

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

**DENEYSEL DİYABETİK FARE BEYİN DOKUSUNDAKİ  
APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE D<sub>3</sub> VİTAMİNİNİN  
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Fatih KARABOĞA**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Serpil BULUT**

**ELAZIĞ  
2010**

## ONAY SAYFASI

### DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

**DEKAN**

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Bülent MÜNGEN

**Nöroloji Anabilim Dalı Başkanı**

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

Prof. Dr. Serpil BULUT

**Danışman**

**Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_  
..... \_\_\_\_\_

## TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince benden desteklerini esirgemeyen, bilgisinden ve tecrübesinden her zaman yararlandığım, Nöroloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent MÜNGEN'e, tezimin hazırlanması aşamasında destekleriyle bana her zaman yardımcı olan ve asistanlık eğitimime büyük katkı sağlayan, tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Serpil BULUT'a, asistanlık eğitimime katkılarından dolayı Nöroloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyeleri olan değerli hocalarım Doç. Dr. M. Said BERİLGİN ve Yrd. Doç. Dr. Caner Fevzi DEMİR'e, tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU'na, yine katkılarından dolayı Histoloji ve Embriyoloji öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Özlem DABAK ve Doç. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU hocalarıma, tezimin istatistik aşamasındaki katkılarından dolayı Uzm. Dr. Selçuk İLHAN'a, tezimin yazım aşamasındaki katkılarından dolayı değerli arkadaşım Dr. Ahmet KILIÇARSLAN'a, Nöroloji Anabilim dalında birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, hemşire hanımlara ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca doğduğum günden beri sevgi, şefkat ve dualarıyla her zaman yanımda olan anneme ve babama, beni kendilerinden çok düşünen kardeşlerime sonsuz saygı, sevgi ve şükranlarımı sunarım. Onlarla nice güzelliklere...

## ÖZET

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize kronik, metabolik bir hastalıktır. Uzun süreli diyabette nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif düzeyde serebral bozukluklar meydana gelmektedir. Vitamin D<sub>3</sub>, vitamin D'nin aktif metabolitidir ve değişik biyolojik olaylarda rol oynamaktadır. Son yıllarda vitamin D<sub>3</sub>'ün antioksidatif ve nöroprotektif özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada, streptozosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde vitamin D<sub>3</sub>'ün, fare beyin dokusundaki apoptotik değişiklikler üzerine koruyucu etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 21 adet  $30 \pm 7$  gr ağırlığında, 8 haftalık Balb/C türü erkek fareler kullanıldı. Tüm gruplar deney süresince standart fare yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Deney hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (Grup I) herhangi bir uygulama yapılmadı. Diğer 2 gruba 180 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0, 1 M sodyum-sitrat tamponunda (pH: 4, 5) çözdürülerek i.p olarak uygulandı. Deneysel diyabet oluştuktan sonra diyabetik grup (Grup II) belirlenip herhangi bir uygulama yapılmadı. Diyabet + vitamin D grubuna (Grup III) 12 hafta süreyle vitamin D (50 IU/kg/gün) oral yolla verildi. Deney sonunda fareler dekapite edilip beyin dokuları çıkarıldı. Histolojik çalışma için rutin ışık mikroskobu takibi yapılarak dokular parafin bloklara gömüldü. Bloklardan alınan kesitlere histolojik, immünohistokimyasal ve TUNEL boyama yapıldı. Biyokimyasal çalışma için örnekler -80C<sup>o</sup>'de saklandı

Biyokimyasal incelemelerde Grup II'de beyin dokularında total oksidan durum ve oksidatif stres indeksinde anlamlı bir artış vardı. Grup III'de bu değerler Grup I'e yakın gözlemlendi. Histolojik incelemelerde, Grup II'de astrositlerde yer yer proliferasyon yanısıra hücrel pleomorfizm ve hiperkromazi artışı vardı. Grup III'de Grup I'e benzer morfolojik özellikler mevcuttu. İmmünohistokimyasal boyamada; Grup II'de bax immünreaktivitesinde belirgin bir artış vardı. Grup III'de ise Grup I'e benzer immünreaktivite izlendi. TUNEL boyamada Grup II'de TUNEL pozitif

hücrelerde anlamlı bir artış olmasına rağmen Grup III'de Grup I'e yakın boyanma görüldü.

Sonuç olarak, DM un oluşturduğu hücre hasarına karşı vitamin D'nin koruyucu etkilerinin gösterilmesi, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla vitamin D ile ilişkili tedavi yaklaşımlarının denenmesinin yararlı olabileceği ve bu konuda ileri araştırmaların yapılması gerektiği kanatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Diabetes mellitus, vitamin D, beyin, apoptozis.

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF EFFECT OF VITAMIN D3 ON THE APOPTOTIC ALTERATIONS IN THE EXPERIMENTAL DIABETIC MOUSE BRAIN TISSUE

Diabetes mellitus (DM) is a hyperglycemic metabolic disorder caused by the lack of insulin secretion and/or effect of insulin or both of them. Electrophysiological, structural and cognitive cerebral disorders occur in the long-term diabetes. Vitamin D<sub>3</sub>, active metabolite of vitamin D, has important roles in the different biological events. In recent studies, it is determined that vitamin D<sub>3</sub>, has antioxidant and neuroprotective properties.

In this study, it is investigated the protective effects of vitamin D on apoptotic changes in mice brain which streptozotocin (STZ) - induced experimental diabetes.

Twenty one Balb / C type male mice (aged 8 week and weighing  $30 \pm 7$  gr) were used in this study. All of mice were received standard chow and water ad libitum during experimental period. Mice were randomly divided into three groups with seven animals per group. Mice in group I were used as control. Mice in group II and group III were injected with 180 mg/kg streptozocin solved in 0, 1 M phosphate-citrate buffer (pH:4, 5) intraperitoneally. After confirmed of experimental diabetes mellitus we separated the diabetes group (Group II) and no application was performed to this group for 12 weeks. In Group III mice were administered with 50 IU/kg/day vitamin D orally for 12 weeks. At the end of experimental study mice were decapitated and brain tissues were taken and some of them fixed in formaldehyde solution (10%). Tissues were processed to parafin wax by routine histological analysis, parafin sections were stained by immunohistochemically and TUNEL protocols. Remaining tissue samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until the biochemical analysis were performed.

In Group II biochemical investigations showed us total oxidant status and oxidative stress index increased significantly. These parametres were much about the similar in Group I and Group III when compared each other. In histological

examination, proliferation of astrocytes, cellular pleomorphism and hyperchromasia were observed in Group II. Brain structures of Group I and Group III were much similar. It was observed that expression of bax in brain tissues of Group II increased significantly. Immunoreactivities of bax were similar in Group I and Group III. Count of TUNEL(+) cells were significantly higher in the Group II than cells of Group I and Group III.

In conclusion, we suggest that vitamin D has protective effects against the cell damage caused DM so, vitamin D therapy models can be improved by using different experimental research techniques.

**Key Words:** Diabetes mellitus, vitamin D, brain, apoptosis

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK.....</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI.....</b>	<b>ii</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>iii</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER.....</b>	<b>viii</b>
<b>TABLolar LİSTESİ.....</b>	<b>xi</b>
<b>ŞEKİLLER LİSTESİ.....</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Diabetes Mellitus .....	1
1.1.1. Tanım.....	1
1.1.2. Epidemiyoloji.....	1
1.1.3. Tanı.....	1
1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması .....	3
1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus.....	3
1.1.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi .....	3
1.1.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus.....	4
1.1.4.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi .....	4
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları.....	5
1.1.6. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonları.....	6
1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonlarının Patogenezi.....	10
1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogeneziyle Olan Bağlantılar.....	10
1.1.6.1.2. Beyin Yaşlanması Patogeneziyle Olan Bağlantılar .....	12
1.1.6.3. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü .....	13
1.1.6.4. Hipogliseminin Etkileri.....	13
1.2. Oksidatif Stres.....	14
1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres .....	15
1.2.2. Anti-Oksidanlar .....	19

1.3. Apoptozis .....	19
1.3.1. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler .....	22
1.3.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri.....	23
1.3.1.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı .....	23
1.3.1.1.2. Floresan Mikroskobu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı .....	24
1.3.1.1.3. Elektron Mikroskobu: .....	24
1.3.1.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu:.....	25
1.3.1.2. Histokimyasal Yöntemler.....	25
1.3.1.2.1. Anneksin V Yöntemi: .....	25
1.3.1.2.2. TUNEL Yöntemi .....	25
1.3.1.2.3. M30 Yöntemi:.....	25
1.3.1.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi: .....	26
1.3.1.3. Biokimyasal Yöntemler .....	26
1.3.1.3.1. Agaroz Jel Elektrofrezisi:.....	26
1.3.1.3.2. "Western" Blotting.....	26
1.3.1.3.3. "Flow" Sitometri .....	26
1.3.1.4. İmmünojenik Yöntemler.....	27
1.3.1.4.1. ELISA.....	27
1.3.1.4.2. Flourimetrik Yöntem.....	27
1.3.1.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri.....	27
1.3.1.5.1. DNA Microarrays: .....	27
1.4. Vitamin D ve Biyolojik Etkileri.....	28
1.4.1. Vitamin D'nin Biyokimyası ve Fizyolojisi.....	28
1.4.2. Vitamin D'nin Metabolizması ve Fonksiyonları.....	29
1.4.3. Vitamin D Kaynakları.....	33
1.4.4. Vitamin D'nin Nöroprotektif Etkileri.....	33
1.4.5. Nörotransmitter Biyosentezi .....	34
1.4.6. Vitamin D <sub>3</sub> ve Santral Sinir Sistemi Hastalıkları.....	34
1.4.6.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri.....	34

1.4.6.2. Santral Sinir Sistemi`nin Otoimmün ve İnflamatuvar Hastalıkları.....	35
1.4.6.3. Serebral İskemi.....	36
1.4.6.4. Nörodejeneratif Hastalıklar.....	36
1.4.6.5. Diabetik Periferel Nöropati.....	36
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
2.1.Deney Hayvanları.....	37
2.2.Diyabet İndüksiyonu.....	38
2.3.Deney Gruplarının Oluşturulması.....	38
2.4.Örneklerin Alınması.....	39
2.5. Biyokimyasal Çalışma.....	39
2.5.1. Kan glukoz düzeyleri.....	39
2.5.2. Beyin dokusunda TAS, TOS ve OSI ölçümü.....	39
2.6. Histolojik Çalışma.....	39
2.7. İmmünohistokimyasal Çalışma.....	40
2.8. TUNEL Metodu.....	41
2.9. İstatistiksel Analiz.....	42
<b>3. BULGULAR.....</b>	<b>43</b>
3.1. Klinik Bulgular.....	43
3.2.Biyokimyasal Bulgular.....	43
3.2.1.Kan glukoz düzeyleri.....	43
3.2.2. TAS, TOS VE OSI değerleri.....	43
3.3. Histolojik Bulgular.....	44
3.4.İmmünohistokimyasal Bulgular.....	46
3.5.TUNEL Bulgular.....	55
<b>4. TARTIŞMA.....</b>	<b>60</b>
<b>5. KAYNAKLAR.....</b>	<b>65</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>84</b>

## TABLULAR LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b>	Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri (9).....	2
<b>Tablo 2.</b>	Glukoz Toleransının Sınıflaması (9).....	3
<b>Tablo 3.</b>	Apopitozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar .....	22
<b>Tablo 4.</b>	Apopitozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	23
<b>Tablo 5.</b>	Deney hayvanlarına verilen fare yeminin terkibi .....	37
<b>Tablo 6.</b>	Histolojik takip serileri.....	40
<b>Tablo 7.</b>	İmmünohistokimyasal boyama prosedürü .....	40
<b>Tablo 8.</b>	İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi.....	41
<b>Tablo 9.</b>	TUNEL boyama prosedürü .....	42
<b>Tablo 10.</b>	STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final ağırlık değerleri.....	43
<b>Tablo 11.</b>	STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final kan glukoz değerleri.....	43
<b>Tablo 12.</b>	Beyin dokularındaki TAS, TOS ve OSI değerleri .....	44
<b>Tablo 13.</b>	Apopitotik İndeks (%).....	59

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Oksidatif Stress (www.woongbee.com).....	14
<b>Şekil 2.</b>	Polyol Yolunun Şeması (76) .....	18
<b>Şekil 3.</b>	Antioksidan Savunma Sistemleri (77) .....	19
<b>Şekil 4.</b>	Normal ve Apoptotik İnsan Lökosit Hücresi .....	23
<b>Şekil 5.</b>	TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü.....	25
<b>Şekil 6.</b>	Vitamin D'nin Metabolizması .....	30
<b>Şekil 7.</b>	Grup I'de normal beyin histolojisi. H&E X200.....	45
<b>Şekil 8.</b>	Grup II'de astrositlerde yer yer proliferasyon, hücrel pleomorfizm ve hiperkromazi artışı. H&E X200 .....	45
<b>Şekil 9.</b>	Grup III'de gerilemiş astrosit proliferasyonu, azalmış hücrel pleomorfizm ve hiperkromazi. H&E X200.....	46
<b>Şekil 10.</b>	Grup I'de beyin kortexinde bax immünreaktif hücreler (→). X200 .	47
<b>Şekil 11.</b>	Grup I'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200 .....	47
<b>Şekil 12.</b>	Grup I'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	48
<b>Şekil 13.</b>	Grup I'de hipokampüsün CA3 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200 .....	48
<b>Şekil 14.</b>	Grup I'de CA 4 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200 .	49
<b>Şekil 15.</b>	Grup II'de beyin kortexinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	49
<b>Şekil 16.</b>	Grup II'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	50
<b>Şekil 17.</b>	Grup II'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	50
<b>Şekil 18.</b>	Grup II'de hipokampüsün CA 3 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	51
<b>Şekil 19.</b>	Grup II'de hipokampüsün CA4 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	51

<b>Şekil 20.</b>	Grup III'de beyin kortexinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	52
<b>Şekil 21.</b>	Grup III'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	52
<b>Şekil 22.</b>	Grup III'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	53
<b>Şekil 23.</b>	Grup III'de hipokampüsün CA 3 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	53
<b>Şekil 24.</b>	Grup III'de hipokampüsün CA 4 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200.....	54
<b>Şekil 25.</b>	Bax negatif kontrol. X200.....	54
<b>Şekil 26.</b>	Grup I'de beyin kortexinde TUNEL pozitif hücre (→). X200.....	55
<b>Şekil 27.</b>	Grup II'de beyin kortexinde artmış TUNEL pozitif hücreler (→). X200.....	56
<b>Şekil 28.</b>	Grup III'de beyin korteksinde TUNEL pozitif hücreler (→). X200.....	56
<b>Şekil 29.</b>	Grup I'de beyin hipokampüs bölgesinde TUNEL negatif boyanma. X200.....	57
<b>Şekil 30.</b>	Grup II'de beyin hipokampüs bölgesinde artmış TUNEL pozitif hücreler (→). X200.....	57
<b>Şekil 31.</b>	Grup III'de beyin hipokampüs bölgesinde TUNEL pozitif hücreler (→). X200.....	58
<b>Şekil 32.</b>	TUNEL pozitif kontrol. Meme Dokusu. X200.....	58
<b>Şekil 33.</b>	TUNEL negatif kontrol. X200.....	59

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ADA</b>	: Amerikan Diyabet Cemiyeti
<b>AGEs</b>	: İleri glikasyon son ürünleri
<b>AMP</b>	: Adenozin monofosfat
<b>ATP</b>	: Adenozin trifosfat
<b>BAEPs</b>	: Beyin sapı işitsel uyarılmış potansiyelleri
<b>CAMKII</b>	: Ca <sup>2+</sup> /kalmodulin bağımlı protein kinaz II
<b>Cat</b>	: Katalaz
<b>DISC</b>	: Ölümü indükleyen sinyal kompleksi
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DBP</b>	: Vitamin D bağlayıcı protein
<b>DSÖ</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>EAE</b>	: Deneysel allerjik ensefalomyelit
<b>EEG</b>	: Elektroensefalografi
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
<b>GDNF</b>	: Glial cell derived nörotrofik faktör
<b>GPx</b>	: Glutasyon Peroksidaz
<b>GSH</b>	: Redükte glutasyon
<b>HB</b>	: Hematoksilen boyama
<b>HbA1c</b>	: Hemoglobin A1c
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen Peroksit
<b>IDDM</b>	: İnsüline bağımlı Diabetes Mellitus
<b>IFG</b>	: Bozulmuş açlık glisemisi
<b>İGT</b>	: Bozulmuş glukoz toleransı
<b>mRNA</b>	: Mesajcı ribonükleik asit
<b>MDA</b>	: Malonyldialdehide
<b>MS</b>	: Multiple Skleroz
<b>MT</b>	: Metallothionein
<b>NADH / NAD<sup>+</sup></b>	: Redükte nikotinamid adenin dinükleotid: nikotinamid

adenin dinükleotid

- NADPH** : Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat  
**NIDDM** : İnsüline bağımlı olmayan Diabetes Mellitus  
**NMDA** : N-Metil D-Aspartat  
**NOD** : Non-Obez Diyabet  
**NT3** : Nörotropin 3  
**OGTT** : Oral glukoz tolerans testi  
**ONOO•** : Peroksinitrit  
**OSI** : Oksidatif stres testi  
**PBS** : Phosphate buffered saline  
**PCD** : Programmed Cell Death  
**PKC** : Protein kinaz C  
**PTH** : Paratiroid hormon  
**RDA** : Alınması tavsiye edilen günlük doz  
**ROS** : Reaktif oksijen türleri  
**SOD** : Süperoksit dismutaz  
**SSS** : Santral Sinir Sistemi  
**STZ** : Streptozosin  
**SSEPs** : Somatosensorial uyarılmış potansiyeller  
**TAS** : Total antioksidan status  
**TOS** : Total oksidan status  
**TRIAL** : Apoptozisi indükleyen reseptör ligand  
**TÜRDEP** : Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması  
**VDR** : Vitamin D reseptörü

# 1. GİRİŞ

## 1.1. Diabetes Mellitus

### 1.1.1. Tanım

Diabetes Mellitus (DM), insülin sekresyonu, insülinin 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 (1).

DM klinik olarak polidipsi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı gibi klinik belirtiler ile ortaya çıkar. Ağır formlarında tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidosis ya da nonketotik hiperosmolar hiperglisemi gibi semptomlar gösterir. Çoğunlukla semptomlar ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Patolojik fonksiyon değişikliklerine neden olan hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Kimi zaman da retinopati, nöropati, nefropati gibi komplikasyonları ile karşımıza gelir (1-3). Bazı durumlarda diyabet, gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM) veya gebelikte görülen Glukoz İntoleransı gibi örneklerde olduğu gibi kolaylıkla fark edilebilir. Bazı kişilerde diyabet gelişme olasılığı glukoz tolerans anomalilerinden önce de tanımlanabilir (4).

### 1.1.2. Epidemiyoloji

Hastalık ilk yıllarda genellikle asemptomatik seyrettiğinden, gelişmiş ülkelerde bile diyabetiklerin, diyabet olduğu bilinmeyenlere oranı 2/1'dir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün yaptığı çalışmalara göre 100 milyon civarındaki diyabetli sayısının önümüzdeki on yılın sonunda 200 milyona ve 21. yüzyılın başlarında da 300 milyona ulaşması beklenmektedir (5, 6). Amerika'da 20-74 yaş grubunda toplumda diyabet prevalansı % 6, 6 bulunmuş ve diyabet olduğu bilinmeyen olgularının oranının % 50 civarında olduğu bildirilmiştir (7). Ülkemizde ise 1997-1998 yıllarında yapılan Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Çalışması'na (TÜRDEP) göre 20-80 yaş grubunda diyabet sıklığı % 7, 2 olarak bulunmuştur (8).

### 1.1.3. Tanı

Amerikan Diyabet Birliği'ne (ADA) göre diyabet tanısı, açlık kan şekerinin venöz plazmada ardışık en az iki ölçüm sonucunda 126 mg/dl veya üzerinde olması

ile konur. Ayrıca günün herhangi bir saatinde açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın venöz plazmada ölçülen kan şekerinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması ve buna polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi diyabet semptomlarının eşlik etmesi de tanı koymak için yeterlidir (Tablo 1).

**Tablo 1.** Diabetes Mellitus'un Tanı Kriterleri (9)

- 
1. Diyabete özgü semptomlara ek olarak günün herhangi bir saatinde ölçülen plazma Glukoz değerinin  $\geq 200$ mg/dl olması  
Diyabet semptomların varlığı: poliüri, polidipsi, açıklanamayan kilo kaybı
  2. Açlık plazma Glukoz değerinin  $\geq 126$ mg/dl olması: En az 8 saatlik açlık sonrası
  3. Oral Glukoz tolerans testi sırasında 2. saat plazma Glukoz düzeyinin  $\geq 200$ mg/dl olması
- 

Açlık plazma Glukoz düzeyi 100-126 mg/dl arasında olan hastalarda Bozulmuş Açlık Glisemisi (IFG) söz konusu olup, bu hastalarda Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) yapılarak diyabet tanısı konulur. Testin 2. saatinde kan şekerinin 200 mg/dl ve üzerinde olması diyabet tanısı koydurur (Tablo 1).

Bozulmuş Açlık Glisemisinin kategorileri 1997'de ADA tarafından tanımlandı, bununla eş zamanlı olarak, diyabetin tanısı için açlık plazma glukoz konsantrasyonu 126 mg/dL ( $\geq 7, 0$  mmol/L)'ye düşürüldü. IFG için, açlık plazma glukoz konsantrasyonu 110-125 mg/dL (6, 1-7 mmol L) olarak belirlendi, fakat 2003'de 100-125 mg/dL (5, 6-7 mmol/L) olarak değiştirildi (Tablo 2).

Eğer bir hastada susuzluk, poliüri, açıklanamayan kilo kaybı, uykuya meyil veya koma ve glukozüri varsa diyabet teşhisi, açlık hiperglisemisinin gösterilmesiyle konabilir. Eğer açlık glukoz konsantrasyonu diyabet için tanısal birimler içinde ise OGTT teşhis için gerekli değildir. Güvenilir bir test yapılmalıdır, çünkü bir diyabet tanısı, hastalar için ömür boyu süren ve hatırı sayılır sonuçlar taşır. Bireyler arası farklılık veya tam olmayan bir açlık yanlış tanı ile sonuçlanabilir. Eğer hasta asemptomatik ise veya minimal semptom varsa ve açlık kan veya plazma glukoz konsantrasyonları tanısal değilse, diyabet tanısının konması veya dışlanması için OGTT gerekli olur (9).

**Tablo 2.** Glukoz Toleransının Sınıflaması (9)

---

---

<b>Açlık Plazma Glukozu</b>
Normal <100 mg/dl
Bozulmuş açlık Glukozu $\geq$ 100 mg/dl ve <126 mg/dl
Diyabet $\geq$ 126 mg/dl
<b>OGTT sırasında 2. saat plazma Glukozu</b>
Normal <140 mg/dl
Bozulmuş Glukoz toleransı (IGT) $\geq$ 140 ve <200 mg/dl
Diyabet $\geq$ 200 mg/dl

---

---

#### **1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması**

1. Tip 1 (IDDM)
2. Tip 2 (NIDDM)
3. Gestasyonel DM
4. Sekonder DM (diğer hastalıklara sekonder gelişen)
5. Konjenital insülin rezistansına bağlı DM
6. Ailevi otoimmün DM

Diyabetiklerin %90`na yakını Tip 2, %5`i ise Tip 1 diyabettir (10).

##### **1.1.4.1. Tip 1 Diabetes Mellitus**

Tip 1 diyabet genetik zeminde ilerleyici beta hücre yıkımı sonucu insülin yetersizliği ile karakterize otoimmün bir hastalıktır (11). Genellikle otuz yaşın altında ortaya çıkar. Tip 1 diyabet, tüm diyabetlilerin yaklaşık % 7-10 oranı kadar bölümünü kapsar (12).

##### **1.1.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus Patogenezi**

**a) Genetik Faktörler:** Tip 1 diyabette genetik faktörlerin öneminin bilinmesine karşın spesifik bir genetik geçiş şekli tespit edilememiştir. Diyabetlilerin kardeşlerinde Tip 1 diyabet genel popülasyona göre yaklaşık 15 kat daha sık görülür. Tip 1 diyabetli vakaların % 90-95`i DR3 ve/veya DR4 Class II HLA molekülü ile eksprese ederler (13-17).

**b) Beta Hücre İmmüntoleransının Bozulmasına Neden Olan Çevresel Faktörler:** Beta hücrelerinde immün toleransın bozulmasına ve otoimmunitenin

aktivasyonuna neden olan etkenlerin başında virüsler, toksinler ve bazı gıda maddeleri gelir (13-17).

**c) Beta Hücrelerine Yönelik Hücre Aktivasyonu:** Virüs ya da toksinlerle doğal yapısı bozulan beta hücreleri, salgıladıkları sitokinlerle (IFN-a, IFN-g, TNF-a, nitrik oksit (NO), IL-1 vb.) ya da antijenik peptidlerle immün sistem elemanlarını uyarır. Bunun sonucunda destrüktif insülitis başlatılır (13-17).

**d) İnsülitis ve Beta Hücre Ölümü:** Geç faz immün aktif dönemde, inflamasyon ve mononükleer hücre infiltrasyonu süreci insülitis olarak nitelendirilir. Adacıkları önce makrofajlar, CD8 sitotoksik T lenfositleri daha sonra CD4 lenfositleri, TH1, NK (Natural Killer) hücreleri ve B lenfositleri infiltre eder ve hasara uğrattır. Hasar, hastalığın başlangıç yaşı küçük olanlarda, puberte döneminde, sekonder infeksiyonlarda ve kız çocuklarında daha hızlıdır (13-17).

**e) Beta Hücre Otoantijen ve Otoantikoları:** Günümüzde prelinik dönem Tip 1 diyabet tanısında sensitivite ve spesifitesi yüksek altın standart olarak alınan üç otoantikor; ICA (Adacık hücre antijeni), anti GAD (Glutamik asit dekarboksilaz) IA 2 (Tirozin fosfataz) otoantikolarıdır (13-17).

#### **1.1.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus**

Tip 2 diyabetliler, tüm diyabetiklerin ortalama % 85'ini oluşturmaktadır (18). Uzun sürebilen asemptomatik bir dönem çoğunlukla mevcuttur. Yakınlmalar genellikle 45 yaş civarında başlar. İlk tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar çoğu zaman vardır (1, 3).

##### **1.1.4.2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi**

Tip 2 diyabet patogenezinde beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve hepatik glukoz üretimi artışı gibi üç ana metabolik bozukluk rol oynar (1-4). Primer defekt olarak insülin direnci ve /veya insülin eksikliği ön plandadır (1, 2).

Tip 2 diyabette primer patolojinin beta hücre fonksiyon bozukluğu veya insülin direnci olmasında yaş, etnik farklılıklar, obezite ve diyabetin heterojenitesinin kısmen de olsa belirleyici olduğu ileri sürülmektedir (19). Tip 2 diyabetin çoğu formları genetik yüklülük ile ilişkilidir. Son yıllarda bunlara eklenen dördüncü bir görüş, primer defektin hiperinsülinemi olduğu ve insülin direncinin hiperinsülinemiye bağlı olarak oluştuğu hipotezidir. Hiperinsülineminin nonoksidatif

glukoz kullanımını veya glikojen sentezini bozarak Tip 2 diyabette olduğu gibi insülin direncine yol açabileceği ileri sürülmektedir (20, 21).

