

**T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL DİYABETİK RAT TESTİS DOKUSUNDAKİ APOPTOTİK
DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE VİTAMİN D VE VİTAMİN E'NİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Ali Ekber TÜRK**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Emir DÖNDER**

**ELAZIĞ
2010**

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. İrfan ORHAN

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Emir DÖNDER

İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı

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

Prof. Dr. Emir DÖNDER

Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

..... _____
..... _____
..... _____
..... _____
..... _____

Aileme.....

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta tez danışmanım ve aynı zamanda İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. Emir DÖNDER olmak üzere, diğer saygıdeğer hocalarım; Prof. Dr. Ahmet IŞIK, Prof. Dr. Hüseyin ÇELİKER, Prof. Dr. İ. Halil BAHÇECİOĞLU, Prof. Dr. Ayhan DOĞUKAN, Doç. Dr. Yusuf ÖZKAN, Doç. Dr. Mehmet YALNIZ, Doç. Dr. E. Tamer ELKIRAN, Doç. Dr. Bilge AYGEN, Doç. Dr. S. Serdar KOCA, Yrd. Doç. Dr. Cem AYGÜN, Yrd. Doç. Dr. Ulvi DEMİREL'e, yan dal ihtisası yapmakta olan Uzm. Dr. İrem PEMBEGÜL YIĞIT, Uzm. Dr. Ramazan ULU ve Uzm. Dr. Metin ÖZGEN'e teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, deneyiminden ve bilgisinden faydalandığım Fırat Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Uzm. Dr. Tuncay KULOĞLU ve Yrd. Doç. Dr. Özlem DABAK'a ve yine ekibiyle beraber tezime katkıları olan Veterinerlik Fakültesi'nden Gaffari TÜRK'e teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım samimi ve dostane duygular paylaştığım tüm asistan ve uzman olmuş arkadaşlarıma, iç hastalıkları servislerinde çalışan tüm hemşire, personel ve kliniğimiz çalışanlarına teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan ve hayatımın tüm aşamalarında olduğu gibi asistanlığım süresince de bana sevgi ve desteklerini bir an bile eksik etmeyen ve bana sabırlarını sunan sevgili annem, babam ve kardeşlerime teşekkür ederim.

Tez çalışmam esnasında her türlü desteğini esirgemeyen, varlığıyla güven veren yol arkadaşım, sevgili eşim Dr. Bilge (AYDIN) TÜRK'e ve biricik oğlumuz Melih'e sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Diabetes mellitus (DM), mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır. Diyabetik erkeklerde, artmış oksidatif strese bağlı olarak testislerde germ hücrelerinde apoptozisde artış meydana gelmekte ve testiküler fonksiyon bozuklukları ortaya çıkmaktadır. Son yıllarda vitamin D'nin antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir. Vitamin E ise çok önemli bir antioksidan olup, lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur.

Bu çalışmada, streptozotosin (STZ) ile oluşturulan deneysel diyabet modelinde vitamin D ve vitamin E'nin, rat testis dokusundaki apoptotik değişiklikler üzerine koruyucu etkileri incelenmiştir.

Çalışmada, 28 adet 8 haftalık Wistar albino cinsi erkek ratlar kullanıldı. Deneysel hayvanları her grupta 7 hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna (Grup I) herhangi bir uygulama yapılmadı. Diğer 3 gruba 50 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum-sitrat tamponunda (pH: 4,5) çözülürülerek intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. Diyabet oluştuğundan sonra diyabetik grup (Grup II) belirlenip herhangi bir uygulama yapılmadı. DM + vitamin D grubuna (Grup III), vitamin D (50 IU/kg/gün) ve DM + vitamin E grubuna (Grup IV) ise vitamin E (500 IU/kg/gün) 9 hafta süreyle oral yolla verildi. Deneysel sonunda ratlar dekapite edilerek testis dokuları çıkarıldı. Testis dokularına Hemotoksilen&Eozin ve TUNEL boyama yapıldı.

Diyabetik grup, kontrol grubuna göre kıyaslandığında testis, kauda epididimis, ventral prostat ağırlıkları, sperm sayısı ve motilitesi ($p<0.01$) ile epididimis ve seminal bez ağırlığında ($p<0.001$) anlamlı derecede azalma mevcuttu. Diyabetik gruba göre DM + vitamin D grubu ve DM + vitamin E grubunda testis ağırlığı ve sperm motilitesi ($p<0.01$) ile epididimis ağırlığında ($p<0.001$) anlamlı derecede artış mevcuttu. Histolojik incelemelerde, diyabetik grupta atrofik tübüller, belirgin ödem, damarlarda konjesyon, sayıca azalmış ve yer yer disorganize germ hücreleri mevcuttu. DM + vitamin D grubu ve DM + vitamin E grubunda ise kontrol grubuna yakın histolojik bulgular mevcuttu. TUNEL boyamada, diyabetik grupta apoptotik indekste anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). Diyabetik grup ile kıyaslandığında DM + vitamin D grubu ve DM + vitamin E grubunda apoptotik indekste anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$).

Sonuç olarak, DM'ye bağlı oksidatif strese karşı vitamin D ve vitamin E'nin koruyucu etkilerinin gösterilmesi, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla yeni tedavi yaklaşımlarının denenmesinin yararlı olabileceği kanatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Diabetes mellitus, vitamin D, vitamin E, apoptozis, testis.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EFFECTS VITAMIN D AND VITAMIN E ON APOPTOSIS AT EXPERIMENTAL DIABETIC RAT TESTES TISSUE

Diabetes mellitus (DM) is a chronic metabolic disease characterized by microvascular and macrovascular complications. In diabetic men, apoptosis increases in testicular germ cells and testicular dysfunction occurs, due to increased oxidative stress. In recent years, vitamin D has been shown to have antioxidative effects. Vitamin E is an antioxidant that is very important, creates a first line of defense against lipid peroxidation.

In this study, protective effects of vitamin D and vitamin E on apoptotic changes of the rat testicular tissue in streptozotocin (STZ) induced experimental model of diabetes were investigated.

Twenty-eight Wistar albino male rats, aged 9 weeks were used. The experimental animals were divided into 4 groups that have 7 animals in each group. No application made to the control group (group 1). 50 mg/kg single-dose STZ was intraperitoneally (i.p) induced to other 3 groups by dissolving on the 0,1 M sodium-citrate buffer (pH: 4,5). After diabetes occurred, the diabetic group (Group II) did not receive any medication. Vitamin D (50 IU/kg/day) was given to DM + vitamin D group (Group III) and vitamin E (500 IU/kg/day) was given to DM + vitamin E group (Group IV), orally for 9 weeks. Rats were decapitated at the end of the experiment and testicular tissues were removed. The testicular tissues were stained with Haematoxylin-Eosin and TUNEL.

In diabetic group, weights of testis, cauda epididimidis and ventral prostat, count and motility of sperm ($p < 0.01$), weights of epididimidis and seminal vesicles were significantly less than control group ($p < 0.001$). In DM + vitamin D group and DM + vitamin E group, there was a significant increase in the weight of testis and sperm motility ($p < 0.01$) and weight of epididimidis compared to diabetic group ($p < 0.001$). In histological examinations of diabetic group, there were atrophic tubules, marked edema, vascular congestion, decrease in number of germ cells and some disorganised areas. But in DM + vitamin D group and DM + vitamin E group, there were similar histological findings with control group. Diabetic group had a significant increase in apoptotic index with TUNEL staining ($p < 0.05$). There was a

significant reduction in apoptotic index in DM + vitamin D group and DM + vitamin E group compared to diabetic group ($p < 0.05$).

As a result, showing the protective effects of vitamin D and vitamin E against the oxidative stress due to DM, new treatment approaches may be useful in order to prevent complications of diabetes.

Key words: Diabetes mellitus, vitamin D, vitamin E, apoptosis, testis.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLO LİSTESİ	xii
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Diabetes Mellitus	1
1.1.1. Tanım	1
1.1.2. Epidemiyoloji	1
1.1.3. Tanı	2
1.1.3.1. Oral Glukoz Tolerans Testi	3
1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması	4
1.1.5. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	4
1.2. Serbest Radikaller	4
1.3. Oksidatif Stres	6
1.3.1. Giriş	6
1.3.2. Diyabet ve Oksidatif Stres	6
1.3.2.1. Glukozun Oto-Oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi	7
1.3.2.2. Proteinlerin Glikolizasyonu ve İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri Oluşumu	8
1.3.2.3. Poliöl Yolu	8
1.4. Anti-Oksidanlar	9
1.4.1. Antioksidan Mekanizmalar	9
1.4.2. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar	10
1.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	10
1.4.2.2. Katalaz (KAT)	10

1.4.2.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	10
1.4.2.4. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)	11
1.4.2.5. Glutasyon Redüktaz (GR)	11
1.4.2.6. Paraoksonaz (PON)	11
1.4.3. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar	11
1.5. Testis ve Oksidatif Stres	11
1.6. Diyabet ve Testis	13
1.7. Apoptozis	13
1.7.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi	13
1.7.2. Apoptozisin Regülasyonu	14
1.7.2.1. p53'ün Rolü	15
1.7.2.2. Bcl-2/Bax	15
1.7.2.3. Kaspazlar	16
1.7.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu	17
1.7.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi	17
1.7.3.2. Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu	18
1.7.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)	18
1.7.5. Hastalıklarda Apoptozis	19
1.7.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	20
1.7.6.1. TUNEL (TdT-mediated nick and labeling technique) Yöntemi	21
1.8. E Vitamini	21
1.8.1. Yapısı ve Özellikleri	21
1.9. D vitamini	23
1.9.1. Sentez ve Metabolizma	23
1.9.2. 1,25(OH)2D'nin Etkisi	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Deney Hayvanları	28
2.2. Diyabet İndüksiyonu	29
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	29
2.4. Örneklerin Alınması	30
2.4.1. Spermatolojik Muayeneler	30
2.5. Biyokimyasal Çalışma	30

2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri	30
2.6. Histolojik Çalışma	30
2.7. TUNEL Metodu	31
2.8. İstatistiksel Analiz	33
3. BULGULAR	34
3.1. Kan Glukoz Düzeyleri	34
3.2. Reprodüktif Parametrelere Ait Değerler	34
3.3. Histolojik Bulgular	35
3.4. TUNEL Bulgular	39
4. TARTIŞMA	43
5. KAYNAKLAR	50
6. ÖZGEÇMİŞ	66

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. DM'nin tanı kriterleri	2
Tablo 2. Tip 2 DM için yüksek risk grupları	3
Tablo 3. ADA 1997, 2004 ve DSÖ 1999 raporlarına göre bozulmuş glukoz metabolizma kriterleri	3
Tablo 4. DM'nin etiyolojik sınıflandırılması	4
Tablo 5. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları	4
Tablo 6. Apoptozis ve genler	15
Tablo 7. Apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar	20
Tablo 8. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	21
Tablo 9. Deney hayvanlarına verilen rat yeminin terkibi	28
Tablo 10. Histolojik takip serileri	31
Tablo 11. TUNEL boyama işlemi	33
Tablo 12. STZ ile deneysel DM oluştuğu andaki başlangıç ve deney sonu kan glukoz değerleri	34
Tablo 13. Reprodüktif parametrelere ait değerler	35
Tablo 14. Apoptotik indeks (%)	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü	9
Şekil 2. Apoptozisin mekanizması	19
Şekil 3. E vitamininin kimyasal yapısı	22
Şekil 4. D vitamininin sentez ve metabolizması	25
Şekil 5. D vitamininin kalsiyum, fosfor ve kemik dengesi üzerindeki etkileri dışında potansiyel pleiotropik etkileri	27
Şekil 6. Kontrol grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&E X400.	36
Şekil 7. DM grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400	37
Şekil 8. DM grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400	37
Şekil 9. DM + Vit D grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400	38
Şekil 10. DM + Vit E grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX200	38
Şekil 11. Kontrol grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→) X 200	39
Şekil 12. DM grubu testis dokusunda artmış TUNEL pozitif hücreler (→) X 200	40
Şekil 13. DM + Vit D grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→) X 200	40
Şekil 14. DM + Vit E grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→) X 200	41
Şekil 15. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu. X 200	41
Şekil 16. TUNEL negatif kontrol. X 200	42

KISALTMALAR LİSTESİ

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AGEs	: Glikozilasyon Son Ürünleri
Aİ	: Apoptotik İndeks
AIF	: Apoptozis Uyarıcı Faktör
Apaf-1	: Apoptotik Proteaz Aktivatör Faktör-1
ATP	: Adenozin Trifosfat
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
eNOS	: Endotelyal Nitrik Oksit Sentetaz
FSH	: Follikül Stimulan Hormon
GDM	: Gestasyonel Diabetes Mellitus
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz
H&E	: Hematoksilen Eozin
IFG	: Bozulmuş Açlık Glukozu
IGT	: Bozulmuş Glukoz Toleransı
KAT	: Katalaz
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoprotein
LH	: Luteinizan Hormon
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	: Nitrik Oksit
OGTT	: Oral Glukoz Tolerans Testi
PON	: Paraoksonaz
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
STZ	: Streptozotosin
TdT	: Deoksinükleotidil Transferaz
TNF	: Tümör Nekrozis Faktör
TNF-R1	: TNF Reseptörü-1

TUNEL : TdT-mediated nick and labeling

VDR : Vitamin D Reseptörü

1. GİRİŞ

1.1. Diabetes Mellitus

1.1.1. Tanım

Hiperglisemi ile karakterize heterojen bir metabolizma bozukluğu olan diabetes mellitus (DM) (1), insülin sekresyonu ve/veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanmaktadır. DM; karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ile hızlanmış aterosklerozla birlikte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (2).

Hiperglisemi, DM tanısı konulmadan uzun süre önce mevcut olabilir. Semptomlar çoğunlukla ağır değildir, bazen hiçbir semptom da görülmeyebilir. Ağız kuruluğu, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifaji gibi semptomlar görülebilir. Ağır formları tedavi edilmediğinde stupor, koma, hatta ölüme neden olan ketoasidozis veya nonketotik hiperosmolar hiperglisemi ile kendini gösterebilir (3).

1.1.2. Epidemiyoloji

Diabetes mellitus'un tanınması, erken dönemde tanı konması ve tedavi programlarının belirlenmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir (2). Yeni bir konu olan diyabet epidemiyolojisi, ilk olarak 1979'da "National Diabetes Data Group" toplantısında ele alınmıştır. Daha sonra 1980'de, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), DM kriterleri ve sınıflandırmasının standardizasyonu toplantılarında diyabet epidemiyolojisi tartışılmıştır. Son 20 yılda diyabetin araştırma, bakım ve önlenmesi için epidemiyoloji çalışmaları oldukça hızlanmıştır. Günümüzde DM birçok gelişmiş ve gelişmekte olan ülkede epidemik bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Günümüzde epidemiyolojiye genetik, çevresel, davranışsal, sosyoekonomik ve kültürel faktörler etkilidir. Bu faktörlerin eklenmesi özellikle Tip 2 DM prevalansında artışın sebepleri arasındadır. Dünyanın farklı bölgelerinde farklı oranlarda görülen DM'nin en yüksek prevalansı Amerika'da yaşayan Pima Kızılderilileri'nde olup % 55'tir. Grönland ve Alaska Eskimolarında ise DM prevalansının çok düşük olduğu saptanmıştır (4).

Ülkemizde yapılan en geniş çalışma Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Araştırması (TURDEP) olup; 20 yaş ve üzerinde, % 45'i erkek ve % 55'i kadın; toplam 24.788 hastadan oluşan, toplum kökenli kesitsel bir alan çalışmasıdır. Bu

çalışmada DM prevalansı % 7,2 (daha önce tanı almamış yeni DM % 2,3) ve glukoz tolerans bozukluğu (IGT) prevalansı % 6,7 olarak saptanmıştır. Kadınlarda DM, IGT ve obezite (özellikle kırsal kesimde) daha yüksek bulunmuştur (5). Gökçel ve arkadaşlarının Adana'da yaptığı çalışmada 1637 randomize seçilmiş, 20-79 yaş arası erişkin birey çalışmaya dahil edilmiştir. Erkeklerde DM prevalansı % 12,9 ve kadınlarda % 10,9 iken toplam prevalansı % 11,6 olarak bulunmuştur. Keleştimur ve arkadaşlarının Kayseri'de 30 yaş ve üzerindeki 1774 erişkinin 1452'sinde yapılan oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonrasında % 4 DM, % 2,9 tanı konulmamış DM, % 9 IGT saptanmış olup toplam IGT % 15,9'dur (6).

1.1.3. Tanı

Diabetes mellitus tanısı konusunda oldukça sık değişiklikler olmuştur. Amerikan Diyabet Birliği (ADA) ve DSÖ uzmanları tarafından paneller yapılmıştır. En son gözden geçirilen ve uzlaşma sağlanan tanı kriterleri açıklanmıştır (1). ADA'nın 2004 ve DSÖ'nün 1999 yılı raporlarına göre DM'nin tanı kriterleri Tablo 1'deki gibidir (4, 7, 8).

Tablo 1. DM'nin tanı kriterleri

-
1. Klasik diyabet semptomları (poliüri, polidipsi ve açıklanamayan kilo kaybı) ile birlikte günün herhangi bir saatinde, son öğün zamanı dikkate alınmaksızın, plazma glukoz konsantrasyonunun ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) olması
 2. En az 8 saatlik açlık sonrasında plazma glukoz düzeyinin ≥ 126 mg/dl (7,0 mmol/L) olması
 3. 75 gr glukoz kullanılarak uygulanan olan Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT)'nin 2. saat glukoz düzeyinin ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/L) olması
-

Eğer açlık kan şekeri 100-125 mg/dl aralığında ise kişide bozulmuş açlık glukozu (IFG), OGTT sonrası 2. saat kan şekeri düzeyi 140-199 mg/dl aralığında ise kişide bozulmuş glukoz toleransı (IGT) mevcuttur (7).

Üçüncü kriter olan OGTT'nin rutin olarak uygulanması önerilmez. Diyabet için yüksek risk taşıyan bireyler (Tablo 2), tanı amaçlı olarak OGTT ile değerlendirilmelidir (1, 9).

