



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**1,25(OH)₂D₃ VİTAMİNİN APOPİTOZ VE OKSİDATİF STRES
ÜZERİNE DOZA BAĞLI ETKİLERİ**

ÇAĞRI ÇAKICI

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. TÜRKAN YİĞİTBAŞI

İSTANBUL-2016

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bilgi ve tecrübesi ile destek olan her daim örnek aldığımız saygıdeğer Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Emekli'ye

Yüksek Lisans Tezime ilgili araştırmanın planlanmasından, tezin basımına kadar her aşamada bana rehberlik eden sorularıma ve sorunlarıma çözüm sağlayan saygıdeğer Hocam Doç. Dr. Türkan Yiğitbaşı'na

Deney hayvanlarını temin etme konusunda desteğini esirgemeyen Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a

Yoğun çalışma programına rağmen dokudaki histolojik çalışmaları geciktirmeden değerlendiren Yrd. Doç. Dr. Şule Ayla'ya

İstatistik hesaplamalarında desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Pakize Yiğit'e

Laboratuvar çalışmalarımda yanımda olan her türlü destek ve yardıma gönülden hazır olduklarını bildiğim arkadaşlarım Öğr. Gör. Hadi KARIMKHANI ve Araş. Gör. Feyza Bayramoğlu'na

Sadece Yüksek Lisans çalışmamda değil hayatımın her anında kendimi huzurlu ve güvende hissetmemi sağlayan benim hayatımı kendi hayatlarının önünde tutan canım annem, babam ve ablama,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

KISALTMALAR

FGF 23:	Fibroblast Growth Factor 23
DBP:	Vitamin D Bağlayıcı Proteinler
VDR:	Vitamin D Reseptörü
RXR:	Retinoid X Reseptör
VDRE:	Vitamin D Duyarlı Element
PTH:	Parathormon
AF:	Alkalen Fosfataz
MS:	Multipleskleroz
FasL:	Fas Ligandları
FasR:	Fas reseptörü
FADD:	Fas Adaptör Protein
DISC:	Ölüm Başlatan Sinyal Kompleksi
TRADD	TNFR Adaptör Protein
Apaf-1:	Apopitoz Aktive Edici Faktör
ATP:	Adenozin Trifosfat
ER:	Endoplazmik Retikulum
IPR3:	Inositol Trifosfat Reseptör
RyR:	Ryanodin Reseptörü
VICC:	Voltaja Bağımlı Kalsiyum Kanalı
VDCC:	Voltaja Duyarlı Kalsiyum Kanalı
IF:	İntermediate Filamentler

MF:	Aktin İçeren Filamentler
MT:	Mikrotübüler
CK-18:	Sitokeratin 18
PS:	Fosfolipid Fosfotidilserin
ROT:	Reaktif Oksijen Türleri
RNT:	Reaktif Nitrojen Türleri
SOD:	Süperoksid Dismutaz
GPx:	Glutasyon Peroksidaz
Prx:	Peroksi Redoksinler
NQO1:	Nad(P)H:Ubiquinonoksido Redüktaz
TOS:	Total Oksidan Seviye
TAK:	Total Antioksidan Kapasite
ANX – V:	Annexin V
PAS:	Periyodik Asit Schiff
HE:	Hematoksilen-Eosin
OSİ:	Oksidatif Stres İndeksi
1,25(OH) ₂ D ₃ :	Kalsitriol
25(OH)D:	Kalsidiol

TABLO ALTLARI

Tablo 1.1.Bazı besinlerin vitamin D değerleri (100 gram'da IU olarak).....	6
Tablo 4.3.1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri.....	22
Tablo 4.3.3.2.Endojen ve ekzojen non enzimatik antioksidanlar	25
Tablo 4.5.1.Serum kalsiyum düzeyleri	27
Tablo 5.1.1.Deney sırasında kullanılan araç ve gereçler	29
Tablo 5.2.1.Oluşturulan deney grupları	30
Tablo 5.7.1.ELİZA çalışması için kit ile gelen malzemeler	32
Tablo 5.7.2.Standartların hazırlanma prosedürü	32
Tablo 5.9.1. TAK deney prosedürü.....	39
Tablo 5.10.1.TOS deney prosödürü	40
Tablo 6.1.Gruplardaki farelerin ortalama ağırlıkları.....	42
Tablo 6.2.Kontrol ve doz gruplarının laboratuvar bulgularının karşılaştırılması	49
Tablo 6.3.Parametrelerin birbirleri ile arasında olan korelasyon ilişkisi	50

ŞEKİL ATTLARI

Şekil 1.1.Vitamin D2 ve Vitamin D3'ün kimyasal yapıları.....	5
Şekil 4.1.2.1: D vitamini metabolizması.....	8
Şekil 4.1.2.2: D vitamininin etki mekanizması.....	9
Şekil 4.2.1: Apoptoz mekanizması.....	15
Şekil 4.2.3.1: 1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün apoptoza etkisi.....	17
Şekil 4.3.3.Antioksidan enzimler.....	23
Şekil 5.6.1.1.Annexin Kalibrasyon Eğrisi.....	34
Şekil 6.1.Annexin V değerlerinin doza bağlı değişimi.....	43
Şekil 6.2.Böbrekte glomerul mezengial matriks oranı yüzdesinin dozlara bağlı değişimi.....	44
Şekil 6.3. Böbrek PAS boyama.....	44
Şekil 6.4.Karaciğerde yapılan histopatolojik skorlama yüzdesinin doza bağlı değişimi.....	45
Şekil 6.5.Karaciğer HE boyama.....	46
Şekil 6.6.TAK değerlerinin değişimi.....	47
Şekil 6.7.OSİ değerlerinin doza bağlı değişimi.....	48

