levels of group 4 and control groups.

Results: According to our study that we tried to investigate preventive and therapeutic effects of vitamin D on streptozotocin-induced diabetes we conclude that early treatment is more effective and this beneficial effect of 1,25-(OH)₂D3 is associated with decreased cytokine secretion by the pancreatic islets.

Key words: diabetes, vitamin D, oxidative stress, IP-10

KAYNAKLAR

1. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 2010 Jan;33 Suppl 1:S62-9.
2. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes--2010. Diabetes Care. 2010 Jan;33 Suppl 1:S11-61.
3. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. Diabetes Care. 2004 May;27(5):1047-53
4. King H, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. Diabetes Care. 1998 Sep;21(9):1414-31.
5. Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S ve ark. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. 2002 Sep;25(9):1551-6.
6. Abacı A, Böber E, Büyükgebiz A. Tip 1 Diyabet. Güncel Pediatri 2007; 5: 1-10
7. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C. TEMD Diabetes Mellitus Çalışma Grubu. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. 2009; 4. Baskı: Sayfa 95-115
8. Kawada J. [New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus]. Yakugaku Zasshi. 1992 Nov;112(11):773-91.
9. Bolzan, A. D, and Bianchi, M. S. (2002) Genotoxicity of streptozotocin. Mutat Res, 512, 121-134.
10. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. Am J Clin Nutr 1994; 60: 619-630.
11. Ataş A, Çakmak , Soran M. D Vitamin Metabolizması ve Rikets Hastalığı. Bakırköy Tıp Dergisi 2008;4:1-7
12. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. J Clin Invest 2006; 116: 2062-272.
13. Holick MF. Sunlight "D" ilemma: risk of skin cancer or bone disease and muscle weakness. Lancet. 2001; 357: 4-6.
14. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. Trends Biochem Sci. 2004; 29: 664-673
15. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. J J Clin Nutr 2004; 80: 1689- 96.
16. Holick MF. The Vitamin D epidemic and its health consequences. J Nutr 2005; 135: 2739- 48.
17. Holick MF. Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. South Med J 2005; 98: 1024- 7.
18. DeLuca HF, Cantorna MT. Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J 2001; 15: 2579- 85.

19. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-687.
20. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease¹⁻⁴. *Am J Clin Nutr* 2004;80(suppl):1678S– 88S
21. Luong K, Nguyen LT, Nguyen DN. The role of vitamin D in protecting type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Res Rev*. 2005 Jul-Aug;21(4):338-46.
22. Borkar VV, Verma S, Bhalla A. Low levels of vitamin D in North Indian children with newly diagnosed type 1 diabetes. *Pediatr Diabetes*. 2009 Nov 9.
23. Vitamin D supplement in early childhood and risk for Type I (insulin-dependent) diabetes mellitus. The EURODIAB Substudy 2 Study Group. *Diabetologia*. 1999 Jan;42(1):51-4. ***
24. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia*. 2005 Jul;48(7):1247-57.
25. Gregori S, Giarratana N, Smioldo S, Uskokovic M, Adorini L. A 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2002 May;51(5):1367-74.
26. Haussler MR, Haussler CA, Jurutka PW, Thompson PD, Hsieh JC, Remus LS, Selznick SH, Whitfield GK. The vitamin D hormone and its nuclear receptor: molecular actions and disease states. *Endocrinol*. 1997 Sep;154 Suppl:S57-73.
27. Nilgün A, Dinçel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 312: 51-56
28. Aksoy Y. Antioksidan mekanizmada glutatyonun rolü. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2002;22:442-448.
29. Percival M. Antioksidants. *Clin Nutr Insights*. 1998.
30. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. baskı. Konya, Mimoza Yayınları, 1-132, 1995.
31. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48:1-9.
32. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes*. 1997 Nov;46(11):1733-42.
33. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *-Diabetes*. 1998 Oct;47(10):1578-85.
34. Kajimoto Y, Kaneto H. Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Apr;1011:168-76.
35. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. *Gen Pharmacol*. 1998; 31: 329-336.

36. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 473-80.
37. Mackness MI, Mackness B, Durrington PN. Paraoxonase and coronary heart disease. *Atheroscler Suppl.* 2002; 3: 49-55.
38. La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, Standiford TJ. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact.* 1999 May 14;119-120:379-88.
39. Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? *Mol Med Today.* 1999; 5: 381-386.
40. Jaouad L, de Guise C, Berrougui H, Cloutier M, Isabelle M, Fulop T, Payette H, Khalil A. Age-related decrease in high-density lipoproteins antioxidant activity is due to an alteration in the PON1's free sulfhydryl groups. *Atherosclerosis.* 2006 Mar;185(1):191-200. Epub 2005 Jul 18.
41. van Himbergen T.M, van Tits L.J.H, Roes M, Stalenhoef A.F.H. The story of PON1: how an organophosphatehydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine. *The Netherlands Journal of Medicine.* february 2006, Vol. 64, No. 2
42. Azarsız E, Sözmen E. Paraoxonaz ve Klinik Önemi. *Türk Biyokimya Dergisi* 2000, Cilt:25, Sayı:3
43. Başkol G., Köse K. Paraoxonaz: Biyokimyasal Özellikleri, Fonksiyonları ve Klinik Önemi. *Erciyes Tıp Dergisi* 2004; 26(2): 75 – 80
44. Mackness MI. Why plasma should not be used to study paraoxonase. *Atherosclerosis* 136 (1998) 195–196
45. Billecke S, Draganov D, Counsell R, et al. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 2000;28: 1335-1342.
46. Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billecke S, Draganov D, Mira Rosenblat M. Human Serum Paraoxonases (PON1) Q and R Selectively Decrease Lipid Peroxides in Human Coronary and Carotid Atherosclerotic Lesions. *PON1 Esterase and Peroxidase-Like Activities. Circulation.* 2000;101:2510-2517.
47. Garin MC, James RW, Dussoix P, Blanché H, Passa P, Froguel P, Ruiz J. Paraoxonase polymorphism Met-Leu54 is associated with modified serum concentrations of the enzyme. A possible link between the paraoxonase gene and increased risk of cardiovascular disease in diabetes. *J Clin Invest.* 1997 Jan 1;99(1):62-6.
48. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin. Invest.* Volume 101, Number 8, April 1998, 1581–1590
49. Ng CJ, Shih DM, Susan Y, Hama SY, Villa N, Navab M, Reddy ST. The paraoxonase gene family and atherosclerosis. *Free Radical Biology & Medicine* 38 (2005) 153– 16

50. Draganov DI, Stetson PL, Wateon Ce, Billecke SS, La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3(PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000; 275: 33435-33442
51. Ayub A, Mackness MI, Arrol S, Mackness B, Patel J, Durrington PN. Serum paraoxonase after myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, 19:330-335.
52. Tuncel P, Örmən M, Şişman AR. Paraoksonazın Biyolojik Varyasyonu ve HDL-Kolesterol İle İlişkisi. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009; 7(1): 17-22
53. Costa LG, Vitalone A, Cole TB, Furlong CE. Modulation of paraoxonase (PON1) activity. *Biochemical Pharmacology* 69 (2005) 541–550
54. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmun Rev.* 2009 Mar;8(5):379-83. Epub 2008 Dec 25.
55. Tsunoda I, Lane TE, Blackett J, Fujinami RS. Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10. *Mult Scler.* 2004 Feb;10(1):26-34.
56. Li D, Zhu SW, Liu DJ, Liu GL. Expression of interferon inducible protein-10 in pancreas of mice. *World J Gastroenterol.* 2005 Aug 14;11(30):4750-2.
57. Baker MS, Chen X, Rotramel AR, Nelson JJ, Kaufman DB. Interferon regulatory factor-1 down-regulates cytokine-induced IP-10 expression in pancreatic islets. *Surgery.* 2003 Aug;134(2):134-41.
58. Shimada A, Oikawa Y, Yamada Y, Okubo Y, Narumi S. The Role of the CXCL10/CXCR3 System in Type 1 Diabetes. *Rev Diabet Stud.* 2009;6(2):81-4. Epub 2009 Aug 10.
59. Xin Y, Zhao YQ, Zhao YX, Zhang LH. [The changes of serum interferon-inducible protein-10 levels in children with type 1 diabetes mellitus] *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2007 Nov;45(11):853-5.
60. Uno S, Imagawa A, Saisho K, Okita K, Iwahashi H, Hanafusa T, Shimomura I. Expression of chemokines, CXC chemokine ligand 10 (CXCL10) and CXCR3 in the inflamed islets of patients with recent-onset autoimmune type 1 diabetes. *Endocr J.* 2010 Nov 30;57(11):991-6. Epub 2010 Oct 19.
61. Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37 (2004) 112– 119
62. Erel O A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry* 38 (2005) 1103–1111
63. Pittas AG, Hughes BD. Vitamin D and diabetes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* xxx (2010) xxx–xxx
64. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Hughes BD. REVIEW: The Role of Vitamin D and Calcium in Type 2 Diabetes. A Systematic Review and Meta-Analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 92(6):2017–2029