Tablo 2. Tip 2 DM için yüksek risk grupları

Amerikan Diyabet Birliği, 2004 yılında açlık plazma glukoz düzeyinde bir değişiklik yaparak alt sınırı 100 mg/dl 'ye indirmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. ADA 1997, 2004 ve DSÖ 1999 raporlarına göre bozulmuş glukoz metabolizma kriterleri (7, 8).

		ADA (1997)	ADA (2004)	DSÖ (1999)
Diyabet	Açlık	$\geq 126 \text{ mg/dl}$	$\geq 126 \text{ mg/dl}$	$\geq 126 \text{ mg/dl}$
	OGTT 2. saat	$\geq 200 \text{ mg/dl}$	$\geq 200 \text{ mg/dl}$	$\geq 200 \text{ mg/dl}$
IFG	Açlık	110-125 mg/dl	100-125 mg/dl	110-125 mg/dl
	OGTT 2. saat			$< 140 \text{ mg/dl}$
IGT	Açlık			$< 126 \text{ mg/dl}$
	OGTT 2. saat	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl

1.1.3.1. Oral Glukoz Tolerans Testi

Oral glukoz tolerans testi, sabah vaktinde, her zamanki fiziksel aktivite ve en az 3 günlük sıkı bir diyet ($> 150 \text{ gr}$ günlük karbonhidrat) yaptıktan sonra yapılmalıdır. Hastalar test öncesi gece boyunca 10-16 saat aç kalmalıdır. Test sonucunu etkileyebilen faktörler göz önüne alınmalıdır (medikasyon, inaktivite, enfeksiyonlar vs.). Açlık kan örneği alındıktan sonra, hastalara 5 dakikalık süre içinde 75 gr glukoz, 300 ml su içinde eritilerek içirilir. Kan örnekleri testten önce

(açlık) ve testin başlangıcından sonra ikinci saatte alınmalıdır (3). OGTT sonuçları Tablo 3’de verilen kriterlere göre yorumlanmalıdır.

1.1.4. Diabetes Mellitus Sınıflaması

Diyabetin spesifik etiyojolojiyle tanımlanan formlarının artması üzerine 1997 yılında, ADA diyabetin klinik klasifikasyon kriterlerini düzenleyip DSÖ’ye bildirmiştir. Bu kriterler 1999 yılında DSÖ tarafından bir rapor halinde açıklanmıştır. Yeni sınıflama etiyojolojiye göre yapılmıştır. Bu sınıflama ile insüline bağımlı ve insüline bağımlı olmayan diyabet yerine Tip 1 ve Tip 2 diyabet terminolojisinin kullanılması tavsiye edilmiştir. Diyabet 4 ana klinik grup olacak şekilde sınıflandırılmıştır. Bunlar; Tip 1 DM, Tip 2 DM, diğer spesifik diyabet tipleri ve gestasyonel DM (GDM)’dir (10, 11). ADA’nın 2004’te kabul ettiği DM’nin etiyojolojik sınıflandırılması Tablo 4’de gösterilmiştir (7).

Tablo 4. DM’nin etiyojolojik sınıflandırılması

I- Tip 1 Diyabet

- a) İmmunolojik
- b) İdiopatik

II- Tip 2 Diyabet

III- Diğer spesifik tipler

IV- Gestasyonel diyabet (GDM)

1.1.5. Diabetes Mellitus’un Komplikasyonları

Diyabet, akut ve kronik komplikasyonlarla seyrederek. Uzun süreli diyabet kapilleri, arteriollerini yapan vasküler hücreleri ve bazal membranları etkileyerek tüm damarların yapısını bozar. Tüm mikrovasküler yapılar etkilenmesine karşın klinikte retina, renal glomerül ve büyük sinirlerdeki patolojiler ile ortaya çıkar (9). DM’nin akut ve kronik komplikasyonları gruplar halinde Tablo 5’de gösterilmiştir (12, 13).

1.2. Serbest Radikaller

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen otoritelerin üzerinde birleştiği tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir (14). Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en

fazla iki elektron bulunur. Serbest radikaller; pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (14).

Her ne kadar serbest radikal reaksiyonları, bağışıklık sistemi hücrelerinden nötrofil, makrofaj gibi hücrelerin savunma mekanizması için gerekli olsa da, serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır (15).

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, deoksiribonükleik asit (DNA) ve karbonhidratlar gibi tüm önemli bileşiklere etkilidirler ve de yapılarının bozulmalarına neden olurlar. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROS), nitrik oksit (NO^{\cdot}), hidroksil radikali (HO^{\cdot}), süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) peroksil radikali (ROO^{\cdot}) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenleri olarak bilinir (16).

Tablo 5. Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları

Akut Komplikasyonlar

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

Kronik Komplikasyonlar

Makrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik kalp hastalığı
- b. Periferik arter hastalığı
- c. Serebrovasküler hastalık

Mikrovasküler komplikasyonlar

- a. Diyabetik nöropati
- b. Diyabetik nefropati
- c. Diyabetik retinopati

Diğer komplikasyonlar

- a. Diyabetik ayak
 - b. Diyabetik gastroenteropati
 - c. Genitoüriner bozukluklar
 - d. Erektile disfonksiyon
-

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 (17).

1.3. Oksidatif Stres

1.3.1. Giriş

Oksidatif stres, diyabetin etiolojisinde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilir. Serbest radikaller normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir ve sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim halindedir. Fizyolojik olarak antioksidanların çoğu canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu savunur (18).

Diabetes mellitus, günümüz insanının yaşam şartlarından dolayı tüm dünyada hızla yayılan, yüksek mortalite ve morbidite riski taşıyan bir hastalıktır. Oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu, deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonun önemli derecede arttığı gözlenmiştir (19).

Bunlara ek olarak, antioksidan kapasitede görülen değişikliklerin ve uzamış oksidatif stresin, diyabetin kronik komplikasyonlarının oluşması ile de ilişkili olabileceği araştırmacılar tarafından vurgulanmaktadır (20, 21).

1.3.2. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikolizasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı saptanmıştır (22). Diyabette hücrel defansın, toksik serbest radikallere göre azalması uzun zamandır bilinmektedir (23).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimlerin ekspresyonlarının ve antioksidan kapasitenin

pankreas adacık hücrelerinde, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokularla kıyaslandığında en düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (24, 25).

Oksidatif strese en duyarlı yapılardan biri olduğu bilinen beta hücrelerinde gözlenen hasarın, hipergliseminin toksik etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir (26). Diyabet oluşturulan rat deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinde de artış saptanmıştır (27).

Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu savunan çalışmalar da bulunmaktadır (28). Bunun yanı sıra endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glukoz içeren ortamda inkübe edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (29, 30). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında bağlantı olduğu görüşü in vivo çalışmalar ile de desteklenmiştir (31). Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan streptozotosin (STZ) (32), oksidan maddeler oluşturarak Langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip eder. Uygun olmayan nitrik oksit (NO) cevaplarına neden olarak diyabeti başlattığı sanılmaktadır (33, 34).

Hiperglisemi aracılı ROS üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanmaktadır (35).

1.3.2.1. Glukozun Oto-oksidasyonu ve Süperoksit Üretimi

Bir geçiş elementinin varlığında glukoz, reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna dönüştürülür. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikali oluşturması ile son bulur. Hücre içi glukoz oksidasyonu redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADH) açığa çıkmasına neden olur. Solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile adenzin trifosfat (ATP) üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere NADH kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali oluşur. Yüksek glukoz konsantrasyonu varlığında bu yolla süperoksit radikal üretimi fazlaşır. Mitokondri solunum zinciri başlıca hücre içi ROS üretim kaynağıdır. Normal solunum zinciri olayları sırasında sürekli olarak süperoksit radikali oluştuğu sanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, diyabetteki patolojilerin birçoğunun artmış mitokondriyal ROS üretimi ile bağlantılı olduğunu açıklamaktadır (36-38).

1.3.2.2. Proteinlerin Glikolizasyonu ve İlerlemiş Glikolizasyon Son Ürünleri Oluşumu (AGEs: Advanced glycation end-products)

Protein glikolizasyonu glukozun aldehid formuyla proteinlerin serbest amino grupları arasındaki kovalent bağlanmalar sonucu meydana gelir. Geçiş metallerinin varlığında (demir, bakır vs.) glikolizasyona uğramış proteinler moleküler oksijene bir elektron vererek serbest radikallerin oluşmasına neden olurlar. Daha sonraları bu olayın geçiş metallerinin yokluğunda da meydana gelebileceği gösterilmiştir. Proteinin yarı ömrünün 10 haftadan uzun olduğu durumlarda glikolizasyona uğramış proteinler geri dönüşümsüz modifikasyonlarla Maillard ürünlerini ya da AGEs'i oluştururlar. Glikolizasyona uğramış proteinler gibi, AGEs de serbest oksijen radikalleri oluşturabilirler. Ayrıca, ROS da AGEs'in oluşumunu hızlandırırlar (39).

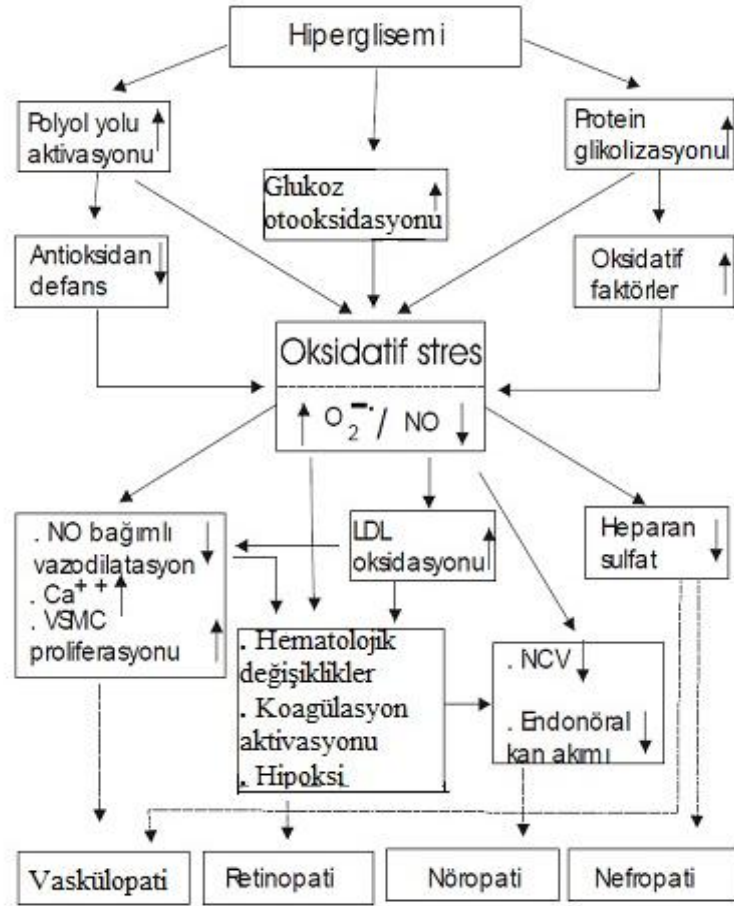
Diyabetik hayvanlarda ve insanlarda ROS ile mücadele eden SOD ve glutatyon redüktaz (GR) gibi enzimlerin non-enzimatik glikolizasyonunun da bu enzimlerin azalmış aktivitelerinden sorumlu olabileceği ve ROS'un artışına neden olabileceği ileri sürülmektedir (40). AGEs formasyonunun bir inhibitörü olan aminoguanidin'in diyabetik hayvan modellerinde, nefropati ve retinopati tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur (41, 42). İlginçtir ki, anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörü olan ramipril ile tedavide de, AGEs formasyonu inhibitörü gibi, renal AGEs birikiminin azaldığı saptanmıştır (43).

1.3.2.3. Polioliol Yolu

Yüksek glukoz konsantrasyonu, polioliol yolu ile sorbitol üretimini artırır. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH (Redükte nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kullanıldığı için hücre içi NADPH kullanılır. NADPH okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve NO sentezi için gereklidir. Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanmasına yol açar (44).

Redükte glutatyonun ve vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin azalması, diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkarak (33), glukozu sorbitol yolu ile fruktoza ve sorbitola dönüştürülmesinin bir sonucu olarak hücrede miyoinozitol düzeylerini azaltır. Bunun sonucunda da Na-K ATP-az enzim aktivitesinde azalma olur ki, bu enzim aktivitesi sinir iletim hızı için önemlidir (45, 46). Sorbitolun kendisi bir doku toksini gibi hareket eder. Bu nedenle retinopati,

nöropati, katarakt, nefropati ve kalp hastalığı patogenezinde rol oynadığı sanılmaktadır (47, 48). Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü Şekil 1’de gösterilmiştir (49).



Şekil 1. Oksidatif stresin diyabetin komplikasyonlarının patogenezindeki rolü (R.J. Reiter’den modifiye edilmiştir). VSMC (vascular smooth muscle cell): vasküler düz kas hücresi, NCV(neuron conduction velocity): nöron iletim hızı

1.4. Anti-Oksidanlar

1.4.1. Antioksidan Mekanizmalar

Oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan veya kısmen tamir eden moleküllere “antioksidanlar” adı verilir (50). Vücutta, oksidatif stres sonucu oluşabilecek hasarı engellemek için antioksidan vitaminler, Redükte glutasyon (GSH), antioksidan enzimler ve sülhidrillerden oluşan bir antioksidan savunma sistemi bulunur. Genel olarak antioksidan vitaminler (E vitamini, beta karoten gibi) serbest radikalleri ve tekli oksijeni direkt olarak yakalayarak (trapping) etkisizleştirirler. GSH ve diğer tiyol kaynakları ise hücrel oksidasyon ve redüksiyonda görev alırlar. SOD, KAT

ve GSH-Px gibi antioksidan enzimler SOR'ların bir elektron redüksiyonunu katalizlerler. Antioksidanların hücresel düzeyleri birçok fizyolojik, patolojik ve besinsel faktörlerden etkilenir. Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler (51):

1. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya ortamdan uzaklaştırılması
2. Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması
3. O_2^- , H_2O_2 gibi bazı SOR'ların ortamdan uzaklaştırılması
4. Zincir reaksiyonunun kırılması
5. Tek oksijen üzerine çöpçü veya söndürücü etki gösterilmesi

Antioksidanları etki mekanizmalarına veya organizmadaki lokalizasyonlarına göre sınıflandırmak mümkündür (51).

1.4.2. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

1.4.2.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Vasküler endotelde bulunan en önemli antioksidan enzimlerden birisidir ve endotel hücreleri ile düz kas hücreleri arasında bol miktarda bulunur. Normalde damar duvarında süperoksit radikallerini detoksifiye ederler. Bu şekilde lipid peroksidasyonunu ve ateroskleroz gelişimini inhibe ederler. Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta O_2^- oluştuğu ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığından dolayı, hücre içindeki ilk savunma sistemini bu enzim yapmaktadır (50).

1.4.2.2. Katalaz (KAT)

Katalaz başlıca peroksizomlarda yerleşiktir. Yapısında 4 “hem” prostetik grubu bulunan bir hemoprotein olarak bilinir. Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşan H_2O_2 bir radikal olmamasına karşın en reaktif SOR olan hidroksil ($OH \cdot$) radikalinin öncüsü olduğu için birçok SOR'dan daha fazla oksidatif hasar oluşturur. KAT, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene ayırır (52).

1.4.2.3. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)

Glutatyon peroksidaz, eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidandır ve hidrojen peroksit ile lipid hidroperoksitlerin redüksiyonunu katalizler. Her iki reaksiyonda da GSH hidrojen vericisi olarak kullanılır. Enzimin aktivitesi özellikle karaciğer ve eritrositlerde fazladır (52).

1.4.2.4. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz, pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olup intrasellüler NADPH'nin da başlıca kaynağıdır. Üretilen NADPH serbest radikallerin detoksifikasyonunda görev alan GSH-Px enziminin aktivitesi için gerekli olan indirgenmiş GSH sağlamaktadır (53). G6PD'nin vasküler endotelial hücreler ve düz kas hücrelerinde de serbest radikallere karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Ayrıca G6PD'nin vasküler endotelial hücrelerde NADPH'ı kofaktör olarak kullanan endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) enziminin aktivitesi için de gerekli olduğu ve eksikliğinde eNOS'un yeterli aktivite gösteremeyerek süperoksit radikali üretmeye başladığı ve böylece LDL oksidasyonunun tetiklenebileceği gösterilmiştir (54).

1.4.2.5. Glutasyon Redüktaz (GR)

Glutasyon redüktaz enzimi NADPH varlığında okside glutasyonun (GSSG) tekrar redükte GSH'a dönüşümünü katalizleyerek antioksidan aktivitenin devamlılığına yol açar (52).

1.4.2.6. Paraoksonaz (PON)

Paraoksonaz bir organofosfat olan paration'un vücuttaki aktif metaboliti olan paraoksonun hidrolize edilmesiyle oluşur. Başlıca karaciğerde sentezlenen PON enziminin aktivite ve stabilitesi için Ca^{+2} iyonu gereklidir (55). Son yıllarda ateroskleroz etyopatogenezinde lipoprotein oksidasyonu yoluyla rolü olduğu öne sürülmüştür. Hücre dışı enzimlerinden biri olan PON ile lipoprotein oksidasyonu arasındaki ilişki, yeni araştırmalara konu olmaktadır (56).

1.4.3. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

C vitamini, E vitamini, A vitamini, glutasyon, ürik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve bilirubin enzim yapısında olmayan antioksidanlardır (52).

1.5. Testis ve Oksidatif Stres

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimini göstermektedir. Testisteki zayıf vaskülarizasyona bağlı olarak oksijen miktarının düşük olması sonucu bu oksijene olan rekabet oldukça şiddetlidir (57).

Ayrıca fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle testis oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir (57).

Hem spermatogenez hem de Leydig hücrelerindeki steroidogenez, oksidatif stresle hasar görebildiği ve bu dokudaki düşük oksijen miktarı nedeniyle, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmalar önem kazanmaktadır (57). Testis bu korunmayı sağlamak için; çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir. Testis, steroidogenez ve sperm üretimini desteklemek amacı ile antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir (Kriptorşidizm, testiküler torsiyon, varikosel, hipertiroidizm, diyabet, enfeksiyon, reproduktif hormon dengesizliği, zenobiyotiklerin etkisi vs.). Bunların sonucunda; erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı ve testiküler SOD ile KAT'ın baskılanması görülmektedir (57).