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU.....	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
KISALTMALAR.....	iv
TABLO ALTLARI.....	vi
ŞEKİL ALTLARI.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT.....	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4.GENEL BİLGİLER.....	5
4.1.D vitamini.....	5
4.1.1.Kimyasal Özellikleri.....	6
4.1.2.Vitamin D Metabolizması.....	7
4.1.3.Vitamin D Reseptörlerinin Kalsiyum ve Kemik Mineral Dengesindeki Rollerini.....	9
4.1.4.D Vitamininin Fonksiyonları.....	10
4.1.5.D Vitamini Eksikliği.....	11
4.1.6.D vitamini Fazlalığı.....	11
4.2.Apopitoz.....	12
4.2.1.Kaspazlar.....	15
4.2.3.Apopitoz ve D vitamini İlişkisi.....	16
4.2.4.Apopitozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	18
4.2.4.1.M30.....	19
4.2.4.1.1.Sitokeratinler.....	19
4.2.4.1.2.Sitokeratin 18.....	19
4.2.4.2.Annexin V.....	20
4.3.Oksidatif Stres.....	20
4.3.1.Serbest Radikaller.....	20
4.3.2.Reaktif Oksijen Türleri(ROT).....	21
4.3.3.Antioksidan Savunma Sistemleri.....	22

4.3.3.1.Enzimatik Antioksidanlar	23
4.3.3.2.Non enzimatik antioksidanlar	24
4.3.4.Total Oksidan Seviye (TOS).....	25
4.3.5.Total Antioksidan Kapasite (TAK).....	25
4.3.6.D vitamini ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki	26
4.5.Kalsiyum	26
5.MATERYAL VE METOD	29
5.1.Kullanılan Araç ve Gereçler.....	29
5.2.Deney Grubunun Demografik Özellikleri.....	29
5.3.Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler	30
5.4.Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	30
5.5.Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması.....	31
5.6.Kan Örneklerinde İncelenen Parametreler ve Yöntemleri.....	31
5.7.Eliza Yöntemi ile Serumda Annexin V Ölçülmesi	31
5.8.Histolojik Değerlendirme.....	34
5.8.1.Doku Takip Protokolü.....	35
5.8.2.Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama	35
5.8.3.Hematoksilen – Eosin (HE) Boyama	36
5.8.4.Böbrekte Gomerul Mezengial matriks Oranı	36
5.8.5.Karaciğerde Histopatolojik Skorelama	37
5.9.Total Antioksidan Tayini	38
5.10.Total Oksidan Tayini:	39
5.11.Oksidatif Stress İndeksinin Hesaplanması	40
5.12.Kalsiyum	41
5.13.İstatistiksel Analiz.....	41
6.BULGULAR	42
7.TARTIŞMA	52
8.SONUÇ	59
9.KAYNAKLAR	61
10.ETİK KURUL ONAYI.....	71
11.ÖZGEÇMİŞ	74

1.ÖZET

1,25(OH)₂D₃ VİTAMİNİN APOPİTOZ VE OKSİDATİF STRES ÜZERİNE DOZA BAĞLI ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı 1,25(OH)₂D₃ vitamininin apopitoz ve oksidatif stres üzerine doza bağlı etkilerini araştırmaktır. İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezinde (REMER) yapılan çalışmamızda kontrol ve deney grubu olarak 10 haftalık 50 adet erkek Balb/c türü fare kullanıldı. Fareler her bir grup 10 adet fareden oluşmak üzere 5 gruba ayrıldı. Oluşturulan deney gruplarından düşük doz D vitamini grubuna (0.5 µg/kg), orta doz D vitamini grubuna (1 µg/kg), orta yüksek doz D vitamini grubuna (5 µg/kg) ve yüksek doz D vitamini grubuna (10 µg/kg) 1,25(OH)₂D₃ vitamini intraperitoneal olarak 14 gün boyunca haftada 3 kez enjekte edildi. Kontrol grubuna ise serum fizyolojik yine intraperitoneal olarak verildi. Çalışma sonunda farelerden elde edilen serumlarda Annexin V Eliza yöntemi ile, kalsiyum, TAK, TOS kolorimetrik yöntemle ölçüldü. TOS /TAKx100 formülü kullanılarak OSI değeri hesaplandı. Farelerden alınan böbrek ve karaciğer dokularında ise PAS ve hematoksin eozin ile boyama yapılarak histokimyasal inceleme yapıldı. Orta-yüksek doz D vitamini (5 µg/kg) uygulaması sonucu kontrol grubuna ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde serumda TAK değerlerinin azaldığı, Annexin V değerinin düştüğü ve böbrekte glomerül mezengial matriks oranının yükseldiği gözlemlendi (p<0,05). Yüksek doz D vitamini (10 µg/kg) uygulaması sonucu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında OSI değerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği, TAK ve Annexin V değerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde düştüğü, karaciğerde hasarlanmanın arttığı ve böbrekte glomerül mezengial matriks oranının yükseldiği gözlemlendi (p<0,05).

Bu çalışmada, antioksidan olarak tanımlanan D vitamininin orta-yüksek doz ve yüksek dozlarının oksidatif stresi arttırdığı, karaciğer ve böbrekte histopatolojik lezyonlara sebep olduğu ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: 1,25(OH)₂D₃, apopitoz, oksidatif stres, TAK, TOS.

2.ABSTRACT

THE EFFECTS OF 1,25(OH)₂D₃ DEPENDING ON DOSE ON APOPTOSIS AND OXIDATIVE STRESS.