### **1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları**

Diabetes mellitusun komplikasyonları aşağıda akut ve kronik olarak sınıflandırılmıştır (22).

#### **A) Akut (Metabolik) Komplikasyonlar:**

- Diyabetik ketoasidoz
- Hiperosmolar non-ketotik koma
- Laktik asidoz koması
- Hipoglisemi koması

#### **B) Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar:**

##### **1) Makrovasküler komplikasyonlar:**

- Kardiyovasküler hastalıklar (Hipertansiyon, Koroner kalp hastalığı)
- Serebrovasküler hastalıklar
- Periferik damar hastalığı

##### **2) Mikrovasküler Komplikasyonlar:**

- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati
- Diyabetik nöropati

##### **3) Diğer Kronik Komplikasyonlar:**

- Diyabetik ayak
- Eretil disfonksiyon ve diğer seksüel fonksiyon bozuklukları
- Gastrointestinal problemler
- Kemik ve mineral metabolizma bozuklukları
- Psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklar

Diabetes Control an Complications Trial (DCCT) çalışmasının sonuçları ve deneysel çalışmalar, iyi bir glukoz kontrolünün diyabetin komplikasyonlarını azaltıcı etkisinin olduğunu göstermiştir. Uzun süreli olarak HbA1C düzeylerinin < % 7.1 olması sonucu mikrovasküler komplikasyonlar retinopati, nöropati ve nefropati %

50-70 oranında azalmıştır. Bu düzey makrovasküler komplikasyonlar yönünden de yararlı olmaktadır (23).

### **1.1.6. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonları**

DM'nin nörolojik komplikasyonlarının etyopatogenezi uzun yıllar araştırmacıların ilgi alanı olmuştur. Bu ilgi genellikle periferik ve otonom sinir sistemi üzerinde yoğunlaşmıştır (24). Ancak son yıllarda DM'nin santral sinir sistemi(SSS)'ni de etkilediğine dair kanıtlar da ortaya konmaktadır (25). Periferik sinir sistemindeki komplikasyonların aksine, santral sinir sistemindeki diyabetik komplikasyonlar kolay fark edilemez (26). Diyabetik hastalarda hem akut, hem de kronik metabolik ve vasküler bozukluklar beynin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğüne zarar verebilir (25, 27). Akut serebral bozukluklara neden olan farklı olaylar vardır. Örneğin; diyabetik olgularda serebrovasküler olay riski ve tahribatı artmıştır. Ayrıca hiperglisemik ve hipoglisemik ataklar da akut serebral fonksiyon bozukluğuna neden olur (25, 26). Uzun süreli diyabette, daha sinsi gelişen bu yüzden de kolay fark edilemeyen serebral değişiklikler de meydana gelmektedir (25, 27). Bu serebral bozukluklar; nörokimyasal, elektrofizyolojik, yapısal ve kognitif düzeyde gösterilmiştir.

Nörokimyasal değişikliklerle ilgili verilerin çoğu kemirgen modellerden elde edilen sonuçlara dayanmaktadır. Bu değişiklikler şunlardır:

1. STZ ile diyabet oluşturulmuş ratların striatumunda azalmış asetilkolin sentez ve salınımı. Asetil kolin metabolizmasında meydana gelen bu değişiklikler kognitif bozukluklarla ilişkilendirilmektedir.
2. Diyabetik ratların beyinlerinin farklı bölgelerinde değişmiş adrenalin ve noradrenalin içeriği.
3. Azalmış serotonin döngüsü.
4. Azalmış dopaminerjik nöronal aktivite ve artmış dopamin içeriği.

Nörokimyasal değişikliklerle ilgili insan çalışmalarından elde edilen veriler ise şunlardır:

1. Ciddi ketoasidozda artmış serotonin döngüsü ve post-mortem beyin örneklerinde medial ve lateral hipotalamusta artmış serotonin içeriği.

## 2. Beynin farklı bölgelerinde artmış dopamin içeriği (26).

Diyabetik hastalarda elektrofizyolojik anormalliklere ilişkin veriler evoked potansiyeller ve event-related potansiyellerin ölçülmesiyle elde edilmiştir. Evoked potansiyeller, eksternal bir stimulusa beynin verdiği cevabın elektrofizyolojik tezahürüdür. Beyin sapı işitsel evoked potansiyelleri (BAEPs), görsel evoked potansiyelleri (VEPs) ve somatosensorial evoked potansiyelleri (SEPs)'nin latanslarının ölçümü, diyabetik hastalarda santral sinir sisteminin fonksiyonel bütünlüğünü değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Diyabetik hastalarda hem santral hem de periferik orijinli evoked potansiyellerin latanslarında artış olmaktadır. Latanslardaki bu artış diyabetin santral sinir sisteminde sinyal iletimini bozduğunu göstermektedir.

Evoked potansiyellere ilaveten, P300 dalgasında olduğu gibi event-related potansiyellerin latansları da artmaktadır. P300 dalgası, kognitif ve hafızaya ait fonksiyonlarla ilişkili bir geç kortikal nörofizyolojik olaydır. Dikkat ve kısa süreli hafızayla yakından ilişkilidir. Diyabetik hastalardaki artmış P300 latansı yüksek beyin fonksiyonlarındaki bozulmanın bir göstergesi olabilir ve bu sayede elektrofizyolojik ve kognitif bozukluklar arasında bir bağ kurulabilir (25-27).

Bir diğer elektrofizyolojik değişiklik, insüline bağımlı olmayan diyabetik hastalarda rastlanan, tüm santral kortekste ortaya çıkan yavaşlamış EEG (elektroensefalografi) ritmidir. Buna ilaveten diyabetik çocuklarda da non-spesifik EEG anormalliklerine rastlanmaktadır (26).

Tip 1 DM'de santral sinir sistemi komplikasyonlarının gelişiminde insülin eksikliğinin yanısıra, C peptid eksikliğinin de önem taşıdığı bildirilmiştir. C peptid için özgül bir reseptör yöresi tanımlanmamış olmakla birlikte, bu peptidin insülinin sinyal yolları aracılığı ile etki oluşturduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır. C peptidin BB/Wor sıçanlarda bozulmuş insülin benzeri büyüme faktörü aktivitesini ve insülin reseptör sentezini kısmen düzelttiği ve hipokampustaki nöronal apoptozisin oluşumunu kısmen önlediği bildirilmiştir. Yapılan invivo ve invitro çalışmalardan elde edilen sonuçlar, insülin / C peptid yetersizliğinin Tip 1 DM'de görülen nöronal apoptoziste önemli rol oynadığını ortaya koymaktadır (28, 29).

Diyabet beyinde serebral atrofi ve fokal beyaz madde lezyonlarının gelişimi gibi yapısal değişikliklerin oluşumu için bir risk faktörüdür. Diyabetik olguların beyinlerindeki yapısal değişiklikler normal yaşlanmadaki değişiklikleri taklit etmektedir ancak diyabet olmayan olgulara göre daha erken yaşlarda ortaya çıkmaktadır (25).

Deneyssel diyabet oluşturulan hayvanlarda, subkortikal alanda ve beyin kökünde lezyonlar, beyin ve medulla spinaliste nöronal atrofi, aksonal dejenerasyon, glikojen birikimi, ensefalomalazi, demiyelinizasyon ve glia (astrofit) hücrelerinde hasar oluşumu gibi yapısal değişiklikler oluştuğu bildirilmiştir (30-33). Diyabetik hayvanlarda hipokampus, arkuat ve ventromediyal nükleus, neokorteks ve prefrontal korteks nöronlarının yoğunluğunda anlamlı bir azalma görüldüğü, nöron kayıpları nedeni ile beyin ağırlığında azalma olduğu rapor edilmiştir. İnvivo ve invitro çalışmalar, söz konusu nöron kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığını göstermektedir. Tip 1 DM'de nöronal yoğunluğun azalmasının diyabetin süresi ile korelasyon gösterdiği, zaman ilerledikçe apoptozis kaynaklı nöronal kaybın arttığı bildirilmiştir (30, 34).

Hücresele düzeyde değerlendirildiğinde ise, diyabetik hayvanların santral sinir sistemlerine ait hücrelerin çekirdek şekillerinde ve kromatin görünümünde bozulmalar olduğu, mikrotübül sayılarının arttığı, endoplazmik retikulumlarında genişleme, parçalanma ve degranülasyon oluştuğu bildirilmiştir (29).

Tip 1 ve Tip 2 diyabetik hastalardaki nöropsikolojik çalışmalarda, geniş çeşitlilikteki kognitif testlerde performans kayıpları gözlenmektedir (25-27). Tip 1 diyabetik hastalarda öğrenme ve hafızada, problem çözmede ve mental ve motor hızda bozulmalar meydana gelebilmektedir (25-27, 35).

Tip 1 diyabetik çocuklardaki kognitif değişikliklerin temel belirleyicileri, diyabetin ortaya çıkış yaşı ve hipoglisemik olayların sıklığıdır (25, 26). Diyabetin 5 yaşından önce ortaya çıktığı ve hipoglisemik olaylara sık maruz kalan olgularda, kognitif bozukluklara daha sık rastlanmaktadır. Diyabetik çocuklarda kognitif fonksiyonları etkileyen diğer faktörler ise, HbA1c (hemogloblinA1c) düzeyleri ile takip edilen glisemik kontrolün kötü olması ve hastalığın süresidir.

Tip 1 diyabetik yetişkinlerde mental verimlilikte küçük fakat fark edilebilir azalmalar meydana gelmektedir. Ciddi boyuttaki bozukluklara nadiren

rastlanmaktadır (25). Diyabetik hastalarda bozuklukların gözleendiği spesifik vakalarla ilgili çalışmaların sonuçları ve bozuklukların dereceleri farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar, bozuklukların kısmen zor fark edilir olmasından ve çalışmalara katılan popülasyonların heterojen olmasından kaynaklanmaktadır (25, 27, 36). Ayrıca diyabetik hastalar arasında ciddi hipoglisemi ve kronik hiperglisemiye maruziyette farklılıklar olması da önemlidir; çünkü hipoglisemi ve hiperglisemi beyni farklı mekanizmalar aracılığıyla etkiler (25, 27). Glisemik kontrol yetişkin Tip 1 diyabetiklerdeki serebral komplikasyonların önlenmesinde iki yönlü rol oynamaktadır. Bir yandan yükselmiş HbA1c değerleriyle ifade edilen kötü glisemik kontrol ve periferik nöropati gibi kötü glisemik kontrolle ilişkili diğer komplikasyonlar kognitif fonksiyon bozukluğuyla ilişkili iken diğer yandan da yoğun tedavi hipoglisemik olayların sıklığını arttırmakta ve beyni olumsuz yönde etkilemektedir (25).

Tip 1 diyabetik hastalarla karşılaştırıldığında, Tip 2 diyabetik hastalarda yapılan nöropsikolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar birbirleriyle daha uyumludur. Tip 2 diyabetik hastalarda, özellikle sözel hafıza ve kompleks bilgi işlenmesi ile ilgili tasklarda orta derecede kognitif bozukluklar rapor edilmiştir. Temel dikkat işlevi, motor reaksiyon zamanı ve kısa süreli hafıza kısmen etkilenmiyor görünmektedir. Tip 2 diyabetik hastalarda kognitif fonksiyon bozukluğu için risk faktörleri; artmış HbA1c ve açlık plazma glukoz düzeyleri, yükselmiş serum trigliserid düzeyleri ve periferik nöropatinin varlığıdır. Hipoglisemik olaylar temel bir belirleyici gibi görünmemektedir, çünkü bozulmuş glukoz toleransı olan olgularda ve yeni teşhis edilmiş ve henüz tedaviye başlanmamış hastalarda da kognitif bozukluklara rastlanmaktadır.

Yapılan çalışmalarda Tip 1 ve Tip 2 diyabetin kognitif bozukluklarla ilişkili olduğu açıkça ortaya konulmuştur ancak araştırmacılar arasında geçerli olan görüş günlük işlevler üzerine olan etkinin sınırlı olduğudur. Ancak bu sonuç 70 yaşın altındaki hastalar için geçerli olmasına rağmen, daha yaşlı diyabetik hastalar için geçerli gibi görünmemektedir. Son zamanlarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar diyabet ile hem vasküler demans hem de Alzheimer hastalığı arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, aynı yaştaki kontrollerle karşılaştırıldığında daha belirgin kognitif bozukluklar gösteren yaşlı diyabetik hastalardan elde edilen

sonuçlarla uyumludur. Diyabetin beyin üzerine olan etkilerinin yaşlılarda daha belirgin olmasının nedenleri açık değildir. Hem yeni teşhis edilmiş diyabetik olgularda hem de bozulmuş glukoz toleransı ve/veya hiperinsülinemisi olan yaşlı olgularda kognitif fonksiyon bozukluklarına rastlanabilmektedir. Bu bulgular, yaşlılarda diyabetin beyin üzerindeki etkilerinin uzun süreyle diyabete maruz kalmaktan ziyade, yaşlanmakta olan beynin diyabetik koşullar karşısında daha zayıf olmasından kaynaklandığına işaret etmektedir (25, 27).

Diyabetik hastalarda kognitif fonksiyonu etkilediği düşünülen başka faktörler de vardır. Örneğin; hem Tip 1 hem de Tip 2 diyabetik hastalarda psikiyatrik bozuklukların, özellikle de depresyon ve anksiyete bozukluklarının prevalansı artmıştır (25). Özet olarak diyabet; yavaş gelişen, klinik olarak anlamlı kognitif bozukluklarla karakterize bir ensefalopatiyle ilişkilidir. Kognitif bozukluklar, beyinde meydana gelen elektrofizyolojik ve yapısal değişikliklerle de koreledir (27).

#### **1.1.6.1. Diabetes Mellitus'un Serebral Komplikasyonlarının Patogenezi**

Diyabetin diğer komplikasyonlarıyla kıyaslandığında, diyabetik ensefalopatinin patogeneze yönelik çalışmalar daha azdır. Bu komplikasyonların oluşumunda pek çok patogenetik faktör bir arada rol oynuyor gibi görünmektedir. İlk olarak, periferik diyabetik nöropati patogenezinde yer alan faktörler rol oynuyor olabilir (25, 27). İkinci olarak, diyabetteki nöropsikolojik ve yapısal değişiklikler yaşlanmakta olan beyindeki değişiklikleri taklit ettiğinden ve yaşlı olgular diyabetin beyin üzerindeki etkilerine genç olgulardan daha duyarlı olduğundan, diyabetin beynin yaşlanma sürecine katkıda bulunduğundan ya da bu süreci hızlandırdığından söz edilebilir (25, 27, 37). Üçüncüsü, serebrovasküler olaylar için risk faktörleri olan hipertansiyon ve ateroskleroz rol oynayabilir (25). Dördüncü olarak, hipogliseminin muhtemel rolünden bahsedilir (25, 26, 24, 38-40). Son olarak da insülinin şüpheli rolünden söz edilir ki bu; serebral insülin düzeylerindeki, insülin reseptörlerindeki ve insülin sinyalizasyonundaki değişikliklerin dahil olduğu nöromodülatuar değişikliklerin bir sonucudur (27, 41-43).

##### **1.1.6.1.1. Diyabetik Nöropatinin Patogeneziyle Olan Bağlantılar**

Periferik diyabetik nöropatinin patogenezi multifaktöriyeldir ve vasküler disfonksiyon, trofik destekte meydana gelen değişiklikler ve artmış glukoz

düzeylerinin direkt toksik etkisini içerir. Vasküler disfonksiyon diyabetik nöropatide olduğu gibi, diyabetik ensafalopatide de önemli rol oynar. Beyinde meydana gelen vasküler değişiklikler sinir kan akımında ve endonöral oksijen miktarında azalmayla sonuçlanır (25-27). Serebral kan akımındaki lokal azalmalar hem akut hem de kronik hiperglisemisi olan hayvanlarda gösterilmiştir (26). Diyabetik hastalarda da serebral kan akımında hem lokal azalmalar hem de artışlar olduğu rapor edilmiştir (25). Yapılan çalışmalarda nörotrofik destekte de değişikliklerin meydana geldiği bildirilmiştir. Bu değişikliklere örnek olarak IGF (insülin benzeri büyüme faktörü) geninin serebral ekspresyonundaki azalma verilebilir.

Hiperglisemi beyinde glukoz düzeyinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Beyindeki artmış glukoz düzeyi aynen periferik sinir sisteminde olduğu gibi polyol yolağı aktivitesinde artışa ve sorbitol ve fruktozun birikimine neden olur. Ancak diyabetik rodentlerin beyinlerindeki sorbitol ve fruktoz düzeylerindeki artış periferik sinirlerdeki artışa göre daha düşük seviyededir. Periferik sinirlerdeki sorbitol düzeylerindeki artışın, myoinozitol seviyelerindeki azalmaya bağlı olduğu düşünülmektedir. Myoinozitolün azalması fosfoinozitid metabolizmasında bozukluklara neden olmakta bu da diaçilgliserol üretimini bozmaktadır. Sonuçta meydana gelen bu değişiklikler de PKC (protein kinaz C) aktivitesinde meydana gelen değişikliklerle ilişkilendirilmektedir. Diyabetik ratların beyinlerinde, sorbitol düzeylerindeki artışa rağmen myoinozitol düzeyleri de artmaktadır. Fakat periferik sinirlerde olduğu gibi fosfoinozitid ve diaçilgliserol düzeyleri düşmektedir. Sinaptik plastisitede meydana gelen değişikliklerin ışığında, diyabetin beyindeki protein kinaz aktivitelerini de etkilediği söylenmektedir. Diyabetik ratlarda protein kinaz A ve C aktivitelerinin arttığı, CAMKII ( $Ca^{2+}$  / kalmodulin bağımlı protein kinaz II) aktivitesinin ise azaldığı gösterilmiştir. Yüksek glukoz düzeylerinin neden olduğu bir diğer toksik etki de AGEs (ileri glikasyon son ürünleri) üretiminin artışıdır. Diyabetik ratların spinal kordlarında ve beyinlerinde AGEs'nin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Ancak bu artış periferik sinirlerdeki artıştan daha düşük düzeydedir. Yine diyabetik ratların beyin dokularında ve serebral mikrodamarlarında oksidatif hasarı gösteren lipid peroksidasyon yan ürünlerinin arttığı gözlenmektedir. Bunun dışında beyin antioksidan savunmasında rol oynayan süperoksit dismutaz ve katalaz aktiviteleri de azalmaktadır (25, 27). Hiperglisemiye bağlı olduğu düşünülen bir

diğer değişiklik de  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bozulmadır. Diyabetik hayvanlar ve insanlardan elde edilen sonuçlara göre birçok dokuda intrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinin arttığı gözlenmiştir. İntrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeyini belirleyen membran Na, K-ATPaz aktivitesi de değişmektedir. Periferik sinir sisteminde myoinozitol eksikliğinin Na, K-ATPaz aktivitesini düşürdüğü ve bunun da sinir disfonksiyonuna neden olduğu düşünölmektedir. Streptozotosin ile deneysel diyabet oluşturulmuş ratların santral sinir sistemlerinde de Na, K-ATPaz aktivitesi azalmakta ve lokal farklılıklar göstermektedir. En çok düşüş serebral korteks ve hipokampusta gözlenmektedir. Ancak hipergliseminin beyindeki myoinozitol düzeyini arttırdığı bilindiğinden, santral sinir sisteminde Na, K-ATPaz aktivitesi ile myoinozitol düzeyi arasındaki ilişki net değildir (25-27, 44).

#### **1.1.6.1.2. Beyin Yaşlanmasının Patogeneziyle Olan Bağlantılar**

Diyabetin beyin üzerindeki etkilerinin yaşlılarda daha belirgin olduğu gözlenmiştir. Yaşlı olgularda hızlanmış kognitif gerilemeyle kendini gösteren bu olay, yaşlanmakta olan beynin diyabetin etkilerine karşı daha duyarlı olmasına ya da yaşlanmanın ve diyabetin patogenezinin etkileşimine bağlanabilir. Ayrıca Tip 1 ve Tip 2 diyabetin patofizyolojisindeki farklılıklar da gözardı edilmemelidir çünkü yaşlılar daha çok Tip 2 diyabetten etkilenmektedirler (27).

Diyabetik komplikasyonların patogenezinde adı geçen oksidatif stres, AGEs'nin birikimi ve vasküler fonksiyon bozukluğu gibi olaylar beynin yaşlanmasında da rol oynamaktadır. Yaşlanmakta olan kemirgenlerin ve insanların beyinlerinde protein ve lipidlerin oksidasyonunun arttığı gösterilmiştir. Yine muhtemelen düşük protein döngüsünün bir sonucu olarak, beynin de dahil olduğu birçok dokuda AGEs'nin biriktiği görölmektedir. AGEs'nin oluşumu reaktif oksijen türlerinin artmış üretimi ile ilişkilidir. Yaşlanma esnasında beynin kapillerlerinin ilerleyici bir dejenerasyona uğradığı da bilinmektedir. Sonuçta meydana gelen kapiller anormallikler uzun vadede serebral kan akımını etkileyebilmektedir. Oksidatif stres, AGEs ve iskeminin olumsuz etkileri kısmen bozulmuş olan nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazı aracılığıyla meydana gelmekte ve nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazındaki bu bozulma beynin yaşlanmasıyla ilişkili nöropatolojik değişikliklerin ortaya çıkmasında bir son yolak olarak kabul edilmektedir.

Sonuç olarak iskemi, oksidatif stres, AGEs'nin oluşumu ve bozulmuş nöronal  $Ca^{2+}$  homeostazının beyin yaşlanmasına ve diyabetin serebral komplikasyonlarının gelişimine olan etkileri farklılıklar göstermektedir. Ancak benzerliklerin olduğu da inkar edilemez ve yaşlı diyabetik hastaların diyabetin beyin üzerindeki etkilerine karşı daha hassas olmalarını kısmen de olsa açıklayabilir (25, 27).

### **1.1.6.3. Serebrovasküler Değişikliklerin Rolü**

Diyabet hipertansiyon ve serebrovasküler hastalık prevalansındaki artışla ilişkilendirilmektedir. Serebrovasküler hastalık inme riskini arttırmakta ve hemodinamik değişikliklere neden olmaktadır. Bu hemodinamik değişiklikler de serebral kan akımındaki lokal değişimlerle sonuçlanmaktadır (25). Ayrıca diyabetik hastalarda serebral vazoreaktivite de bozulmaktadır (25, 27, 38). Serebral vazoreaktivite ve eşlik eden kan akımındaki değişiklikler, hipoglisemi, hipotansiyon, hipoksi ve hiperkapni gibi durumlarda rol oynayan önemli kompensatuar mekanizmalardır. Bu mekanizmaların kaybının beyin üzerinde zararlı etkileri olması muhtemeldir.

Hipertansiyon diyabetin serebral komplikasyonları üzerinde hem direkt hem de indirekt olarak rol oynamaktadır. Serebrovasküler hastalığın gelişimi sürecini hızlandırmakta (25, 45) ve buna ilaveten hem diyabetik hem de diyabetik olmayan yaşlılarda kognitif bozukluklar için predispozisyon oluşturmaktadır (25, 46). Kronik hipertansiyonun beyin üzerindeki etkilerinin patofizyolojisi kısmen anlaşılmıştır ancak hiperinsülineminin diyabetik olmayan olgularda dahi hipertansiyonun beyin üzerindeki zararlı etkilerini kuvvetlendirdiğini belirtmekte yarar vardır (25, 47).

### **1.1.6.4. Hipogliseminin Etkileri**

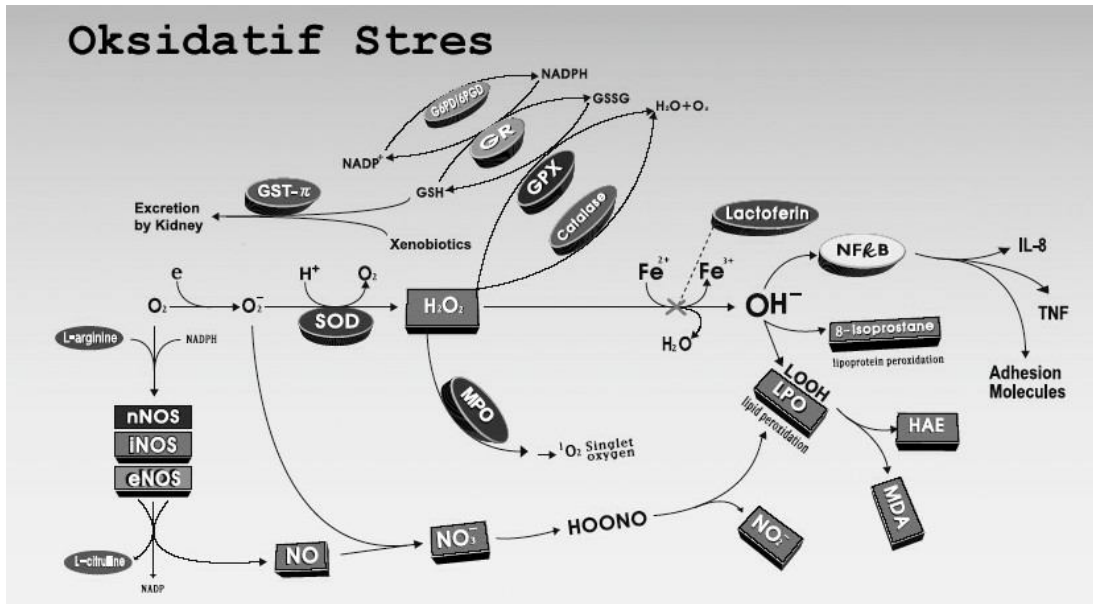
Hipogliseminin, özellikle sık sık tekrarlanması halinde, beyin fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (24). Örneğin; tek bir hipoglisemik olaya eşlik eden kognitif değişikliklerin geçici olduğu düşünülmektedir ancak tekrarlayan hipoglisemik olayların kümülatif etkisi kalıcı kognitif bozukluklarla sonuçlanabilmektedir (25, 26).

Hipoglisemide asidik aminoasitlerin rol aldığı eksitotoksik beyin zedelenmesi meydana gelmektedir. İskemi ve hipoksida de bu tarz zedelenme gözlenmektedir (24). Hipoglisemi esnasında meydana gelen seçici nöronal hasarın bir eksitatuvar

aminoasit alt tipi olan NMDA reseptörü'nün aktivitesindeki artışa bağlı olduğu gösterilmiştir. NMDA reseptör aktivitesindeki bu aktivite artışı intrasellüler  $Ca^{2+}$  düzeylerinde patolojik bir artışa neden olur. Sonuç olarak nükleer ve mitokondrial fonksiyon kaybı ve proteazların ve diğer  $Ca^{2+}$  bağımlı enzimlerin aktivitesinde artış meydana gelir (24-26). Bu değişiklikler nörotransmisyon ve nöronal aktiviteyi uyarak zaten yetersiz olan enerji kullanımını artırır ve enerji açığı olan hücrelerin ölümüne neden olur (24). Beyindeki seçici nöronal hasarın dağılımı NMDA-reseptör yoğunluğuyla ilişkilidir (26).

## 1.2. Oksidatif Stres

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 1) (48).