Erkek kaynaklı infertilite, tüm infertilite vakalarının yarısına yakınıni oluşturmaktadır (58). ROS'a bağlı sperm hasarının vakaların % 30-80'inde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (59-61). Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, ilk defa 1943'te İskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermazoonların hareketliliğinin KAT eklenmesi ile arttığını göstermesi ile başlamaktadır (62). Diyabette testiküler disfonksiyon gelişmesinde oksidatif stresin rolü tam olarak gösterilememiştir. Fakat, oksidatif stresin diyabette erektil dokuda vaskülopati, endotelial disfonksiyon, nöropati ve diğer faktörlere neden olarak diyabetik erkeklerde infertiliteyi oluşturabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır (63). Diyabet, vücut ve reproduktif organ ağırlıklarında azalmaya sebep olarak, testislerde ve epididimislerde sperm sayısında azalma oluşturur (64).

Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığı için, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışardan alınacak antioksidanlarla mümkün olmaktadır (Örn: Vitamin E, C, Melatonin). Böylece uygulanan antioksidan tedavi spermin kalitesini de

arttırmaktadır. Antioksidan tedavi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (65-71).

1.6. Diyabet ve Testis

Anormal sperm yapımı ve üremedeki engel, DM'nin uzun zamandır tanımlanmış bir neticesidir. İnfertilite diyabetik erkeklerde ortak komplikasyondur (72-75). Ratlarda diyabet; testiküler ağırlıkta, sperm sayısında ve hareketlerinde, testosteron düzeylerinde azalma ve sıklıkla anormal spermatogoneze sebep olabilmektedir (76-79). STZ ile diyabet oluşturulan modellerde androjen reseptörlerinin testiste, epididimide ve prostat bezinde azaldığı gösterilmiştir (80). Androjen reseptörlerinin azalması, diyabetik sıçanlarda hormon sentezinde ve seksüel fonksiyonlarda bozukluklara neden olur (80).

Aynı zamanda STZ uygulanması sonucunda luteinizan hormon (LH), follikül stimulan hormon (FSH) ve testosteron düzeyleri belirgin olarak azalmaktadır. İnsüline bağlı diyabette meydana gelen FSH azalması sonucu, Leydig hücrelerinin fonksiyonunda, testosteron üretiminde ve bunun sonucu olarak LH düzeylerinde azalma gözlenir. Ayrıca, sperm atımı ve fertilesi de FSH'a bağlı olarak azalır (81).

Ayrıca diyabet hem farelerin hem de ratların testiküler germ hücrelerinde apoptozisde artış yapmaktadır (82, 83). Diyabetiklerde olgunlaşmamış, apoptozise giden ve az hareketli sperm yüzdesi oldukça yüksektir (84). Diyabete bağlı olarak testislerde, tunika albugeniada, seminifer tübüllerde, intertisyel bağ dokuda ve Leydig hücrelerinde histolojik değişiklikler saptanmıştır (85, 86). Yine de testislerdeki histolojik değişiklikler ve bu disfonksiyonun altında yatan moleküller mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır (64).

1.7. Apoptozis

1.7.1. Apoptozisin Tanımı ve Tarihçesi

Fizyolojik ya da programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptoz; biyoloji alanında olduğu kadar temel ve klinik tıp bilimlerinde de ilgi çeken bir konudur. Apoptozis birçok gen ile ilişkili aktif bir sistem olup, Yunancada apo (= ayrı) ve ptozis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş sonbaharda yaprak dökümünü tanımlayan bir kelimedir (87).

İlk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından “fizyolojik hücre ölümü” ifadesi tanımlandıktan sonra Wyllie ve Kerr tarafından deneysel bir çalışma ile gösterilmiştir (88). Programlı hücre ölümünün moleküler mekanizması tam olarak çözülememiştir. Hücrelerin genetik olarak belleklerinde var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylarla aktive olmasıyla başladığı tahmin edilmektedir (89). Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik ilaçlar ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirirler (88).

Apoptozisde, hücre ölümü çevreye rahatsızlık vermeksizin gelişse de, bazen apoptozis dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersine nekroz apoptozis gelişmesine yol açabilir (90).

Günümüzde, biyokimyasal ve genetik komponentlerin apoptozis sürecinde rolü vardır. Bunların ortaya çıkmasıyla apoptozisin aktivasyonuna ya da inhibisyonuna yönelik çalışmalar; kanser, AIDS (Acquired İmmüne Deficiency Syndrome) ve otoimmün bozukluklar gibi birçok hastalıkta yeni tedavi imkanları üzerinde çalışılmaktadır (91).

1993 yılında Cohen (92, 93) yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini araştırmıştır. Sonuçta timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise sürüklediğini bulmuştur. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu saptanmıştır.

1.7.2. Apoptozisin Regülasyonu

Apoptozisin regülasyonu, nematodlardan insana kadar gen kontrol süreci ile oldukça sıkı bir biçimde korunmaktadır. Ölüm sinyali, gen ekspresyonu ile regüle edilir. Bu süreç genotoksik hasar (kemoterapi, radyasyon vb) veya sitokinlerin olmaması gibi (eritropoietin vb) farklı uyarılarla hareketlenebilir. DNA tek veya çift iplik parçaları ve nükleotit azlığı ve DNA-bağlı transkripsiyon faktör p53 ile başlar. Bundan sonra bir dizi olay aktive olur ve hücre apoptotik yola girer (94). Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır (95) (Tablo 6).

Tablo 6. Apoptozis ve genler

Apoptozisi baskılayan genler	Apoptozisi indükleyen genler
<ul style="list-style-type: none">• Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1• c-abl geni• Ras onkogeni• Çözünebilir fas• p35• A20	<ul style="list-style-type: none">• Bcl- 2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-Xs, bid, bik, Hrk-1• c-myc• P53, p21• Fas (CD95/APO1) FADD, MORT, RIP, FAST• İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)• LOH (MTS1/CDK41)

1.7.2.1. p53'ün Rolü

İnsanda apoptozisin düzenlenmesi, p53 ile başlayan ve kaspazlara kadar devam eden bir olaylar zinciridir. Bir tümör süpresör gen olarak çalışan p53 mutasyona uğradığı ya da bulunmadığı zaman hücre yaşamı uzamaktadır. Genotoksik olaylarla oluşan hücre hasarı p53'ü aktive eder. p53 protein ürünü, DNA'ya doğrudan bağlanarak hasarı tanıdıktan sonra, G1'de hücre siklusunun durmasını uyararak tamir için gerekli zamanı elde eder. Diğer bir taraftan hasar fazlaysa hücreyi apoptozise sevkeder. Ayrıca p53'ün Bax/Bax, Bax/Bcl-2 ve Bcl- 2/Bcl-2 gruplarının oranlarını düzenlediği sanılmaktadır (94).

1.7.2.2. Bcl-2/Bax

Bcl-2/Bax gen ailesi apoptozisin regülasyonundan sorumludur (94, 96). Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır; bunlardan bazıları Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Boo, Mcl-1 gibi apoptozis inhibitörüdür, bazıları ise apoptozisi indükler ve proapoptotik genler olarak adlandırılır (97). Proapoptotik genlerin Bax (Bax, Bak ve Bok) ve BH3 (Bik, Blk, Hrk, BNIP3, Bad, Bid gibi) olmak üzere iki alt ailesi vardır (98). Bcl-2/Bax gen ailesinin ürünleri, mitokondri ve çekirdek zarlarının yanı sıra endoplazmik retikulum zarının üzerinde de bulunurlar ve homodimer ya da heterodimerler şeklinde kompleks oluşturarak işlerini görürler (94, 99). Örneğin; Bcl-2'nin Bax ile olan etkileşiminde Bcl-2'nin oranının daha yüksek olması halinde hücre yaşamına devam eder. Bax'ın daha fazla olması halinde ise hücre ölür (90).

Son yıllarda, hücrenin yaşamı ya da ölümü konusundaki araştırmalar dikkatleri mitokondri üzerine çekmiştir (100). Mitokondriler çift zarlı organellerdir. Bcl-2, 24-26 kDa'luk protein kodlayan bir proto-onkogendir ve ürettiği protein, mitokondrinin sitoplazmaya dönük dış zarı üzerinde ve endoplazmik retikulumun bir bölümü olan çekirdek zarında yerleşmiştir (101). Bu proteinler, iyon alışverişini düzenler ve zarın parçalanmasına karşı koruyucu etkileri vardır. Özellikle antiapoptotik genler içinde yer alan Bcl-xL'nin, mitokondriyal hasarı engelleyerek mitokondriyi koruduğu öngörülmektedir. Bu sayede apoptozis inhibisyonu oluşmaktadır (98). Bax proteinleri sitoplazmada da vardır. Apoptotik sinyal alındıktan sonra Bax proteinleri, mitokondri zarının "permeabilite geçiş poru"na doğru ilerleyip, buraya tutunurlar. Bu bağlanma, seçici iyon geçirgenliğini azaltabilir. Zardaki bu değişiklikler nedeniyle sitokrom c ve AIF (Apoptosis Inducing Factor) gibi mitokondri zarı içinde yer alan faktörler sitoplazmaya aktarılırlar. AIF, çekirdeğe doğru yönelirken, sitoplazmadaki sitokrom c apoptozisin en son basamağında görev alır. Sitokrom c, bir sitoplazma proteini olan Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1)'in aktivatörüdür (94). Sitokrom c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks "apoptosom" olarak adlandırılır (102). Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonuna neden olur (94). Apaf-1 aynı zamanda ATP'ye de bağlanır. Bu olay apoptozisin neden enerji gereksinimi duyduğunun bir kanıtıdır (99).

1.7.2.3. Kaspazlar

Apoptozis mekanizmasında üç temel grup rol alır. Bunlar:

- 1- Ölüm reseptörleri
- 2- Adaptör proteinler
- 3- Proteolitik enzimlerdir (kaspazlar) (99, 100).

Ölüm reseptörleri; TNF (Tumour Necrosis Factor) reseptör gen ailesine aittir. Bu reseptör polipeptidlerin sitoplazmik bölümleri, ölüm alanı (Death Domain) adı verilen, adaptör proteinlere bağlanan bir aminoasit dizisinden oluşur (100). Bilinen altı tane ölüm reseptörü olup, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF Related Apoptosis-Inducing Ligand)-R1, TRAILR2, TNF-R1 (TNF reseptörü-1), DR3 ve DR6 vardır (103). Reseptörle gelen sinyal sonucunda adaptör proteinler

kaspazlara bağlanarak onları aktive ederler. Bu reseptörlerin en çok bilinenleri TNF-R1 ve Fas (CD95) karaciğerde çok miktarda mevcuttur. Fas'ın etkisiyle kaspaz dizisi aktive olur ve kaspazla aktive olan DNaz (CAD: caspase activated DNase;) aracılığı ile DNA yıkımından sorumludur (100). Memeli hücrelerindeki kaspazların aktif merkezinde sistein vardır. Bu moleküller sitoplazmada inaktif prokürsörler olarak yer almaktadır. Bu grup, proteaz aktivasyon dizisini başlatarak sitoplazmik proteinlerin yıkımında bazı görevleri vardır. Ayrıca nükleazlar da aktive olarak DNA parçalanması ve RNA degradasyonu meydana gelmektedir (89). Sitokrom c'nin sitoplazma içine salınması ile apoptozisin son basamaklarından sorumlu olan kaspazlar aktifleşir. İnflamasyonu uyaran ve ilk kez bir proteaz olarak tanımlanan ICE (Interleukin-1 β -Converting Enzyme), prokaspaz-1 olarak adlandırılmıştır. Kaspazlar bir seri olaylar dizisinde diğer prokaspazları aktive ederler. Kaspazlar; sitokin üretimine katkıda bulunanlar (kaspaz 1, 4, 5, 13), proteolizisin "başlatıcıları" (kaspaz 2, 8- 10) ya da "uygulayıcıları" (kaspaz 3, 6, 7) olarak sınıflara ayrılırlar (98, 100). Ölüm sinyali veren başlatıcı kaspazlar, adaptöre bağlanarak ölüme yön verirler. Fakat ölüme gerçekleştirmezler, bunu yapacak olanları aktifleştirirler. Ölüme neden olanlar ise uygulayıcı (effektör) kaspazlardır. Uygulayıcı kaspazlar, başlatıcı kaspazların akışını aktive ederler (100).

Apoptotik programın merkezi bileşeni kaspazlardır (104). Kaspaz aktivasyonu hücreye özgüdür ve kaspaz inhibitörlerinin IAP (Inhibitors of Apoptosis) efektör kaspazları baskılayarak apoptozisi inhibe ettiği gözlenmiştir (100). Ayrıca IAP ailesinin kaspazlardan farklı olarak, transkripsiyon faktörlerin modülasyonu ve hücre siklusunun kontrolüne katkıda bulunarak apoptozisi inhibe ettiği bilinen bir gerçektir. Bu inhibitörler malign hücrelerde bol miktarda bulunur (94). Kaspazlar, proteinleri yalnızca aspartik asit bulunan bölgelerden keser, bundan dolayı c-asp-ases adını alırlar. Böylece kaspazların kısıtlı proteolizisi nedeniyle, hücrede lizis şekillenmez ve apoptotik cisimcikler meydana gelir (94, 104).

1.7.3. Apoptozisin Sitotoksik Regülasyonu

1.7.3.1. Granzim veya Perforin Sistemi

Bu salgısal apoptotik yol, patojenle infekte hücreler ve tümör hücrelerinin ortadan kaldırılmasında görevlidir. Granzim ve Perforinler, sitotoksik T lenfositler

(CTL) ve Naturel Killer (NK) hücrelerinin sitoplazmik salgı granülleri içindeki proteinlerin en önemlileridir. CTL reseptörü hedef hücreye bağlandığında, perforinler salgılanır ve bunlar hedef hücre üzerinde dairesel bir por meydana getirirler. Bu perforin poru, hücre içi kalsiyumda hızlı bir artışa neden olur. Granzim B, reseptör aracılığı ile bir vezikül içinde açılan delikten hedef hücreye girer. Perforin proteini hücre içine girdikten sonra vezikülden granzim B'nin serbest kalmasına sebep olur. Bu andan itibaren granzim B, DNA parçalanmasını ve apoptozis ile birlikte prokaspaz aktivasyonunu başlatır. Bununla birlikte granzim A da, perforinle sinerjik olarak kaspaz bağımsız yolda apoptozisde görev üstlenir (94).

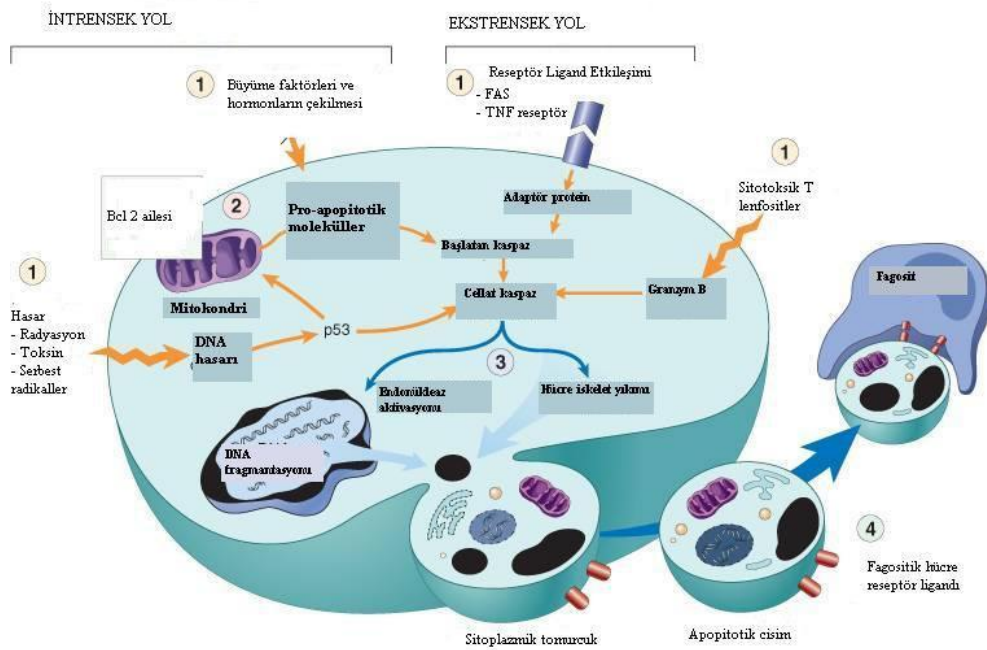
1.7.3.2. Fas - Fas Ligandı veya CD95 Yolu

Apoptozisin salgıdan bağımsız mekanizması, hücre zarı üzerinde bulunan "ölüm reseptörlerinin" aktivasyonu ile bağlantılıdır. Hücre yüzey reseptörü olan Fas (CD95), tümör nekroz faktörü grubundandır. Fas apoptotik işaretin uyarıcısıdır ve birçok hücre tipinde bulunmaktadır. TNF ailesinin bir üyesi olan Fas ligandı (FasL) ise, sitotoksik T hücreleri ve NK hücreleri üzerinde mevcuttur. FasL'nin Fas reseptörüne bağlanması sonucu apoptotik süreç başlar. Bu mekanizma ile oluşan bazı olayların başlıcaları; bir immün tepki sonunda aktive olmuş T hücrelerinin uzaklaştırılması, virüs enfekte hedef hücrelerin ortadan kaldırılması, tümör hücrelerinin öldürülmesi ve birçok patolojik durumdaki hücrelerin uzaklaştırılması gibi olaylar sayılabilir. TNF'nin TNFR-1'e bağlanmasıyla da benzer olaylar şekillenir. Fas ve TNFR-1'in sitoplazmik uzantısı, bir ölüm alanını kapsamaktadır. Fas'ın sitoplazmik bölümü FADD (Fas Associating protein with a Death Domain protein) ve RIP (Receptör Interacting Protein) ile etkileşim halindedir. Ölüm alanlarını içeren bu TRADD ve RIP proteinleri, prokaspaz-8'in aktivasyonu ile apoptozisi doğrudan indüklerler. Aktive olan kaspaz-8 de diğer uygulayıcı kaspazları aktive etmektedir (94).