The main purpose of this study was to observe the effects of 1,25(OH)₂D₃ depending on dose on apoptosis and oxidative stress. This study was conducted at Istanbul Medipol University Regenerative and Restorative Medicine Research Center (REMER). In the present study, 50 male Balb/c mouse, 10- weeks of age were used. They were divided into five equal groups as one for control and others for experimental groups. Experimental groups involving 1,25(OH)₂D₃ vitamin treatment were dosed by intraperitoneal injection for 14 days three times a week (Monday, Wednesday, Friday) with (0.5 µg/kg) to low dose vitamin D group, (1 µg/kg) to medium dose vitamin D group, (5 µg/kg) to medium high dose vitamin D group and (10 µg/kg) to high dose vitamin D group. Control mice were received only physiological saline solution intraperitoneally. Annexin V was determined by Elisa method; calcium, total oxidant level (TOS) and total antioxidative capacity (TAC) were determined by colorimetric method on the serum that obtained from mice at the end of the experiment. Oxidative stress index (OSI) was calculated using TOS/TAC×100 formula. Histochemical investigations were studied in liver and kidney tissue samples obtained from mice. It is found for the comparison of medium-high dose vitamin D (5 µg/kg) with control group; TAC value has a statistically significant decrease in serum, Annexin V value has decreased and glomerular mesangial matrix ratio is increased in kidney (p<0,05). When high dose vitamin D (10 µg/kg) group compared with control group; it is observed that OSI value had a statistically significant increase, TAC and Annexin V values had a statistically significant decrease, increase in liver damage and increase in glomerular mesangial matrix ratio of kidney (p<0,05). Even though vitamin D is known as an antioxidant, this study suggests that high levels of vitamin D increases oxidative stress and results with histopathological lesions on liver and kidney.

Keywords: 1,25(OH)₂D₃, apoptosis, oxidative stress, TAC, TOS

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Yağda eriyen vitaminler arasında yer alan D vitamini diğer vitaminlerden farklı olarak vücutta sentezlenebilmekte ve kan dolaşımına katılarak diğer dokular üzerinde etki gösterebilmektedir. Bu özelliğinden dolayı vitaminden çok sterol yapılı bir hormon olarak değerlendirilmektedir, Holick (1), Holick (2). Genel olarak vücutta kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesi ve kemik ve dişlerin teşekkülünden sorumludur, Emekli (4).

D vitamini vücutta 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D halinde bulunabilmektedir. D vitamini metabolitlerinin sentezi karaciğerde ve böbrekte vitamin D₂ ve D₃'ün 25hidroksilasyonu ve 1- α -hidroksilasyonunu içermektedir. İlk önce, karaciğerde birinci hidroksilasyon meydana gelmekte ve 25(OH)D oluşmaktadır. 25(OH)D vitamin D bağlayıcı proteinler (DBP) ile böbreğe taşınarak ikinci hidroksilasyona uğramakta ve en aktif D vitamini formu olan 1,25(OH)₂D₃ ya da kalsitriol'ü oluşturmaktadır. 1,25(OH)₂D₃ dokularda bulunan vitamin D reseptörlerine bağlanarak kalsiyum metabolizması ile ilgili rikets, osteomalzi gibi hastalıkların yanında; otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon, kanser vb. gibi hastalıkların oluşum mekanizmasını etkilemektedir, Goltzman (3).

Apoptoz; normal ve hasta hücrelerde görülen organizmadaki çeşitli hücre tiplerininin hasarı esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumlu fizyolojik bir olaydır ve hücrede denge unsurudur, Altunkaynak ve Özbek (4). Apoptoz belli bir sıra ile gerçekleşmektedir;

- 1- Apoptozun başlatılması
- 2- Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- 3- Hücre içi çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
- 4- Fagositoz yolu ile yok edilme, Öztürk (5).

Apoptoz mekanizmasında intrensek ve ekstrensek olarak adlandırılan iki yolak bulunmaktadır. Ekstrensek sistem ölüm reseptörleri üzerinden hücreyi apoptoza götürmektedir. İntrensek sistem ise mitokondriden üzerinden salgılanan sitokrom c'nin apoptozom yapısını oluşturması ve oluşan apoptozom da kaspaz 9'u aktive

etmektedir. Aktive olan kaspaz 9, kaspaz 3,6,7'yi aktifleştirerek hücreyi apoptoza götürmektedir, Afford ve Randhawa (6).

Oksidatif stres; potansiyel olarak hasara yol açan oksidan yani reaktif oksijen türlerinde (ROS) bir artma ve antioksidan aktivitede azalmadan kaynaklanan bir denge durumu bozukluğu olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif stresin vücutta artması ile kanser, nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, inflamasyona bağlı hastalıklar görülebilmektedir, Preiser (7).

Aşırı oksidatif stres, hücreleri nekroz veya apoptoz yolu ile öldürebilir. Serbest radikallerin apoptozu başlatan ajanlar olduğu düşünölmektedir. Ayrıca apoptozun başlaması ile ROS'lerin ani üretimini olduğu düşünölmektedir.

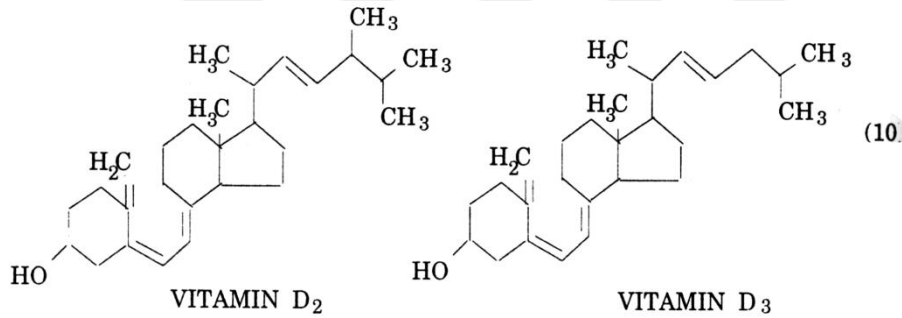
Bu çalışmada farelerde 1,25(OH)₂D₃ vitamininin apoptoz ve oksidatif stres üzerine doza bağlı etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.D vitamini

D vitamini yağda eriyen vitaminler arasında yer alan, endojen olarak uygun biyolojik ortamda sentezlenebilen hormon ve hormon öncülü bir steroldür, Fidan ve ark (8). Vücutta kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinden, kemik ve dişlerin teşekkülünden sorumludur, Fidan ve ark (8), Emekli (9).