Şekil 1. Oksidatif Stres ([www.woongbee.com](http://www.woongbee.com))

### 1.2.1. Diabetes Mellitus ve Oksidatif Stres

Diyabet ROS (reaktif oksijen türleri)'nin artmış üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuç olarak artmış oksidatif stresle ilişkilidir (49, 50). Ancak oksidatif stresin diyabetin bir komplikasyonu mu, yoksa diyabetin diğer uzun dönem komplikasyonlarının bir nedeni mi olduğu konusunda araştırmalar devam etmektedir (49, 51). Son yıllarda yapılan çalışmalar, artmış serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun, birçok hastalığın patogeneğinde rol aldığını göstermektedir. Lipid peroksidasyonu; yağların, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif oksijen bağımlı yıkımı olarak tanımlanabilir (52). Lipid peroksidasyonu sonucu hücre zarının yapısı ve akışkanlığı bozulur, kalsiyum gibi iyonlar hücre içine girer. Kalsiyumun hücre içinde artması sonucu proteazlar aktive olur ve hücre iskeletinde hasar meydana gelir. Kalsiyum endonükleazları aktive ederek DNA kırıklarına da neden olur. Lipid peroksidasyonunun son ürünleri; hidrokarbon gazlar ve toksik aldehitlerdir (53). Aldehitlerden malonildialdehit (MDA) ölçümü lipid peroksidasyonunun göstergesidir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır (53, 54).

Miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (55-61). Diabetes 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 diabet etiyojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (62). Bunlara ilave olarak, uzamış oksidatif stresin ve antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin, diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (63, 64).

ROS düşük konsantrasyonlarda normal hücresel fonksiyon için esansiyel olmalarına rağmen, lipid membranların, DNA (deoksiribonükleik asit)'in ve proteinlerin peroksidasyonuna neden olabilir ve hücresel homeostazı ve fonksiyonları olumsuz yönde etkileyebilirler.  $O_2^{\bullet}$  (süperoksit anyonu),  $\bullet OH$  (hidroksil radikalleri),  $H_2O_2$  (hidrojen peroksit) ve  $ONOO^{\bullet}$  (peroksinitrit) gibi

ROS'nin oluşumu, ROS ile mücadele eden Cat (katalaz), GPx (glutasyon peroksidaz), SOD (süperoksit dismutaz), vitamin E ve GSH (redükte glutasyon) gibi bileşiklerle sınırlandırılır. Hiperglisemi pro- ve antioksidan bileşikler arasındaki dengeyi bozacak değişiklikleri indükleyebilir ve bu da ROS'nin artmış üretimi ve savunma mekanizmalarının yetersizliği ile sonuçlanır (50). Diabetes Mellitusta artan ROS üretiminin hiperglisemi dışındaki nedenleri iskemi, artmış mitokondrial kaçak, katekolamin oksidasyonu ve lökositlerdir (49). Diğer yandan ROS'ni temizleyen bileşiklerin eksikliği ise, diyabetin bu temizleyicilerin üretimi ya da aktivitesi üzerine olan direkt etkisine bağlı olabileceği gibi, bu bileşiklerin ROS tarafından artmış tüketimine de bağlı olabilir (65). Hiperglisemi ROS'nin üretimini birkaç farklı mekanizma ile artırır. Bu mekanizmalar; glukozun otooksidasyonu, protein glikasyonu, PKC aktivasyonu ve polyol yolağıdır (49, 51, 66, 67).

**Glukozun otooksidasyonu:** Geçiş metallerin varlığında, glukozun bir enediol radikal anyonuna dönüşümüdür. Bu radikal moleküler oksijeni indirgerken  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  ve  $H_2O_2$  gibi oksidan araçlar ve  $\alpha$ -ketoaldehydlerin üretimine neden olur. Bu moleküller DNA, proteinler ve lipidler gibi önemli biyomoleküllere zarar verebilirler (49). Ayrıca glukozun otooksidasyonu AGEs'nin oluşumu ile de yakından ilişkilidir (66).

**Protein glikasyonu ve AGEs'nin oluşumu:** Protein glikasyonu glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki kovalent bağlanmalar sonucu meydana gelir. Geçiş metallerin varlığında (demir, bakır vs.) glikasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerin yokluğunda da meydana gelebileceği gösterilmiştir. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan uzun olduğu durumlarda glikasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'ni oluştururlar. Glikasyona uğramış proteinler gibi, AGEs de serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Ayrıca ROS de AGEs'nin oluşumunu hızlandırır (68).

Diyabetik hayvanlarda ve insanlarda ROS ile mücadele eden SOD ve glutasyon redüktaz gibi enzimlerin non-enzimatik glikasyonunun da bu enzimlerin azalmış aktivitelerinden sorumlu olabileceği ve ROS'nin artışına neden olabileceği ileri sürülmektedir (50).

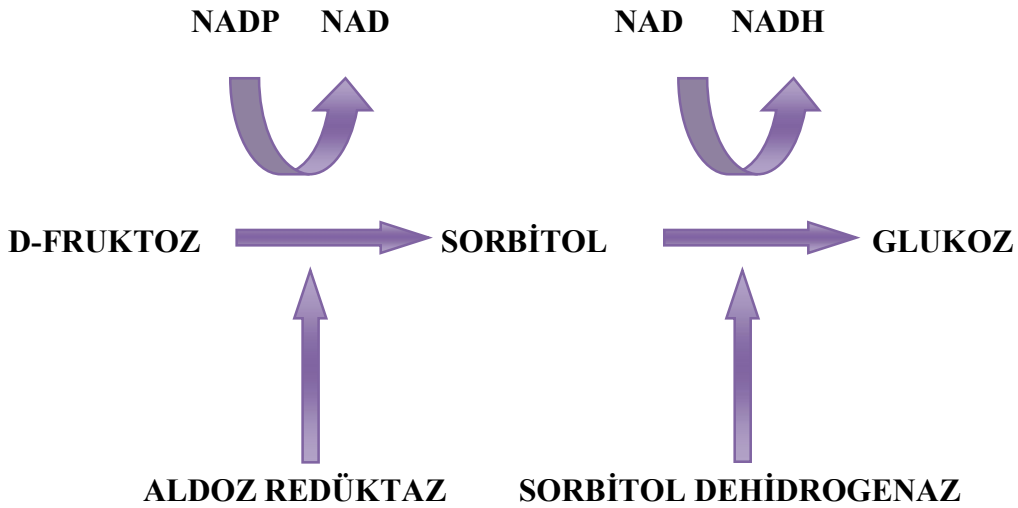
**PKC aktivasyonu:** Hipergliseminin kendisi bazı anahtar hücrel özellikleri değiştirerek ROS'nin mitokondriden aşırı miktarda serbestlenmesine neden olabilir. Hipergliseminin neden olduğu bu değişikliklerden biri PKC'nin aktivasyonudur (69). Diaçilgliserolün de novo senteziyle PKC izoformlarının aktivasyonu, diyabette hasara uğrayan hedef organellerde patolojik gen ekspresyonu ve protein modifikasyonu ile sonuçlanır (70). Yapılan bazı çalışmalarda aldoz redüktaz yolağının aktivasyonunun da diyabetik komplikasyonlara duyarlı bazı dokularda PKC'nin aktivasyonuna katılabileceği rapor edilmiştir (71, 72). Yine aldoz redüktaz yolağının bir sonucu olarak GSH ve taurin gibi antioksidanların miktarındaki azalmanın da PKC'nin aktivasyonunu azaltabileceği gösterilmiştir (66).

**Polyol yolağı:** Hücre içine giren glukoz bir kez fosforile edilip glukoz-6-fosfat'a dönüştüğünde, iki temel yolla metabolize edilir; glikoliz ve pentoz fosfat yolu. Bunlardan pentoz fosfat yolu primer NADPH (redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kaynağıdır (49). Glukozun hücre içi konsantrasyonunun anormal olarak arttığı durumlarda ise polyol yolağı ile metabolize edilir. Polyol yolağında glukoz aldoz redüktaz ile sorbitole indirgenir ve sorbitol de sorbitol dehidrogenazla fruktoza yükseltgenir. Aldoz redüktazın aktivite gösterebilmesi için NADPH'a ihtiyacı vardır. Bu yüzden polyol yolağı aktivitesinin artması intrasellüler NADPH eksikliğiyle sonuçlanır. Glutasyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin de NADPH'a ihtiyacı vardır. Bu yüzden bu kofaktörün intrasellüler eksikliği glutasyon redüktaz aktivitesini azaltarak, serbest radikal aracılı hasarlara karşı korunmada önemli bir faktör olan intrasellüler GSH içeriğinin azalmasına neden olur (68). Aldoz redüktaz inhibitörlerinin kullanıldığı bazı çalışmalarda lipid peroksidasyonunun azaldığı (73) ve eritrosit GSH düzeylerinin arttığı (74) gösterilmiştir. Sorbitol dehidrogenaz aktivitesinin artması ise hücre içi NADH / NAD<sup>+</sup> (redükte nikotinamid adenin dinükleotid / nikotinamid adenin dinükleotid) oranının artmasına neden olur. Bu durum "hiperglisemik psödohipoksi" olarak adlandırılır ve serbest radikal üretiminin artmasına neden olur bu da iskemiyle sonuçlanabilir (49). Bunun ötesinde biriken sorbitol ozmotik stres aracılığıyla mitokondrial disfonksiyona neden olarak, antioksidatif defansı olumsuz yönde etkiler. İntrasellüler bir ozmolit ve endojen bir antioksidan olan ve antioksidatif savunmada rol alan taurinin ve glutasyonun azalmasına neden olur (66). Yine hücre içi ROS'nin aşırı üretimine neden olan bir

başka sebep de glikoliz sonucu oluşan piruvatın kompleks II (süksinatubikinin) düzeyinde mitokondriye olan transportudur (70).

Son zamanlarda, ROS ve oksidatif stresle ilişkili olarak bazı farklı biyokimyasal yollarda da hipergliseminin rolü üzerinde durulmaktadır. Bunlar; nükleer faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), NH<sub>2</sub>-terminal Jun kinazlar / stresle aktive edilen protein kinazlar (JNK/SAPK), p38 mitojenle aktive edilen protein (MAP) kinaz ve heksozaminin stresle aktive edilen yollarıdır (67).

Diyabetin neden olduğu artmış oksidatif stres ve azalmış antioksidan aktivite beynin patolojik olaylara karşı daha duyarlı hale gelmesine neden olur. Deneysel olarak indüklenen hiperglisemide ratların beyinlerinde oksidatif hasarın arttığı gösterilmiştir. Tip 1 diyabetik hastaların serumlarında da süperoksit üretiminin arttığı ve bu artışın glisemik kontrolün etkinliğinin artırılmasıyla azaldığı gözlenmiştir (75). Yine yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyon ürünlerinin de hem Tip 1 diyabetik ratların (75, 65) hem de Tip 2 diyabetik mice'ların beyinlerinde arttığı rapor edilmiştir (75). STZ ile diyabet oluşturulmuş ratlarda beynin antioksidan savunmasında rol alan SOD ve Cat aktivitelerinin düştüğü ancak Tip 2 diyabetik mice'larda ise SOD'nin aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (65).



**Şekil 2.** Polyol Yolunun Şeması (76)

### 1.2.2. Anti-Oksidanlar

ROS'ların oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar “Antioksidan Savunma Sistemleri” olarak bilinirler (Şekil 3).



Şekil 3. Antioksidan Savunma Sistemleri (77)

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon- S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (77).

### 1.3. Apoptozis

Ağaç yapraklarının ağaç gövdesinden ayrılması anlamına gelen ‘apoptosis’ kelimesi, Yunanca’dan köken almıştır ve çok hücreli canlılarda görülen programlı hücre ölümü “Programmed cell death (PCD)” anlamına gelir (78). Fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı terimleri de aynı anlamda kullanılabilen ve literatürde yer alan diğer ifadelerdir.

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskopunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk tanımlanan terim nekroz olmuştur.

1970'li yılların başında, iskekiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan daha farklı olan, yeni hücre ölüm formları olduğu gözlenmiş ve buna programlanmış hücre ölümü diye de tanımlanan apoptosis adı verilmiştir (78, 79). Bu tarihten itibaren de farklı disiplinlerdeki bilim adamları hücre ölümü araştırmalarıyla yakından ilgilenmeye başlamışlardır.

Hücre ölümü genellikle apoptosis ve nekroz olarak iki ana başlık altında sınıflandırılır. Nekroz; pasif, katabolik bir süreç ve her zaman patolojik bir olaydır. Histolojik bulguları mitokondrial ve nükleer şişme, organellerin bozulması, nükleus etrafındaki kromatinin yoğunlaşması şeklinde devam ederek, DNA'nın nükleer ve sitoplazmik membranında bozulma ile giden bir süreçtir (80, 81).

Apoptosis ise nekrozun tersine, multisellüler organizmalarda fizyolojik koşullarda oluşur. Gelişimin normal bir parçasıdır ve enerji gerektiren aktif bir süreçtir (80, 82, 83). Apoptosis değişik doku ve hücre tiplerinde oluşabilecek morfolojik ve biyokimyasal seyri ile kompleks bir olgudur (84, 85). Bununla ilişkili biyokimyasal yollarda, protein faktörlerinin, nöronal yaşam ve ölüm arasındaki dengenin düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları gözlenmiştir (86).

Apoptosisin indüklenmesi birçok hücrenin sitoplazmasında inaktif olarak bulunan kaspaz (cysteinyl aspartate-specific proteinases) adı verilen sitozolik enzimlerin aktivasyonu ile olmaktadır. Lenfositlerde ve diğer birçok hücrede kaspazların aktive olmasıyla oluşan apoptosis iki farklı yolak izler. Bunlardan birisi (intrinsek yolak) mitokondrial değişiklikler ile ilişkilidir ve programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılır. Mitokondrial intermembran boşluğundan serbestlenen sitokrom c intrinsek yolağın başlaması için tetikleyici rolünü üstlenir. Sitozolik sitokrom c, dATP'nin varlığında, apoptosis proteaz aktifleyen faktör-1 (APAF-1)'e bağlanır ve sonuçta kaspaz-9'u aktive eder. Kaspaz-9 intrinsek yol için ilk aktive olan kaspazdır ve bunun aktive olmasıyla kaspaz-3 gibi diğer efektör prosesler aktive olur. Endoplazmik retikulum (ER) fonksiyonlarındaki değişikliklerin intrinsek apoptotik yolağın başlaması için ikinci majör etkiye sahip olduğu bilinmektedir. ER'un protein sentezini, protein trafiğini, strese cevabı ve intrasellüler kalsiyum seviyelerini düzenlemede rol oynadığı bildirilmektedir (87-89).

İkinci yolak olan ekstrinsek yolak, plazma membranındaki ölüm reseptörlerinin sinyalleriyle ilişkilidir ve aktivasyonun indüklediği hücre ölümü

olarak da isimlendirilir. Küçük molekül ağırlıklı ligandların, bir veya daha fazla membrandan eksprese olan ölüm reseptörlerine bağlanması ile tetiklenir. Bu reseptörler için gerekli olan ligandlar; TNF- $\alpha$ , Fas ligand ve TNF apoptosisi indükleyen reseptör ligand (TRIAL)'dır. Aktive olduktan sonra ligandlar ilgili reseptörlere bağlanmaktadır ve bu reseptörler kaspaz-8'i aktive eden bir adaptör protein ile ilişkilidir. Kaspaz-8'in aktivasyonu yolağı başlatıp kaspaz-3 gibi efektör proteazları aktiflemesi sonucu ölümü indükleyen sinyal kompleksini (DISC) oluşturmaktadır (89).

Pasif hücre ölümü, spesifik antijenin tanınması, interlökin-2 (IL-2) gibi büyüme faktörleri ve kositimülasyonların devreye girmesi ile önlenir. Bu uyarıların tümü Bcl ailesinin anti-apoptotik proteinlerinin ekspresyonunu indükler. Bcl ailesi kompleks bir aile olup; pro-apoptotik (Bax, Bid ve Bim) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-xl ve Bcl-w) üyeleri bilinmektedir. Bax, Bid, Bad ve Bim gibi hücre ölümünü provoke eden üyelerin aktive edilmesi sonucu apoptosisin başlatıldığı, Bcl-2 ve onun homoloğu olan Bcl-x'in ise pro-apoptotik proteinlerin serbestlenmesini bloke ederek apoptosisi inhibe ettiği araştırmalar sonucunda gösterilmiştir (90-92).

Apoptosis, deri, bağırsak mukozası ve immün sistem gibi dokulardaki çoğalan hücrelerin sayısını ve sürekliliğini devam ettirmekle kalmayıp aynı zamanda periferik ve merkezi sinir sisteminin gelişiminde de önemli rol oynamaktadır (93). Gelişim esnasında oluşan programlanmış hücre ölümü ilk kez sinir sistemi için tanımlanmıştır (94). Apoptotik hücre ölümü hem akut hem de kronik nörolojik hastalıkların bir özelliğidir (95).

Apoptozis, akut ve kronik düzensiz hücre ölümüyle beraber birçok hastalığa yol açmaktadır. Düzensiz apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar Tablo 3'de gösterilmiştir (96).

**Tablo 3.** Apoptozisin Yer Aldığı Patofizyolojik Durumlar

---

<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Malign ve Pre-Malign Durumlar</b> Solid Tümörler B Hücre Lenfomaları, Kronik Lenfositik Lösemi, Prostat Hipertrofisi, Preneoplastik Karaciğer Odakları, Kemoterapiye Direnç.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İmmun Sistem Bozuklukları</b> AİDS, Tip 1 Diabetes Mellitus, Lupus Eritematozus, Sjogren Sendromu, Glomerülonefritis.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Nörolojik Bozukluklar</b> Felç, Alzheimer Hastalığı, Ataxia Telangiectasia.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>İntestinal Bozukluklar</b> Dizanteri, İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları, Radyasyon ve HIV Enfeksiyonu ile Oluşan Diare.</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Kalp Hastalıkları</b> İskemik Kardiyak Hasar, Kemoterapiyle İndüklenen Miyokardial Baskılanma.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• <b>Böbrek Hastalıkları</b> Polikistik Böbrek Hastalığı, Anemi / Eritropoezis.</li></ul>

---

### 1.3.1. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tesbit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tesbit edilebilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 80'li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya konulmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulundu. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 90'ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlandı. Apoptozisin belirlenmesine yönelik geliştirilen tüm metodları, 2000'li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde olmak üzere kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikorların kullanılarak daha spesifik olarak saptanması takip etti. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (Tablo 4).

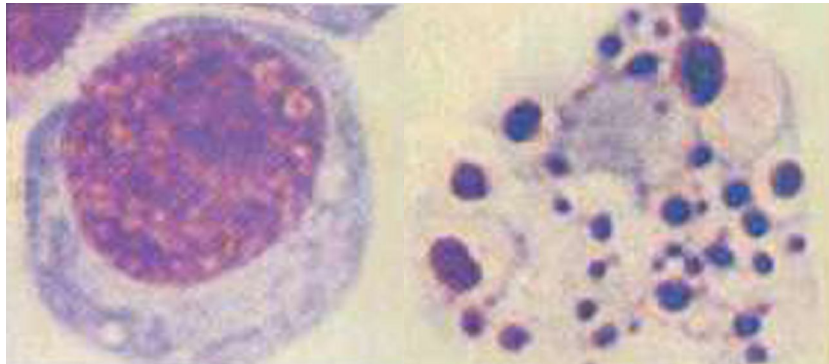
**Tablo 4.** Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

- 
- 
- I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
  - II. İmmünohistokimyasal yöntemler
  - III. Biyokimyasal yöntemler
  - IV. İmmunolojik yöntemler
  - V. Moleküler biyoloji yöntemleri
- 
- 

### 1.3.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

#### 1.3.1.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı

**1. Hematoksilen boyama:** Hematoksilen boyama (HB) hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metod olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk değerlendirme, maliyet) diğer metodlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir. Gözlenebilen değişiklikler şunlardır: hücre küçülmesi "celi shrinkage", veya sitoplazmik küçülme "cytoplasmic shrinkage", kromatinin kondanse olması "nuclear condensation" ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi "pyknosis" veya parçalara bölünmesi "nuclear fragmentation" (97) (Şekil 4).



**Şekil 4.** Normal ve Apoptotik İnsan Lökosit Hücresi

**2.Giemsas boyama:** Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (97).

#### **1.3.1.1.2. Floresan Mikroskopu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı**

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile yaşayan hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn. Hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn. propidium iyodur) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodur gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Kuşkusuz bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozis veya nekrozis ile ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (97).

#### **1.3.1.1.3. Elektron Mikroskopu:**

Elektron mikroskopu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar da (örn. mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi) incelenebilir. Elektron mikroskopu çalışmalarında, nükleus fragmentasyonu net olarak izlenebilir, apoptotik hücrede, normal hücreyle kıyaslandığında sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilmektedir (97).

#### **1.3.1.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu:**

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır (97).

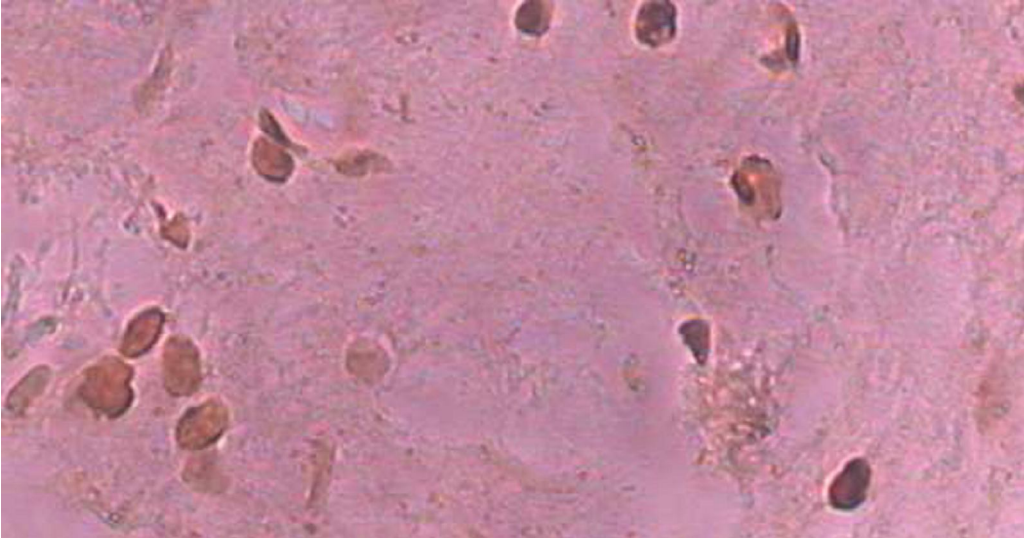
#### **1.3.1.2. Histokimyasal Yöntemler**

##### **1.3.1.2.1. Anneksin V Yöntemi:**

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (97).

##### **1.3.1.2.2. TUNEL Yöntemi**

DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı bu metodla saptanabilir (97).



**Şekil 5.** TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü

##### **1.3.1.2.3. M30 Yöntemi**

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal

yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (97).

#### **1.3.1.2.4. Kaspaz-3 Yöntemi:**

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 IHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (97).

#### **1.3.1.3. Biokimyasal Yöntemler**

##### **1.3.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi**

*DNA Fragmentasyonu:* DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (97).

##### **1.3.1.3.2. "Western" Blotting**

- *Substrat kırılmaları*
- *Aktif kaspazın belirlenmesi*
- *Sitokrom c salıverilmesi*

Bu metod yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür, sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (97).

##### **1.3.1.3.3. "Flow" Sitometri**

- *DNA azalması*
- *Annexin V*

"Flow" sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır;

1. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
2. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir (97).

#### **1.3.1.4. İmmünolojik Yöntemler**

##### **1.3.1.4.1. ELISA**

- *DNA fragmentasyonu*
- *M30 düzeyi*

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre popülasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (97).

##### **1.3.1.4.2. Flourimetrik Yöntem**

- *Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)*

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (97).

#### **1.3.1.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri**

##### **1.3.1.5.1. DNA Microarrays:**

*Gen ekspresyon dereceleri (mRNA)*

- Hücre ölüm reseptörleri

- Kaspazlar

DNA "microarray" teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (97).

#### **1.4. Vitamin D ve Biyolojik Etkileri**

Vitamin D önemli bir metabolit olarak kabul edilmektedir. Vitamin D ve metabolitlerinin hücre proliferasyonunu azaltarak apoptozisi düzenlediği, malign hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını kontrol ettiği iddia edilmektedir. Ayrıca kemik ve kalsiyum metabolizmasına selektif olarak etki etmekte ve immün sistemin düzenlenmesinde rol almaktadır (98). Multiple Skleroz gibi bazı hastalıkların progresyonunu yavaşlatmaktadır (99). Vitamin D immünmodülatör etkisini antijen sunan hücreler ve T hücreleri tarafından sunulan vitamin D reseptörü aracılığıyla yapmaktadır (100).

##### **1.4.1. Vitamin D'nin Biyokimyası ve Fizyolojisi**

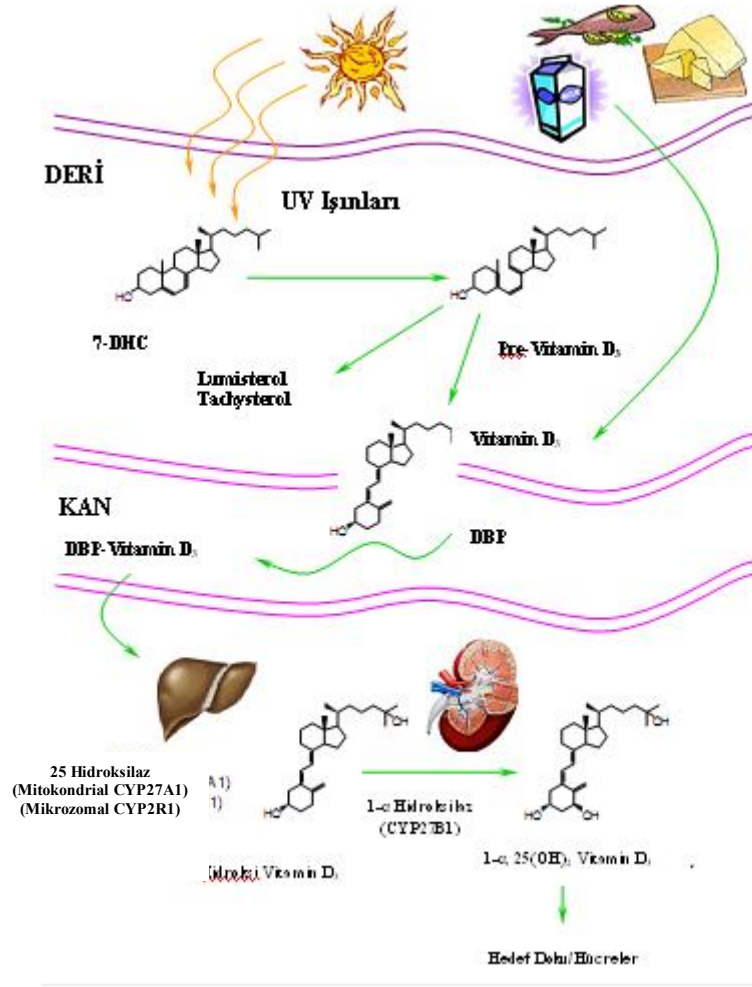
Vitamin D'nin 37 tane metaboliti mevcuttur ve bunlardan en iyi bilinen iki formu Vitamin D<sub>3</sub> (kolekalsiferol-C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O) ve Vitamin D<sub>2</sub>'dir (ergokalsiferol-C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O) (101). Vitamin D<sub>3</sub> üç adet çift bağa sahiptir ve erime noktası 84-85° C'dir. UV absorpsiyonu ise 265 nm'de maksimumdur. Suda çözünmez (102). Vitamin D<sub>2</sub> ise dört adet çift bağa sahip olup kaynama noktası 121° C'dir. UV absorpsiyon ve çözünübilirlik özellikleri D<sub>3</sub> ile aynıdır (101). Vitamin D ısıya, ışığa ve saklama koşullarına karşı duyarlıdır. Vitamin D<sub>3</sub> hayvansal kaynaklıdır; sentezi ultraviole ışınları yardımıyla deride gerçekleşir, Vitamin D<sub>2</sub> ise bitki ve mantarlardan elde edilir. Vitamin D yan zincirindeki farklılık nedeniyle değişik formlara sahiptir ve biyolojik olarak inaktiftir. Vitamin D'nin 25 hidroksi (25(OH)D) ve 1, 25 dihidroksi (1 $\alpha$ , 25 (OH)<sub>2</sub>D) metabolitleri mevcut olup bunlardan 1 $\alpha$ , 25 dihidroksikolekalsiferol (Vitamin D<sub>3</sub>) aktif formdur. Yapılan araştırmalar insan vücudunda vitamin D<sub>3</sub>'ün vitamin D<sub>2</sub>'ye göre çok daha etkili olduğunu göstermiştir (103, 104).