1.7.4. Apoptozis Uyarıcı Faktör (AIF)

Apoptozis nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşmasını içeren birkaç morfolojik nükleer değişiklik meydana gelmektedir. Bu değişiklikler membranöz kaspaz ailesi, kaspaz DNaz aktivitesi ve birkaç yeni protein aktivasyonu ile başlamaktadır. Kromatin yoğunlaşması ve DNA kırılmasına neden olan bu yeni gen

yakın zamanda keşfedilmiş, daha sonra klonlanmış ve AIF olarak adlandırılmıştır. AIF, apoptotik kaspaz-9 ve sitokrom c gibi mitokondride yerleşiktir. AIF, kaspaz bağımsız DNA kırılması ve kromatin yoğunlaşması ile apoptozisi başlatır (105). Kanser hücreleri, kanser gelişim ve ilerlemesi sürecinde, hücre ölümü uyarısından kendilerini korumaları nedeniyle apoptozisten kurtulma yeteneği kazanırlar. AIF, NADH oksidaz aktivitesi ile kolon kanserine neden olur. Apoptozisin mekanizması Şekil 2’de gösterilmiştir (106).



Şekil 2. Apoptozisin mekanizması

1.7.5. Hastalıklarda Apoptozis

Apoptozis birçok patolojik ve fizyolojik olayda etkin rol oynamaktadır. Fizyolojik olayların başında hücre yapım ve yıkımı gelir. Deri, barsak epiteli ve kan hücreleri gibi hücre yapım ve yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozisle ortadan kaldırılarak yeni hücrelerin oluşması sağlanır. Patolojik olarak sayılabilecek olaylarda ise; tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında görev alır. Apoptozis mekanizması; dokularda hormona bağlı patolojik atrofi, otoimmün hastalıklar, bazı kalp hastalıkları, nörodejenaratif bozukluklara bağlı hastalıklarda ve kanser gibi olaylarda devreye girer (91, 107-110). Apoptozisin artması veya azalması ile ilgili hastalıklar Tablo 7’de verilmiştir (111).

Tablo 7. Apoptozisin yer aldığı patofizyolojik durumlar

İmmun Sistem Bozuklukları	Malign ve Pre-Malign Durumlar
AİDS	Solid Tümörler
Tip 1 DM	B Hücre Lenfomaları
Lupus Eritematozus	Kronik Lenfositik Lösemi
Sjogren Sendromu	Prostat Hipertrofisi
Glomerülonefrit	Preneoplastik Karaciğer Odakları
İntestinal Bozukluklar	Kemoterapiye Direnç
Dizanteri	Nörolojik Bozukluklar
İnflamatuvar Bağırsak Hastalıkları	Felç
Radyasyon ve HIV Enfeksiyonu ile oluşan diyare	Alzheimer Hastalığı
Böbrek Hastalıkları	Ataksi Telenjektazi
Polikistik Böbrek Hastalığı	Kalp Hastalıkları
Anemi / Eritropoezis	İskemik Kardiak Hasar
	Kemoterapiyle İndüklenen Miyokardial Baskılanma

Canlı doku ortamında hücrelerin tek tek iz bırakmaksızın silindiği fizyolojik bir ölüm şekli olan apoptozis, ilgi çekici olduğu kadar insanlardaki önemli patolojilerin tedavisi açısından da umut verici bir mekanizmadır (112).

1.7.6. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptozis, 1980’li yılların sonuna doğru DNA kırıklarının oluştuğunun ortaya konulmasıyla birlikte bu kırıkların saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlanmıştır. 1990’ların ortalarında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metodlarla saptanabilen apoptozis, 1990’ların sonuna doğru fosfatidilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlanmıştır. 2000’li yılların başlarında, sadece apoptotik epitelyal hücrelerde

kaspaz aktivitesiyle kırılan bir protein olan keratin 18'in, kırıldıktan sonraki özgün formunu saptayan antikolar kullanılmıştır. Böylece apoptozis daha spesifik olarak saptanmıştır (113). Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler Tablo 8'de verilmiştir (114).

Tablo 8. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

Morfolojik görüntüleme yöntemleri

İmmünohistokimyasal yöntemler

Biyokimyasal yöntemler

İmmünolojik yöntemler

Moleküler biyoloji yöntemleri

1.7.6.1. TUNEL (TdT-mediated nick and labeling technique) Yöntemi

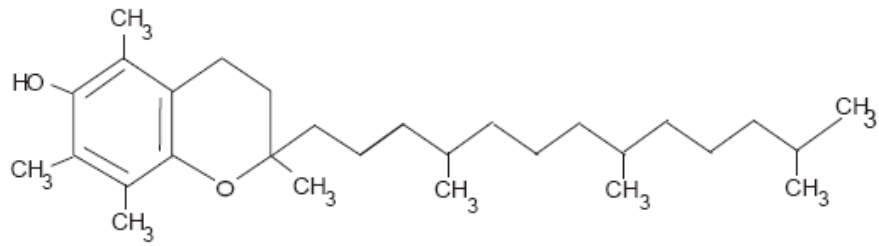
Apoptotik sinyal kaskadında DNA kırıklarının saptanmasında, TUNEL yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır (115). İlk kez 1992 yılında Gavrieli ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (115, 116). Apoptozisde sonlandırıcı proteinler aktifleştikten sonra sitoplazma ve çekirdekte hedef proteinleri yıkarlar (117). Bu proteinlerden bir tanesi DNA endonükleaz ile bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirirler. Çekirdek içine giren Ca-Mg bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur (118). TUNEL yöntemi bu DNA kırıklarının saptanmasını sağlar (115, 117). Bu yöntemde oluşan DNA kırık uçlarının, kimyasal olarak spesifik uçlar olması prensibinden yola çıkılmaktadır. Apoptotik hücrelere ait DNA'lar hızla parçalanmakta olduklarından kromatin ağ bütünlüğünü kaybeder ve 3'-OH içeren DNA parçacıklarının sayısı çok yükselir (118). Hücrede terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) enzimi, ortama eklenen biotin-dUTP'yi parçalanmış DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına taşır (117, 119). Biotin ile işaretlenmiş DNA parçacıkları avidin eklendiğinde görünür hale gelirler (118).

1.8. E Vitamini

1.8.1. Yapısı ve Özellikleri

E vitamininin gerekli bir besin maddesi olduğu ilk defa 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur. Önceleri X, daha sonra antisterilite vitamini ve 1936 yılında buğday tohumundan ekstrakte edildikten sonra ise tokoferol olarak adlandırılmıştır (120).

E vitamini tokoferol yapısındadır. İnsanlar tokoferolü sentezleyemezler ancak diyetel kaynaklardan alabilirler (121). Doğal olarak meydana gelen alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli tokoferoller bulunmaktadır. Bunların hepsi izoprenoidlerin yer değiştirdiği 6-hidroksi kromanlar veya tokollerdir. D- α -tokoferol en geniş doğal dağılımı ve en büyük biyolojik aktiviteyi gösterir. Antioksidan aktivitesi en yüksek olan tokoferol de α -tokoferoldür. Kimyasal yapısı C₂₉H₅₀O₂ (5, 7, 8-trimethyltolcol) şeklindedir. Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (122) (Şekil 3).



Şekil 3. E vitamininin kimyasal yapısı

α -tokoferol dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek E vitamini konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Miyokard membranlarındaki miktarı oldukça fazladır. Sitozol ve peroksizomda ise daha az bulunur (121, 123). Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. Bitkisel yağların, sabunlaşmayan kısımlarında ve en çok yer fıstığı, badem, fındık, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Zeytinyağı içerisinde az miktarda E vitamini vardır. Diyetle yağda çözülmüş olarak bulunur, yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için yağ emiliminin ve safra asitlerinin normal olması gereklidir. Herhangi bir taşıyıcı protein olmadan, pasif difüzyonla emilir. Önce, şilomikron yapısına dahil olur. Şilomikronlar, lipoprotein lipaz aracılığı ile hidrolize olurken, E vitamininin bir bölümü dokulara taşınır. Kalan E vitamini ise, şilomikron kalıntıları ile birlikte karaciğer tarafından alınıp, hepatik kökenli VLDL (Very low density lipoprotein: çok düşük dansiteli lipoprotein)'ler aracılığı ile tekrar dolaşıma salınır veya HDL'ye transfer olur. E vitamini sıklıkla LDL'nin, dış tabakasında ve kromonal halkası sulu faza yönelmiş şekilde lokalizedir. Ortalama bir LDL partikülünde 6 tane α -tokoferol molekülü vardır. E vitamininin en önemli

depolanma yeri yağ dokusudur. Plazma konsantrasyonu ise 0,5-1,8 mg/dL kadardır (122, 124).

E vitamini çok önemli bir antioksidan olup, lipid peroksidasyonunun erken aşamalarında, biyomembranlardaki serbest radikal toplayıcı aktivitesi sonucu, hücre membran fosfolipidlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini (PUFA), serbest radikal etkisinden koruyarak, lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Bir molekül α -tokoferol, 100 molekül PUFA'nın peroksidasyonunu engelleyebilir. E vitamini, süperoksit, hidroksil radikalleri, tekli oksijen, lipid peroksil radikalleri ve diğer radikal örneklerini indirger. GSH-Px ile E vitamini, serbest radikallere karşı birbirlerine tamamlayıcı etki gösterirler. GSH-Px, teşekkül etmiş olan peroksitleri ortadan kaldırırken, E vitamini peroksitlerin sentezini engeller (122, 125). E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Çünkü fonksiyonları, lipid peroksil radikallerini ortadan kaldırmak ve böylece lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırmaktır.

E vitamininin, lipid peroksidasyonu ürünü olan malondialdehit üretimini durdurarak ve midede nitritlerin, nitrozaminlere dönüşümünü engelleyerek kanserin engellenmesi ve kontrolünde rolü olduğu deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (123). E vitamini selenitlerle birlikte verildiğinde, hücrede glutatyon enzim aktivitesini, ağır metallerin toksik etkilerine karşı korumaktadır (121).

1.9. D Vitamini

1.9.1. Sentez ve Metabolizma

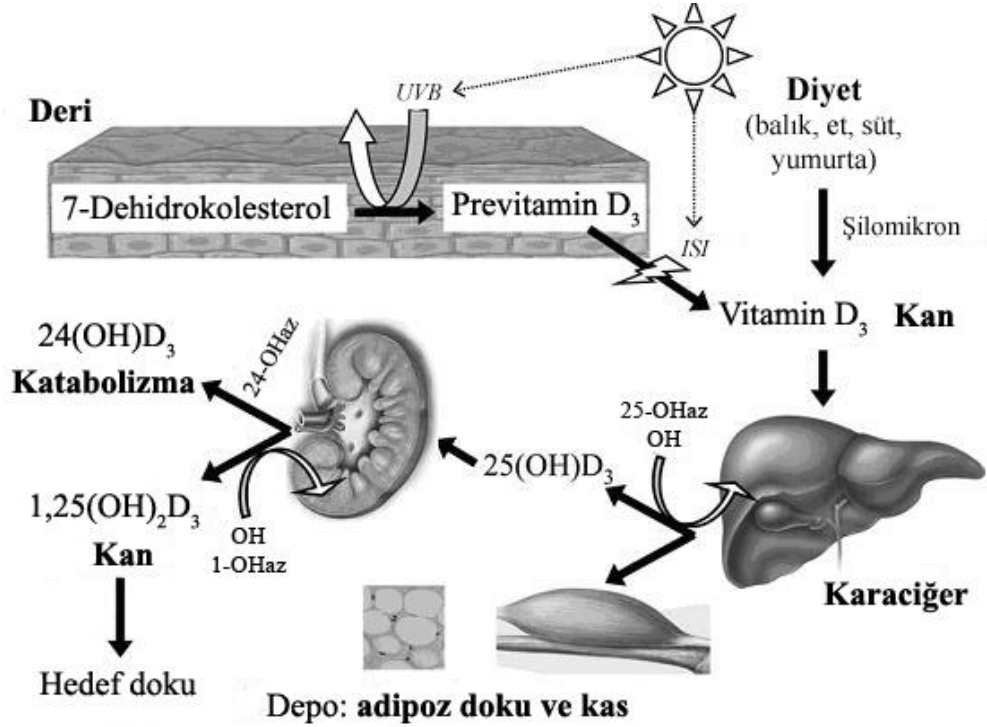
1,25 dihidroksivitamin D (1,25(OH)₂D) mineral iyon homeostaz regülasyonunda yer alan majör steroid hormondur. Vitamin D ve metabolitler vitaminlerden çok hormon ve hormon öncülleridir, çünkü uygun biyolojik ortamlarda endojen olarak sentez edilebilir. Derinin ultraviyole ışığına yanıt olarak, fotokimyasal bir ayrışma sonucunda 7-dehidrokolesterolden vitamin D oluşur. Derideki vitamin D üretimi, ultraviyole ışığın deriye penetrasyonunu önemli ölçüde bozan melanin ve yüksek koruma faktörlü güneş yağları ile azalır. Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da güneş yağı kullanımındaki artış ve güneş ışığına olan maruziyetin azalması, diyetdeki vitamin D miktarının artırılması gerekliliği inancını arttırmıştır. ABD'de ve Kanada'da bu kaynaklar büyük oranda yumurta sarısı ve balık yağlarına ek olarak takviye edilmiş tahıllardan ve süt ürünlerinden

sağlanır. Bitkisel kaynaklardan elde edilen D vitamini D2 formundayken, hayvansal kaynaklılar D3 formundadır. Bu iki formun insanda eşit derecede biyolojik aktivitesi vardır ve vitamin D tarafından eşit derecede aktive edilir. İster ince barsaktan emilsin, isterse deride sentez edilsin; vitamin D dolaşıma katılır ve karaciğerde sentezlenen α -globulin olan vitamin-D bağlayıcı globuline bağlanır. Vitamin D daha sonra karaciğerde sitokrom, mitokondri ve mikrozoamlarda sitokrom P450 benzeri enzimler ile 25-hidroksilasyona uğrar. Bu hidroksilazın aktivitesi sıkı bir şekilde regüle edilmez ve ortaya çıkan metabolit olan 25-hidroksivitamin D (25(OH)D), D vitamininin majör dolaşan ve depo edilen formudur. Kandaki 25(OH)D'nin yaklaşık % 88'i vitamin D-bağlayıcı proteine, % 0,03'ü serbest ve geri kalanı ise albumine bağlı olarak dolaşır. 25(OH)D'nin yarılanma ömrü yaklaşık 2-3 haftadır; ancak nefrotik sendrom gibi durumlarda olduğu gibi idrarla kayıplara bağlı olarak vitamin D bağlayıcı protein seviyesi azaldığında bu süre dramatik olarak düşer (126).

Matür hormon oluşumu için gereken son hidroksilasyon böbrekte oluşur. 25(OH)D-1 α -hidroksilaz, proksimal tübül hücrelerinde bulunan sitokrom P450 benzeri karışık fonksiyonlu oksidaz ile sıkı bir şekilde ayarlanır. Parathormon (PTH) bu mikrozomal enzimi uyarırken, kalsiyum ve enzimin etkisiyle oluşan ürün (1,25(OH)2D) bunu baskılar. 25(OH)D-1 α -hidroksilaz ayrıca epidermal keratinositlerde de bulunur, ancak 1,25(OH)2D'nin keratinosit ürününün bu hormonun kandaki seviyesine katkıda bulunmadığı sanılmaktadır. 1 α -hidroksilaz plasentanın trofoblastik tabakasında bulunur ve sarkoidoz, tüberküloz ve berilyozisde olduğu gibi lenfomalarda da üretilir. Bahsedilen bu son durumlarda, enzim aktivitesi interferon- α ve TNF ile indüklenir, ancak kalsiyum ya da 1,25(OH)2D ile regüle edilmez; bu nedenle yüksek 1,25(OH)2D seviyesi nedeniyle hiperkalsemi oluşabilir. Sarkoidoz ile ilişkili hiperkalseminin glukokortikoidler, ketakonazol veya klorokin ile tedavisinde serum 1,25(OH)2D düzeyinin düştüğü gözlenmektedir (126).

Vitamin D metabolitlerinin inaktivasyonu için majör yolak; birçok dokuda bulunan vitamin-D-24 hidroksilaz ile ilave hidroksilasyon aşamasıdır. Böylece vitamin-D-24-hidroksilazın majör indükleyicisi olan 1,25(OH)2D kendi inaktivasyonunu sağlar ve böylece biyolojik etkilerini sınırlandırır.

1,25(OH)₂D₃'nin polar metabolitleri safraya salgılanır ve enteropatik dolaşım ile geri emilir. Terminal ileum hastalıklarında bu dolaşımın bozulması vitamin D metabolitlerinin hızla kaybolmasına neden olur (126). D vitamininin sentez ve metabolizması Şekil 4'de gösterilmiştir (127).



Şekil 4. D vitamininin sentez ve metabolizması

1.9.2. 1,25(OH)₂D₃'nin Etkisi

1,25(OH)₂D₃ biyolojik etkisini nükleer reseptör süper ailesinin bir üyesi olan vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak gösterir. Bu reseptör tiroid hormon reseptörleri, retinoid reseptörler ve peroksizom proliferatör-aktif reseptörlerin de dahil olduğu bir alt aileye aittir. Bu alt ailenin diğer üyelerinin aksine, sadece bir VDR izoformu izole edilmiştir. VDR, retinoid X reseptörü ile birlikte bir heterodimer olarak hedef DNA sekansına bağlanır ve hedef gen ekspresyonunun indüksiyonu ile sonuçlanan koaktivatörler serisini harekete geçirir. VDR hedef gen ekspresyonuna neden olduğunda, ya aktive edici transkripsiyon faktörlerinin etkisini engeller ya da transkripsiyonal olarak baskılanmasına neden olan VDR kompleksi için yeni proteinleri toplar (126).

Vitamin D reseptörünün, 1,25(OH)₂D₃ için afinitesi, diğer vitamin D metabolitleri için olan afiniteden yaklaşık olarak 3 kat daha fazladır. Fizyolojik

koşullar altında, diğer metabolitler reseptör bağımlı etkiyi uyarır. Bununla birlikte vitamin D toksisitesinde 25(OH)D seviyesi belirgin olarak yükselerek VDR ile doğrudan etkileşir ya da serum vitamin-D-bağlayıcı proteinden 1,25(OH)2D'yi uzaklaştırır; sonuçta aktif hormon biyoyararlılığında artış olur (126).