D vitaminin doğada 6 ana formu vardır ve bunlar vitamin D₂, vitamin D₃, vitamin D₄, vitamin D₅, vitamin D₆ ve vitamin D₇ olarak adlandırılmaktadır. Bunların arasından Vitamin D₂ (25(OH)D, ergokalsiferol) ve Vitamin D₃ (1,25(OH)₂D, kolekalsiferol) en önemlileridir, Chen (10). Vitamin D₂ fotokimyasal olarak bitkilerden sentezlenirken Vitamin D₃ güneş ışığından faydalanılarak dermiste ve epidermiste sentezlenmektedir, Vuolo ve ark (11).



Şekil 1.1.Vitamin D2 ve Vitamin D3'ün kimyasal yapıları

Güneş ışığı D vitamini üretimi için temeldir ve normal olarak D vitaminin %90-95'i deride güneş ışınları etkisi ile üretilir. Güneş ışınlarından yeterince faydalanılan durumlarda ilave D vitamini alımı gerekmemektedir, Akpınar ve ark (12). Doğada çok az miktarda besin, D vitamini içermektedir. Yumurta, tereyağı, süt, çeşitli balık türleri ve karaciğerde D vitamini içeren gıdalara örnek olarak gösterilebilir, Emekli (9). (Tablo 1)

Diyetle alınan vitamin D₂ ve vitamin D₃ şilomikron yapısına girerek lenfotik sistem ile venöz sirkülasyona taşınmaktadır. Diyetle alınan veya endojen olarak yapılan vitamin D₂ veya vitamin D₃ yağ hücrelerinde depo edilmekte ve gerektiğinde dolaşıma salınmaktadır, Holick (13).

Tablo 1.1.Bazı besinlerin vitamin D değerleri (100 gram'da IU olarak)

Besinler	Vitamin D Seviyeleri (IU)	Besinler	Vitamin D Seviyeleri (IU)
Morina Balığı Karaciğer Yağı	10.000	Tereyağı	92
Yumurta Sarısı	265	Dana Biftek	13
Peynir	33	Süt	4.4
Karides	150	Somon Balığı	314

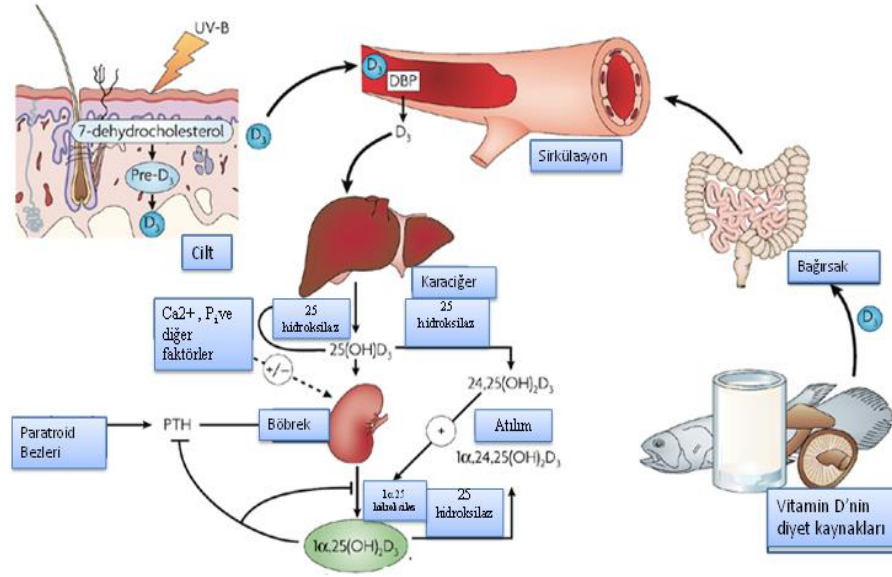
Biyolojik olarak aktif olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, D vitamini düzeyinin ideal ölçümü için uygun değildir. Çünkü yarı ömrü 4-6 saattir ve sirkülatuar düzeyleri $25(\text{OH})\text{D}$ 'e göre 1000 kat daha düşüktür, Bikle (14). Bu nedenle D vitamini düzeylerini değerlendirmek için $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyinin ölçümü tercih edilmektedir. Vitamin D formları arasında baskın olan bu metabolit, hem D vitamini alımını hemde endojen yapımı göstermektedir, Donkena ve Young (15), Özçelik ve ark (16). Serum $25(\text{OH})\text{D}$ seviyesi $\leq 10\text{ng/ml}$ ise; ciddi eksiklik, $20-29\text{ ng/ml}$ ise; yetersizlik, $\geq 30\text{ ng/ml}$ ise; normal, $40-50\text{ ng/ml}$ ise; ideal, $>150\text{ ng/ml}$ ise; toksik olarak kabul edilir, Özçelik ve ark (16), Öngen ve ark (17), Grant ve Holick (18), Holick (19).

4.1.1.Kimyasal Özellikleri

Molekül ağırlığı 384.65 g/mol olan Vitamin D_3 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}$)'ün erime noktası $84-85^\circ\text{C}$ arasındadır ve $264 - 265\text{ nm}$ 'de maksimum UV absorpsiyonuna sahiptir. Vitamin D_2 'nin ise erime noktası 121°C 'dir ve maksimum UV absorpsiyonunu 265 nm 'de göstermektedir. D vitamini su içinde çözünmez iken, benzen, kloroform, etanol ve aseton gibi organik çözücülerde çözünebilmektedir, Zemleni (20).