#### 1.4.2. Vitamin D'nin Metabolizması ve Fonksiyonları

Vitamin D, derinin 290-315 nm dalga boyunda ultraviyole ışınlarına maruz kalması ile sentezlenir (105). RDA (alınması tavsiye edilen günlük doz) kişinin vücut yüzeyinin güneşe 30 dakika maruz kalması ile sağlanabilir (106). Vitamin D<sub>3</sub>, %80'in üzerinde derinin epidermis tabakasında, %20 kadarı ise dermis tabakasında sentezlenir (107). Vitamin D, safra asitlerinin varlığında ince bağırsaktan absorbe olur ve lenfatik sistem yoluyla dolaşıma katılır. Bu özelliği nedeniyle Vitamin A'ya benzerlik göstermektedir.

Vitamin D deride 7-dehidrokolesterol'den güneş ışığı yardımı ile sentezlenmektedir. Karaciğer-de 7-dehidrokolesterol 25-hidroksi-vitamin D<sub>3</sub>'e, daha sonra böbrekte vitamin D<sub>3</sub>'e dönüşmektedir. Vitamin D<sub>3</sub> yeterli miktara ulaştığında böbrekte 24, 25 dihidroksi-vitamin D (24, 25 (OH)<sub>2</sub>D)'e dönüşmekte ve ardından katabolize edilmektedir (101). Vitamin D, bağırsaklar tarafından absorbe edildikten sonra karaciğer tarafından hızla alınır ve depolanır. Kanda diğer dokulara göre daha yüksek konsantrasyonda vitamin D bulunduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda insan vücudunda en çok yağ dokusunda, daha sonra ise kas dokusunda vitamin D depolandığı bildirilmiştir (102). D vitamininin katabolizması net değildir fakat vitamin D ve metabolitlerinin atılımına primer olarak safra tuzları ile feçeste rastlanmıştır. İdrarda ise az miktarda bulunmuştur (101).

Vitamin D'nin metabolitleri kanda vitamin D bağlayıcı proteine (DBP) bağlı olarak dolaşır. Bu protein albumine benzerdir ve 25 (OH)D, 1α, 25 (OH)<sub>2</sub>D ile 24, 25 (OH)<sub>2</sub>D'ye yüksek oranda afinite gösterir. Aktif metabolit vitamin D<sub>3</sub> hücreye girer ve nükleer vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. Bu kompleks retinoid reseptörüyle bir heterodimer oluşturur ve ilgili gen üzerindeki vitamin D duyarlı elemente bağlanır. Bu olayı transkripsiyon, translasyon takip eder ve kalsiyum bağlayıcı protein veya osteokalsin gibi proteinler meydana gelir. Nükleer VDR'ler kas, deri, hematolenfopoietik ve sinir doku ile üreme, endokrin sistem dokularında mevcuttur. Ancak osteoklast hücrelerinde nükleer VDR bulunmadığından vitamin D<sub>3</sub> bu hücreleri indirekt veya non-genomik bir mekanizma ile etkilemektedir. Benign, hiperplastik ve malign epitelyal ve fibroblastik dokularda da vitamin D<sub>3</sub> reseptörü mevcuttur.



Şekil 6. Vitamin D'nin Metabolizması

Birçok onkogen ürününü içeren elliden fazla proteinin vitamin D<sub>3</sub> tarafından düzenlendiği bilinmektedir (102).

Vitamin D<sub>3</sub>'ün aktif kalsiyum transportu üzerindeki klasik etkisi ise bağırsak hücrelerinde gerçekleşmektedir. Kalsiyum hücreye membran proteinleri aracılığıyla girmektedir. Bağırsak hücresinde vitamin D<sub>3</sub>, vitamin D reseptörüne bağlanmakta ve kalsiyum bağlayıcı protein sentezlenmektedir, bu da hücrede aktif transportu düzenlemektedir. Kalsiyum ATP-bağımlı bir mekanizma ile ekstraselüler sıvıya geçmektedir. Vitamin D<sub>3</sub> kemik, bağırsak, böbrek gibi hedef organlar üzerindeki etkisini göstermekte ve bu organlardan kana kalsiyum geçişini uyarmaktadır. Vitamin D<sub>3</sub>'ün üretimi paratiroid hormonu (PTH) tarafından uyarılmaktadır. PTH seviyesinin düşmesine neden olan negatif geribildirim mekanizması kalsiyum

sayesinde olmaktadır. Diğer bir deyişle vitamin D, plazma membran reseptörleri ve MAP kinaz ya da siklik AMP gibi ikincil mesajcılar aracılığı ile de işlevini yerine getirmektedir (104).

Vitamin D hem hormon hem de vitamin olarak nitelendirilebilir. Vitamin D kanda insülin seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar, şeker metabolizmasını destekler. Vitamin D güçlü antiproliferatif, prodiferansiyatif, ve immunomodülatör etki göstermektedir (100).  $1\alpha, 25(\text{OH})_2$  dihidroksikolekalsiferol kalsiyum bağlayıcı proteinin sentezini uyararak kalsiyumun bağırsak hücrelerince emilimini artırır. Serum kalsiyum seviyesini artırır, böylece kalsiyum kemiklerde depo edilir. Kemik rezorpsiyonuna neden oluyormuş gibi görünse de sonuçta kemiklerde kalsiyum depolanmasını arttırmaktadır.

Östrojen hormonu  $1\alpha, 25(\text{OH})_2$  vitamin D üzerinde etkilidir.  $1\alpha, 25(\text{OH})_2$  östrojen salınımı ile artar, buna bağlı olarak kalsiyum absorpsiyonu da indirekt olarak artar. Dolayısıyla östrojen hormonu vitamin D reseptör fonksiyonunun düzenlenmesinde görev almaktadır denilebilir (108).

Yapılan çalışmalar vitamin D metabolitlerinin dendritik ve Th1 hücrelerinin downregülasyonuna etki etmek suretiyle makrofaj hücrelerinin antijen sunma kapasitesini arttırdığı dolayısı ile DM Tip 1'e karşı koruyucu özellik gösterdiğini ortaya koymuştur. Populasyon çalışmaları vitamin D seviyesi yüksek bireylerde DM Tip 1 ve 2'ye yakalanma riskinin azaldığını göstermektedir (109). Ayrıca Non-obez diyabetik farelerde vitamin D<sub>3</sub> ve analoglarının kullanımı başlangıç fazında görülen insülitis tablosunun klinik diyabete ilerlemesini engeller (110). Yaşamın erken dönemlerinde vitamin D eksikliği ve raşitizm gelişen çocuklarda, daha ileri dönemde diyabet gelişme riski 3 kat artmıştır (111). Buna karşılık yaşamın erken döneminde vitamin D alımı ile Tip 1 diyabet gelişme riski arasında da ters ilişki gösterilmiştir (112).

NOD farelerde vitamin D tedavisiyle regülatör hücrelerde artma ve lenfositlerde Th1 fenotipinden Th2 fenotipine kayma belirlenmiştir. Koruyucu Th2 populasyon sadece beta hücreleri çevresinde değil, periferik immün sistemde de saptanmıştır (113). Vitamin D verilen NOD farenin, diyabete spesifik bir otoantijen ile immünizasyonu sonrası, drene edilen lenf bezlerinden izole edilen lenfositlerde artmış IL-4 ve azalmış IFN- $\gamma$  üretimi, invitro ve invivo olarak gösterilmiştir (113).

Vitamin D ile indüklenen bu immün yanıt, pankreatik otoantijenlere sınırlıdır ve ovalbumin gibi adacık hücreleri ile ilişkisi olmayan bir antijen ile immünizasyon sonrası gözlenmez. Vitamin D uygulanması ile lenfositlerde ve dentritik hücrelerdeki defektif apoptozis duyarlılığının restore edilmesi, otoreaktif T hücre klonlarının eliminasyonunu uyararak otoimmün diyabet gelişimine karşı koruyucu rol oynar. Uzun dönem koruma sağlayan ve Tip 1 diyabet gelişimi öncesi uygulanan steroidler de benzer mekanizmayla etkili olmaktadır (110).

Vitamin D<sub>3</sub> non-genomik etkisini osteoblast ve osteoklast hücrelerinde Ca<sup>2+</sup> kanallarının açılmasını sağlayarak, karaciğerde lipid metabolizmasına etki ederek, kaslarda ise pek çok yoldan göstermektedir. Vitamin D eksikliğinde kaslarda zayıflık veya miyopati gözlenmektedir. Miyoblast ve iskelet kası hücre kültürleri ile yapılan çalışmalar vitamin D<sub>3</sub> formunun kalsiyum taşınmasına direkt olarak etkili olduğunu göstermiştir. Vitamin D<sub>3</sub> formunun kalp kası fonksiyonlarının yerine getirilebilmesi için önem taşıdığı bilinmektedir (102).

Birçok gen fonksiyonu vitamin D<sub>3</sub> tarafından düzenlenmektedir. Bu genlere örnek olarak osteokalsin, osteopontin, kalbindin, 24-hidroksilaz, karbonik anhidraz verilebilir (102, 114). Öteki taraftan, vitamin D IL-2 ve IL-12 gibi inflamatuvar markerları azaltmakta ve antiproliferatif etki göstermektedir. Sitokinlerin etkisi ile ekstrarenal hücreler ve dokularda 25(OH)D formu hidroksillenerek 1, 25(OH)<sub>2</sub>D formuna dönüşmektedir. Bu ekstrarenal vitamin D<sub>3</sub> formu hücrel farklılaşma sırasında parakrin regülasyon için önemlidir. Vitamin D etkisi ile gen ürünlerinin azalmasına örnek olarak T lenfositlerdeki  $\gamma$ -interferon ile böbrek ve bağırsak hücrelerindeki sitokrom b verilebilir (102).

Vitamin D, T hücresi gelişimi için fizyolojik bir regülatör görevi yapmaktadır. Bu görevini Th1 hücrelerini negatif, Th2 hücrelerini ise pozitif yönde düzenleyerek yapar. Böylece Th1 ve Th2 hücreleri arasındaki denge sağlanmaktadır. T hücrelerinde, vitamin D<sub>3</sub> formu T helper 1 (Th1) hücrelerinin proliferasyon hızını düşürmekte ve sitokin sekresyonunu azaltmaktadır (115, 116).

Vitamin D<sub>3</sub> formunun hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev aldığı hatta G1 fazına etki ettiği düşünülmektedir. Birçok siklin ve siklin bağımlı kinaz vitamin D<sub>3</sub> formuna karşı muhtemel bir cevap vermekte, transkripsiyon faktörleri de olaya dahil olmaktadır. DNA replikasyonu ve tamirinde görev yapan bir grup gen bu

şekilde aktive olmaktadır (98). Pankreasta insülin sekresyonunun normal bir şekilde yapılabilmesi için vitamin D<sub>3</sub> formunun gerekli olduğu ratlarda yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Vitamin D<sub>3</sub> formu pankreas β hücreleri fonksiyonunu direkt olarak etkilemektedir (102).

D vitamini analogları doku transplantasyonu sonrasında kullanıldığında dokunun vücut tarafından reddini engellemeye yardımcı olduğu, enfeksiyonlara olan yatkınlığı azalttığı ve vücut direncini artırdığı gözlenmiş, bu vitaminin ileride potansiyel bir tedavi aracı olabileceği kanaatine varılmıştır (117).

Kalsiyum alımı kan sitozolik basıncını düşürmektedir. Vitamin D<sub>3</sub> ve kalsiyumun kısa süreli birlikte alınması tek başına kalsiyum alınmasından daha etkili olmuştur (118).

#### **1.4.3. Vitamin D Kaynakları**

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

**Besinsel kaynaklar:** Hayvansal kaynaklı besinlerden; balık yağı, tereyağı, yumurta sarısı, süt, sebzelerden; koyu yapraklı yeşil sebzeler ve mantar vitamin D'den zengindir. İnsan sütü de 25 hidroksikolekalsiferol içermektedir. Bu durum yeni doğanlarda karaciğerin kolekalsiferolün ilk hidroksilasyonunu yapabilecek kadar gelişmemiş olmasından ileri gelir (102).

#### **1.4.4. Vitamin D'nin Nöroprotektif Etkileri**

Pek çok çalışma D vitamininin sinir sistemi hücrelerinin modülasyonu ve nörotropinlerin üretimi üzerine etkisini göstermiştir. Örneğin NGF sentezi (119, 120, 121) Nörotropin 3 (NT3) (122) ve glial cell line- derived nörotrofik factor (GDNF) (123) vitamin D<sub>3</sub> tarafından upregülasyona uğrar ve NT4 (122) downregülasyon gösterir. Pekçok vakada vitamin D'nin Nörotrofin üretim stimülasyonu nöroprotektif etki ile korelidir (124, 125). Bu bağlamda vitamin D yakın geçmişte farelerde 6-hidrodoamin artışına bağlı gözlenen hipokinezi ve nörotoksititeyi azaltmada önemlidir (126). Bu datalar, vitamin D<sub>3</sub> veya onun sentetik analogunun nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde uygun olabileceğini gösterir. Vitamin D<sub>3</sub> nörotrofin sentezi üzerine etkisine ek olarak nöronal Ca hemostazının modülasyonu aracılığıyla da nöroprotektif etkilerini gerçekleştirir. Son çalışmalara göre;

hipokampal nöronlardaki voltaja duyarlı L-tipi Ca kanallarının downregülasyonunda vitamin D<sub>3</sub> ün varlığı yine nöroprotektif etkisi ile ilişkilendirilmiştir (127). Bir başka yolda vitamin D<sub>3</sub> parvalbümin gibi Ca bağlayıcı proteinlerin sentezini arttırarak nöroprotektif etkisini göstermektedir (128). Vitamin D<sub>3</sub>'ün Alzheimer Hastalığı, Parkinson, AIDS, MS, deneysel otoimmün ensefalomyelit gibi çeşitli hastalıklarda nöronal ve non-nöronal hücreleri uyaran bir enzim olan iNOS'un sentezini inhibe ettiği raporlanmıştır (129, 130). iNOS NO sentezler, biyolojik etkilerinden herhangi biri de nöronlar ya da oligodentrositlerin her ikisinin de hasarında yüksek düzeylerde üretilir (131, 132). Benzer şekilde, vitamin D<sub>3</sub> ile tedavi edilmiş, M-CSF ve TNF- $\alpha$ 'yı şifreleyen mRNA nın düzeylerinin yüksek olduğu astrositlerde kısmi bir azalma görülür (133). Vitamin D<sub>3</sub>'ün aynı zamanda farelerin beyindeki gama glutamil transpeptidaz aktivitesinin upregülasyonunu ve ilgili genin ekspresyonunu sağladığı rapor edilmiştir (134, 135).

#### **1.4.5. Nörotransmitter Biyosentezi**

Fare beyin nükleuslarında vitamin D<sub>3</sub> tedavisi sonucunda kolinasetiltransferaz aktivitesini arttırmasının bulunuşu, bu hormonun ön hipofiz lob fonksiyonları üzerine etkili olabileceğini düşündürdü (136). Bir başka çalışma vitamin D<sub>3</sub> eksikliğinin farelerde kortexte dopamin konsantrasyonunu arttırdığı raporlanmıştır (137). Vitamin D<sub>3</sub>'ün aynı zamanda adrenal kromaffin hücrelerinde tirozin hidroxilaz gen ekspresyonunu da arttırması ilgi çekmiştir (138). Çünkü katekolamin sentezinde hız kısıtlayıcı enzim tirozin hidroxilazdır.

#### **1.4.6. Vitamin D<sub>3</sub> ve Santral Sinir Sistemi Hastalıkları**

##### **1.4.6.1. Santral Sinir Sistemi Tümörleri**

Vitamin D<sub>3</sub>'ün kanser tedavisindeki potansiyel rolü ilk kez 1981'de myeloid lösemi de tanımlanmıştır (139). Daha sonra bu diğer malignitelerde, örneğin meme, kolon, prostat gibi genişletilmiştir. Bu antiproliferatif özellikleri, kalsemik aktiviteyi azaltan kanser hücrelerinin büyümelerini engelleyici farmakolojik analogların gelişmesini doğurmuştur. SSS tümörlerinde vitamin D'nin değişik sentetik analogları glioma hücrelerindeki hücrelerin ölümü yolunu uyarıcı olması konusunda efektiftir (140-142). Bu etki VDR gen ekspresyonuna ihtiyaç duyar (143) ve vitamin D<sub>3</sub> tarafından P75 reseptörünün upregülasyonuna katılır (144, 145). Buna paralel olarak

vitamin D<sub>3</sub> fare C6 glioma hücrelerinde tenascin-c sentezini inhibe eder ki bu extraselüler matrix proteini olup growth-promoting (büyümeyi uyarıcı) invaziv ve pro-onkojenik özelliklerde rol oynar (146) ve M-CSF ve LİF gen ekspresyonunu arttırır (133). Bu beyinle ilişkili vitamin D<sub>3</sub> antikanser aktivitenin alternatif mekanizmalarını düşündürmektedir. Son olarak vitamin D<sub>3</sub>'ün glioma hücrelerine sensitivitesi cerrahi spesmenlerden alınan birincil kültürler ve çeşitli glioma hücre kesitleriyle genişletilmiştir (147). Glioblastoma tedavisinde vitamin D<sub>3</sub> terapisinin faydalı etkileri Faz 2 klinik çalışmalarda raporlanmıştır (148). Ek olarak gliomanın tedavisiyle sırasında, tümör hücrelerinin yakınındaki mikroglial hücrelerde vitamin D'nin lokal sentezi glioma hücrelerinin proliferasyonunun kontrolüne katkıda bulunur (149).

#### **1.4.6.2. Santral Sinir Sistemi'nin Otoimmün ve İnflamatuar Hastalıkları**

Vitamin D<sub>3</sub>'ün MS'in hayvansal modelindeki Deneysel Allerjik Ensefalomyelit'in (EAE) önleyici bir faktörü olduğu uzun zamandır bilinmektedir (150). Hem ratlarda (151) hem de farelerde (152) klinik belirtilerin başlangıcından sonra uygulandığı zaman EAE'nin progresyonunun geri dönüşümlü olarak bloke edildiği son zamanlarda rapor edilmektedir. Bundan dolayı vitamin D eksikliği farelerde EAE nin klinik belirtilerini agra ve etmektedir (152). Bu modellerde hormon tedavisinin yararlı etkileri antijen ekspresyonunda bir inhibitör olan CD 4'ün (151) İL-12'nin Th1 bağımlı hücrelerin gelişiminde (153) ve santral sinir sisteminde iNOS sentezine (129) eşlik etmektedir. Benzer şekilde iNOS sentezleyen mRNA'nın ve proteinlerin azalması vitamin D'nin eksikliğinde hipokampal inflamasyonun olduğunu göstermiştir (130). Buna karşın vitamin D<sub>3</sub> ile EAE'nin kütatif tedavisinden sonra iki ensefalotojenik sitokin olan TGF-B ve İL-4 seviyelerinde fare modellerinde artış olduğu gösterilmiştir (154). İmmün sistem hücrelerinin SSS'deki koruyuculuğu beyindeki inflamatuvar immün sistem hastalıklarında vitamin D<sub>3</sub> için potansiyel hedef olarak açıklanabilmektedir fakat SSS hücrelerinden olan mikroglial hücreler ve astrositlerin EAE ya da beyin inflamasyonu süresince hormona yanıt vermektedir (129, 130, 151). Bunun SSS'deki vitamin D<sub>3</sub>'ün nöromodülatör etkilerinin bu hormonun ve onun analoglarının muhtemel bir yararlı etkisi (ve benzer analoglarının) MS'in gerilemesine etkili olabileceği ileri sürülmektedir (155, 156).

#### **1.4.6.3. Serebral İskemi**

Vitamin D<sub>3</sub> tedavisinin 8. gününde erişkin ratlarda orta serebral arter ligasyonuna bağlı enfarkt miktarında azalma olmaktadır. Bu etkinin önemli derecede GDNF artışıyla korele olduğu ve bundan dolayı bu nörotrofin artışına neden olduğu varsayılmaktadır (124).

#### **1.4.6.4. Nörodejeneratif Hastalıklar**

Alzheimer Hastalığında hipokampal CA1 ve CA2 piramidal hücrelerinde VDR kodlayan mRNA seviyelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (157). Bu gözlemlerde vitamin D'ye bağlı Nörotrofin sentezi ya da detoksifikasyon yollarında nöronal hücrelerin küçük bir kısmında lokal olarak etkileyebileceğine dair ihtimaller artmaktadır. Streptozosinle deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda NGF sentezinde bir defisit olduğu rapor edilmiştir. Vitamin D<sub>3</sub> analogları hayvanlara verildiği zaman NGF'nin koruyuculuğunu ve nörotrofik defisitlerin önlenmesinde artış sağlamaktadır.

#### **1.4.6.5. Diabetik Periferel Nöropati**

Streptozosinle diabetik ratların deneysel modellerinde NGF sentezinde eksiklik rapor edilmiştir, vitamin D<sub>3</sub> ve analoglarıyla tedavi altındaki hayvanlarda NGF üretiminin arttığı ve nörotrofik defisitlerin önlendiği görülmüştür (125).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile birlikte yapıldı ve çalışmanın etik onayı, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan alındı.

### 2.1. Deney Hayvanları

Deneyselerde kullanılan en az 8 haftalık erişkin BALB-C cinsi erkek fareler, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi (FÜDAM) Hayvan Laboratuvarı'nda buldukları ortamın sıcaklığı 22-25 °C arasında sabit tutuldu ve hayvanlar 12 saat ışık altında ve 12 saat karanlıkta takip edildi. Fareler havalandırma sistemi bulunan bir ortamda özel olarak hazırlanmış ve her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Yemler özel çelik kaplarda, su da paslanmaz çelik bilyeli biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Deney hayvanları Elazığ Yem Fabrikası'nda özel olarak hazırlanan pelletler halindeki fare yemleriyle beslendi. Farelere verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 5'de belirtilmiştir. Farelerin deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

**Tablo 5.** Deney hayvanlarına verilen fare yeminin terkibi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29, 4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0, 6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0, 2
Methionin (%)	0, 2
DCP (%)**	1, 6

\*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D<sub>3</sub>, 12 mg E, 0, 8 mg K<sub>3</sub>, 0, 8 mg B<sub>1</sub>, 2, 4 mg B<sub>2</sub>, 1, 2 mg B<sub>6</sub>, 0.006 mg B<sub>12</sub> vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3, 2 mg Cal. D. Panth. 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0, 8 mg I, 0, 2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

\*\*% 18 fosfor, %25 kalsiyum, %0, 2 flor'dan oluşur.

## 2.2. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 14 adet farede diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 180 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal olarak 0, 4 ml (0, 1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4, 5) çözdürülerek intraperitoneal enjeksiyonla tek doz olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçümü sonucu açlık kan glukozu > 250 mg/dl'yi geçen fareler, diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile yapıldı. Farelerin açlık kan glukoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 9-10 arasında alındı.

## 2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneysel çalışmalar, toplam 21 adet fare üzerinde gerçekleştirildi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Fareler; kontrol (Grup I), diyabetik (Grup II) ve diyabet + vitamin D (Grup III) olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

**1. Grup (n=7) kontrol grubu:** 12 haftalık deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

**2. Grup (n=7) diyabet grubu:** 180 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilip 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

**3. Grup (n=7) diyabet + vitamin D grubu:** 180 mg/kg dozunda, sodyum-sitrat tamponunda çözülmüş tek doz intraperitoneal (İP) streptozotosin verilip 72 saat sonra kuyruk veninden kan şekeri 250 mg/dl üzerinde olan bu hayvanlara diyabet oluşumu itibariyle 12 hafta boyunca vitamin D Devit-3 oral damla (Deva Holding, İstanbul, Türkiye) 50IU/kg/gün oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde ağırlık değişimleri ve glukoz düzeyleri kaydedildi.

## **2.4. Örneklerin Alınması**

Tüm gruptaki fareler deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından farelerin beyin dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan beyin dokuları biyokimyasal çalışma için -80C<sup>o</sup>'de saklandı. Histolojik çalışma için ise % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

## **2.5. Biyokimyasal Çalışma**

### **2.5.1. Kan glukoz düzeyleri**

Kan glukoz düzeyleri çalışma süresince glukometre (Glucostix (Myles, Eckhart, IN) ile ölçüldü.

### **2.5.2. Beyin dokusunda TAS, TOS ve OSI ölçümü**

TAS ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan total antioksidan aktivite metodu kullanılarak yapıldı (158). Ölçümün sonuçları  $\mu\text{mol Trolox equivalent/l}$  olarak birimlendirilmiştir.

TOS ölçümü Özcan Erel tarafından tanımlanan yöntemle yapıldı (159). Ölçümün sonuçları  $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L}$  olarak birimlendirilmiştir.

OSİ değeri TAS ve TOS değerlerinin % oranı olarak kabul edildi. Öncelikle TAK değerleri  $\text{mmol/L}$  ye çevrildi. OSİ değeri Formula yöntemine göre hesaplandı (160).  $\text{OSI (Arbitrary Unit)} = \text{TOS (mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq/L)} / \text{TAK (mmol Trolox Equiv./L)}$ .

## **2.6. Histolojik Çalışma**

Her gruptan alınan beyin dokuları, % 10'luk formaldehit tespit solüsyonunda 24 saat süresince tespit edildikten sonra musluk suyu altında yıkamaya alındı. Musluk suyunda 24 saat yıkanan dokular daha sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 6). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6  $\mu\text{m}$  kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E ) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH–2) incelenip fotoğraflandı.

**Tablo 6.** Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	.....

### 2.7. İmmünohistokimyasal Çalışma

Beyin dokusunda bax immünreaktivitesinin belirlenmesi için Avidin-Biotin-Peroksidaz Kompleksi yöntemi uygulandı. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 7).

**Tablo 7.** İmmünohistokimyasal boyama prosedürü

Sıra	İşlem	Süre
1	Xylol I	10 dakika
2	Xylol II	10 dakika
3	Xylol	10 dakika
4	% 100 Alkol	10 dakika
5	% 96 Alkol	10 dakika
6	% 80 Alkol	10 dakika
7	Distile su	5 dakika
8	Mikrodalga	7+5 dakika
9	Oda ısısında soğutma	20 dakika
10	PBS (Phosphate Buffered Saline)	3X5 dakika
11	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 dakika
12	PBS	3X5 dakika
13	Normal blok solüsyonu	5 dakika
14	Primer antikor	60 dakika
15	PBS	3X5 dakika
16	Sekonder antikor	30 dakika
17	PBS	3X5 dakika
18	Streptavidin HRP (Horse radish peroksidaz)	20 dakika
19	PBS	3X5 dakika
20	AEC (3-Amino-9-ethyl carbazole)	5 dakika
21	Distile su	5 dakika
22	Zıt boya olarak Mayer's hematoksilen	10 saniye
23	Akarsu	5 dakika
24	Özel kapatma maddesi ile kapatma	.....

Parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (Bax mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-7480, California, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (biyotinli anti-mouse IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz ve 3-Amino-9-ethyl carbazole kromojeni uygulandıktan sonra Mayer's hematoksilenle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. Sitoplazmik immün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 8).

**Tablo 8.** İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Çok az
+2	Az
+3	Orta
+4	Şiddetli

## 2.8. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 9). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal,

kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı.

**Tablo 9.** TUNEL boyama prosedürü

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.	.....
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokağı (% 3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme ) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer ( 2ml ) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	.....

## 2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama  $\pm$  standart hata olarak belirlendi. Elde edilen verilerin istatistiksel anlamlılık düzeyleri student *t* ve ANOVA testi ile belirlendi.  $p < 0.05$  değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Klinik Bulgular

Grup I'e ait farelerin vücut ağırlıklarında deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Grup II ve Grup III'de ise Grup I ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ( $p<0.05$ ) (Tablo 10).

**Tablo 10.** STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final ağırlık değerleri

	Grup I (n=7)	Grup II (n=7)	Grup III (n=7)
Başlangıç vücut ağırlığı (gr)	29, 4±1, 21	30, 2±1, 28	30, 4±2, 11
Final vücut ağırlığı (gr)	39, 4±1, 66 <sup>a</sup>	28, 4±1, 91 <sup>b</sup>	31, 6±1, 56 <sup>b</sup>

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

#### 3.2. Biyokimyasal Bulgular

##### 3.2.1. Kan glukoz düzeyleri

Grup II ve Grup III'e ait farelerin kan glukozu değerlerinde deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı ( $p<0.001$ ). Grup I ile kıyaslandığında Grup II ve Grup III'e ait farelerin kan glukozu değerlerinde deneyin sonunda anlamlı bir artış vardı ( $p<0.001$ ). (Tablo 11)

**Tablo 11.** STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve final kan glukoz değerleri

	Grup I (n=7)	Grup II (n=7)	Grup III (n=7)
Başlangıç kan glukozu (mg/dl)	98, 40 ± 3, 85	104, 40 ± 5, 81	97, 40 ± 7, 60
Final kan glukozu (mg/dl)	96, 00 ± 8, 57	417, 20 ± 11, 57 <sup>a, b</sup>	413, 20 ± 13, 17 <sup>a, b</sup>

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.001$ ).

##### 3.2.2. TAS, TOS VE OSI değerleri

Beyin dokularında TAS ve TOS miktarları ve OSI nin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; gruplar arasında TAS için anlamlılık yoktu. TOS ve

OSİ de ise Grup I ile kıyaslandığında Grup II’de anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Grup III’de ise Grup II ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ( $p<0.05$ ). (Tablo 12)

**Tablo 12.** Beyin dokularındaki TAS, TOS ve OSI değerleri

	<b>Grup I (n=7)</b>	<b>Grup II (n=7)</b>	<b>Grup III (n=7)</b>
TAS ( $\mu\text{mol Trolox equivalent/l}$ )	0,64 $\pm$ 0,44	0,58 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,19
TOS ( $\text{mmol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L}$ )	5,91 $\pm$ 0,85	7,372 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>	5,3560 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>
OSI (Arbitrary Unit)	0,93 $\pm$ 0,63	1,28 $\pm$ 0,29 <sup>a</sup>	0,86 $\pm$ 0,50 <sup>b</sup>

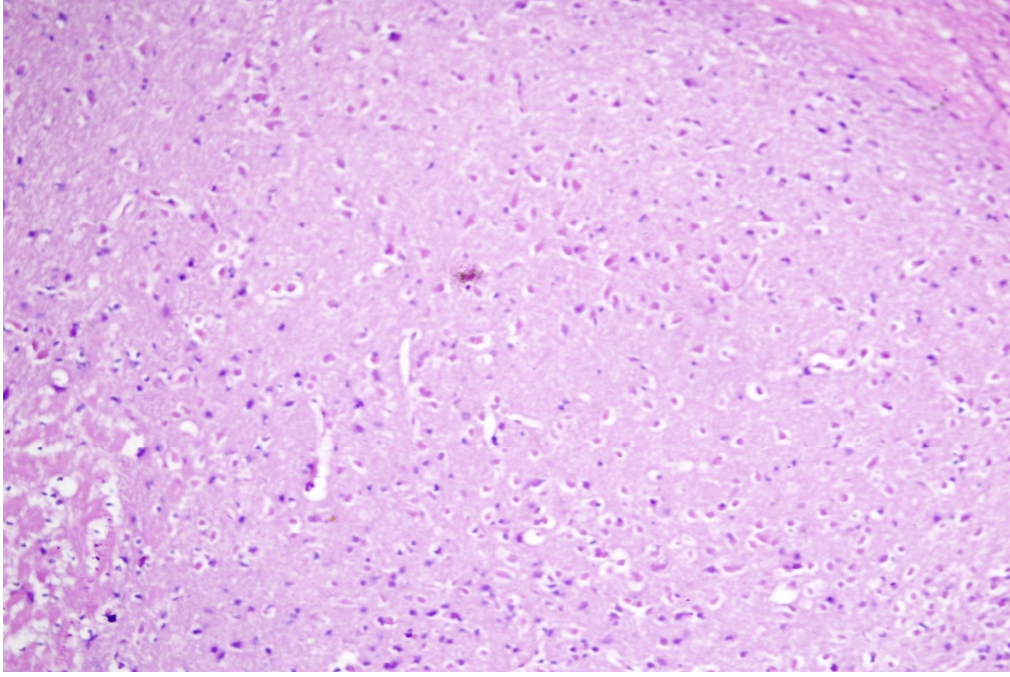
<sup>a</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

<sup>b</sup> Diyabet grubuna (Grup II) göre karşılaştırıldığında, ( $p<0.05$ ).

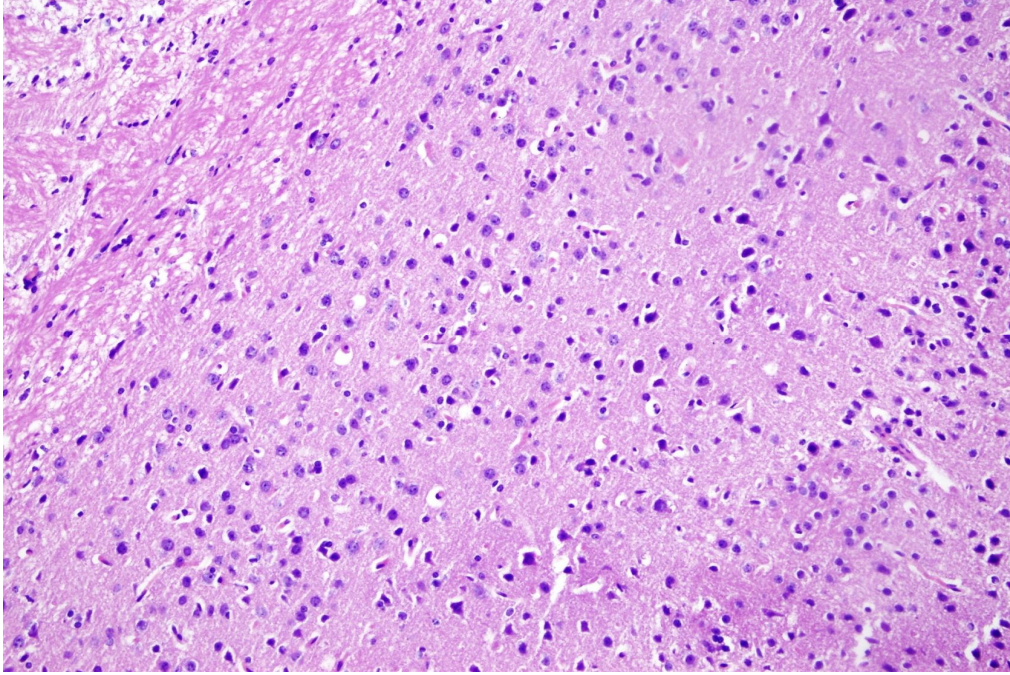
### 3.3. Histolojik Bulgular

Tüm grupların hematoxilen eozin boyalı preparatlarının ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Grup I ile (Şekil 7) karşılaştırıldığında Grup II’de astrositlerde yer yer proliferasyon yanısıra hücrel pleomorfizm ve hiperkromazi artışı izlenmektedir (Şekil 8).

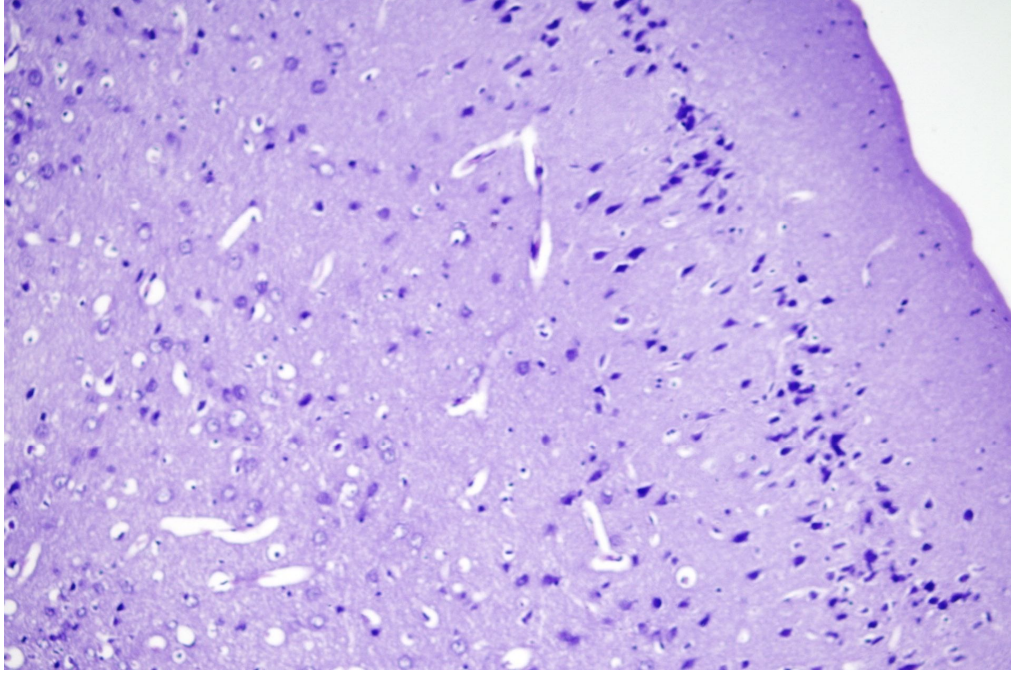
Grup III’de ise Grup I’e yakın morfolojik özellikler mevcuttur. Astrositlerdeki proliferasyonun gerilemiş olduğu ve hücrel pleomorfizm ile hiperkromazinin azaldığı dikkati çekmektedir (Şekil 9).



**Şekil 7.** Grup I'de normal beyin histolojisi. H&E X200.



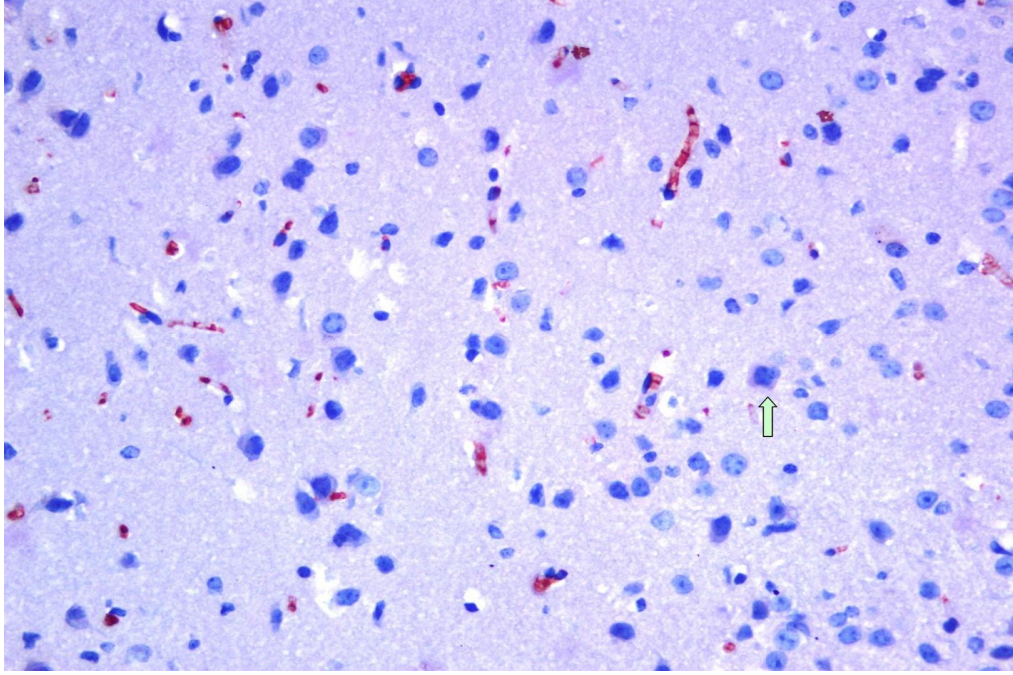
**Şekil 8.** Grup II'de astrositlerde yer yer proliferasyon, hücresel pleomorfizm ve hiperkromazi artışı. H&E X200



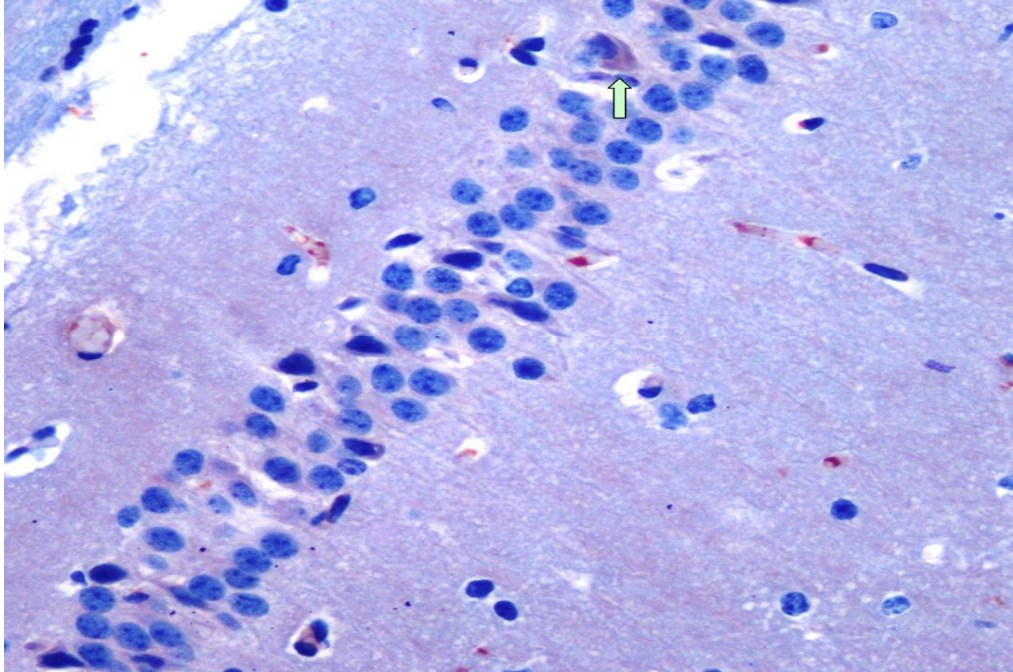
**Şekil 9.** Grup III'de gerilemiş astrosit proliferasyonu, azalmış hücresel pleomorfizm ve hiperkromazi. H&E X200

### **3.4.İmmünohistokimyasal Bulgular**

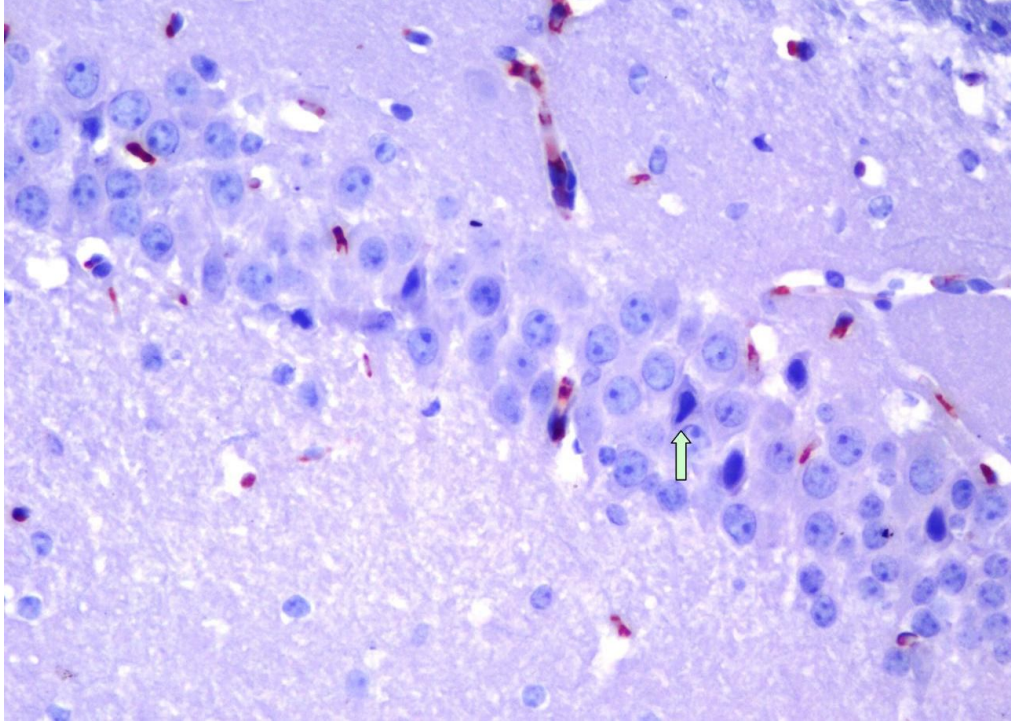
Bax immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; Grup I'de beyin korteksinde ve hipokampüsün CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanlarında bax immünreaktivitesinin +1 yoğunluğunda olduğu gözlemlendi (Şekil 10, 11, 12, 13, 14). Grup I ile karşılaştırıldığında Grup II'de bax immünreaktivitesinde beyin korteksinde ve hipokampüsün CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanlarında belirgin bir artış vardı ve +4 yoğunluğunda olduğu görüldü (Şekil 15, 16, 17, 18, 19). Grup III'de ise bax immünreaktivitesi beyin korteksinde ve hipokampüsün CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanlarında Grup II'ye göre belirgin azaldığı, Grup I'e yakın olduğu izlendi ve +1 yoğunluğundaydı (Şekil 20, 21, 22, 23, 24).



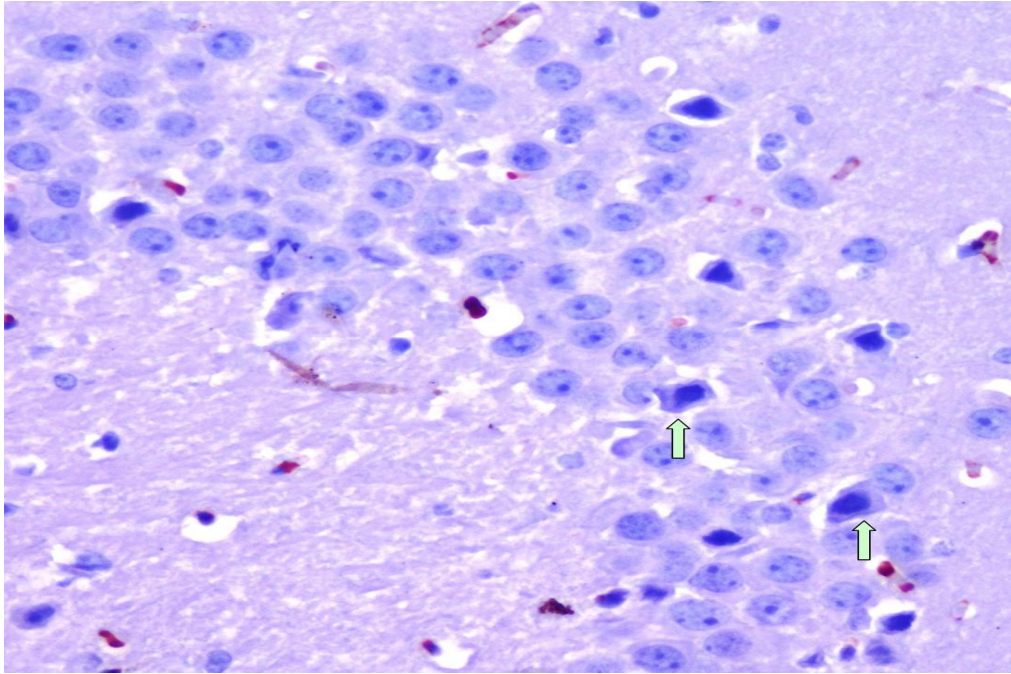
**Şekil 10.** Grup I'de beyin kortexinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



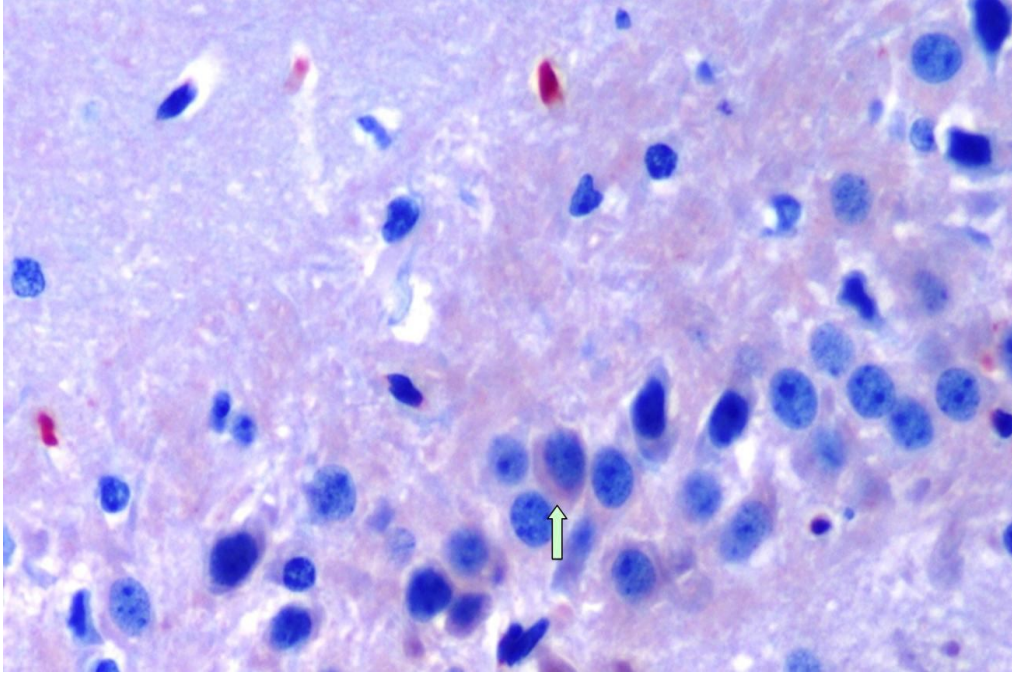
**Şekil 11.** Grup I'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→).  
X200



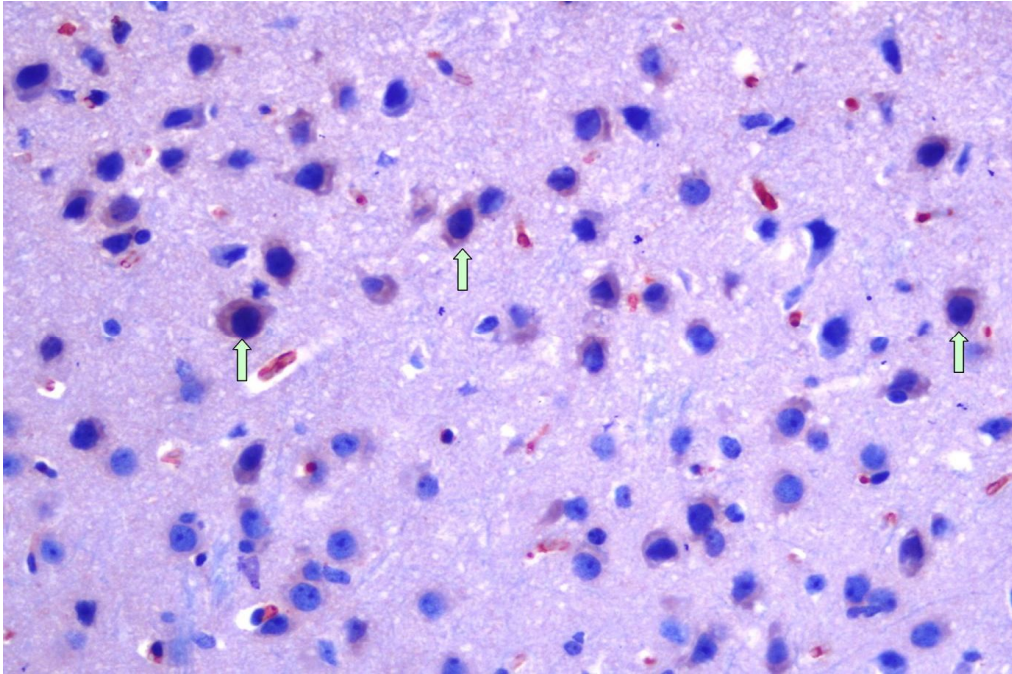
**Şekil 12.** Grup I'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→).  
X200



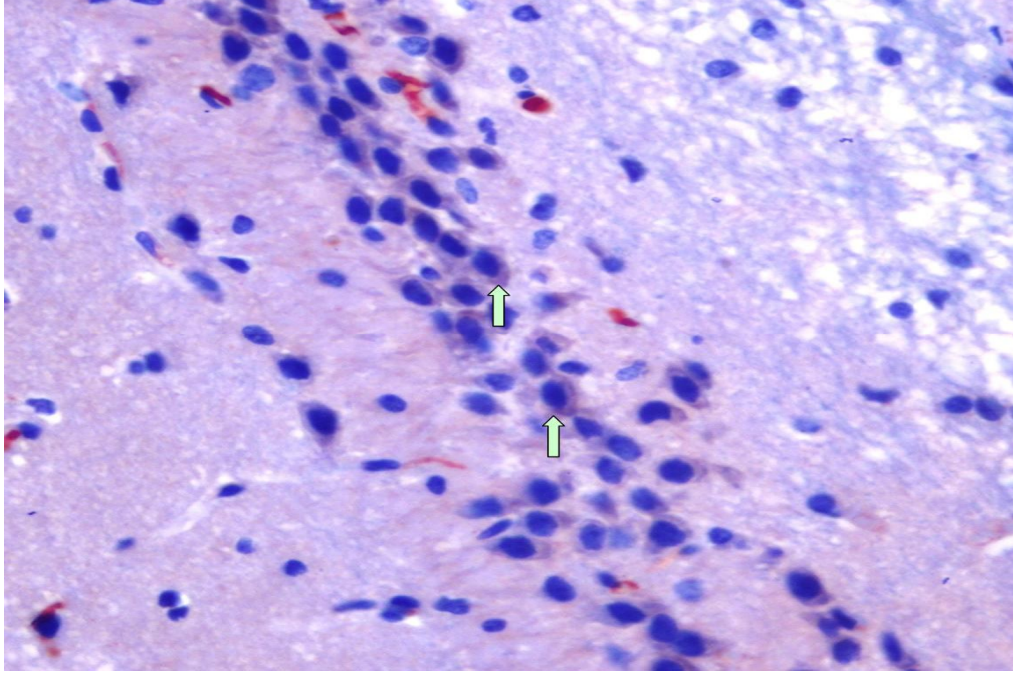
**Şekil 13.** Grup I'de hipokampüsün CA3 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→).  
X200