Vitamin D reseptörü birçok hücre ve dokuda bulunur. 1,25(OH)2D'nin moleküler etkisi en çok mineral iyon homeostazında yer alan dokularda çalışılmıştır. Bu hormon, ince barsakta bulunan bir kalsiyum bağlayıcı protein olan ve kalsiyumun enterositlerden aktif transportunda önemli bir rol oynadığına inanılan calbindin 9K'nın majör indükleyicisidir. İntestinal epitelde eksprese edilen iki majör kalsiyum taşıyıcısı (ECaC ve ICaC) da vitamin D'ye duyarlıdır. 1,25(OH)2D ince barsaktaki ve bu diğer genlerin ekspresyonunu indükleyerek intestinal kalsiyum absorpsiyonunun etkinliğini artırır (126).

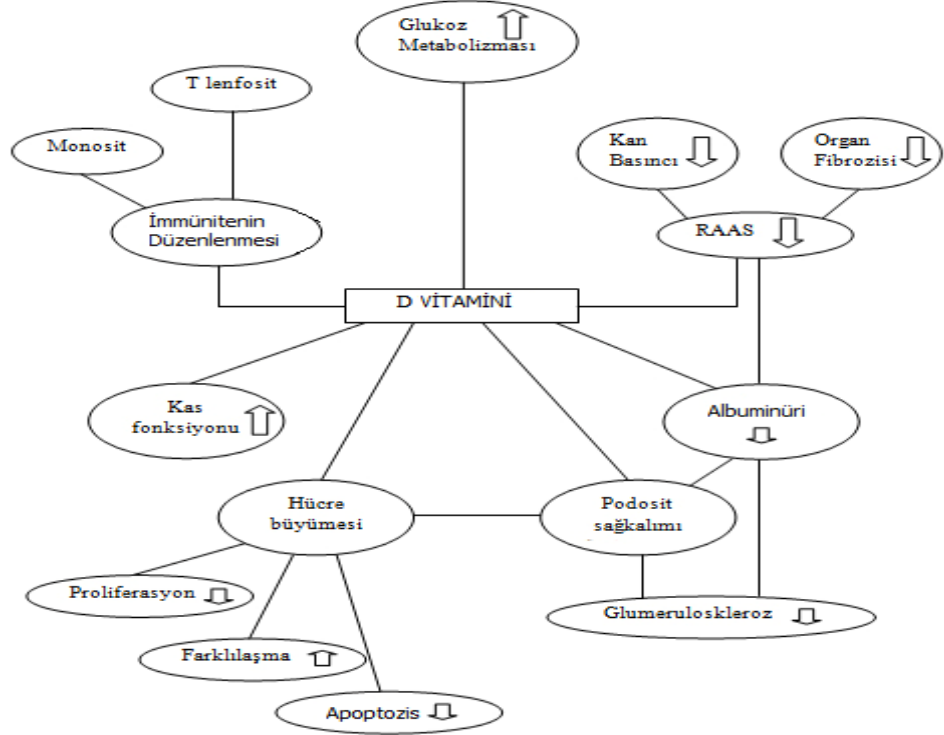
Vitamin D reseptörü, osteoblastlardaki bazı genlerin ekspresyonunu düzenler. Hedef genler; 1,25(OH)2D ve tip I kollajen tarafından regüle edilen kemik matriks proteinleri, osteokalsin ve osteopontindir. 1,25(OH)2D ve PTH, osteoklast farklılaşmasına ve osteoklast aktivitesini artıran RANK (Receptor activator of NF-kappaB) ligandının ekspresyonunu indüklerler (126).

Paratiroid bezde, VDR paratiroid hücreler üzerinde antiproliferatif etki gösterir ve PTH geninin transkripsiyonunu baskılar. 1,25(OH)2D'nin paratiroid bez üzerindeki bu etkileri renal yetersizlik ile ilişkili hiperparatiroidinin önlenmesi ve tedavisine yönelik güncel tedavilerin mantığını oluşturur (126).

Vitamin D reseptörü ayrıca mineral iyon homeostazında bir rolü olmayan doku ve organlarda da eksprese edilir. Bu konu ile ilgili dikkate değer bir husus, 1,25(OH)2D'nin keratinositler, meme kanser hücreleri ve prostat kanser hücreleri gibi bazı hücre tipleri üzerinde antiproliferatif etkileri olduğunun gözlenmesidir. Mutant VDR'leri olan insan ve sıçanlarda alopesi görülür, ancak alopesinin vitamin D eksikliğinin bir özelliği olmaması reseptörün hormondan bağımsız etkileri olduğunu düşündürmektedir (126).

Vitamin D'nin farklı hücre tiplerinde büyümeyi engellemesi ve diferansasyonu uyarabilmesi nedeniyle çeşitli endokrin hastalıklarda, immün sistemin düzenlenmesi ve kanserden korunmada etkileri mevcuttur. Vitamin D eksikliği ile diyabet, kanser, otoimmün hastalıklar ve hipertansiyon arasında ilişki

olduğu gösterilmiştir (128). D vitamininin kalsiyum, fosfor ve kemik dengesi üzerindeki etkileri dışında potansiyel pleiotropik etkileri Şekil 5’de gösterilmiştir (129).



Şekil 5. D vitamininin kalsiyum, fosfor ve kemik dengesi üzerindeki etkileri dışında potansiyel pleiotropik etkileri

Bu çalışmada patogeneğinde oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı DM'nin, rat testis dokusunda meydana getirdiği apoptotik değişiklikler üzerine vitamin D ve vitamin E'nin iyileştirici etkilerinin histolojik ve TUNEL yöntemleriyle incelenmesi amaçlanmıştır.

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

Deneylelerde kullanılan en az 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek ratlar, 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. Ratlar 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 rat yemleriyle beslendi. Ratlara verilen yemin bileşiminde bulunan katkı maddeleri Tablo 9'da belirtilmiştir. Ratların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi.

Tablo 9. Deney hayvanlarına verilen rat 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 D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

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

2.2. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 21 adet ratda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 50 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 ratlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Glucostix (Myles, Ekhart, IN) ile yapıldı. Ratların 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 28 adet rat üzerinde gerçekleştirildi. İlk tartımları yapılarak ağırlıkları kaydedildi. Ratlar; kontrol (Grup I), diyabetik (Grup II), diyabet + vitamin D (Grup III) ve diyabet + vitamin E (Grup IV) olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1. Grup (n=7) Kontrol Grubu: 9 haftalık deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde glukoz düzeyleri kaydedildi.

2. Grup (n=7) Diyabet Grubu: 50 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 glukoz düzeyleri kaydedildi.

3. Grup (n=7) Diyabet + Vitamin D Grubu: 50 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 9 hafta boyunca vitamin D (DeVİT-3 oral damla, Deva Holding, İstanbul, Türkiye) 50 IU/kg/gün oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde glukoz düzeyleri kaydedildi.

4. Grup (n=7) Diyabet + Vitamin E Grubu: 50 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 9 hafta boyunca vitamin E (Ephynal 300 mg yumuşak kapsül, Roche Müstahzarları Sanayi Anonim Şirketi, İstanbul, Türkiye) 500 IU/kg/gün oral olarak verildi. Çalışmanın başlangıcında ve sonunda düzenli bir şekilde glukoz düzeyleri kaydedildi.

2.4. Örneklerin Alınması

Tüm gruplardaki ratlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından ratların testis dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan testis dokuları histolojik çalışma için bouin solüsyonunda tespit edildi.

Testis ve epididimisler yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartıldı. Eklenti bezlerinden seminal bez ile ventral prostat çıkarılarak tartıldı.

2.4.1. Spermatolojik Muayeneler

Sağ kauda epididimisteki spermier modifiye metot kullanılarak hemositometrik yöntemle sayıldı. Sperm motilitesini tayin etmek için sol kauda epididimisteki spermier kullanıldı. Bunun için bir lam mikroskopunun ısıtma tablasına yerleştirilerek sıcaklığının 37 °C'ye ulaşması sağlandı. Birkaç damla Tris buffer solüsyonu [0,3 M Tris (hidroksimetil) aminometan, 0,027 M glukoz, 0,1 M sitrik asit ve 100 ml distile su] ısıtma tablası üzerindeki lama damlatıldıktan sonra sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon ihtiva eden küçük bir damla süspansiyon bu solüsyon üzerine yerleştirilip lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlandı. Daha sonra 400'lük büyütmede gözle motilite yüzdesi belirlendi. Motilite tahminleri sol kauda epididimisten alınan her 3 damla süspansiyon için 3 farklı saha incelenerek yapıldı. Bu 3 farklı sahanın ortalama değerleri, yüzde (%) motilite oranı olarak hesaplandı (130).

2.5. Biyokimyasal Çalışma

2.5.1. Kan Glukoz Düzeyleri

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

2.6. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan testis dokuları, boin 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 10). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 5–6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (Olympus BH–2) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 10. 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. 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 apoptozise giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 11). Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda (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 11: TUNEL boyama işlemi

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 blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3x5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme)	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3x5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3x5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 % 80, % 96 ve % 100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2x5 dakika
22 Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

PBS (Phosphate Buffered Saline), DAB (3,3'-diaminobenzidine)

2.8. 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. Kan Glukoz Düzeyleri

Diabetes mellitus, DM + Vit D ve DM + Vit E gruplarına ait ratların kan glukoz değerlerinde deneyin sonunda başlangıca göre anlamlı bir artış vardı ($p<0.001$). Kontrol ile kıyaslandığında DM, DM + Vit D ve DM + Vit E gruplarına ait ratların kan glukoz değerlerinde deneyin sonunda anlamlı bir artış vardı ($p<0.001$) (Tablo 12).

Tablo 12. STZ ile deneysel DM olduğu andaki başlangıç ve deney sonu kan glukoz değerleri

	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
	(Kontrol)	(DM)	(DM+Vit D)	(DM+Vit E)
	(n=7)	(n=7)	(n=7)	(n=7)
Başlangıç kan glukozu (mg/dl)	88,71±4,02	89,57±4,58	91,85±3,12	98,71±3,19
Deney sonu kan glukozu (mg/dl)	92,42±3,97	379,42±29,96 ^{a,b}	329,28±25,31 ^{a,b}	367,00±26,07 ^{a,b}

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Aynı grupta ilk ölçüme göre son ölçüm karşılaştırıldığında ($p<0.001$).

^b Kontrol grubuna (Grup I) göre karşılaştırıldığında ($p<0.001$).

3.2. Reprodüktif Parametrelere Ait Değerler

Diabetes mellitus grubunda, kontrol grubuna göre testis, kauda epididimis, ventral prostat ağırlıkları, sperm sayısı ve motilitesi ($p<0.01$) ile epididimis ve seminal bez ağırlığında ($p<0.001$) anlamlı derecede azalma mevcuttu. DM grubuyla karşılaştırıldığında DM + Vit D grubunda testis, kauda epididimis ağırlıkları, sperm sayısı ve motilitesi ($p<0.01$) ile epididimis ve seminal bez ağırlığında ($p<0.001$) anlamlı derecede artış saptanmıştır. DM grubuna göre DM + Vit E grubunda ise testis ağırlığı ve sperm motilitesi ($p<0.01$) ile epididimis ağırlığında ($p<0.001$) anlamlı derecede artış mevcuttu. DM grubuna göre DM + Vit E grubunda, kauda epididimis, ventral prostat ve seminal bez ağırlıkları ile sperm sayısında sayısal bir artış olmasına rağmen istatistiksel bir farklılık görülmedi. Her iki tedavi grubundaki

(DM + Vit D ve DM + Vit E grupları) testis ağırlığı ve sperm motilitesindeki iyileşmeler hemen hemen kontrole benzerdi (Tablo 13).

Tablo 13. Reprodüktif parametrelere ait değerler

Parametreler	Kontrol	DM	DM + Vit D	DM + Vit E
Testis ağırlığı (mg)	1383.3±76.6 ^a	460.0±160.2 ^b	1255.0±119.3 ^a	1040.0±65.0 ^a
Epididimis ağırlığı (mg)	505.0±11.5 ^A	150.0±25.1 ^B	371.6±43.3 ^C	280.0±15.0 ^C
Kauda epididimis ağırlığı (mg)	200.0±15.2 ^a	56.7±12.0 ^b	143.3±20.3 ^c	107.5±7.5 ^{bc}
Seminal bez ağırlığı (mg)	690.0±49.3 ^A	113.3±12.0 ^B	300.0±11.5 ^C	125.0±5.0 ^B
Ventral prostat ağırlığı (mg)	336.6±40.6 ^a	50.0±5.7 ^b	146.7±36.6 ^b	70.0±10.0 ^b
Sperm sayısı (milyon / kauda epididimis)	99.3±14.3 ^a	10.7±8.2 ^b	51.3±7.6 ^c	48.5±15.5 ^{bc}
Sperm motilitesi (%)	73.3±3.3 ^a	20.0±10.0 ^b	63.3±8.8 ^a	55.0±5.0 ^a

Veriler ortalama ± SEM değerleri olarak sunulmuştur.

Aynı satır içerisinde değişik a, b ve c; p<0.01 ve A, B ve C; p<0.001 harf taşıyan değerler arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan anlamlıdır.

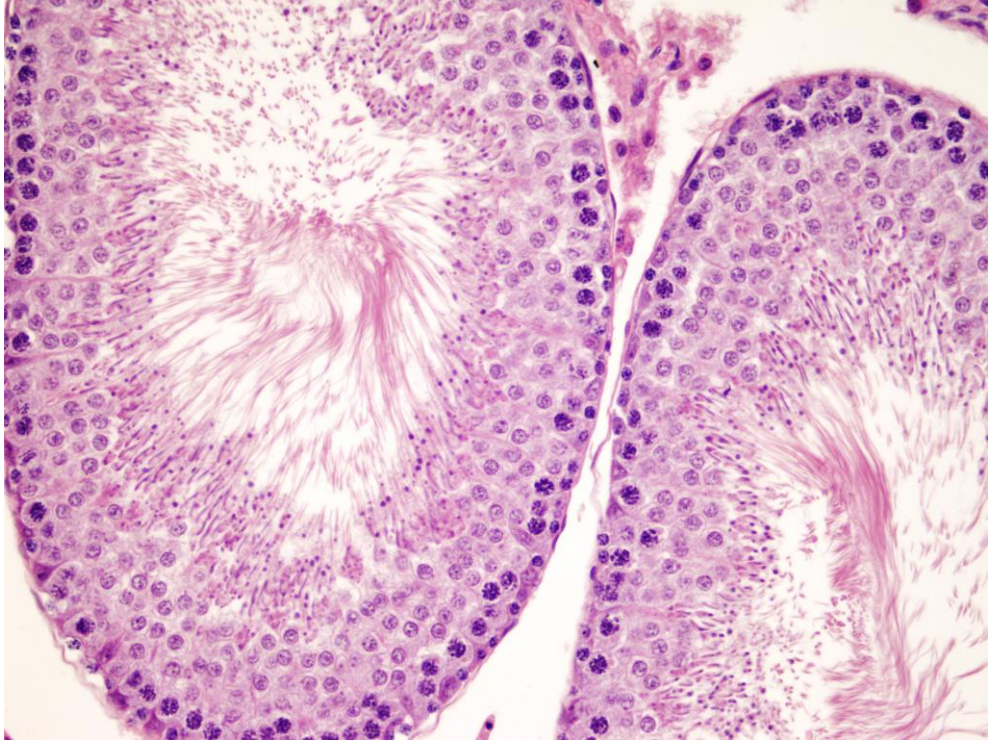
3.3. Histolojik Bulgular

Tüm grupların hematoksilen eozin boyalı preparatlarının ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; kontrol grubunda tinea albuginea ile çevrili, farklı büyüklüklerde, çok sayıda seminifer tübül mevcuttu. Tübüllerde sertoli hücrelerinin bazal membrana dik yerleştiği ve bunlara bitişik çok sayıda germ hücresinin lümenine doğru matürasyon gösterdiği izlendi (Şekil 6).

Diabetik gruba ait kesitlerde normal tübül yapıları ile birlikte az sayıda atrofik tübül izlendi. Atrofik tübüllerde hemen hemen tüm hücreler lümenine dökülmüş, canlılığını yitirmiş görünümdeydi. Bazı tübüllerde belirgin ödem mevcut olup hücrelerde ayrışma izlendi. Kontrol grubuna göre DM grubunda daha kalın duvarlı ve konjesyone damarlar mevcuttu. Ayrıca DM grubunda germ hücreleri sayıca azalmış ve yer yer disorganize görünümdeydi (Şekil 7, 8).

Diabetes mellitus + Vit D grubunda ödemin DM grubuna göre azaldığı ve germ hücre sayısının bazı tübüllerde normale yakın olacak şekilde arttığı görüldü. Damar yapıları DM'ye göre daha ince duvarlı olup konjesyon azalmıştı (Şekil 9).

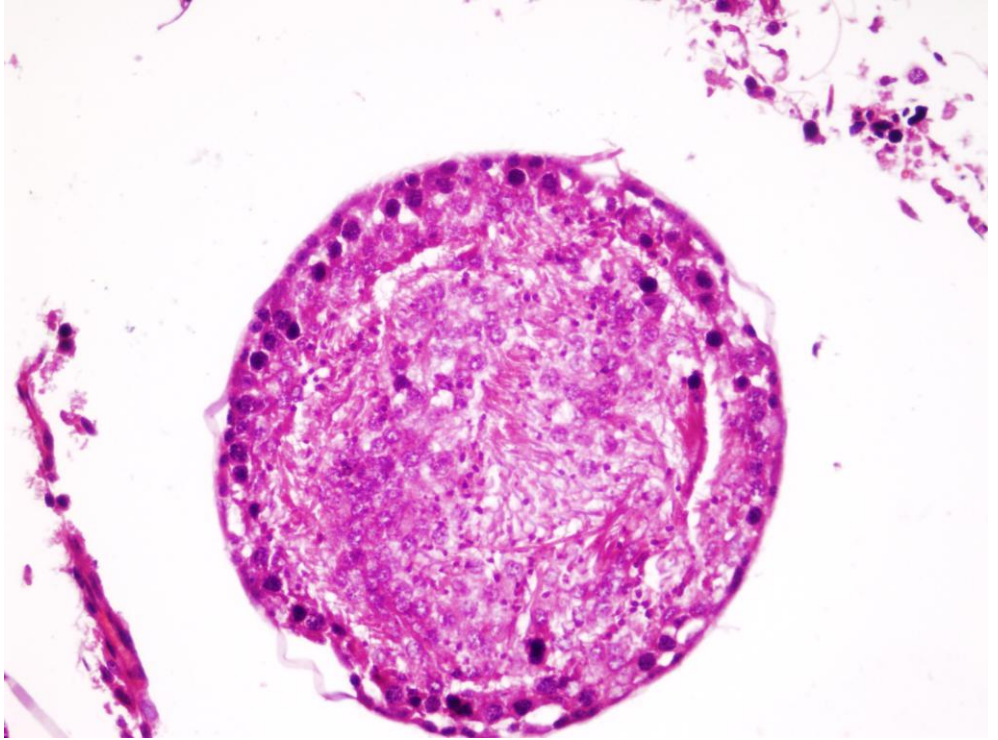
Diabetes mellitus + Vit E grubunda ise ödem DM + Vit D grubundan daha fazlaydı, ancak DM grubuna göre daha az ve fokaldi. Germ hücre sayısı DM grubuna göre daha iyiydi, ancak DM + Vit D grubunda olduğu kadar kontrole yakın değildi (Şekil 10).