4.1.2.Vitamin D Metabolizması

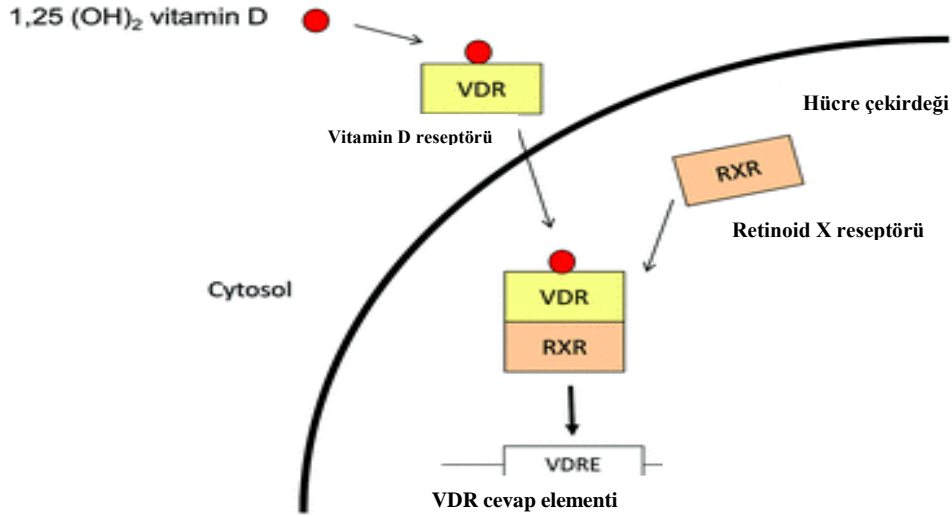
Diyetle, bitkilerde bulunan ergokalsiferol (D_2 vitamini) ve hayvan dokularında bulunan kolekalsiferol (vitamin D_3) alınabilmektedir. Ayrıca endojen olarak Vitamin D_3 dermis ve epidermiste bulunan 7 dehidrokolestrol'ün güneş ışınları yardımı ile previtamin D_3 formuna dönüşmesi ile sentezlenmektedir, Nakanishi ve ark (21). Vücuda alınan D vitamini metabolitleri belirli organlarda P-450 enzimleri yardımı ile hidroksilasyona uğrayarak aktif ve inaktif forma dönüşmektedir. İlk olarak karaciğerde 25-hidroksilaz enzimleri (CYP2R1 ve CYP27A1) yardımı ile D vitaminin inaktif formu olan 25(OH)D (kalsidiol) formuna dönüşmektedir. Daha sonra böbrekte, 1- α hidroksilaz enzimi (CYP27B1) yardımı ile 25(OH)D vitamini, D vitaminin biyolojik olarak aktif metaboliti olan 1,25(OH) $_2$ D (kalsitriol) formuna dönüşmektedir, Shui ve ark (22). D vitamini sentezinde kilit konumda olan 1- α hidroksilaz enzim aktivitesinin düzenlenmesinde parat hormon (PTH), kalsiyum, fosfor ve fibroblast growth factor 23 (FGF 23) rol oynar, Özçelik ve ark (16). 1- α hidroksilaz enzim aktivitesinin azalması ile 1,25(OH) $_2$ D seviyesi azalır. Bu durumda vucüt PTH sentezini artırarak 1- α hidroksilaz enzimini aktive eder. Kemikten salınarak böbrek ve ince bağırsak hücrelerinde Na-PO $_4$ kotransportuna neden olan FGF 23 ise 1,25(OH) $_2$ D sentezini baskılar, ayrıca 24 hidroksilaz enzimini de aktive ederek 1,25(OH) $_2$ D'nin inaktif formuna dönüşmesine neden olur, Özçelik ve ark (16). Bunlara ek olarak fosfor ve kalsiyum düzeyleri düştüğünde, 1- α hidroksilaz enzim aktivitesi artar ve dolayısı ile D vitamini sentezi artmaktadır, Öngen ve ark (17). D vitamini metabolitlerinin katabolizmasında, 24-hidroksilaz (CYP24A1) enzimi rol oynar. Bu enzim yardımı ile 1,25(OH) $_2$ D ve 25(OH)D metabolitleri 1,24,25(OH) $_2$ D ve 24,25(OH) $_2$ D formuna dönüştürülerek üriner sistem yolu ile atılırlar, Chow ve ark (23).



Şekil 4.1.2.1: D vitamini metabolizması

Vitamin D metabolitlerinin dolaşım sistemi içinde transferleri Vitamin D bağlayıcı proteinler (DBP) sayesinde sağlanır, Vuolo ve ark (11). Albumin ile aynı protein ailesine ait olan DBP karaciğer tarafından sentezlenir ve salgılanır, Bhan (24), Ying ve ark (25). D vitamini metabolitleri serumda DBP'ye bağlanarak taşınır iken; sadece %1-3'ü serbest olarak bulunur, Akkoyun ve ark (26). Bu protein 25(OH)D, 1,25(OH)₂D ve 24,25(OH)₂D'ye yüksek oranda affinite gösterir, Bhan (24).

Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D, DBP ile dokulara taşındıktan sonra vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanır. VDR insanda 30 kadar farklı dokuda aktif olarak saptanan intraselüler nükleer reseptördür, Vuolo ve ark (11). Hedef hücrelerde, D vitamininin aktif formu VDR'ye bağlanır. Sonra bu kompleks retinoid X reseptör (RXR) ile heterodimer oluşturur ve ilgili gen üzerindeki vitamin D duyarlı elemente (VDRE) bağlanarak etkinlik gösterir, Shui ve ark (22), Özkorkmaz (27), Dixon ve Mason (76). Bağlanan D vitamini osteoporoz, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon, kanser vb. gibi hastalıkların oluşum mekanizmasına etki eder.



Şekil 4.1.2.2: D vitamininin etki mekanizması

4.1.3. Vitamin D Reseptörlerinin Kalsiyum ve Kemik Mineral Dengesindeki Rollerini

Tiroid/steroid ailesine dahil olan VDR, liganta bağımlı bir transkripsiyon faktörüdür. Geleneksel olarak kalsiyum aktivitesi ile ilişkilendirilmektedir. VDR, bağırsak, böbrek ve kemik dokusunda kalsiyum ve fosfor dengesini dolayısı ile kemik yapısının korunmasını sağlar, Nagpal ve ark (28).