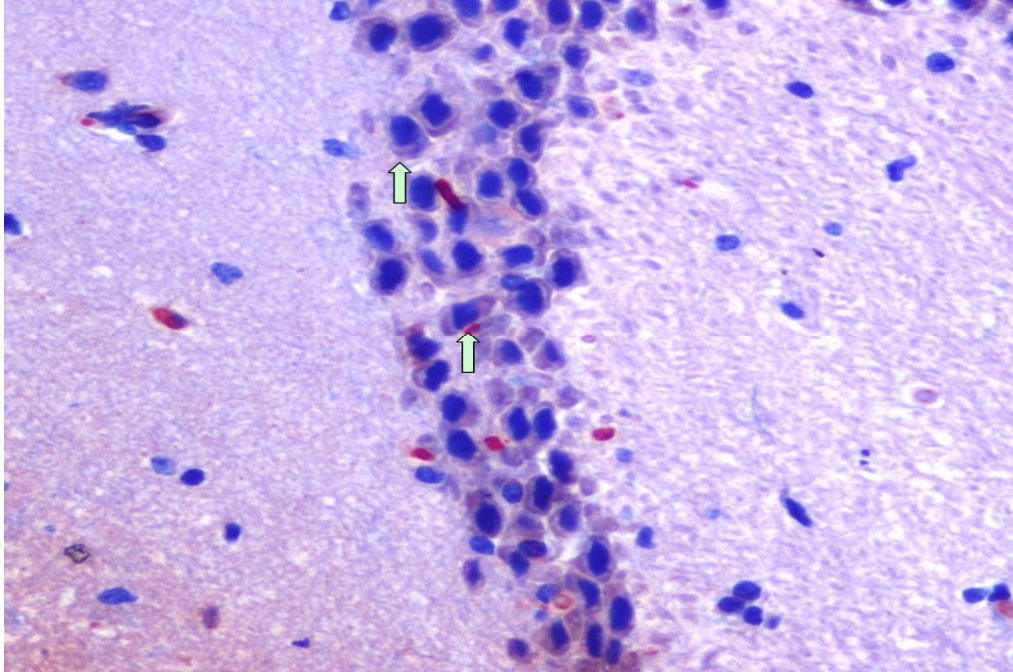
**Şekil 14.** Grup I'de CA 4 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



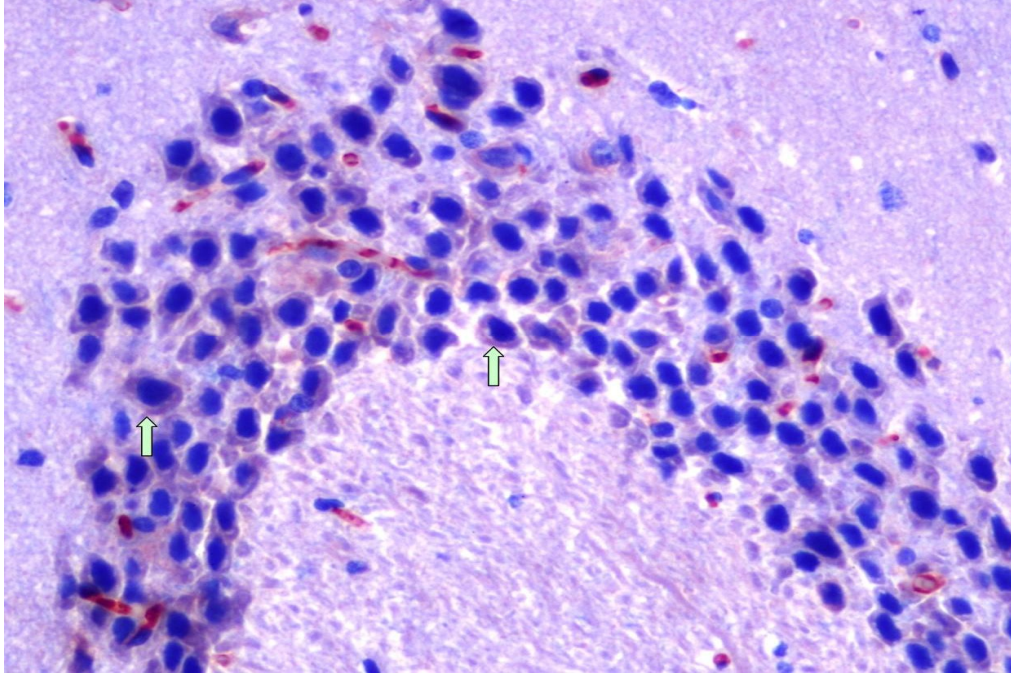
**Şekil 15.** Grup II'de beyin kortexinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200



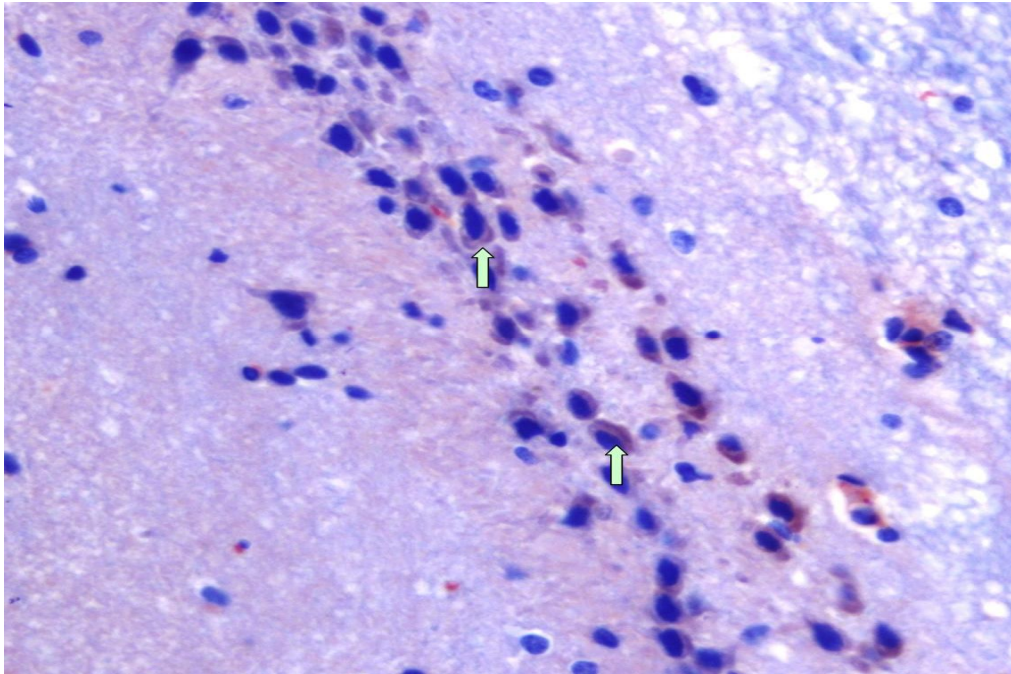
**Şekil 16.** Grup II'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200



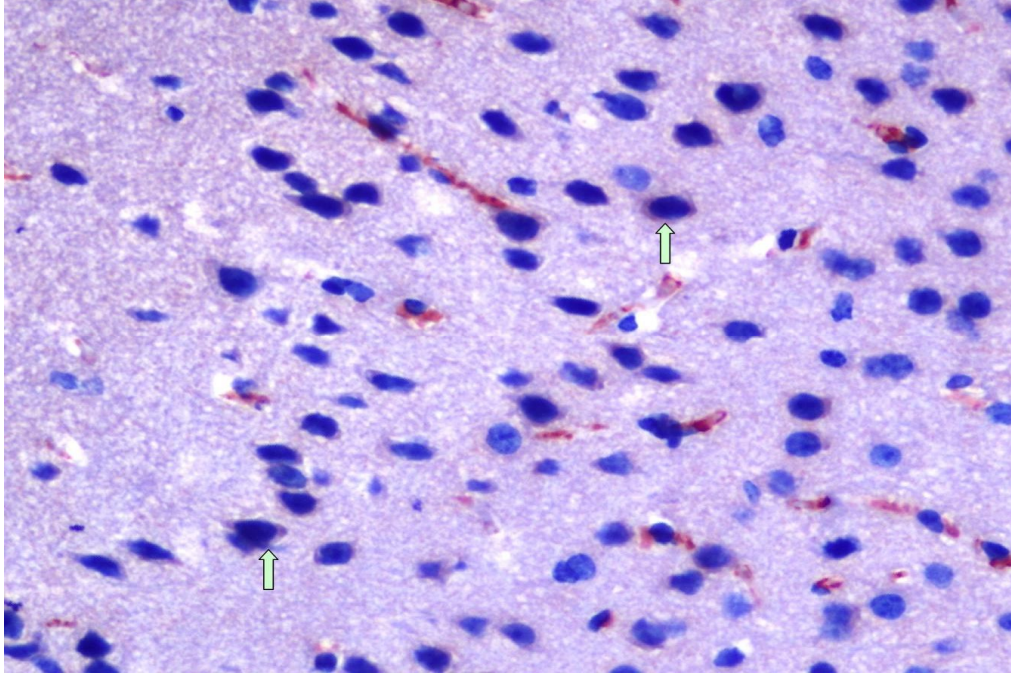
**Şekil 17.** Grup II'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200



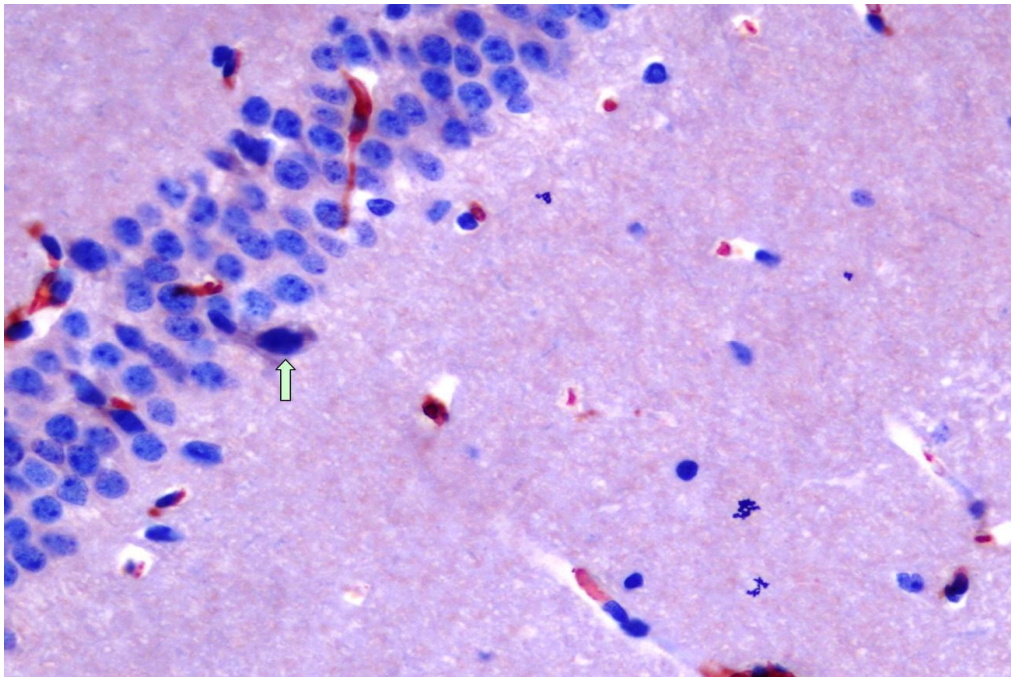
**Şekil 18.** Grup II'de hipokampüsün CA 3 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200



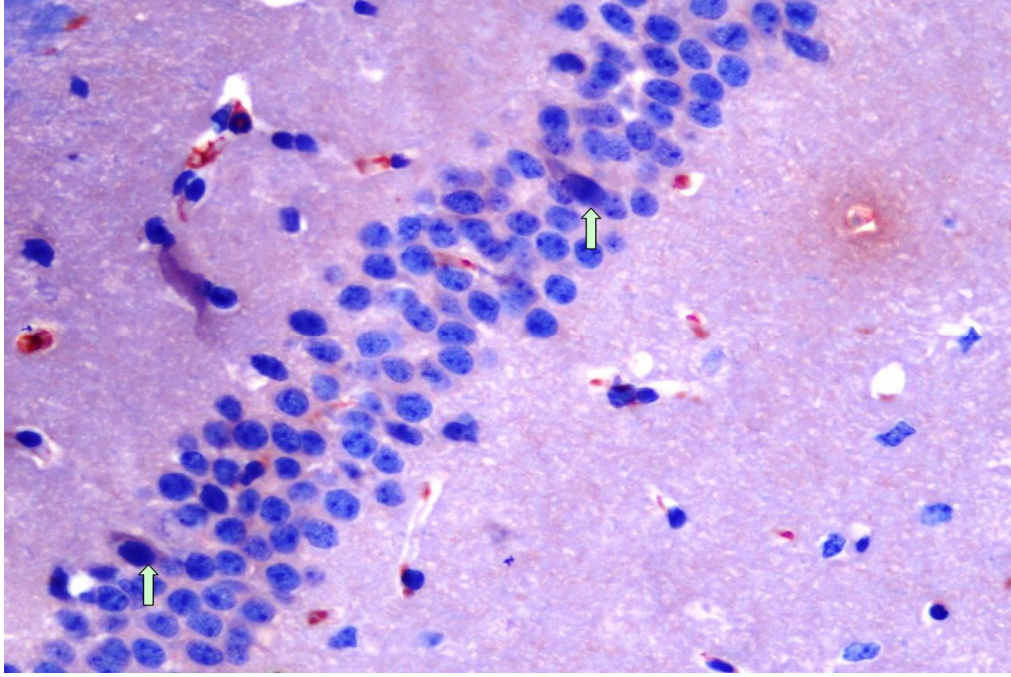
**Şekil 19.** Grup II'de hipokampüsün CA4 bölgesinde artmış bax immünreaktif hücreler (→). X200



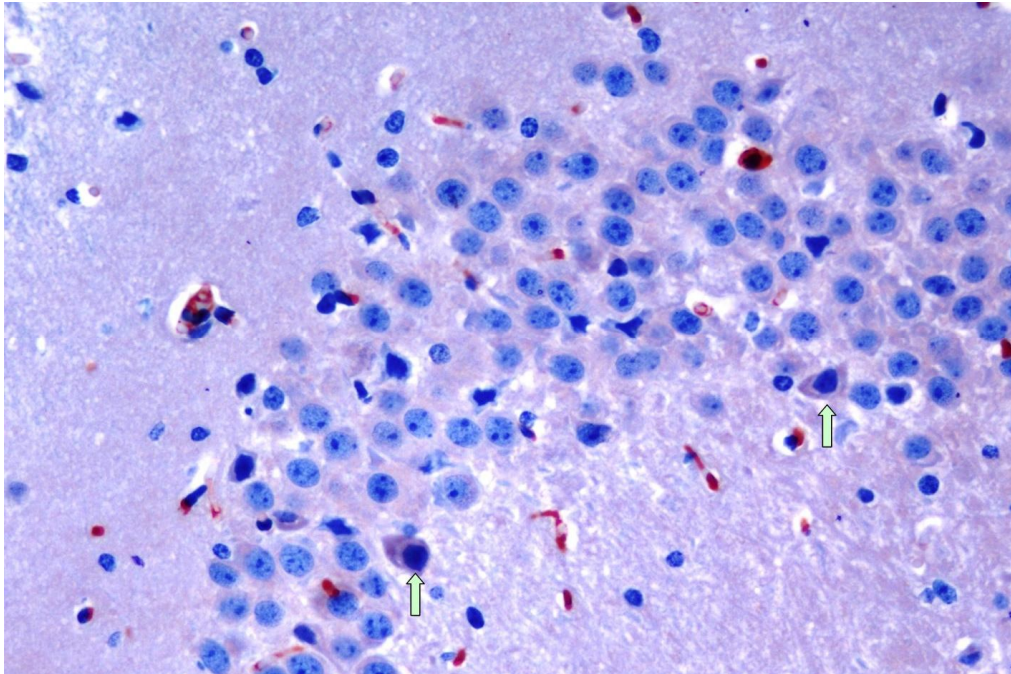
**Şekil 20.** Grup III'de beyin kortexinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



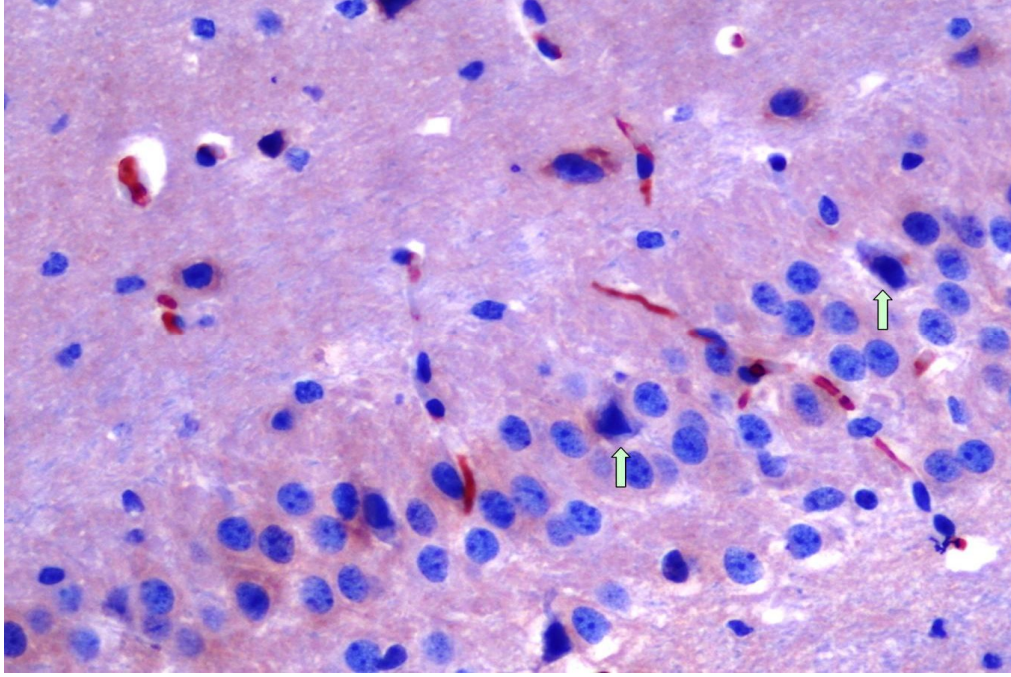
**Şekil 21.** Grup III'de hipokampüsün CA 1 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



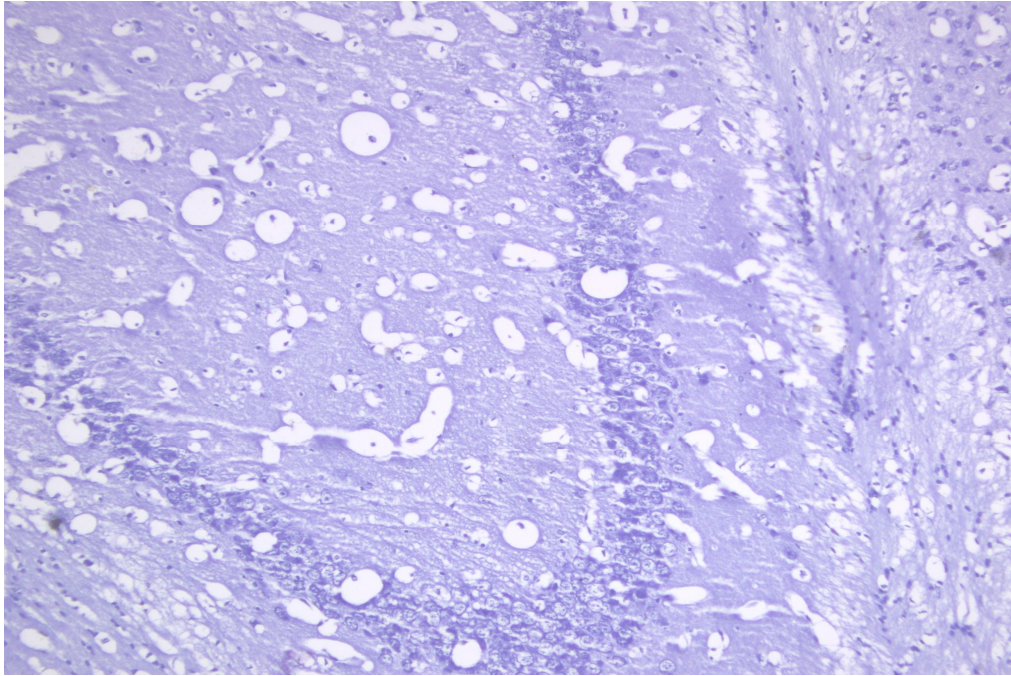
**Şekil 22.** Grup III'de hipokampüsün CA 2 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



**Şekil 23.** Grup III'de hipokampüsün CA 3 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→). X200



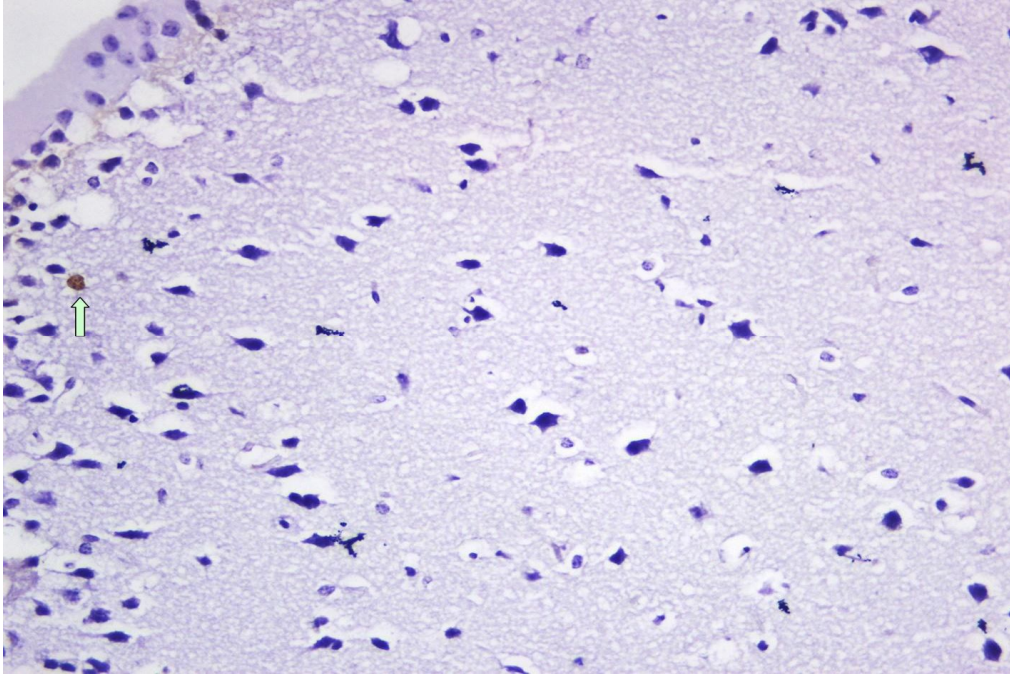
**Şekil 24.** Grup III'de hipkampusün CA 4 bölgesinde bax immünreaktif hücreler (→).  
X200



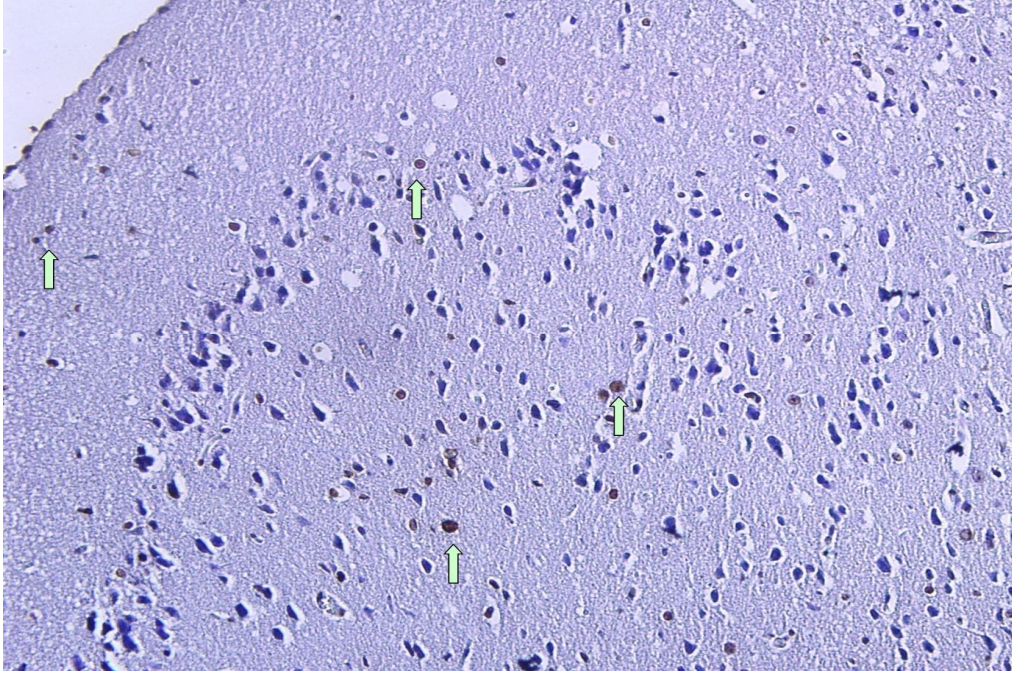
**Şekil 25.** Bax negatif kontrol. X200

### 3.5. TUNEL Bulgular

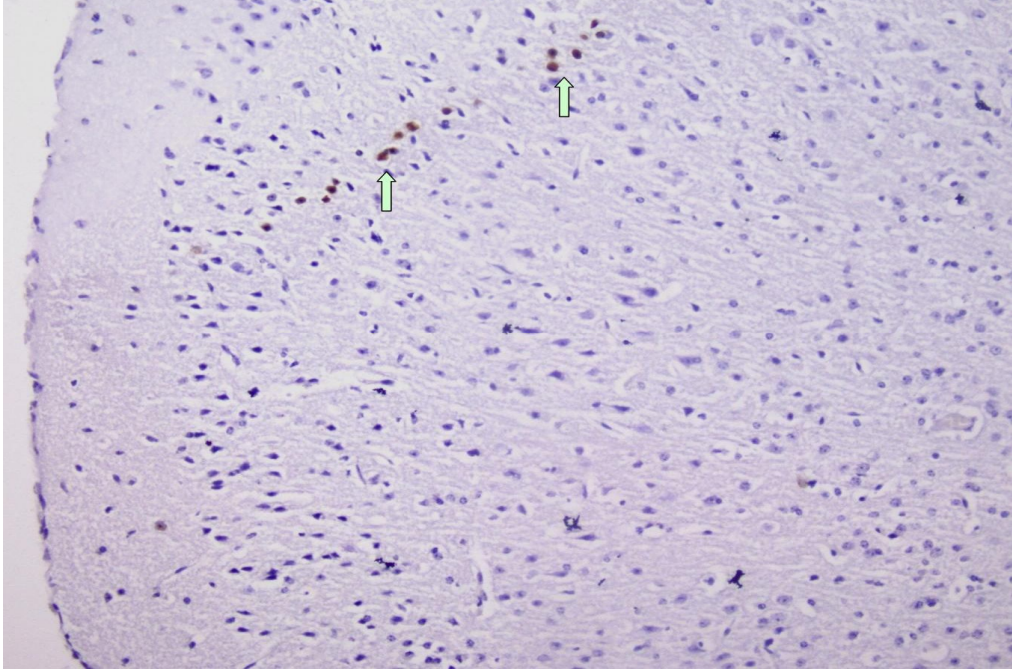
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; beyin korteksinde ve hipokampüsün CA1, CA2, CA3 ve CA4 alanlarında Grup I ile kıyaslandığında Grup II’de anlamlı bir artış vardı ( $p<0.05$ ). Grup III’de ise Grup II ile kıyaslandığında anlamlı bir azalma vardı ( $p<0.05$ ) (Şekil 26, 27, 28, 29, 30, 31) (Tablo 13).