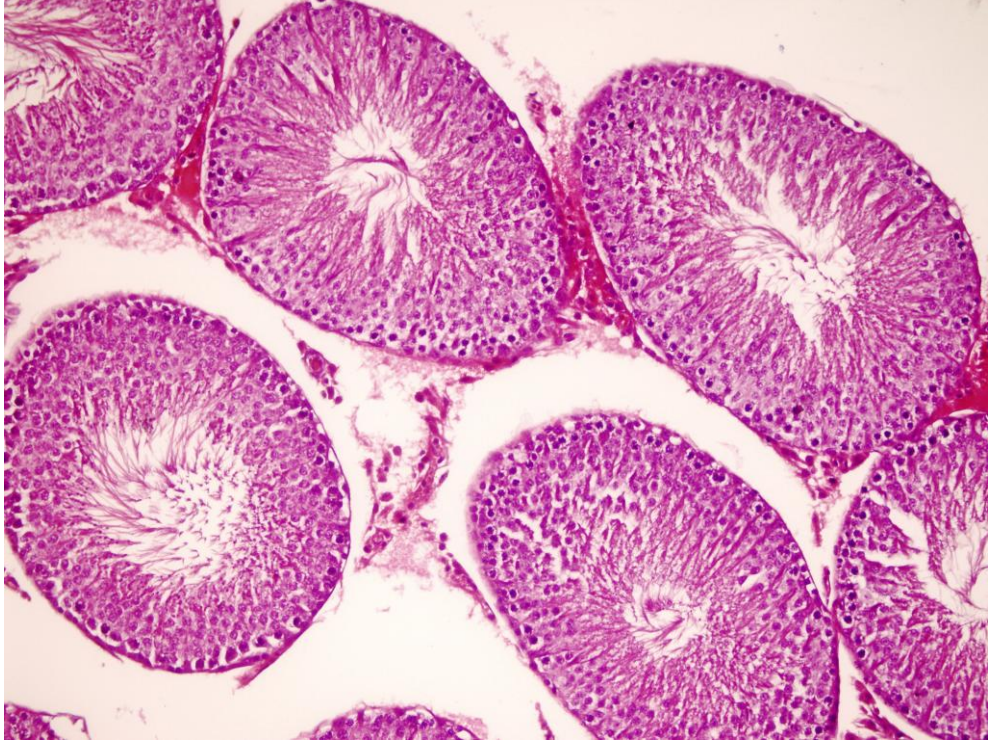
Şekil 6. Kontrol grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&E X400.



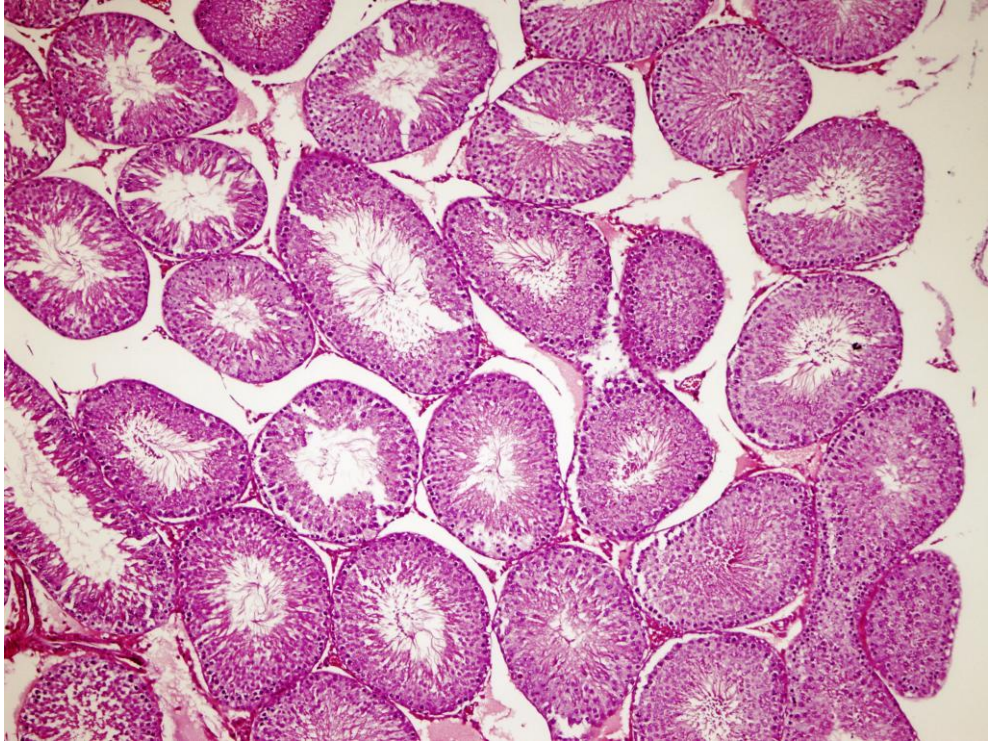
Şekil 7. DM grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400



Şekil 8. DM grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400



Şekil 9. DM + Vit D grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX400



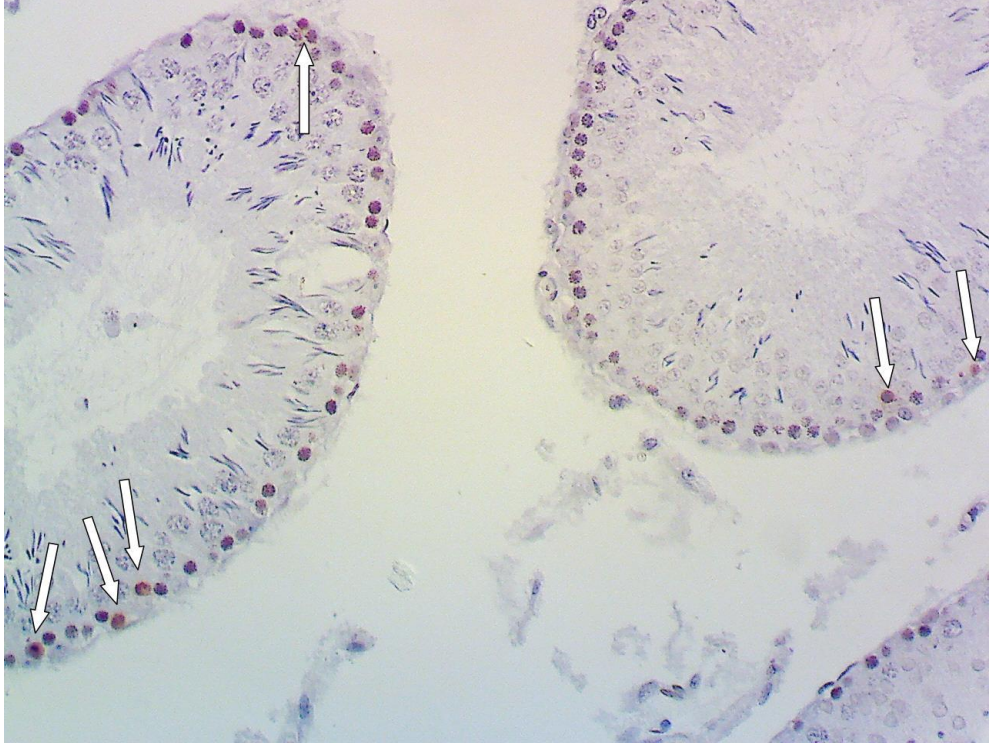
Şekil 10. DM + Vit E grubu: testis dokusu histolojik görünümü H&EX200

3.4. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; testiste kontrol grubu ile kıyaslandığında DM grubunda apoptotik indekste anlamlı bir artış vardı ($p<0.05$). DM + Vit D grubu ve DM + Vit E grubu ise DM grubu ile kıyaslandığında apoptotik indekste anlamlı bir azalma vardı ($p<0.05$) (Şekil 11, 12, 13, 14) (Tablo 14).



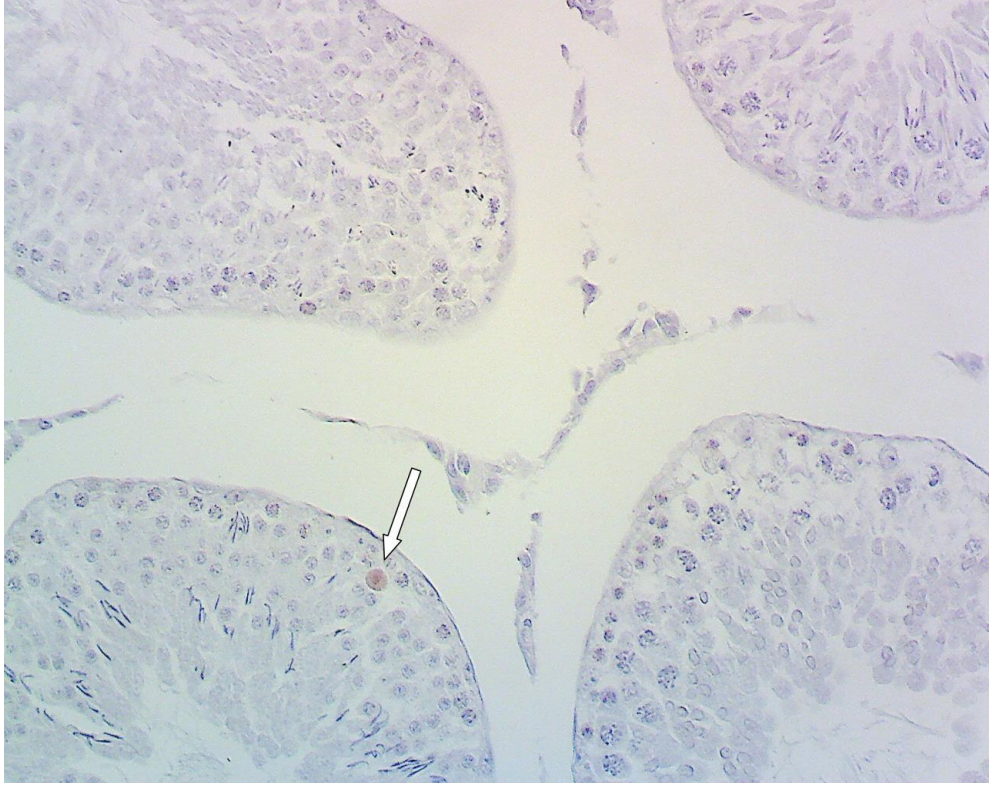
Şekil 11. Kontrol grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→) X 200



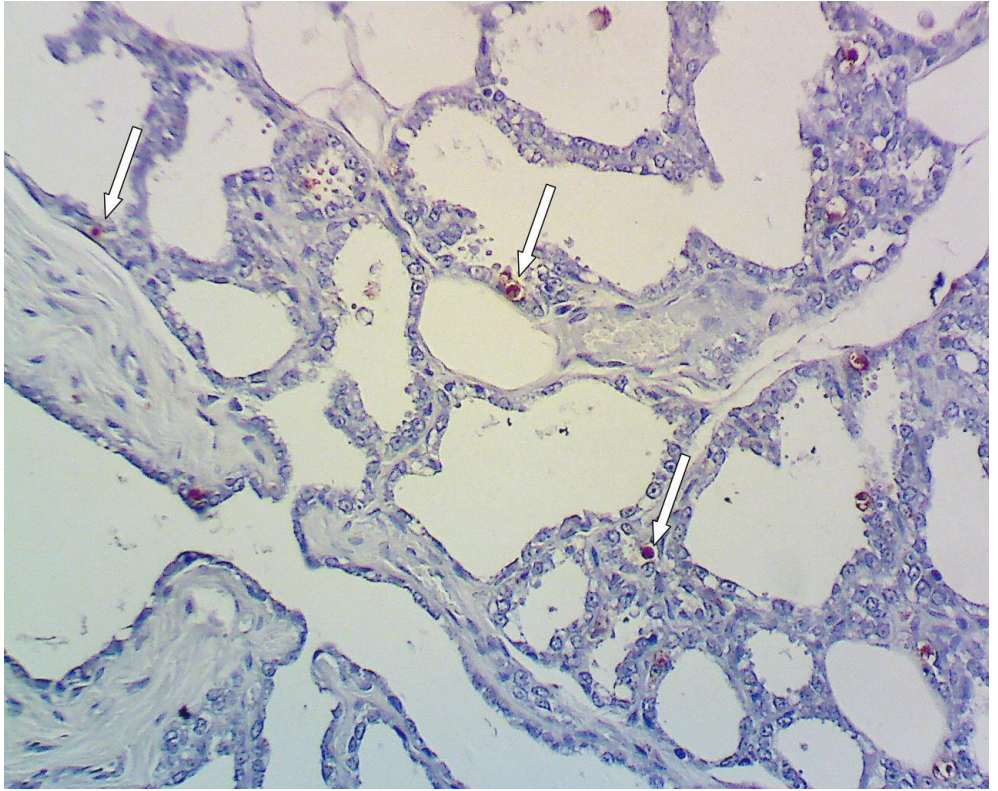
Şekil 12. DM grubu testis dokusunda artmış TUNEL pozitif hücreler (→)
X 200



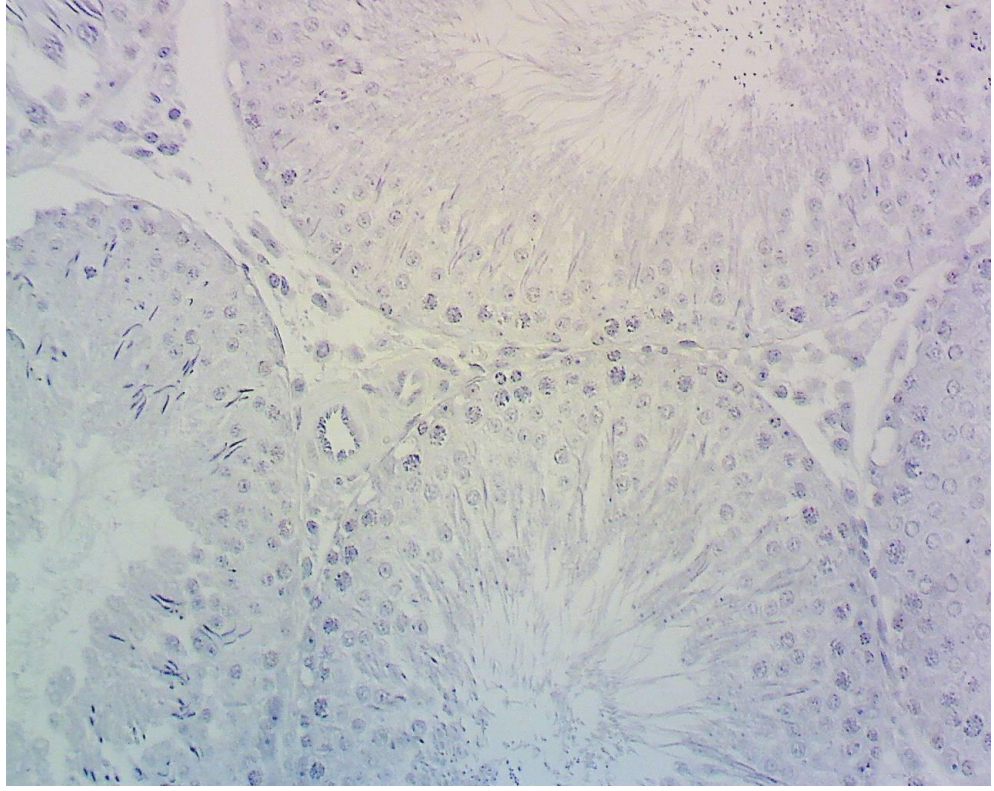
Şekil 13. DM + Vit D grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→)
X 200



Şekil 14. DM + Vit E grubu testis dokusunda TUNEL pozitif hücre (→)
X 200



Şekil 15. TUNEL pozitif kontrol. Meme dokusu. X 200



Şekil 16. TUNEL negatif kontrol. X 200

Tablo 14. Apoptotik indeks (%)

	Grup I (Kontrol)	Grup II (DM)	Grup III (DM+Vit D)	Grup IV (DM+Vit E)
Apoptotik İndeks (%)	0,5714±0.20	12,1429±0,34 ^a	0,7143±0,18 ^b	0,8571±0,14 ^b

Değerler ortalama ± standart hata olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında (p<0.05).

^b Diyabetik gruba göre karşılaştırıldığında (p<0.05).

4. TARTIŞMA

Diabetes mellitus; insülin sekresyonu ve/veya insülinin etkisindeki bozukluklardan kaynaklanan, hiperglisemi ile karakterize karbonhidrat, lipid ve protein metabolizması bozuklukları ve hızlanmış aterosklerozla birlikte, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlarla seyreden kronik metabolik bir hastalıktır (2).

Serbest radikaller sürekli olarak çevresel uyarılarla etkileşim ve normal metabolik sürecin sonucu olarak vücutta üretilir. Fizyolojik şartlar altında antioksidanların büyük bir bölümü canlı ortamda serbest radikal üretiminin olumsuz etkilerine karşı vücudu korurlar (18).

Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabetik hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiolojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (19).

Son yıllarda oksidatif stresin; DM, obezite, kanser, yaşlanma, inflamasyon, nörodejeneratif hastalıklar, hipertansiyon, apoptozis, kardiyovasküler hastalıklar ve kalp yetmezliği gibi hastalıkların patogenezinde rolü olduğu ile ilgili çalışmalar yapılmıştır (131).