VDR osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar tarafından sentezlenmektedir. İskelet dokusunda 1,25(OH)₂D olgun kemik rezorbsiyon hücrelerindeki preosteoklastların farklılaşmasını indükleyerek osteoklast sayısını artırmaktadır. Ayrıca osteokalsin ve osteopontin gibi kemik matriks proteinlerinin sentezini uyararak osteoblastlar üzerine doğrudan etki etmektedir, Dowd ve McDonald (29).

Kemik hücreleri içinde gerçekleşen VDR aracılı aktiviteler plazma kalsiyum ve kemik mineral dengesinin regüle edilmesinde rol oynamaktadır. Yapılan in vivo ve in vitro çalışmalara göre, D vitamini aktivitesi, kemik formasyonunu ve kemik mineral katabolizmasını inhibe ya da stimüle edebilir. Kalsiyum değeri düşük olduğunda D vitamini ya kemikten kalsiyum ve fosfat salgılanmasını sağlar ya da kemik mineral çökmesini önler. Kalsiyum ve fosfat seviyesi yeterli ise kemik hücreleri VDR aracılığı ile plazma 25(OH)D'yi 1,25(OH)₂D'e dönüştürüp kemiklerde kalsiyum ve fosfat artışını sağlamakta ve kemik dayanıklılığını

artırmaktadır. Bu da çocuklarda rikets ve erişkinlerde osteoporoz oluşumunun engellenmesine yardımcı olabilmektedir, Morris (30).

VDR'nin kemik kütlesi ve yoğunluğunun biyolojik değişikliklerle ilgili olabileceği ancak kemikteki mineral yoğunluğu ile ilişkisi hala açıklanamamıştır, Boron ve ark (31).

4.1.4.D Vitamininin Fonksiyonları

D vitaminin başlıca görevi intestinal kalsiyum ve fosfor emilimini sağlayarak PTH ile birlikte organizmanın kalsiyum ve fosfor dengesini düzenlemektir. Vücut kalsiyum ihtiyacına karşılık olarak salgılanan PTH, D vitamini düzeyinin artırılmasında önemli bir yer tutmaktadır. D vitamini yokluğunda kalsiyum emilimi %10-15 iken bu durum D vitamini varlığında %30-80 arasında olmaktadır, Akkoyun ve ark (26).

1,25(OH)₂D₃ vitamini plazma kalsiyum düzeyini dengelemekte ve duodenumdan kalsiyum, ileumdan fosfor emilimini artırmaktadır. Buna ilave olarak böbreklerdeki kalsiyum kaybını önlemekte, kemik rezorpsiyonunu artırmakta ve PTH sentezini azaltmaktadır, Öngen ve ark (17).

Ancak son yıllarda pankreas, immün sistem, makrofajlar, vasküler endotel, mide, epidermis, kolon, plasenta, beyin ve kanser hücreleri olmak üzere pek çok dokuda VDR ve 1- α hidroksilaz (CYP27B1) enzim varlığının saptanması nedeni ile D vitamininin iskelet sistemi dışında da etkileri olabileceği düşünülmektedir. Çünkü bu dokular içerdikleri VDR ve enzim 1- α hidroksilaz enzimi sayesinde 25(OH)D'yi dokuda aktif metabolit olan 1,25(OH)₂D₃'e çevirerek parakrin etki gösterebilmektedirler, Yavuz ve ark (32). Kas fonksiyonu, bağışıklık sistemi, kardiyovasküler sistem, kanser ve nöropsikiyatrik fonksiyon üzerine etkileri olduğu da düşünülmektedir.

1,25(OH)₂D₃ 200'den fazla geni kontrol edebilmektedir ve bu genler apoptoz, proliferasyon, diferansiasyon ve anjiyogenez üzerinde önemli olan genlerdir. İyi bir immünomodülatör olan 1,25(OH)₂D₃ insülin yapımını artırmakta ve renin sentezini

azaltmakadır. Bunun yanında miyokardın kasılma gücünü arttırdığı bilinmektedir, Öngen ve ark (17).

4.1.5.D Vitamini Eksikliği

D vitamini eksikliği ve yetersizliği tüm yaşlardaki kadın ve erkeklerin birçoğunu etkilemektedir. D vitamininin ideal düzeyi hakkındaki belirsizlikler halen devam etmektedir. Ancak birçok araştırmada özellikle kış aylarında D vitamini yetersizliği ve eksikliğin yaygın olduğu ortaya konulmaktadır, Uçar ve ark (33).

Vitamin D eksikliği için risk grubu olarak tanımlananlar arasında prematureler, koyu renk deriye sahip olanlar, yeterli miktarda güneş ışığından faydalanmayanlar, obezler ve yaşlılar sayılmaktadır, Lips (34).

D vitamini eksikliği sonucu rikets ve osteomalazi en çok görülen hastalıklardır, Champe ve ark (35). Bu hastalıklarda kemik mineralizasyonu bozulmuştur. Çocuklarda görülen Rikets'de huzursuzluk, kas tonusunda azalma, iskelet ağrıları, deformiteler, yürüme bozukluğu, büyüme geriliği gibi belirtiler görülmektedir, Öngen ve ark (17). Yetişkinlerde görülen Osteomalazi'de osteoblastlar tarafından oluşturulan organik kemik yapının mineralizasyonunda yetersizlik mevcuttur ve en önemli belirtileri kemik ağrısı ve kas güçsüzlüğüdür. Bu iki hastalıkta da serum Alkalin fosfataz (AF) ve PTH seviyelerinde artma, kalsiyum, fosfat ve 25(OH)D seviyelerinde azalma görülmektedir, Yavuz ve ark (32). Ayrıca yapılan birçok araştırmada Tip 1 diyabet, multipleskleroz (MS), romatoid artrit, osteoartrit, Crohn hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, karaciğer ve böbrek yetmezliği ve çeşitli kanser türlerinde D vitamini yetersizliği gözlemlenmiştir, Mutlu ve Hatun (36).