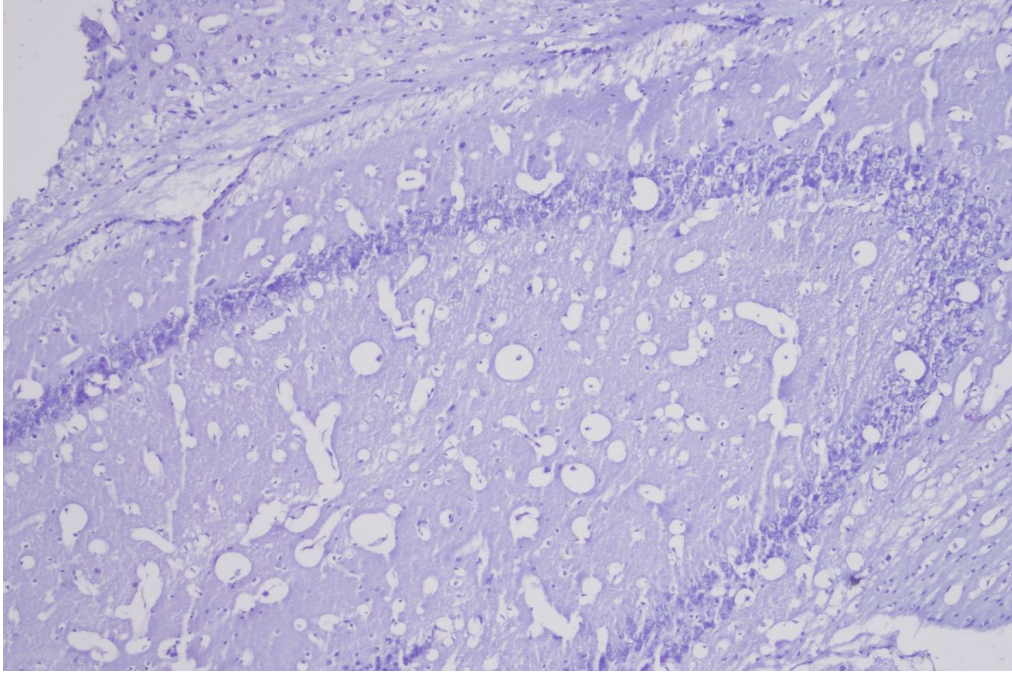
Şekil 26. Grup I'de beyin korteksinde TUNEL pozitif hücre (→). X200



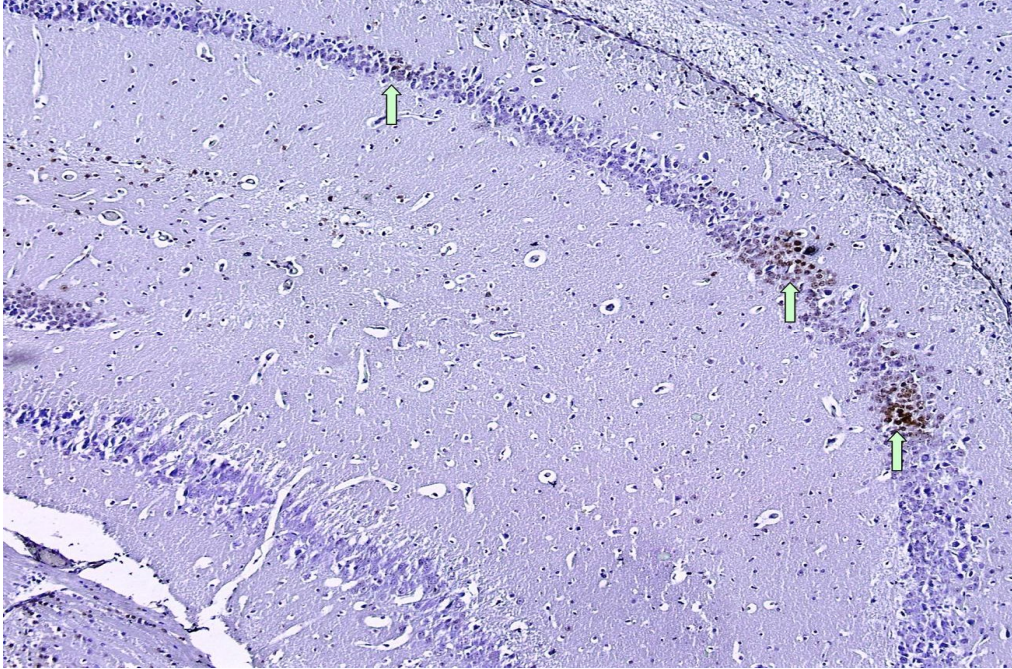
**Şekil 27.** Grup II'de beyin kortexinde artmış TUNEL pozitif hücreler (→). X200



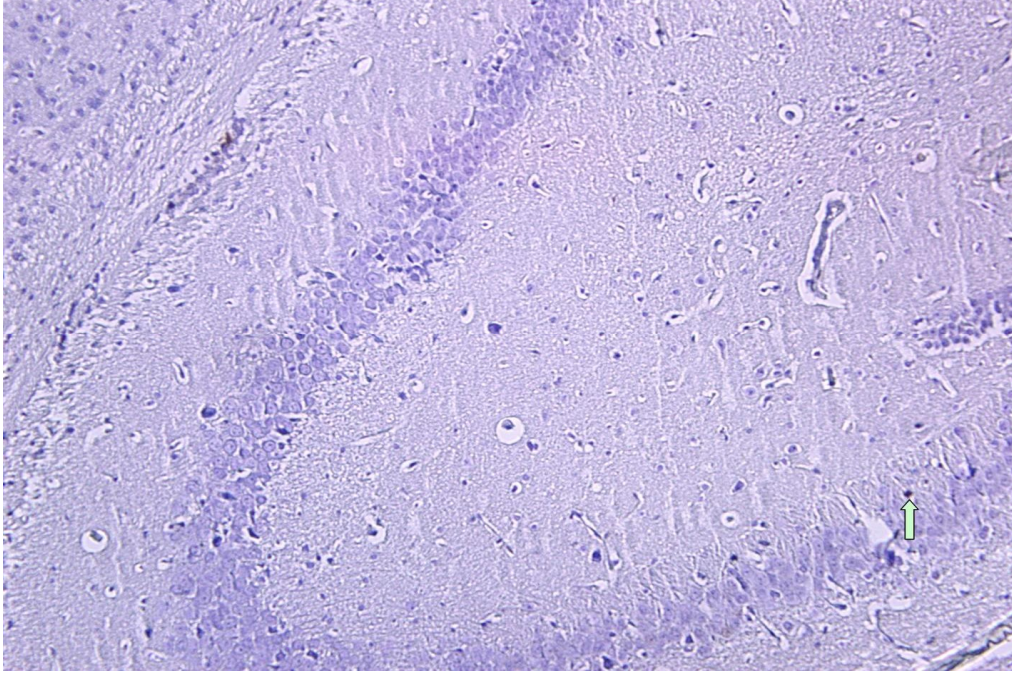
**Şekil 28.** Grup III'de beyin korteksinde TUNEL pozitif hücreler (→). X200



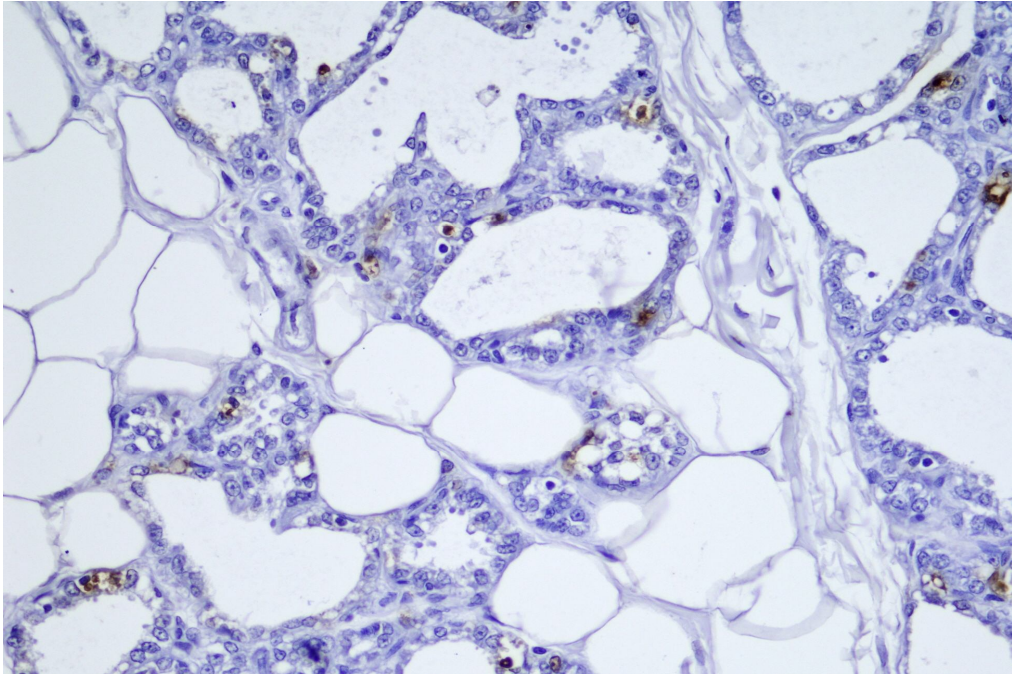
**Şekil 29.** Grup I'de beyin hipokampus bölgesinde TUNEL negatif boyanma. X200



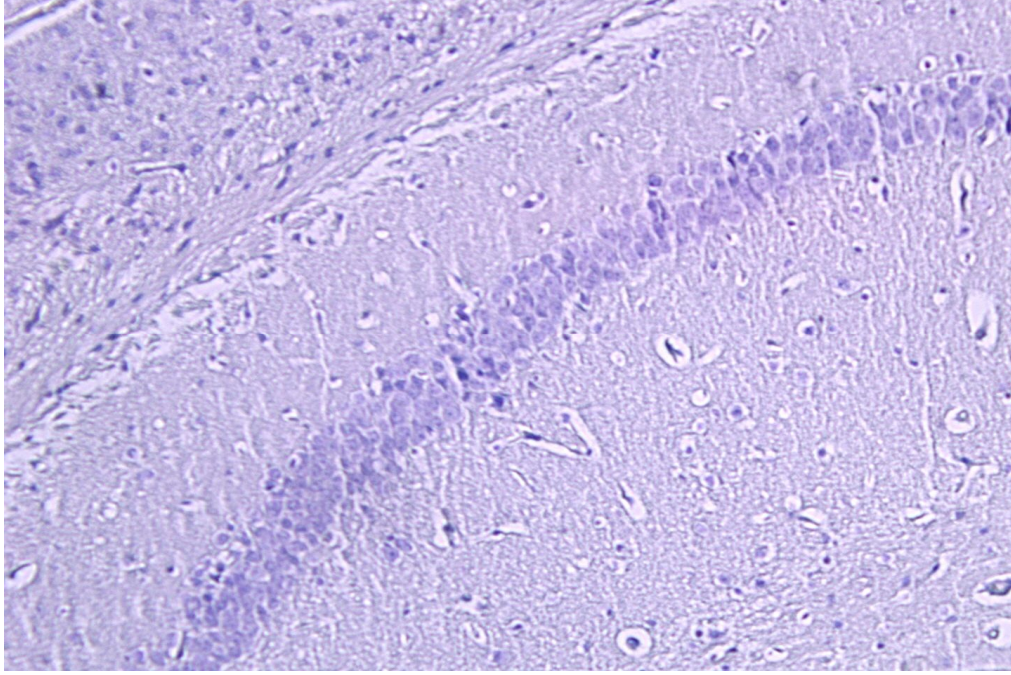
**Şekil 30.** Grup II'de beyin hipokampus bölgesinde artmış TUNEL pozitif hücreler (→). X200



**Şekil 31.** Grup III'de beyin hipokampus bölgesinde TUNEL pozitif hücreler (→).  
X200



**Şekil 32.** TUNEL pozitif kontrol. Meme Dokusu. X200



**Şekil 33.** TUNEL negatif kontrol. X200

**Tablo 13.** Apoptotik İndeks (%)

	<b>Korteks</b>	<b>CA1</b>	<b>CA2</b>	<b>CA3</b>	<b>CA4</b>
<b>Grup I</b> (n=7)	%0, 2±0, 08	%0	%0	%0	%0
<b>Grup II</b> (n=7)	%9±2, 26 <sup>a</sup>	%1, 6±0, 50 <sup>a</sup>	%3, 6±0, 74 <sup>a</sup>	%1, 05±0, 35 <sup>a</sup>	%1±0, 35 <sup>a</sup>
<b>Grup III</b> (n=7)	%2, 6±0, 50 <sup>b</sup>	%0 <sup>b</sup>	%1±0, 54 <sup>b</sup>	%0 <sup>b</sup>	%0 <sup>b</sup>

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

<sup>a</sup> Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında,

<sup>b</sup> Diyabetik gruba (Grup II) göre karşılaştırıldığında, (p<0.05).

#### 4. TARTIŞMA

Deneysel diyabet modelleri genellikle pankreasın beta hücrelerine toksik olan STZ ile oluşturulmaktadır (161). Çalışmamızda *Streptomyces achromogenes* tarafından üretilen bir antibiyotik olan STZ'yi kullandık.

Diabetes Mellitus insülin sekresyonu, insülinin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan özellikle hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış ateroskleroz ile birlikte mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (1).

Diabetes Mellitus ROS (reaktif oksijen türleri)'nin artmış üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuç olarak artmış oksidatif stresle ilişkilidir (49, 50). Artmış oksidatif stresin santral sinir sistemi (SSS) komplikasyonlarının oluşumunda da temel rol oynadığı düşünülmektedir (25, 27). İleri yaşla beraber ROS'un doku ve organlara verdiği hasar sonucu kanser gibi birçok hastalık ortaya çıkar (162). ROS oluşumuna neden olan oksidatif stres SSS'de de inme, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı gibi akut ve kronik nörolojik hastalıklarda nörotoksisite için bir son basamak olarak belirtilmiştir (163). İnvitro ve invivo çalışmalar hipergliseminin neden olduğu oksidatif strese bağlı nöron kayıplarında apoptozisin önemli rol oynadığını göstermektedir. Tip 1 DM'de nöronal yoğunluğun azalmasının diyabetin süresi ile korelasyon gösterdiğini, zaman ilerledikçe apoptozis kaynaklı nöronal kaybın arttığı bildirilmiştir (30, 34).

Vitamin D<sub>3</sub>, vitamin D'nin aktif metabolitidir ve değişik biyolojik olaylarda rol oynadığı rapor edilmiştir (164, 165). Vitamin D<sub>3</sub>'ün geçtiğimiz on yılda antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (166). Ayrıca yakın geçmişte vitamin D<sub>3</sub>'ün nöroprotektif bir rolünün olduğu da öne sürülmüştür (126). Vitamin D<sub>3</sub>'ün ventral mezensefalik nöronal kültürlerde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin indüklediği nöronal hasarı azalttığı rapor edilmiştir (126). Bundan başka çeşitli çalışmalarda sistemik vitamin D<sub>3</sub>'ün 6-hidroksidopamin ve demir tarafından indüklenen kortikal infarkt ve nörotoksisiteyi azalttığı gösterildi (126, 124, 167). Bunun dışında vitamin D<sub>3</sub> iNOS aktivitesini azaltır ve böylece primer rat astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azaltır (135). Bundan başka vitamin D<sub>3</sub>'ün astrosit ve karaciğerde glutasyon içeren

peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif defans sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (135, 168).

Biz bu çalışmamızda oksidatif hasarın arttığı DM'de Vitamin D'nin merkezi sinir sisteminde koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda, ilk olarak tüm gruplara ait beyin dokularında TAS, TOS ve OSİ değerlerine bakılmıştır. Tüm gruplarda TAS değerlerinde bir değişiklik görülmezken TOS düzeylerinde ve OSİ de anlamlı değişiklikler bulunmuştur. STZ ile diyabet oluşturulan farelerin beyin dokularında TOS düzeyleri kontrole kıyaslandığında anlamlı şekilde artmıştı. Vitamin D grubunda ise değerler kontrole yakındı. OSİ ise diyabetik grupta artarken vitamin D grubunda kontrole yakındı.

Çalışmamızda TAS değerlerinde anlamlı bir değişiklik belirlenmemiştir. Farklı yayınlarda bazı antioksidan enzimlerin azaldığı, arttığı veya değişmediği şeklinde çelişkili sonuçlar bildirilmişse de araştırmacıların ortak fikri diyabette lipid peroksidasyonunun arttığıdır (169).

TOS'u oluşturan temel komponentler hidrojen peroksid ve lipid hidroperoksittir (159).

DM'nin oluşturduğu oksidatif strese rol oynayan serbest radikaller süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitrik oksitdir. Pek çok çalışmada diyabetin komplikasyonları ile lipid peroksidasyonu arasında ilişkiyi göstermiş olmasından dolayı lipid peroksidasyonunun kontrolü önem taşımaktadır (170).

Lipit peroksidasyonu ve peroksidasyon sonrası meydana gelen ürünler membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine hasar verir; membran geçirgenliği ve mikrovizkozitesi anlamlı şekilde etkilenir (171, 172).

Vitamin D verdiğimiz tedavi grubunda belirlenen TOS değerlerindeki anlamlı azalma birçok çalışmada bildirdiği gibi vitamin D'nin antioksidan etkisine bağlı olabilir (173, 166).

Çalışmamızda, STZ ile diyabet oluşturulan farelerin beyin dokularında ilk dikkat çekici bulgu yer yer astrosit proliferasyonu ve nöronal dejenerasyonu gösteren hücresel pleomorfizm ve hiperkromazi artıştıydı. Vitamin D verdiğimiz tedavi grubunda ise ışık mikroskopik düzeyde belirlenen histopatolojik bulgular gerilemiş ve kontrole yakın görülmüştür. STZ ile oluşturulan deneysel diyabette beyin dokularında astrositlerdeki ve nöronlardaki değişiklikler daha önceki çalışmalarda da

rapor edilmiştir. Jakobsen ve ark. ile Junker ve ark. uzun süreli deneysel diyabetik sıçanlarda beyinde ışık ve elektron mikroskopik düzeyde nöronlarda dejenerasyon olduğunu ve astrositlerde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgu çalışmamızdaki diyabetik grupta belirlenen nöronal dejenerasyon ve astrosit artışı bulguları ile paralellik göstermektedir (174, 175).

Organizmada serbest radikallerin oluşması ile ortadan kaldırılması bir denge içerisinde ve oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge var olduğu sürece serbest radikaller organizmayı etkileyemezler. Bu denge bozulduğu zaman Oksidatif stres olarak bilinen ve doku hasarına yol açan durum oluşmaktadır (176).

Drukarch ve ark. Astrositlerin ROS inaktivasyon yoluyla nöronal yaşamı koruyabileceğini bildirmişlerdir (177).

Çalışmamızda gözlediğimiz astrositlerin yer yer proliferasyonunu, muhtemelen aynı mekanizma ile hipergliseminin meydana getirdiği nöronal hasara karşı astrositlerin bir cevabı şeklinde yorumlanabileceğini düşünmekteyiz.

Lin ve ark. çinko ile serebral oksidatif stres oluşturmuş ve vitamin D'nin etkilerini antioksidan etkileri iyi bilinen melatonin, beta östradiyol ve vitamin E ile karşılaştırmışlardır. Vitamin D'nin diğer bahsedilen antioksidanlardan daha etkili olduğunu ve bununda lipit peroksidasyonunu ve otooksidasyonu azaltıcı etkilerine bağlı olabileceğini göstermişlerdir (173). Wiseman ve ark yaptıkları çalışmada vitamin D<sub>3</sub>'ün beyin lipozomlarındaki demirin indüklediği lipid peroksidasyonunu bir membran antioksidanı olarak inhibe ettiğini göstermişlerdir (166).

Garcion ve ark. (135) Sardar ve ark. (168) yaptıkları çalışmada vitamin D<sub>3</sub>'ün iNOS aktivitesini düşürdüğü ve böylece primer rat astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azaltarak peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif defans sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi engellediği rapor edilmiştir

Vitamin D<sub>3</sub>'ün beyin dışında da oksidatif stresi azaltarak koruyucu etkinliğini gösteren birçok çalışma mevcuttur. Örneğin; Seumoni ve ark farelerde yaptığı bir çalışmada NMDA'nın intravitroz enjeksiyonuyla oluşturulan oksidatif hasara bağlı gelişen retinal nöron hasarına karşı Vitamin D<sub>3</sub>'ün serbest radikalleri uzaklaştırma kapasitesini arttırarak oksidatif stresi azaltan metallothionein (MT) genlerinin üretimini arttırmak yoluyla koruyucu özellik gösterdiği sonucuna vardılar. Oral

vitamin D<sub>3</sub> alımının karaciğer, böbrek ve deride de MT genlerini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (178).

Bir başka çalışmada Bo-Ying-Bao ve ark. ROS ile ilgili araştırma yaparken BPH'da Vitamin D<sub>3</sub>'ün antioksidan özelliğini belirlemişlerdir. Ayrıca vitamin D<sub>3</sub>'ün prostat kanseri insidansını azalttığını bildirmişlerdir (179). Çalışmalarında vitamin D<sub>3</sub>'ün dokularda redüktan bir madde olduğu bilinen (180) ve oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olan (181) G6PDH ekspresyonunda artma meydana getirerek antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (179).

Çalışmamızda, farelerin beyin korteks ve hipokampus bölgelerinde pro-apoptotik olduğu bilinen Bax'ın ve apoptotik hücrelerin tespit edilmesinde kullanılan TUNEL boyamasının sonucunda; STZ ile diyabet oluşturulan farelerde pro-apoptotik bax ve apoptotik TUNEL pozitif olan hücrelerde kontrole göre belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Vitamin D verdiğimiz tedavi grubumuzda ise diyabetik gruba göre anlamlı bir azalma olduğu görüldü.

Deneyel diyabette beyin dokusunda artmış Bax immünreaktivitesi daha önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Xue ve ark. (182) STZ ile deneyel diyabet oluşturarak bax immünreaktivitesinin arttığını göstermişlerdir. Zhen-guo ve ark. (183) diyabetin süresine göre sıçanlarda nöronal apoptozisi arttırdığını göstermişlerdir ve bunun intrasitoplazmik kalsiyum birikimi ile mitokondrial disfonksiyon, reseptör ile olan veya olmayan mekanizmalar veya IGF aktivitesinin süpresyonu ile olan iskemi gibi değişik hücrel mekanizmalar ile apoptozis indüklenebileceğini söylemişlerdir. Coşar ve ark. (184) STZ ile Deneyel diyabet oluşturmuş ve ratların beyin dokusunda omega-3 yağ asidinin koruyucu etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada MDA (malonyldialdehide), SOD (superoxide dismutase) ve cat (catalase) miktarları ile birlikte nöronal apoptotik değişiklikler incelenmiştir. Diyabetik grupta MDA, SOD ve cat düzeylerinin ve apoptotik nöronların arttığını buna karşı çalışmamızın vitamin D verilen grubunda olduğu gibi omega-3 yağ asidi verilen grubun kontrole yakın olduğunu göstermişlerdir. STZ ile oluşturulan deneyel diyabette hipergliseminin bir sonucu olarak kronik oksidatif stres meydana gelir. Deneyel oluşturulan diyabette oksidatif stresin ve antioksidanların nöron hasarına olan etkilerine bakılmıştır. Hipergliseminin ROS formasyonu meydana getirdiği, bunda hücre membranının lipid peroksidasyonunu başlattığı ve DNA

hasarı yaptığı sonuçta oksidan proteinler tarafından nöronal ölümün arttığı gösterilmiştir (185). Oksidatif strese kalsiyum dengeleri ve mitokondrial membran potansiyeli değişir. Bu değişiklik mitokondriumlarda ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi programlı ölüme yani apoptozise sürükler (186). Hücrenin hasarlandığı ve apoptozise gittiği sırada mitokondri membran potansiyelinde karakteristik olmayan oksidatif stresin eşlik ettiği bazı değişiklikler oluşur. Bu değişiklikler sonucunda sitokrom c, sitozol içerisine salınır. Sitokrom c'nin sitozol içerisine salınımı Bcl-2 ailesinin antiapoptotik üyeleri (Bcl-2, Bcl-XL) tarafından durdurulabilir. Bu sırada Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri (Bax, Bak, Bad) ise sitokrom c salınımını artırmaya yönelik çalışırlar. Hücrenin ölmesi ile yaşaması bu ince dengeye bağlıdır. Bahsedilen proteinlerden pro-apoptotik olanların artması hücreyi ölüme yaklaştırır (187, 188, 189-191, 192).

Yapılan çalışmalarda antioksidanların deneysel diyabette nöronları koruduğu gösterilmiştir (193).

Bu çalışmada STZ verilen farelerde beyinde korteks ve hipokampüste hücresel hasar ortaya çıktığı ve DM'nin oksidatif hasar ile lipid peroksidasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. DM'nin oluşturduğu oksidatif hasarı engellemek için verilen vitamin D'nin lipid peroksidasyonunu azalttığı ve hücreleri yapısal olarak apoptozise karşı koruduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak beyin korteksi ile öğrenme ve bellek fonksiyonlarıyla ilişkili olduğu bilinen hipokampüste, DM'nin oluşturduğu hücre hasarına karşı vitamin D'nin koruyucu etkilerinin olmasının gösterilmesi diyabetin komplikasyonları açısından ele alındığında önemli bir bakış açısı kazandırabilecektir. Gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla, diyabette vitamin D ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla vitamin D ile ilişkili tedavi yaklaşımları da denenebilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi , 2001: 237-243.
2. Foster DW. Diabetes Mellitus. In Wilson JD, Fauci A, Braunwald E, Isselbacher KJ, Martin JB, Kasper DL, et al. (eds), Harrison's Principle of Internal Medicine. 14. edition. New York, Mc Graw Hill Companies 1998: 2: 2060-2080.
3. Koloğlu S. Endokrinoloji Temel ve Klinik. Birinci Baskı. Ankara, Medical Network & Nobel 1996: 368-385.
4. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Joslin's Diabetes Mellitus. Fourteenth edition. Lippincott Williams and Wilkins, Boston 2005: 331-338.
5. King H, Rewers M. WHO Ad Hoc Diabetes Reporting Group. Global estimates for prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in adults. Diabetes Care 1993; 16: 157-177.
6. King H, Aubert RF, Herman WH. Global burden of diabetes. Diabetes Care 1998; 21: 1414-1431.
7. Haris MI, Flegal KM, Cowie CC, Eberhardt MS, Golstein DE, Little RR, et al. Prevalence of diabetes, impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance in U.S. Adults. The Third National Health and Nutrition Examination Survey 1988-1994. Diabetes Care 1998; 21: 518-524.
8. Satman I, Yılmaz MT, Baştar I, Şengül A, Sargön M, Salman F, et al. Diabetes Epidemiology Study in Turkey. First step data result. Diabetes 1998; 47: 384, 1480.
9. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 1997: 20-11.
10. Açıklan İ. İç Hastalıkları. Hacettepe Yayın Birliği, 1988: 222-248.