Oksidatif stres, diyabet ve komplikasyonlarının altında yatan bir mekanizma olarak değerlendirilir (18). DM'a bağlı üremedeki engel ve anormal sperm yapımı uzun zamandır bilinmektedir. İnfertilite, diyabetik erkeklerde ortak komplikasyondur (72-75).

Sperm plazma membranı, bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri içerdiğinden ve sitoplazmasında düşük miktarda temizleyici enzimler bulunduğundan dolayı ROS tarafından oluşturulan hasara yatkındır (132, 133).

Serbest radikallerin artışı bu hücrelerin membranlarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif parçalanması sonucu lipid peroksidasyonunu tetikleyebilir. Sperm lipid peroksidasyonu plazma membranlarındaki lipid matriks yapısında hasara yol açmakta, bu da intraselüler ATP'nin hızlı kaybı ile aksonemal hasar, sperm canlılığında azalma ve hatta bazı olgularda spermatogenezin tam inhibisyonuna neden olmaktadır (134).

Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, ilk defa 1943'te İskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermatazoonların hareketliliğinin katalaz eklenmesi ile arttığını göstermesi ile başlamaktadır (62). ROS'a bağlı sperm hasarının, vakaların % 30-80'inde rol aldığını gösteren çalışmalar mevcuttur (59-61).

Testiste antioksidan durumun bozulması sonucu, erkek germ hücre hattında DNA hasarı, spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinde bozukluk, oksidatif stres indüklenmesi, lipid peroksidasyonunun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı ve testiküler SOD ve KAT'ın baskılanması görülmektedir (57).

Köksal ve ark.'nın (135) infertil hastalarda yaptıkları çalışmada; testiküler dokuda meydana gelen şiddetli patolojik değişikliklerin yüksek düzeydeki lipid peroksidasyonu ile ilişkili olduğu ve infertilite ile ilişkili testiküler dejenerasyonun oluşumunda aşırı ROS üretiminin rol oynayabileceği gösterilmiştir.

Testiküler fonksiyon bozukluğu sonucu spermatogenez sırasında kontrolsüz ve gereksiz apoptozis meydana gelmektedir. Bu nedenle, diyabetik erkeklerdeki testiküler fonksiyon bozukluğunun patogenezinde apoptozis çok önemli bir rol oynar (83).

Vitamin D₃, vitamin D'nin aktif metabolitidir ve değişik biyolojik olaylarda rol oynadığı rapor edilmiştir (136, 137). Vitamin D₃'ün son on yılda antioksidatif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (138). Bundan başka vitamin D₃'ün astrosit ve karaciğerde glutatyon içeren peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif defans sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (139, 140). Lin ve ark. (141) 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 bunun da lipid peroksidasyonunu ve otooksidasyonu azaltıcı etkilerine bağlı olabileceğini göstermişlerdir. Wiseman ve ark. da (138) yaptıkları çalışmada vitamin D₃'ün bir membran antioksidanı olarak demirin indüklediği lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir.

Vitamin E ise çok önemli bir antioksidan olup, lipofilik özelliktedir. Vitamin E, lipid peroksidasyonunun erken evrelerinde biyomembrandaki serbest

radikal toplayıcı aktivitesi sonucu hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyarak, lipid peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattını oluşturur. Vitamin E; süperoksit, hidroksil radikalleri, tekli oksijenleri, lipid peroksil radikalleri ve diğer radikal örneklerini indirger (125, 142).

Çalışmamızda STZ verilerek DM oluşturulan ratlarda, oksidatif strese duyarlı olan testis dokusunda vitamin D ve vitamin E'nin koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

Çalışmamızda ilk olarak testislerdeki reproduktif parametreleri inceledik.

Diyabetik ratlarda epididimis, seminal bez ve prostat ağırlığında azalma olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (79, 143, 144).

Çalışmamızda da bu bulgulara uyumlu bir şekilde testis, epidimis, kauda epididimis, seminal bez ve ventral prostat ağırlığında; DM grubunda kontrol grubuna göre önemli derecede azalma mevcuttu. Testis ve epididimis ağırlığında, tedavi grubunda (DM + Vit D ve DM + Vit E grupları), DM grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklik mevcuttu. Her iki tedavi grubunda da testis ağırlığı kontrol grubuna benzer olarak bulunmuştur.

Diabetes mellitus'a bağlı reproduktif parametrelerdeki azalma, muhtemelen bu organların büyümesinde en önemli düzenleyici olan testosteronun düşük seviyelerde olmasına bağlı olabilir (145, 146). STZ ile diyabet oluşturulan modellerde androjen reseptörlerinin testiste, epididimide ve prostat bezinde azaldığı gösterilmiştir (80). Düşük testosteron düzeyleri ve bozulmuş spermatogenez, diyabetik hayvanların testislerindeki karakteristik özelliklerdir (147).

Sexton ve ark. (148) diyabetik hayvanlarda LH ve testosteron düzeylerinde düşüklük olduğunu göstermişlerdir. Seethalakshmi ve ark. (77) ise düşük testosteron seviyesinin insülin yokluğuna ya da azlığına bağlı olduğunu, insülin tedavisi ile reproduktif organ ağırlıklarında ve vücut ağırlığında artış olduğunu göstermişlerdir.

Diyabette testislerde; epididimal sperm konsantrasyonunda düşüklük, azalmış sperm motilitesi ve anormal sperm oranında yükseklik daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (83, 149).

1943 yılında McLeod, oksijen radikallerinin insan spermatozoa motilitesine toksik olduğunu göstermiştir (150). Diyabetik ratlardaki testiküler fonksiyon bozukluğunda testis ağırlığı, sperm sayısı ve sperm hareketliliğinin azaldığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (77, 79, 83).

Seethalakshmi ve ark. (147) diyabetik ratlarda insülin tedavisi ile serum gonadotropinlerinde, reproduktif ağırlıkta, sperm sayısı ve motilitesinde artış olduğunu göstermişlerdir. Literatür bilgilerine paralel olarak çalışmamızda da; DM grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sperm sayısı ve motilitesinde anlamlı düşüklük saptanmıştır. Tedavi gruplarında (DM + Vit D, DM + Vit E grupları) kontrol grubuyla benzer bulgular saptanmıştır.

Sperm konsantrasyonundaki ve motilitesindeki azalma ile anormal sperm oranındaki artış, diyabete bağlı gelişen oksidatif stress ve Leydig hücre fonksiyonlarındaki azalma ile açıklanabilir (149, 151). Tedavi gruplarında belirlediğimiz kontrol grubuna benzer bulgular muhtemelen vitamin D ve vitamin E'nin antioksidan etkileri ile oksidatif stresi engellemesine bağlı olabilir.

Hamden ve ark. (152) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada vitamin D'nin testosteron ve 17 beta-östradiol düzeylerini arttırdığını ve oksidatif stres, hücre hasar, sperm motilitesi ve sayısı üzerine koruyucu etkilerini göstermişlerdir.

Vitamin E'nin testiste antioksidan etkilerini gösteren çalışmalarda; Obianime ve ark. ratlarda yaptıkları çalışmada, kadmiyumun testislerdeki toksik etkisinin vitamin E ile engellendiğini ve bunun da vitamin E'nin antioksidan özelliğine bağlı olabileceğini göstermişlerdir (153). Benzer bir şekilde; Sönmez ve ark. (154) homosisteinin diyabetik rat testislerinde neden olduğu olumsuz etkilere karşı melatonin ve Vit E'nin antioksidan enzim aktivitelerine, testosteron düzeylerine, sperm sayısı ve motilitesine olumlu etkilerini göstermişlerdir.

Diyabetik erkeklerdeki testiküler disfonksiyonun patogeneğinde, artmış apoptozis önemli bir rol oynamaktadır (83).

Programlı hücre ölümü olarak adlandırılan apoptozis, hücrelerin proliferasyon ve diferansiyasyonu sırasında ortadan kaldırılmasında rol alan bir ölüm şeklidir. Apoptozis normal spermatogenezde önemli rol oynar. Testis çevresel faktörlere bağlı hücre hasara karşı hassastır. DM, iskemi, hipertermi ve

radasyon gibi fizyolojik olmayan stres durumlarında germ hücrelerinde apoptozis görülebilmektedir (155).

Diyabete bağlı apoptozisin mekanizması net değildir. Ancak günümüzdeki çalışmalar oksidatif stresin apoptozise neden olabileceğini göstermektedir (156, 157).

Oksidatif stres apoptozisin uyarılmasında güçlü bir mediatördür. Apoptoziste mitokondriya önemli bir rol oynamaktadır. Oksidatif stres tarafından oluşturulan mitokondriyal hasar ile sitokrom c salınımı olmakta ve sonrasında oluşan kaspaz aktivasyonu ile apoptotik hücre ölümü gerçekleşmektedir (158).

Apoptotik hücre ölümü, Bcl-2 ailesinden proteinler ve kaspazların rol aldığı apoptotik sinyal yollarının aktivasyonu ile düzenlenmektedir. Bcl-2 ve Bcl-XL hücre ölümünü engelleyen anti-apoptotik faktörler olup, Bax ve Bad ise hücre ölümüne neden olan pro-apoptotik faktörlerdir (147). STZ ile diyabet oluşturulan hayvanlarda germ hücrelerinde apoptosizde artış olduğunu gösterenler çalışmalar mevcuttur (82, 83).

Sinha Hikim ve Swerdloff (159) LH ve testosteron düzeylerindeki azalmanın testisteki germ hücrelerinde apoptozisi uyardığını belirtmişlerdir. Zhao ve ark. (160) antioksidan özelliği iyi bilinen N-asetil sistein (NAC)'in diyabete bağlı oluşan apoptotik hücre ölümüne karşı koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TUNEL yöntemi ile boyanan preparatların ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; testiste kontrol grubu ile kıyaslandığında DM grubunda apoptotik indekste anlamlı bir artış vardı. DM + Vit D grubu ve DM + Vit E grubu ise DM grubu ile kıyaslandığında apoptotik indekste anlamlı bir azalma vardı. Bu da mutemelen Vit D ve Vit E'nin antioksidan özellikleri nedeniyle bağlı olarak oksidatif streste azalmaya yol açarak apoptozisi engellemesine bağlı olabilir.

Hamden ve ark.'nın (161) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada; Vit D'nin pankreas, karaciğer ve böbrekte hiperglisemi, oksidatif stres ve hücre hasarını inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Antioksidan kapasitesinin ise antioksidan sistemde anahtar rol alan G6PDH enziminin gen ekspresyonunu arttırarak ve yine insülin

seviyesinde ve sensitivitesinde gerekli olan östrojen ve testosteron düzeylerinde artış yoluyla oluştuğunu belirtmişlerdir.

Petra ve ark.'nın (162) primer insan keratinositlerinde yaptıkları çalışmada ise, vitamin D'nin antiapoptotik genlerde artışa yol açarak apoptozisi engellediği gösterilmiştir. Vitamin D₃'ün oksidatif stresi azaltarak koruyucu etkinliğini gösteren diğer çalışmalarda ise; Garcion ve ark. (139) ile Sardar ve ark. (140) yaptıkları çalışmada vitamin D₃'ün iNOS aktivitesini düşürdüğünü ve böylece primer rat astrositlerindeki serbest radikal oluşumunu azaltarak peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif defans sistemlerini harekete geçirme yoluyla oksidatif stresi engellediğini rapor etmişlerdir.

Bir başka çalışmada Bo-Ying-Bao ve ark. (163) malign olmayan prostat hücrelerinde, vitamin D₃'ün dokularda redüktan bir madde olduğu bilinen ve oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olan G6PDH ekspresyonunda artışa yol açarak antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir.

Vitamin E'nin antioksidan etkileri ile ilgili çalışmalarda ise; Üstüner ve ark. (164) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada Vit E verilen grupta diyabet grubuna göre antioksidan enzimlerde artışa yol açarak, apoptozisde azalma meydana getirdiğini ve böylece Vit E'nin mesane üroepitelyal hücrelerinde koruyucu etkileri olduğunu göstermişlerdir. Cipollone ve ark. (165) diyabetik hastalarda yaptıkları çalışmada, diyabetik nefropatide artmış oksidatif strese bağlı olarak antiapoptotik gen olan Bcl-2 de azalma meydana geldiğini ve Vit E ile Bcl-2'de artış olduğunu göstermişlerdir. Dallak ve ark. da (166) diyabetik ratlarda yaptıkları çalışmada oksidatif stres ve apoptozise bağlı kalpte fonksiyonel ve yapısal değişiklikler olduğunu ve bu değişikliklerin insülin ve Vit E ile önemli derecede düzeldiğini göstermişlerdir.

Yapılan çalışmalarda antioksidanların deneysel diyabette testisleri oksidatif strese karşı korudukları gösterilmiştir. İnfertil erkeklerin antioksidan tedavilerle sperm motilitesi ve DNA hasarında iyileşmeler olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (167-170).

Bu çalışmada STZ verilen ratlarda testis dokusunda hücresel hasar oluştuğu ve DM'nin oksidatif hasar ile apoptozise neden olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda DM'nin oluşturduğu oksidatif hasarı engellemek için verilen Vit D ve Vit E'nin,

testislerdeki oksidatif strese bağlı gelişen apoptozise karşı koruyucu etkileri olduğunu düşündürmektedir.

Sonuç olarak; DM'nin oluşturduğu hücre hasarına bağlı gelişen testiküler fonksiyon bozukluklarına karşı Vit D ve Vit E'nin koruyucu etkilerinin olmasının gösterilmesi diyabetin komplikasyonları açısından ele alındığında önemli bir bakış açısı kazandırabilecektir. Gelecekte daha ileri ve ayrıntılı çalışmalarla, diyabette Vit D ve Vit E ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, diyabetin komplikasyonlarını önlemek amacıyla yeni tedavi yaklaşımları da denenebilecektir.

5. KAYNAKLAR

1. Yönerem A, Özata M. Diabetes mellitus tanısı, sınıflaması, klinik özellikler. Endokrinoloji Metabolizma ve Diyabet. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık, 2006; 275-283.
2. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2001; 1: 51-62.
3. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. Khan CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ (editors). Joslin's Diabetes Mellitus. 14th ed. Boston: Lippincott William and Wilkins, 2005; 331-338.
4. Arslan M. Diabetes mellitusta tanı ve sınıflandırma. İliçin G, Biberoglu K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2279-2295.
5. Satman I, Yılmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. The TURDEP group: Population- based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: result of the Turkish diabetes epidemiology study. Diabetes Care 2002; 25: 1551-1556.
6. Kelestimur F, Cetin M, Pasaoglu H, Coksevim B, Cetinkaya F, Unluhizarci K, et al. The prevalance and identification of risk factors for type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in Kayseri, Central Anatolia, Turkey. Acta Diabetol 1999; 6: 85-91.
7. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2004; 27: 5-10.
8. World Health Organization: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of a WHO Consultation. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Geneva: World Health Organization, 1999.
9. Altuntaş Y. Diabetes mellitus'un tanımı, tanısı ve sınıflaması. Yenigün M (editör). Her yönüyle diabetes mellitus. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 51-62.

10. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, et al. Report of the Committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* 2002; 55: 65-85.
11. Başkal N. Diabetes mellitus'un sınıflandırılması. Erdoğan G (editör). *Koloğlu Endokrinoloji temel ve klinik. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 342-348.*
12. Başkal N. Diabetes mellitusta akut metabolik dekompanseasyonlar. İliçin G, Biberöglü K, Süleymanlar G, Ünal S (editörler). *İç Hastalıkları. 2. Baskı, Ankara: Öncü Basımevi, 2005; 2311-2321.*
13. Gedik O. Diabetes mellitus'un komplikasyonları. Erdoğan G (editör). *Koloğlu Endokrinoloji temel ve klinik. 2. Baskı, Ankara: MN Medical & Nobel, 2005; 367-383.*
14. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995; 3-95.
15. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 1992; 119: 598-620.
16. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000; 109: 33-44.
17. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? *Redox Rep* 2004; 9: 145-152.
18. Birrell AM, Heffernan SJ, Anselin AD, McLennan S, Church DK, Gillin AG, Yue DK. Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia* 2000; 43: 110-116.
19. Pitkanen OM, Martin JM, Hallman M, Akerblom HK, Sariola H, Andersson SM. Free radical activity during development of insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Life Sci* 1992; 50: 335-339.

20. 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 Metab Rev* 1995; 11: 181-192.
21. Bukan N, Sancak B, Yavuz O, Koca C, Tutkun F, Ozcelikay TA, Altan N. Lipid peroxidation and scavenging enzyme levels in the liver of streptozotocin-induced diabetes rats. *Indian J Biochem Biophys* 2003; 40: 447-450.
22. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
23. Pedulla M, d'Aquino R, Desiderio V, de Francesco F, Puca A, Papaccio G. MnSOD mimic compounds can counteract mechanical stress and islet beta cell apoptosis, although at appropriate concentration ranges. *J Cell Physiol* 2007; 212: 432-438.
24. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997; 46: 1733-1742.
25. Tiedge M, Lortz S, Munday R, Lenzen S. Complementary action of antioxidant enzymes in the protection of bioengineered insulin-producing RINm5F cells against the toxicity of reactive oxygen species. *Diabetes* 1998; 47: 1578-1585.
26. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poitout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 119-124.
27. Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K, Odaka H, Tanaka T, Ikeda H, et al. Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic beta-cells of GK rats, a model of type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 927-932.
28. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
29. Rosen P, Du X, Tschöpe D. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by alpha-tocopherol? *Mol Cell Biochem* 1998; 188: 103-111.