4.1.6.D vitamini Fazlalığı

Yüksek dozlarda D vitamini alımı toksik etki göstermektedir. 25(OH)D seviyesinin 150 ng/ml'den yüksek olduğu durumlar D vitamini hipervitaminozu olarak kabul edilmektedir. İntoksikasyon durumlarında temel bulgular hiperkalsemiye bağlıdır. Bu durum gastrointestinal sistemden kalsiyumun fazla emilmesinden kaynaklanmaktadır. 25(OH)D₃ vitamini düzeyinin sürekli yüksek düzeyde olması bağırsaklarda kalsiyum emilimini artırarak ve kemiklerde kalsiyum mobilize

olmasını sağlayarak hiperkalsemiye neden olmaktadır. Hiperkalsemi, nöromusküler, renal, gastrointestinal ve kardiyovasküler semptomlara neden olmaktadır. Nöromusküler olarak; letarji, konfüzyon, stupor, koma, kas güçsüzlüğü gözlenirken, renal olarak poliüri, nefrokalsinozis, nefrolitiazis, böbrek yetersizliği ortaya çıkabilmektedir. Hiperkalsemi ayrıca iştahsızlık, bulantı, kusma, kabızlık, peptik ülser, pankreatit gibi gastrointestinal semptomlar ile EKG’de QT süresinin kısalması, kalp blokları, aritmiler, bradikardi, hipertansiyon gibi kardiyovasküler semptomlara neden olmaktadır, Kibar ve ark (37).

Ayrıca D vitamini fazlalığı kalsiyumun böbrek ve kan damarlarında birikmesine neden olmaktadır. Hiperkalsemiye bağlı böbrek taşı oluşumu, eklemlerde ve yumuşak dokularda kireçlenme gözlenebilmektedir, Akkoyun ve ark (26). Çocuklarda, D vitamini fazlalığında büyüme geriliği, kusma ve böbrek taşı oluşumu sık gözlenen bulgulardır, Samur (38).

4.2.Apopitoz

Ökaryotik organizmalarda hücreler doğar, hücre tipine göre belli süre yaşar ve sonra ölürlür. Bağırsak hücreleri 3-5 günlük bir süreden sonra ölürken, epidermiste bulunan hücreler 20-25 günlük bir yaşam süresinden sonra ölmektedirler. Myokard hücreleri ve nöronlar ise ömür boyu yaşarlar. Bahsedilen bu hücre ölümleri apopitoz ile gerçekleşir. Fizyolojik şartlarda meydana gelen bu ölümlere fizyolojik hücre ölümü (“programmed cell death”) denmektedir. Virüs etkisi ve çevresel nedenler ile DNA’sı hasarlanan hücreler organizmayı korumak için kendilerini öldürürler (“cell suicide”). Yara iyileşmesinde olduğu gibi doku dengesini sağlamak için hücreler ölerek ortamdan kaybolurlar (“cell deletion”). Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı olarak tanımlanan tüm bu kavramlar apopitoz ile eş anlamlı kullanılan terimlerdir, Ulukaya (39)

Apopitoz; yaşlanmış, fazla üretilmiş, fonksiyonunu yitirmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşan programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır, Öztürk (5).

Normal apoptotik hücre ölümü ve yerine yenisinin yapılması günde yaklaşık 1×10^{11} hücreyi bulmaktadır. Bu da yetişkin bir insanın vücut ağırlığının her 18-24 ayda bir yeniden yıkım ve yapımı anlamına gelmektedir, Ulukaya (39).

Apoptoza değişik durumlarda birçok dokuda rastlanabilmektedir. Tümörlerde hücre ölümü, T ve B lenfositlerin ölümü, hepatit ve diğer bazı viral hastalıklar, bağırsak endoteli gibi dokularda proliferen olan labil hücrelerin kaybı, akut inflamasyon sonrası nötröfillerin ölümü örnek olarak gösterilebilir, Yazıcı ve ark (40).

İnsan organizmasında apoptozun izlendiği durumlara bakılacak olunursa:

- 1- Embriyogenez ve fötogenez oluşumu sırasında normal gelişimin sağlanabilmesi amacı ile oluşmuş hücrelerin bir kısmı apoptoza uğramaktadır.
- 2- Erişkin bireylerde hormon yetmezliğine bağlı gelişen organ gerilemelerinde apoptoz görülmektedir.
- 3- Proliferasiyona uğrayan hücrelerde sık olarak apoptoz görülmektedir.
- 4- Tümörlerde regresyona gittikleri zamanlarda apoptoza rastlanmaktadır.
- 5- Sitokin yetersizliğine bağlı olarak T ve B lenfositler apoptoza uğrayabilmektedir.
- 6- Hepatit gibi çeşitli viral hastalıklarda apoptoz görülmektedir.
- 7- Böbrek, pankreas gibi organların kanallarında meydana gelen tıkanmalara bağlı doku körelmelerinde apoptoz görülmektedir, Öztürk (5).

Hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında meydana gelen apoptoz organizma için doğru şekilde çalışmalıdır. Olmaması gerekirken gerçekleşen apoptoz, gereğinden daha hızlı ya da daha yavaş apoptoz organizmada hastalıklara yol açmaktadır. AIDS, norödejeneratif hastalıklar, insüline bağlı Tip 1 diyabet, hepatit C, miyokard enfarktüsü, ateroskleroz hızlanmış apoptoz neticesi ortaya çıkarken otoimmün hastalıklar ve kanser yavaşlamış apoptoz sonucu oluşmaktadır, Ulukaya (39).