11. American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 4-42.
12. American Diabetes Association. Insulin administration. *Diabetes Care* 2004; 22: 94-102.
13. Balasa B, Van Gunst K, Jung N, Balakrishna D, Santamaria P, Hanafusa T, et al. Islet-specific expression of IL-10 promotes in nonobese diabetic mice independent of fas, perforin, TNF receptor-1, and TNF receptor-2 molecules. *J Immunol* 2000; 165: 2841-2849.
14. Bertry-Coussot L, Lucas B, Danel C. Long-term reversal of established autoimmunity upon transient blockade of the LFA-1/intercellüler adhesion molecule-1 pathway. *J Immunol* 2002; 168: 3641-3648.
15. Binder C, Brange J. Insulin chemistry and pharmacokinetics. In Ellenberg & Rifkin's diabetes mellitus, Fifth edition. Eds Porte D. Sherwin RS. Stamford, Appleton & Lange, 1997: 689-708.
16. Cembrera-Rode E, Sarmiento L, Tiberti C, Molina G, Barrios J, Hernandez D, et al. Type1 diabetes islet associated antibodies in subjects infected by echovirus *Diabetologia* 2003; 46: 1348-1353.
17. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, et al. The role of fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997; 89: 17-24.
18. Chervonsky AV, Wang Y, Wong FS, Visintin I, Flavell RA, Janeway CA Jr, et al. The role of fas in autoimmune diabetes. *Cell* 1997; 89: 17-24.
19. Laakso M. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi ve tanısı. In Goldstein BJ, Müler-Wieland D. (eds), *Textbook of Type 2 Diabetes*. New York, Martin Dunitz Group 2003. Çeviri Ed. Akman AC. s:1-12, 1.Baskı. AND Yayıncılık, İstanbul, Düzey Matbaası, 2004.
20. Groop LC, Widen E, Ferrannini E. İnsulin resistance and insulin deficiency in pathogenesis of type 2 diabetes errors of metabolism or of methods. *Diabetologia* 1993; 36: 1326-1331.

21. De Fronzo RA, Bonadonna RC, Ferrannini E. Pathogenesis of NIDDM. In Alberti KGMM, Zimmet P, De Fronzo RA, Keen H (eds), International Textbook of Diabetes Mellitus. Second edition. Chichester, John Wiley & Sons Ltd 1997; 81: 635-689.
22. American Diabetes Association. Standards of medical care for patients with diabetes mellitus. Diabetes Care 2003; 26: 33-50.
23. Writing Team for the Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). Design and methodologic considerations for the feasibility phase. The DCCT Research Group. Diabetes 1986; 35: 530-534.
24. Diabetes mellitus mezuniyet sonrası eğitim kursu kitabı Ankara, 1997.
25. Biessels GJ. Cerebral complications of diabetes: clinical findings and pathogenetic mechanisms. Neth J Med 1999; 54: 35-45.
26. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH. Cerebral function in diabetes mellitus. Diabetologica 1994; 37: 653-650.
27. Gispen WH, Biessels GJ. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. Trends Neuroscience 2000; 23: 542-549.
28. Li ZG, Sima AA. C-peptide and central nervous system complications in diabetes. Exp Diabetes Res 2004; 5: 79-90.
29. Sima AA, Kamiya H, Li ZG. Insulin, C-peptide, hyperglycemia, and central nervous system complications in diabetes. Eur J Pharmacol 2004; 490: 187-97.
30. Martínez-Tellez R, Gómez-Villalobos Mde J, Flores G. Alteration in dendritic morphology of cortical neurons in rats with diabetes mellitus induced by streptozotocin. Brain Res 2005; 1048: 108-115.
31. Araki Y, Nomura M, Tanaka H, Yamamoto H, Yamamoto T, Tsukaguchi I, et al. MRI of the brain in diabetes mellitus. Neuroradiology 1994; 36: 101-103.

32. Unger JW, Klitzsch T, Pera S, Reiter R. Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion and spinal cord. *Exp Neurol* 1998; 153: 23-34.
33. Scott JN, Clark AW, Zochodne DW. Neurofilament and tubulin gene expression in progressive experimental diabetes: failure of synthesis and export by sensory neurons. *Brain* 1999; 122: 2109-18.
34. Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide prevents hippocampal apoptosis in type 1 diabetes. *Int J Exp Diabetes Res* 2002; 3: 241-5.
35. Ryan CM. Neurobehavioral complications of type 1 diabetes examination of possible risk factors. *Diabetes care* 1998; 11: 86-93.
36. Youdim KA, Martin A, Joseph JA. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Devl Neuroscience* 2000; 18: 383-399.
37. Kamal A, Biessels GJ, Gispen WH. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin diabetic rats: interaction of diabetes and ageing. *Diabetologica* 2000; 43: 500-506.
38. McCall AL. The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 1992; 41: 557-570.
39. Auer RN. Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* 1986; 17: 699-708.
40. Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 113-124.
41. Zhao WQ, Alkon DL. Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Molecular and Cellular Endocrinology. The Journal Biological Chemistry* 2001; 177: 125-134.
42. Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E. Brain insulin receptors and spatial memory. *Biological chemistry* 1999; 274: 34893-34902.
43. Park CR. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neuroscience and Biohevaioral Reviews* 2001; 25: 311-325.
44. Levy J, Gavin JR, Sowers JR. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *The American Journal of Medicine* 1994; 96: 260-273.

45. Lee ET, Keen H, Bennett PH. Follow-up of the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes: general description and morbidity. *Diabetologia* 2001; 44: 3-13.
46. EliaS PK, EliaS MF, D'Agostino RB. NIDDM and lood pressure as risk factors for poor cognitive performance. The Framingham Study. *Diabetes Care* 1997; 20: 1388-1395.
47. Kuusisto J, Koivisto K, Mykkanen L. Essential Hypertension and cognitive function. The role of hyperinsulinemia. *Hypertension* 1993; 22: 771-779.
48. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
49. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemi and free radicals. *Diabetic complications* 2001; 77: 1-18.
50. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stres and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. *Neuroscience Research Communications* 1997; 21: 41-48.
51. Doroty J, Vander J, Jason MH. Oxidative stress indices in IDDM subjects with and without long-term diabetic complications. *Clinical Biocemistry* 2001; 34: 265-270.
52. Gutteridge JMC, Halliwell B. *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*. First edition, New York, Oxford University Press 1994.
53. Halliwell B. Oxidants and Central Nervous System: Some Fundamental Questions. *Acta Neurology Scandinavia* 1989; 126: 23-33.
54. Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. *Mayo Clin. Proc* 1988; 63: 381-389.
55. Engin A, Altan N. Effects of obstructive jaundice on the antioxidative capacity of human red blood cells. *Hematologia* 2000; 30: 91-96.
56. Engin A, Altan N, Işık E. Erythrocyte glutathione levels in lithium-induced hypothyroidism. *Drugs R D* 2005; 6: 35-40.

57. Hasanoğlu E, Altan N, Sindel P, Ongun CÖ, Bali M, Altıntaş E. The Relationship Between Erythrocyte Superoxide Dismutase Activity And Plasma Levels of Some Trace Elements (Al, Cu, Zn) of Dialysis Patients. *General Pharmacology* 1994; 25: 107-110.
58. Özenirler S, Tuncer C, Ongun CÖ, Altan N, Kandilci U. Activity of Superoxide Dismutase in Erythrocyte of Nonalcoholic Chronic Liver Diseases. *General Pharmacology* 1994; 25: 1349-1351.
59. Engin A, Bozkurt BS, Altan N, Memiş L, Bukan N. Nitric oxide-mediated liver injury in presence of experimental bile duct obstruction. *World Journal of Surgery* 2003; 27: 253-255.
60. Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Torun M, Şimşek B, Sepici V. Oxidation of Uric Acid in Rheumatoid Arthritis: Is Allontoin a Marker of Oxidative Stress? *Free Radical Research* 2004; 38: 623-628.
61. Yardım-Akaydın S, Sepici A, Özkan Y, Şimşek B, Sepici V. Evaluation of allantoin levels as a new marker of oxidative stress in Behçet's disease. *Scand J Rheumatol* 2006; 35: 61-64.
62. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Science* 1992; 50: 335-339.
63. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews* 1995; 11: 181-192.
64. Bukan N, Sancak B, Yavuz Ö, Koca C, Tutkun F, Özçelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian J Biochem* 2003; 40: 447-450.
65. Bissels GJ, Heide LP, Kamal A. Ageing and diabetes: implications for brain function. *Eur J Pharmacol* 2002; 441: 1-14.

66. Greene DA, Stevens MJ, Obrosova I. Glucose induced oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Eur J Pharmacol* 1999; 375: 217-223.
67. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes* 2003; 52: 1-8.
68. Rousselot DB, Bastard JP, Jaudon MC. Consequences of the diabetic status on the oxidant /antioxidant balance. *Diabetes and Metabolism* 2000; 26: 163-176.
69. Stern DM, Yan SD, Yan SF. Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) and complications of diabetes. *Ageing Research Reviews* 2002; 1: 1-15.
70. Schmidt AM, Stern D. A radical approach to the pathogenesis of diabetic complications. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 31: 367-369.
71. Bursell SE, Takagi C, Clermont AC. Specific retinal diacylglycerol and protein kinase C beta isoform modulation mimics abnormal retinal hemodynamics in diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2711-2720.
72. Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL. Preferential elevation of Protein Kinase C isoform  $\beta$ II and diacylglycerol levels in aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to 55 glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 11059-11063.
73. Yeh LA, Ashton MA. The increase in lipid peroxidation in diabetic rat lens can be reversed by oral sorbinil. *Metabolism* 1990; 39: 619-622.
74. De Matia G, Laurenti O, Bravi C. Effect of aldose reductase inhibition on glutathione redox status in erythrocytes of diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 965-968.
75. Reagan LP, Yee DK, Swzeda LI. Oxidative stress and HNE conjugation of GLUT3 are increased in the hippocampus of diabetic rats subjected to stress. *Brain Research* 2000; 862: 292-300.

76. Yagihashi S, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 1: 184-189.
77. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49: 1341-1348.
78. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-992.
79. Van Cruchten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-23.
80. Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 111-120.
81. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000; 108: 317-30.
82. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-245.
83. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005; 5: 12.
84. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: Programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ* 1995; 2: 87-96.
85. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
86. Nijhawan D, Honarpour N, Wang X. Apoptosis in neural development and disease. *Annu Rev Neurosci* 2000; 23: 73-87.
87. Fujikawa DG. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. *Epilepsy Behav* 2005; 7: 3-11.
88. Li T, Fan Y, Luo Y, Xiao B, Lu C. In vivo delivery of a XIAP (BIR3-RING) fusion protein containing the protein transduction domain protects against neuronal death induced by seizures. *Exp Neurol* 2006; 197: 301-308.

89. Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1557-1572.
90. Takano J, Tomioka M, Tsubuki S, Higuchi M, Iwata N, Itohara S, et al. Calpain mediates excitotoxic DNA fragmentation via mitochondrial pathways in adult brains: Evidence from calpastatin mutant mice. *J Biol Chem* 2005; 280: 16175-16184.
91. Ananth C, Thameem Dheen S, Gopalakrishnakone P, Kaur C. Domoic acid-induced neuronal damage in the rat hippocampus: Changes in apoptosis related genes (bcl-2, bax, caspase-3) and microglial response. *J Neurosci Res* 2001; 66: 177-190.
92. Henshall DC, Araki T, Schindler CK, Lan JQ, Tiekoter KL, Taki W, et al. Activation of Bcl-2-associated death protein and counter-response of Akt within cell populations during seizure-induced neuronal death. *J Neurosci* 2002; 22: 8458-8465.
93. Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1: 120-129.
94. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.
95. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348: 1365-1375.
96. Philip J Barr, L David Tomei. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; 12: 487-493.
97. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2008.
98. Bouillon R, Moody T, Sporn M, Barrett JC, Norman AW. NIH deltanoids meeting on vitamin D and cancer conclusion and strategic options. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 3-5.
99. Anderson, GD. 2008. Vitamins. Web sayfası. Erişim tarihi: 19.09.2008 [andersenchiro.com/vitaminsandminerals.htm](http://andersenchiro.com/vitaminsandminerals.htm)

100. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 93-101.
101. Zempleni J, Rucker RB. *Handbook of vitamins*. 4th ed. CRC Press 2008; 608.
102. Rucker RB. *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker, Inc 2001; 3: 616.
103. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D<sub>2</sub> is much less effective than Vitamin D<sub>3</sub> in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 5387–5391.
104. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol* 2006; 92: 4-8.
105. Whiting SJ, Calvo MS. Dietary recommendations to meet both endocrine and autocrine needs of Vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 7-12.
106. World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations. Joint WHO/FAO Expert consultation on human vitamin and mineral requirements (1998): Vitamin and mineral requirements in human nutrition. 2nd ed. Bangkok, Thailand 2004.
107. MacLaughlin J, Holick MF. Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D<sub>3</sub>. *J Clin Invest* 1985; 76: 1536-1538.
108. Karadavut Kİ, Başaran A, Çakçı A. Osteoporoz tedavisinde vitamin D'nin yeri. *TJ Geriatrics* 2002; 5: 115-122.
109. Mathieu C, Gysemans C, Giulietti A, Bouillon R. Vitamin D and diabetes. *Diabetologia* 2005; 48: 1247- 1257.
110. van Etten E, Mathieu C. Immunoregulation by 1, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>: basic concepts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; 97: 93-101.
111. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001; 358: 1500-1503.
112. Harris S. Can vitamin D supplementation in infancy prevent type 1 diabetes? *Nutr Rev* 2002; 60: 118-21.
113. Overbergh L, Decallonne B, Waer M, Rutgeerts O, Valckx D, Casteels KM, et al. 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> induces an autoantigen-specific T-helper

- 1/T-helper 2 immune shift in NOD mice immunized with GAD65. *Diabetes* 2000; 49: 1301-1307.
114. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endoc Rev* 2005; 26: 662-687.
  115. Cantorna, MT. Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *PSEBM* 2000; 223: 230-233.
  116. May E, Asadullah K, Zügel U. Immunoregulation through 1, 25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004; 3: 377-393.
  117. Ardeniz Ö. Vitamin D ve immün sistem. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2008; 28: 198-205.
  118. Pfeifer M, Bergerow B, Minne HW, Nachtigall D, Hansen C. Effects of short term vitamin D3 and calcium supplementation on blood pressure and parathyroid hormone levels in elderly women. *JCEM* 2001; 86: 1633-1637.
  119. Neveu I, Naveilhan P, Jehan F, Baudet C, Wion D, De Luca HF et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of nerve growth factor in primary cultures of glial cells. *Mol. Brain Res* 1994; 24: 70–76.
  120. Cornet A, Baudet C, Neveu I, Baron-Van Evercooren A, Brachet P, Naveilhan P. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of *VDR* and *NGF* gene in Schwann cells *in vitro*. *J Neurosci Res* 1998; 53: 742–746.
  121. Saporito MS, Brown ER, Hartpence KC, Wilcox HM, Vaught JL, Carswell S. Chronic 1, 25-dihydroxyvitamin D3-mediated induction of nerve growth factor mRNA and protein in L929 fibroblasts and in adult rat brain. *Brain Res* 1994; 633: 189–196.
  122. Neveu I, Naveilhan P, Baudet C, Brachet P, Metsis M. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates NT-3, NT-4 but not BDNF mRNA in astrocytes. *NeuroReport* 1994; 6: 124–126.

123. Naveilhan P, Neveu I, Wion D, Brachet P. 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>, an inducer of glial cell line-derived neurotrophic factor. *NeuroReport* 1996; 7: 2171–2175.
124. Wang Y, Chiang YH, Su TP, Hayashi T, Morales M, Hoffer BJ et al. Vitamin D<sub>3</sub> attenuates cortical infarction induced by middle cerebral arterial ligation in rats. *Neuropharmacology* 2000; 39: 873–880.
125. Riaz S, Malcangio M, Miller M, Tomlinson DR. A vitamin D<sub>3</sub> derivative (CB1093) induces nerve growth factor and prevents neurotrophic deficits in streptozotocindiabetic rats. *Diabetologia* 1999; 42: 1308–1313.
126. Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, et al. Vitamin D<sub>3</sub> attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* 2001; 904: 67–75.
127. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM et al. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type Ca<sup>2+</sup> channel expression in hippocampal neurons. *J. Neurosci* 2001; 21: 98–108.
128. de Viragh PA, Haglid KG, Celio MR. Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86: 3887–3890.
129. Garcion E, Nataf S, Berod A, Darcy F, Brachet P. 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits the expression of inducible nitric oxide synthase in rat nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Mol Brain Res* 1997; 45: 255–267.
130. Garcion E, Sindji L, Montero-Menei C, Andre C, Brachet P, Darcy F. Expression of inducible nitric oxide synthase during rat brain inflammation: regulation by 1, 25- dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Glia* 1998; 22: 282–294.
131. Dawson VL, Dawson TM. Nitric oxide actions in neurochemistry. *Neurochem Int* 1996; 29: 97–110.

132. Mitrovic B, St Pierre BA, Mackenzie-Graham AJ, Merrill JE. The role of nitric oxide in glial pathology. *Ann New York Acad. Sci* 1994; 738: 436–446.
133. Furman I, Baudet C, Brachet P. Differential expression of M-CSF, LIF, and TNF- $\alpha$  genes in normal and malignant rat glial cells: regulation by lipopolysaccharide and vitamin D. *J Neurosci Res* 1996; 46: 360–366.
134. Garcion E, Thanh XD, Bled F, Teissier E, Dehouck MP, Rigault F, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity in rat brain. *Neurosci Lett* 1996; 216: 183–186.
135. Garcion E, Thanh XD, Bled F, Teissier E, Dehouck MP, Rigault F, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the synthesis of  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 859–866.
136. Sonnenberg J, Luine VN, Krey LC, Christakos S. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 treatment results in increased choline acetyltransferase activity in specific brain nuclei. *Endocrinology* 1986; 118: 1433–1439.
137. Baksi SN, Hughes MJ. Chronic vitamin D deficiency in the weanling rat alters catecholamine metabolism in the cortex. *Brain Res* 1982; 242: 387–390.
138. Puchacz E, Stumpf WE, Stachowiak EK, Stachowiak MK. Vitamin D increases expression of the tyrosine hydroxylase gene in adrenal medullary cells. *Mol Brain Res* 1996; 36: 193–196.
139. Abe E, Miyaura C, Sakagami H, Takeda M, Konno K, Yamazaki T et al. Differentiation of Mouse myeloid leukemia cells induced by  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 4990–4994.
140. Naveilhan P, Berger F, Haddad K, Barbot N, Benabid AL, Brachet P et al. Induction of glioma cell death by 1, 25(OH) $_2$  vitamin D3: towards an endocrine therapy of brain tumors? *J Neurosci Res* 1994; 37: 271–277.
141. Baudet C, Chevalier G, Naveilhan P, Binderup L, Brachet P Wion D. Cytotoxic effects of  $1\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3 and synthetic vitamin D3 analogues on a glioma cell line. *Cancer Lett* 1996; 100: 3–10.

142. Baudet C, Chevalier G, Chassevent A, Canova C, Filmon R, Larra F et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 induces programmed cell death in a rat glioma cell line. *J Neurosci Res* 1996; 46: 540–550.
143. Davoust N, Wion D, Chevalier G, Garabedian M, Brachet P, Couez D. Vitamin D receptor stable transfection restores the susceptibility to 1, 25-dihydroxyvitamin D3 cytotoxicity in a rat glioma-resistant clone. *J Neurosci Res* 1998; 52: 210–219.
144. Naveilhan P, Neveu I, Baudet C, Funakoshi H, Wion D, Brachet P et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 regulates the expression of the low-affinity neurotrophin receptor. *Mol Brain Res* 1996; 41: 259–268.
145. Meldolesi J, Sciorati C, Clementi E. The p75 receptor: first insight into the transduction mechanisms leading to either cell death or survival. *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 242–243.
146. Alvarez-Dolado M, González-Sancho JM, Navarro-Yubero C, García-Fernández LF, Muñoz A. Retinoic acid and 1, 25-dihydroxyvitamin D3 inhibit tenascin-C expression in rat glioma C6 cells. *J Neurosci Res* 1999; 58: 293–300.
147. Zou J, Landy H, Feun L, Xu R, Lampidis T, Wu CJ, et al. Correlation of a unique 220-kDa protein with vitamin D sensitivity in glioma cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1361–1365.
148. Trouillas P, Honnorat J, Bret P, Jouvét A, Gerard JP. Redifferentiation therapy in brain tumors: long-lasting complete regression of glioblastomas and an anaplastic astrocytoma under long term 1 $\alpha$ -hydroxycholecalciferol. *J Neuro-Oncol* 2001; 51: 57–66.
149. Neveu I, Naveilhan P, Mena C, Wion D, Brachet P, Garabédian M. Synthesis of 1, 25- dihydroxyvitamin D3 by rat brain macrophages in vitro. *J Neurosci Res* 1994; 38: 214–220.

150. Lemire JM, Archer DC. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 prevents the *in vivo* induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 1991; 87: 1103–1107.
151. Nataf S, Garcion E, Darcy F, Chabannes D, Muller JY, Brachet P. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 exerts regional effects in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55: 904–914.
152. Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 7861–7864.
153. Mattner F, Smiroldo S, Galbiati F, Muller M, Di Lucia P, Poliani PL et al. Inhibition of Th1 development and treatment of chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis by a non-hypercalcemic analogue of 1, 25-dihydroxyvitamin D3. *Eur J Immunol* 2000; 30: 498–508.
154. Cantorna MT, Woodward WD, Hayes CE, DeLuca HF. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF- $\beta$ 1 and IL-4. *J Immunol* 1998; 160: 5314–5319.
155. Brachet, P. Vitamin D, a hormone involved in the control of neuroimmune interactions in the brain. In *Neuroimmune Interactions in Neurologic Disorders* (Patterson, eds), Springer-Verlag 2000; 193–201.
156. Hayes CE. Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis. *Proc Nutr Soc* 2000; 59: 531–535.
157. Sutherland MK, Somerville MJ, Yoong LK, Bergeron C, Haussler MR, McLachlan DR. Reduction of vitamin D hormone receptor mRNA levels in Alzheimer as compared to Huntington hippocampus: correlation with calbindin-28k RNA levels. *Mol Brain Res* 1992; 13: 239–250.
158. Erel O A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem* 2004; 37: 112–119.

159. Erel O A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 2005; 38: 1103–1111.
160. Demirbag R, Yilmaz R, Erel O, Gultekin U, Asci D, Elbasan Z. The relationship between potency of oxidative stress and severity of dilated cardiomyopathy. *Can J Cardiol* 2005; 21: 851-855.
161. Bolzan AD, Bianchi MS. Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res* 2002; 512: 121–134.
162. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1–40.
163. Suemori S, Shimazawa M, Kawase K, Satoh M, Nagase H, Yamamoto T et al. Metallothionein, an Endogenous Antioxidant, Protects against Retinal Neuron Damage in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3975–3982.
164. Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC et al. 1, 25(OH)<sub>2</sub>-Vitamin D<sub>3</sub>, a steroid hormone that produces biological effects via both genomic and nongenomic pathway. *J. Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 231–240.
165. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980–991.
166. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant: ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol, and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS J* 1993; 326: 285–288.
167. Chen KB, Lin AM, Chiu TH. 2003. Systemic vitamin D<sub>3</sub> attenuated oxidative injuries in the locus coeruleus of rat brain. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 993: 313–324.
168. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D<sub>3</sub> and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidants system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitamin Nutrition Res* 1996; 66: 39–45.

169. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative Stress in the Pathogenesis of Diabetic Neuropathy. *Endocrine Reviews* 2004; 25: 612–628.
170. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 668–676.
171. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol Review* 2007; 39: 44-84.
172. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect Review* 1998; 106: 1229-1234.
173. Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D3 on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 319-329.
174. Jakobsen J, Sidenius E, Gundersen HJG, Osterby R. Quantitative changes of cerebral neocortical structure in insulin-treated long-term streptozotocin-induced diabetes in rats. *Diabetes* 1987; 36: 597-601.
175. Junker U, Jaggi C, Bestetti G, Rossi GL. Basement membrane of hypothalamus and cortex capillaries from normotensive and spontaneously hypertensive rats with streptozotocin-induced diabetes. *Acta Neuropathol Berl* 1985; 65: 202-208.
176. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Report* 2004; 9: 145-152.
177. Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH, Van Muiswinkel FL. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 217–220.
178. Karasawa M, Hosoi J, Hashiba H. Regulation of metallothionein gene expression by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1987; 84: 8810–8813.

179. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 2699-2706.
180. Beutler E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. *Annu Rev Med* 1992; 43: 47–59.
181. Koren R, Rocker D, Kotestiano O, Liberman UA, Ravid A. Synergistic anticancer activity of 1, 25-dihydroxyvitamin D(3) and immune cytokines: the involvement of reactive oxygen species. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000; 73: 105–112.
182. Xue H, Jin L, Jin L, Zhang P, Li D, Xia Y, et al. Neuroprotection of aucubin in primary diabetic encephalopathy. *Sci China C Life Sci* 2008; 51: 495-502.
183. Li ZG, Zhang W, Sima AA. C-peptide Prevents Hippocampal Apoptosis in Type 1 Diabetes *Int Jnl Experimental Diab Res* 2002; 3: 241–245.
184. Cosar M, Songur A, Sahin O, Uz E, Yilmaz R, Yagmurca M, et al. The neuroprotective effect of fish n-3 fatty acids in the hippocampus of diabetic rats. *Nutr Neurosci* 2008; 11: 161-166.
185. Tuzcu M, Baydas G. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced and memory impairment in rats. *Eur J Pharmacol* 2006; 537: 106–110.
186. Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaslanma. *Cerrahpasa Journal of Medicine* 2004; 35: 159-169.
187. Lee JI, Lee KS, Paik YH, Nyun Park Y, Han KH, Chon CY, et al. Apoptosis of hepatic stellate cells in carbon tetrachloride induced acute liver injury of the rat: analysis of isolated hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2003; 39: 960-966.
188. Hoijman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004; 145: 418-425.
189. Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 109-120.

190. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997; 88: 355-365.
191. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 2001; 15: 2922-2933.
192. Öniz H. Apoptoz: ölmeye yatmak. Sağlık Bakanlığı Tepecik Eğitim Hastanesi Dergisi 2004; 14: 1-20.
193. Piotr Piotrowski, Krystyna Wierzbicka, Mieczysław Smialek Neuronal death in the rat hippocampus in experimental diabetes and cerebral ischaemia treated with antioxidants *Folia Neuropathol* 2001; 39: 147-154.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ`da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ`da tamamladım. 1997 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2003 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2004-2006 yılları arasında Elazığ Palu Devlet Hastanesinde çalıştım. 2006 Nisan`da Tıpta Uzmanlık Sınavıyla başladığım Fırat Üniversitesi Nöroloji ABD` da ki uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim. Orta derecede İngilizce bilmekteyim.