30. Du X, Stocklauser-Farber K, Rosen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappa B, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 752-763.
31. Ceriello A. Acute hyperglycaemia and oxidative stress generation. *Diabet Med* 1997; 14: 45-49.
32. Davidoff AJ, Rodgers RL. Insulin, thyroid hormone, and heart function of diabetic spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* 1990; 15: 633-642.
33. Das K, Chainy GB. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defence system by thyroid hormone. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1537: 1-13.
34. Altan N, Bugdayci G, Tutkun FK, Sancak B, Nazaroglu NK. The effect of the sulfonylurea glyburide on nitric oxide in streptozotocin-induced diabetic rat. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 319-321.
35. Bonnefont-Rousselot D. Glucose and reactive oxygen species. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2002; 5: 561-568.
36. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
37. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004; 53: 110-118.
38. Altan N, Yiğit S, Elmalı E, Malhatun E, Rota S, Kılıç N. Effect of the sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase in streptozotocin-induced diabetic rat muscle. *Gen Pharmacol* 1997; 28: 795-796.
39. Bonnefont-Rousselot D, Bastard JP, Jaudon MC, Delattre J. Consequences of the diabetic status on the oxidant/antioxidant balance. *Diabetes Metab* 2000; 26: 163-176.
40. Van Dam PS, Bravenboer B. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetic neuropathy. *Neuroscience Research Communications* 1997; 21: 41-48.
41. Soulis-Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, Clarke B, Jerums G. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes* 1991; 40: 1328-1334.

42. Hammes HP, Martin S, Federlin K, Geisen K, Brownlee M. Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 11555-11558.
43. Forbes JM, Cooper ME, Thallas V, Burns WC, Thomas MC, Brammar GC, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy. *Diabetes* 2002; 51: 3274-3282.
44. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17: 24-38.
45. Greene DA, Lattimer SA, Sima AA. Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1987; 316: 599-606.
46. Greene DA, Sima AF, Pfeifer MA, Albers JW. Diabetic neuropathy. *Annu Rev Med* 1990; 41: 303-317.
47. Bukan N, Sancak B, Bilgihan A, Kosova F, Bugdayci G, Altan N. The effects of the sulfonylurea glyburide on glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase activities in the heart tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2004; 26: 519-522.
48. Karasu C, Ozturk Y, Altan N, Yıldızoglu-Arı N, İkizler C, Altan VM. Thyroid hormones mediated effect of insulin on alloxan diabetic rat atria. *Gen Pharmacol* 1990; 21: 735-740.
49. Daloğlu AG. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda E Vitamini ve Kafeik Asit Fenetil Ester'in (Cape) Antioksidan Etkilerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Bölümü, 2003.
50. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-581.
51. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-1828.

52. Kuru M. Diyabetik Nefropati Oluşturulmuş Ratlarda Pioglitazonun Antioksidan Parametrelere ve Patolojik Süreçlere Etkileri. Uzmanlık Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Bölümü, 2009.
53. Tian WN, Braunstein LD, Apse K, Pang J, Rose M, Tian X, Stanton RC. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in cell death. *Am J Physiol* 1999; 276: 1121-1231.
54. Leopold JA, Cap A, Scribner AW, Stanton RC, Loscalzo J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency promotes endothelial oxidant stress and decreases endothelial nitric oxide bioavailability. *FASEB J* 2001; 15: 1771-1773.
55. Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* 1998; 101: 1581-1590.
56. Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 473-480.
57. Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis. *Androloji Bülteni*, 2009; 37: 131-136.
58. McLachlan RI, de Kretser DM. Male infertility: the case for continued research. *Med J Aust* 2001; 174: 116-117.
59. Iwasaki A, Gagnon C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil Steril* 1992; 57: 409-416.
60. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology* 2006; 67: 2-8.
61. Ochsendorf FR, Thiele J, Fuchs J, Schuttau H, Freisleben HJ, Buslau M, Milbradt R. Chemiluminescence in semen of infertile men. *Andrologia* 1994; 26: 289-293.
62. MacLeod J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 1943; 138: 512-518.

63. De Young L, Yu D, Bateman RM, Brock GB. Oxidative stress and antioxidant therapy: their impact in diabetes-associated erectile dysfunction. *J Androl* 2004; 25: 830-836.
64. Ricci G, Catizone A, Esposito R, Pisanti FA, Vietri MT, Galdieri M. Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia* 2009; 41: 361-368.
65. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium-induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000; 14: 238-243.
66. Oner-Iyidogan Y, Gurdol F, Oner P. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res* 2001; 44: 89-93.
67. Hussein MR, Abu-Dief EE, Abou El-Ghait AT, Adly MA, Abdelraheem MH. Melatonin and roentgen irradiation of the testis. *Fertil Steril* 2006; 86: 750-752.
68. Gavazza M, Catala A. Melatonin preserves arachidonic and docosapentaenoic acids during ascorbate-Fe⁺² peroxidation of rat testis microsomes and mitochondria. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 359-366.
69. Gavazza MB, Catala A. Protective effect of N-acetyl-serotonin on the nonenzymatic lipid peroxidation in rat testicular microsomes and mitochondria. *J Pineal Res* 2004; 37: 153-160.
70. Juan ME, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, Planas JM. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *J Nutr* 2005; 135: 757-760.
71. Orozco TJ, Wang JF, Keen CL. Chronic consumption of a flavanol- and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. *J Nutr Biochem* 2003; 14: 104-110.
72. Ficher M, Zuckerman M, Fishkin RE, Goldman A, Neeb M, Fink PJ, et al. Do endocrines play an etiological role in diabetic and nondiabetic sexual dysfunctions? *J Androl* 1984; 5: 8-16.

73. Murray FT, Cameron DF, Orth JM. Gonadal dysfunction in the spontaneously diabetic BB rat. *Metabolism* 1983; 32: 141-147.
74. Calvo JC, Baranao JL, Tesone M, Charreau EH. Hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in the streptozotocin-induced diabetic male rat. *J Steroid Biochem* 1984; 20: 769-772.
75. Steger RW, Amador A, Lam E, Rathert J, Weis J, Smith MS. Streptozotocin-induced deficits in sex behavior and neuroendocrine function in male rats. *Endocrinology* 1989; 124(4): 1737-1743.
76. Kuhn-Velten N, Schermer R, Staib W. Effect of streptozotocin-induced hyperglycaemia on androgen-binding protein in rat testis and epididymis. *Diabetologia* 1984; 26(4): 300-303.
77. Seethalakshmi L, Menon M, Diamond D. The effect of streptozotocin-induced diabetes on the neuroendocrine-male reproductive tract axis of the adult rat. *J Urol* 1987; 138: 190-194.
78. Steger RW. Testosterone replacement fails to reverse the adverse effects of streptozotocin-induced diabetes on sexual behavior in the male rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1990; 35: 577-582.
79. Scarano WR, Messias AG, Oliva SU, Klinefelter GR, Kempinas WG. Sexual behaviour, sperm quantity and quality after short-term streptozotocin-induced hyperglycaemia in rats. *Int J Androl* 2006; 29: 482-488.
80. Liu SH, Wang ZS. Study on the expression of androgen receptor in testis, epididymis and prostate of adult rats with diabetes. *Natl J Androl* 2005; 11: 891-894.
81. Ballester J, Munoz MC, Dominguez J, Rigau T, Guinovart JJ, Rodriguez-Gil JE. Insulin-dependent diabetes affects testicular function by FSH and LH-linked mechanisms. *J Androl* 2004; 25: 706-719.
82. Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int J Androl* 1997; 20: 243-253.

83. Cai L, Chen S, Evans T, Deng DX, Mukherjee K, Chakrabarti S. Apoptotic germ-cell death and testicular damage in experimental diabetes: prevention by endothelin antagonism. *Urol Res* 2000; 28: 342-347.
84. Baccetti B, La Marca A, Piomboni P, Capitani S, Bruni E, Petraglia F, De Leo V. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. *Hum Reprod* 2002; 17: 2673-2677.
85. Cameron DF, Murray FT, Drylie DD. Interstitial compartment pathology and spermatogenic disruption in testes from impotent diabetic men. *Anat Rec* 1985; 213: 53-62.
86. Anderson JE, Thliveris JA. Morphometry and cytochemistry of Leydig cells in experimental diabetes. *Am J Anat* 1987; 180: 41-48.
87. Özvaran MK. Malign mezotelyomada gen tedavisi. *Toraks Dergisi* 2004; 5: 110-115.
88. Hızel N. Apoptoz (Programlanmış Hücre Ölümü). *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1997; 6: 196-197.
89. Hampton MB, Orrenius S. Redox regulation of apoptotic cell death. *Biofactors* 1998; 8: 1-5.
90. Büyükgebiz O, Caferler JS. Apoptoz. *Sendrom* 2001; 13: 102-7.
91. Estaquier J, Idziorek T, de Bels F, Barre-Sinoussi F, Hurtrel B, Aubertin AM, et al. Programmed cell death and AIDS: significance of T-cell apoptosis in pathogenic and nonpathogenic primate lentiviral infections. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9431-9435.
92. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 1993; 15: 35-43.
93. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130.
94. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 395-419.
95. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2001; 2: 91-95.

96. Renehan AG, Booth C, Potten CS. What is apoptosis, and why is it important? *BMJ* 2001; 322: 1536-1538.
97. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-290.
98. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA* 1998; 279: 300-307.
99. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-1777.
100. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and Apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 1999; 53: 577-628.
101. Johnson DE. Programmed cell death regulation: basic mechanisms and therapeutic opportunities. *Leukemia* 2000; 14: 1340-1344.
102. Eichhorst ST, Krammer PH. Derangement of apoptosis in cancer. *The Lancet* 2001; 358: 345-346.
103. King KL, Cidlowski JA. Cell cycle regulation and apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 601-617.
104. Ersoy AH. Kolorektal Karsinomların Postoperatif Mortalitesini Belirlemede Kullanılan ASA Ve POSSUM Değerlerinin Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, II. Genel Cerrahi Kliniği, 2007.
105. Urbano A, Lakshmanan U, Choo PH, Kwan JC, Ng PY, Guo K, et al. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells. *EMBO J* 2005; 24: 2815-2826.
106. Kumar V, Abbas A, Fausto N. Cellular adaptations, cell injury and cell death. Kumar V, Abbas A, Fausto N (editors). *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. Elsevier Philadelphia, 2005; 7: 26-32.

107. Billig H, Furuta I, Rivier C, Tapanainen J, Parvinen M, Hsueh AJ. Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 1995; 136: 5-12.
108. Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2004; 29: 237-242.
109. McPhie DL, Coopersmith R, Hines-Peralta A, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *J Neurosci* 2003; 23: 6914-6927.
110. Ozeki N, Mogi M, Nakamura H, Togari A. Differential expression of the Fas-Fas ligand system on cytokine-induced apoptotic cell death in mouse osteoblastic cells. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 511-517.
111. Philip J Barr, L David Tomei. Apoptosis and its role in human disease. *Bio/Technology* 1994; 12: 487-493.
112. Tomatır AG. Apoptoz: programlı hücre ölümü. *T Klin J Med Sci* 2003; 23: 499-508.
113. Ulukaya E. Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003; 15-26.
114. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2008; 19: 55-63
115. Dubska L, Matalova E, Misek I. Detection of apoptosis in parafin embedded tissues: the influence of tissue type and fixation. *Acta Vet BRNO* 2002; 71: 529- 553.
116. Willingham MC. Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 1101-1110.
117. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to Tunel specificity. *Biomed Pharmacother* 1998; 52: 252-258.

118. Hekim N. Apoptosis. Kalıtsal hastalıklara moleküler tıp açısından bakış sempozyumu, 2003: 115-140.
119. Katherine L, Jonathan M. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001; 49: 821-832.
120. Bjorneboe A, Bjorneboe GE, Drevon CA. Absorption, transport, and distribution of vitamin E. *J Nutr* 1990; 120: 233-242.
121. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. *Sendrom* 1997; 14-23.
122. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. London: Lange Medical Publication, 1993: 573-587.
123. Packer L, Landvik S. Vitamin E in biological systems. *Therapy and Preventive Medicine* 1990; 262: 93-103.
124. Jialal I, Fuller CJ. Oxidized LDL and antioxidants. *Clin Cardiol* 1993; 16: 16-9.
125. Gey KF. Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer, and cardiovascular disease. *Br Med Bull* 1993; 49: 679-99.
126. Jameson JL. *Harrison Endokrinoloji*. Bereket A, Akçay T (Çeviren) s. 425-430, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
127. Palomer X, Gonzalez-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2008; 10: 185-197.
128. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005; 289: 8-28.
129. de Boer IH. Vitamin D and glucose metabolism in chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2008; 17: 566-572.
130. Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Yuce A, Ceribasi AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology* 2007; 67: 778-785.
131. Pitocco D, Zaccardi F, Di Stasio E, Romitelli F, Santini SA, Zuppi C, Ghirlanda G. Oxidative stress, nitric oxide, and diabetes. *Rev Diabet Stud* 2010; 7: 15-25.

132. Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immunol* 2008; 59: 2-11.
133. Aitken RJ, McLaughlin EA. Molecular mechanisms of sperm capacitation: progesterone-induced secondary calcium oscillations reflect the attainment of a capacitated state. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; 63: 273-293.
134. Turk G, Atessahin A, Sonmez M, Ceribasi AO, Yuce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008; 89: 1474-1481.
135. Koksall IT, Usta M, Orhan I, Abbasoglu S, Kadioglu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl* 2003; 5: 95-99.
136. Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, et al. 1,25(OH)₂-vitamin D₃, a steroid hormone that produces biologic effects via both genomic and nongenomic pathways. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 231-240.
137. 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.
138. 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 Lett* 1993; 326: 285-288.
139. Garcion E, Sindji L, Leblondel G, Brachet P, Darcy F. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulates the synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase and glutathione levels in rat primary astrocytes. *J Neurochem* 1999; 73: 859-866.
140. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidant system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 39-45.
141. 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.
142. Slater TF. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 15: 1-15.

143. Navarro-Casado L, Juncos-Tobarra MA, Chafer-Rudilla M, Iniguez-de Onzono L, Blazquez-Cabrera JA, Miralles-Garcia JM. Effect of experimental diabetes and STZ on male fertility capacity: study in rats. *J Androl* 2010 (Baskida).
144. Shrilatha B, Muralidhara. Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 578-587.
145. Mallick C, Mandal S, Barik B, Bhattacharya A, Ghosh D. Protection of testicular dysfunctions by MTEC, a formulated herbal drug, in streptozotocin induced diabetic rat. *Biol Pharm Bull* 2007; 30: 84-90.
146. Barkeley MS, Goldmass BD. A quantitative study of serum testosterone, sex accessory organ growth, and the development of intermale aggression in the mouse. *Horm Behav* 1977; 8: 208-218.
147. Koh PO. Streptozotocin-induced diabetes increases the interaction of Bad/Bcl-XL and decreases the binding of pBad/14-3-3 in rat testis. *Life Sci* 2007; 81: 1079-1084.
148. Sexton WJ, Jarow JP. Effect of diabetes mellitus upon male reproductive function. *Urology* 1997; 49: 508-513.
149. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res* 2002; 36: 1209-1218.
150. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM, el-Malik EM, Nasr MA. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996; 17: 530-537.
151. Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Matsumoto N, Kobayashi S. Impaired testicular function in rats with diet-induced hypercholesterolemia and/or streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Endocr Res* 2001; 27: 109-117.
152. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Ayadi F, Garmazi F, Mezgenni N, Elfeki A. Inhibitory effects of 1alpha, 25dihydroxyvitamin D3 and *Ajuga iva* extract on oxidative stress, toxicity, and hypo-fertility in diabetic rat testes. *J Physiol Biochem* 2008; 64: 231-239.

153. Obianime AW, Roberts II. Antioxidants, cadmium-induced toxicity, serum biochemical and the histological abnormalities of the kidney and testes of the male Wistar rats. *Niger J Physiol Sci* 2009; 24: 177-185.
154. Sonmez M, Yuce A, Turk G. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. *Reprod Toxicol* 2007; 23: 226-231.
155. Guneli E, Tugyan K, Ozturk H, Gumustekin M, Cilaker S, Uysal N. Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Surg Res* 2008; 40: 354-360.
156. Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 25: 241-250.
157. Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci* 2000; 7: 444-458.
158. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res* 2005; 38: 1-9.
159. Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38-47.
160. Zhao H, Xu S, Wang Z, Li Y, Guo W, Lin C, et al. Repetitive exposures to low-dose X-rays attenuate testicular apoptotic cell death in streptozotocin-induced diabetes rats. *Toxicol Lett* 2010; 192: 356-364.
161. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1 alpha, 25 dihydroxyvitamin D3: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009; 55: 215-222.
162. De Haes P, Garmyn M, Carmeliet G, Degreef H, Vantieghem K, Bouillon R, Segaert S. Molecular pathways involved in the anti-apoptotic effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 in primary human keratinocytes. *J Cell Biochem* 2004; 93: 951-967.

- 163.** Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 2699-2706.
- 164.** Ustuner MC, Kabay S, Ozden H, Guven G, Yucel M, Olgun EG, et al. The protective effects of vitamin E on urinary bladder apoptosis and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Urology* 2010; 75: 902-906.
- 165.** Cipollone F, Chiarelli F, Iezzi A, Fazia ML, Cuccurullo C, Pini B, et al. Relationship between reduced BCL-2 expression in circulating mononuclear cells and early nephropathy in type 1 diabetes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18: 625-635.
- 166.** Dallak MM, Mikhailidis DP, Haidara MA, Bin-Jaliah IM, Tork OM, Rateb MA, et al. Oxidative stress as a common mediator for apoptosis induced-cardiac damage in diabetic rats. *Open Cardiovasc Med J* 2008; 2: 70-78.
- 167.** Lenzi A, Sgro P, Salacone P, Paoli D, Gilio B, Lombardo F, et al. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined l-carnitine and l-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2004; 81: 1578-1584.
- 168.** Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J. The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br J Urol* 1998; 82: 76-80.
- 169.** Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril* 1997; 68: 519-524.
- 170.** Menezo YJ, Hazout A, Panteix G, Robert F, Rollet J, Cohen-Bacrie P, et al. Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *Reprod Biomed Online* 2007; 14: 418-421.

6. ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Gaziantep'in Oğuzeli ilçesi Kayacık köyünde doğdum. 1995 yılında Sunguroğlu Erkek Lisesinden mezun olup 1996 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve 2002 yılında mezun oldum. Pratisyen hekim olarak Ardahan Sağlık Eğitim Merkezinde yaklaşık 2 yıl görev yaptıktan sonra 2004-2005 yılları arasında vatani görevimi yaptım. Askerlik sonrası yaklaşık 1,5 yıl Elazığ Fevziçakmak Sağlık Ocağında görev yaptıktan sonra Tıpta Uzmanlık Sınavını kazanarak 2007 yılı Ocak ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimime başladım. Halen eğitimime devam etmekteyim. Evliyim ve bir çocuk babasıyım. Yabancı dilim İngilizcedir.