65. S. Liu, Y. Song, E.S. Ford, J.E. Manson, J.E. Buring, P.M. Ridker, Dietary calcium, vitamin D, and the prevalence of metabolic syndrome in middle-aged and older U.S. women, *Diab. Care* 28 (12) (2005) 2926–2932.
66. Pittas AG, Dawson-Hughes B, Li T, Van Dam RM, Willett WC, Manson JE, Hu FB. Vitamin D and calcium intake in relation to type 2 diabetes in women, *Diab. Care* 29 (3) (2006) 650–656.
67. Knekt P, Laaksonen M, Mattila C, Harkanen T, Marniemi J, Heliovaara M, Rissanen H, Montonen J, Reunanen A. Serum vitamin D and subsequent occurrence of type 2 diabetes, *Epidemiology (Cambridge, MA)* 19 (5) (2008) 666–671.
68. de Souza Santos R, Vianna LM. Effect of cholecalciferol supplementation on blood glucose in an experimental model of type 2 diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats and Wistar rats. *Clin Chim Acta*. 2005 Aug;358(1-2):146-50.
69. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, Ayadi F, Elfeki A. 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2009 Jun;55(3):215-22
70. 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*. 2005 May;5(1):31-6.
71. Calle C, Maestro B, García-Arencibia M. Genomic actions of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on insulin receptor gene expression, insulin receptor number and insulin activity in the kidney, liver and adipose tissue of streptozotocin-induced diabetic rats. *BMC Mol Biol*. 2008 Jul 18;9:65.
72. Aslan M, Sabuncu T, Kocyigit A, Celik H, Selek S. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 Dec;17(10):734-40. Epub 2007 Feb 22.
73. Whiting PH, Kalansooriya A, Holbrook I, Haddad F, Jennings PE. The relationship between chronic glycaemic control and oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Br J Biomed Sci*. 2008;65(2):71-4.
74. Willems D, Dorchy H, Dufrasne D. Serum antioxidant status and oxidized LDL in well-controlled young type 1 diabetic patients with and without subclinical complications. *Atherosclerosis*. 1998 Apr;137 Suppl:S61-4.
75. Valabhji J, McColl AJ, Richmond W, Schachter M, Rubens MB, Elkeles RS. Total antioxidant status and coronary artery calcification in type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Sep;24(9):1608-13.
76. Cetinkalp S, Delen Y, Karadeniz M, Yüce G, Yilmaz C. The effect of 1 α ,25(OH)₂D₃ vitamin over oxidative stress and biochemical parameters in rats where Type 1 diabetes is formed by streptozotocin. *J Diabetes Complications*. 2009 Nov-Dec;23(6):401-8. Epub 2008 Oct 31

77. Patel BN, Mackness MI, Harty DW, Arrol S, Boot-Handford RP, Durrington PN. Serum esterase activities and hyperlipidaemia in the streptozotocin-diabetic rat. *Biochim Biophys Acta*. 1990 Jul 20;1035(1):113-6.
78. Kiyici A, Okudan N, Gökbel H, Belviranlı M. The effect of grape seed extracts on serum paraoxonase activities in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Food*. 2010 Jun;13(3):725-8.
79. Hedrick CC, Thorpe SR, Fu MX, Harper CM, Yoo J, Kim SM, et al. Glycation impairs high-density lipoprotein function. *Diabetologia* 2000;43:312-20.
80. Ferretti G, Bacchetti T, Marchionni C, Caldarelli L, Curatola G. Effect of glycation of high density lipoproteins on their physico-chemical properties and on paraoxonase activity. *Acta Diabetol* 2001;38:163-9.
81. Aviram M, Rosenblat M, Billecke S, Erogul J, Sorenson R, Bisgaier CL, et al. Human serum paraoxonase (PON1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Radic Biol Med* 1999;26:892-904.
82. Karabina SAP, Lehner AN, Frank E, Parthasarathy S, Santanam N. Oxidative inactivation of paraoxonase. Implications in diabetes mellitus and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725:213-21.
83. Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Kluft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis*, 2000; 149: 91-7.
84. Kwiterovich PO. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 1998; 82: 13Q-21Q.
85. Mackness MI, Arool S, Mackness B, Durrington PN. Alloenzymes of paraoxonase and effectiveness of high density lipoproteins in protecting low-density lipoprotein against lipid peroxidation. *The Lancet* 1997; 349: 851-2.
86. Mackness MI, Arrol S, Abbott C, Durrington PN. The role of high-density lipoprotein and lipid soluble antioxidant vitamins in inhibiting low-density lipoprotein oxidation. *Biochem J* 1993; 294: 829-34.
87. Mackness MI, Harty D, Bhatnagar D, Winocour PH, Arrol S, Ishola M, et al. Serum paraoxonase activity in familial hypercholesterolaemia and insulin-dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1991;86:193-9.
88. Abbott CA, Mackness MI, Kumar S, Boulton AJ, Durrington PN. Serum paraoxonase activity, concentration, and phenotype distribution in diabetes mellitus and its relationship to serum lipids and lipoproteins. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1995;15:1812-8.
89. Boemi M, Leviev I, Sirolla C, Pieri C, Marra M, James RW. Serum paraoxonase is reduced in type 1 diabetic patients compared to non-diabetic, first degree relatives; influence on the ability of HDL to protect LDL from oxidation. *Atherosclerosis* 2001;155:229-35.

90. Ikeda Y, Suehiro T, Inoue M, Nakauchi Y, Morita T, Arai K, et al. Serum paraoxonase activity and its relationship to diabetic complications in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1998;47:598-602.
91. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, Turkie W, Julier K, Abuasha B, et al. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 1998;139:341-9.
92. Inoue M, Suehiro T, Nakamura T, Ikeda Y, Kumon Y, Hashimoto K. Serum arylesterase/diazoxonase activity and genetic polymorphisms in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 2000;49:1400-5.
93. Mackness B, Hine D, McElduff P, Mackness M. High C-reactive protein and low paraoxonase1 in diabetes as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis*. 2006 Jun;186(2):396-401. Epub 2005 Sep 2
94. Ferretti G, Bacchetti T, Busni D, Rabini RA, Curatola G. Protective effect of paraoxonase activity in high-density lipoproteins against erythrocyte membranes peroxidation: a comparison between healthy subjects and type 1 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2957-62.
95. Riachy R, Vandewalle B, Belaich S, Kerr-Conte J, Gmyr V, Zerimech F, d'Herbomez M, Lefebvre J, Pattou F. Beneficial effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on cytokine-treated human pancreatic islets. *J Endocrinol*. 2001 Apr;169(1):161-8.
96. Gysemans CA, Cardozo AK, Callewaert H, Giulietti A, Hulshagen L, Bouillon R, Eizirik DL, Mathieu C. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates expression of chemokines and cytokines in pancreatic islets: implications for prevention of diabetes in nonobese diabetic mice. *Endocrinology*. 2005 Apr;146(4):1956-64. Epub 2005 Jan 6.

TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU'na, tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Said Sami Erdem'e ve Anabilim Dalımızda görevli tüm hocalarıma...

Tez konumun belirlenmesinde emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Aysel Kıyıcı' ya...

İstatistik desteği için Yrd. Doç. Dr. Yasemin Durduran'a...

Mesai arkadaşlarım Dr. Sibel Döşeyici, Dr. Ekrem Erbay, Dr. Erkan Taşyürek, Dr. Çiğdem Damla Çetinkaya ve Dr. Gündüz Ayhan Erener ve Dr. Necla Özer'e...

Tez yazım düzeni konusunda yardımcı olan sekreterimiz Aysun Yılmaz' a...

Tüm Biyokimya Anabilim Dalı ve Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına...

Yardımlarından dolayı Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi çalışanlarına...

Ayrıca tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bugünlere ulaşmamda en büyük pay sahibi olan aileme teşekkürü borç bilirim.

Dr. HÜMEYRA ÇİÇEKLER

2011, KONYA