Apoptozun mikroskop altında tanınmasını sağlayan belli başlı özellikleri vardır. Na^+ kaybına bağlı olarak hücre büzülmesi görülmesi, kromatin kondansasyonu yani

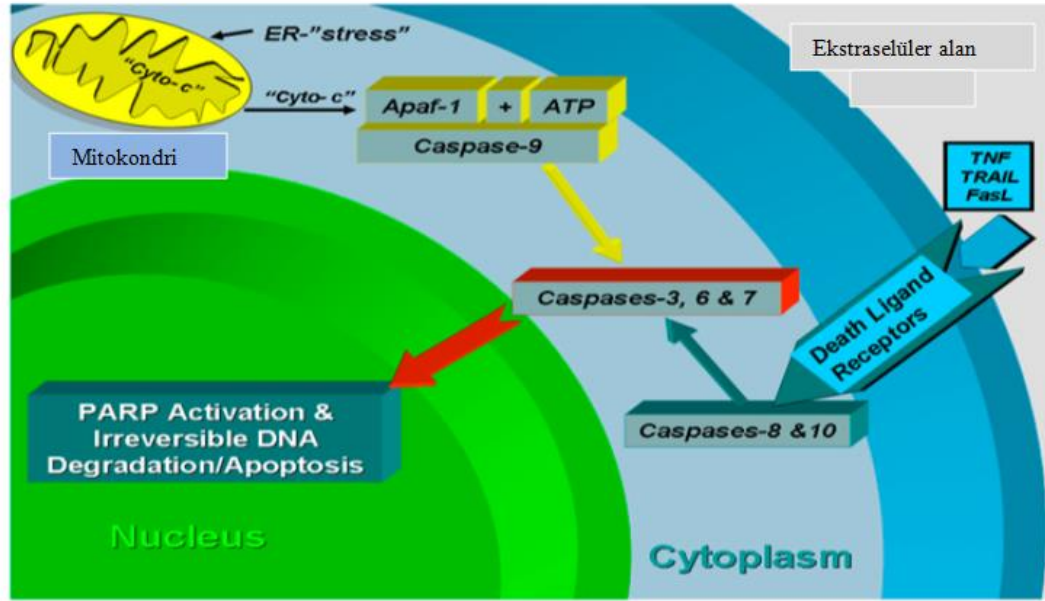
nükleusun endonükleazlar tarafından iki ve daha fazla parçaya bölünmesi, sitoplazmadan boğumlanarak ayrılan apoptotik cisimcikler ve apoptotik cisimciklerin inflamatuvar yanıt oluşturmada fagositozu ile hücre ölümünün gerçekleşmesi apoptozun tipik özelliklerindedir, Yazıcı ve ark (40), Afford ve Randhawa (6), Altunkaynak ve Özbek (4).

Apoptoz mekanizmasına bakıldığında intrensek ve ekstrinsek olmak üzere apoptozu tetikleyen iki yolak vardır. Ekstrinsek sistem yolları apoptozu trans-membran aracılı etkileşimlerle başlatır. Bunlar FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR5 gibi ölüm reseptörlerini içermektedir. Fas ligandları (FasL) Fas reseptörüne bağlanır (FasR) ve reseptörün hücre içinde kalan kısmı Fas adaptör protein (FADD) ile birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksi (DISC) oluşturur. Bu reaksiyon dizisi sonunda prokaspaz 8 oluşumu ile apoptoz başlatılır ve hücre ölümü gerçekleştirilir. TNF'nin TNFR1 ile birleşmesi sonucu ise yine hücre içinde kalan kısmı TNFR adaptör proteine bağlanır (TRADD) ve TRADD'ın FADD'ye bağlanması ile de kaspaz 8 ve 10'u aktive ederek apoptoz başlatılır ve sonlandırıcı kaspazlar olarak adlandırılan kaspaz 3,6,7 ile de hücreler öldürülür, Elmore (41).

İntrensek ya da mitokondriyal yolak ise mitokondrideki sitozolden sitokrom c salınması ile başlatılır. Daha sonra sitokrom c apoptozom adı ile bilinen yapıyı oluşturmak için Apaf-1 (apoptoz aktive edici faktör), adozin trifosfat (ATP) ve prokaspaz 9 ile etkileşime girer. En sonunda apoptozom bölünüp kaspaz 9'u aktive ederek apoptozu sonlandıran kaspaz 3,6,7'yi aktive etmektedir, Sperandio ve ark (42).

Bcl-2 mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesini düzenlemekte ve hücredeki Ca⁺² oranını kontrol etmektedir. Proapoptotik protein ailesinden olan ve normal koşullar altında inaktif durumdaki Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 hücrede antiapoptotik protein ailesinde olan Bcl-2 ve Bcl-x proteinlerini baskılamaktadır. Fakat çeşitli uyarılar ile proapoptotik grubun aktifleşmesini sağlamaktadır. Büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ı, kalsiyum artışı Bim'i ve UV ışın Bmf'yi aktive etmektedir. Sonuç olarak Bcl-2 proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanmakta ve Bcl-2 tarafından baskılanan Bax ve Bak proteinlerini aktifleşmektedir. Bu

proteinlerde mitokondri dış zarındaki geçirgenlik porlarının oluşumuna ve zar potansiyelinin değişimine neden olmaktadır. Buda uygulayıcı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanmaktadır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanmaktadır, Solakoğlu (43), Çoşkun ve Özgür (44).



Şekil 4.2.1: Apoptoz mekanizması

4.2.1.Kaspazlar

Kaspazlar aspartik asitten sonraki peptid bağınyı kıran sistein proteazlarıdır. Hedef proteinlerin kesilmesi, hücre içinde aktifleşmelerini sağlayarak apoptozu neden olmaktadır. Şu ana kadar 14 adet kaspaz aydınlatılmıştır ve bunlar 3 grupta ele alınmaktadır;

- 1- Başlatıcı kaspazlar; kaspaz 2, 8, 9, 10
- 2- Sonlandırıcı; kaspaz 3, 6, 7
- 3- İnflamatuar kaspazlar; kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13, 14.

DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive etmekte ve apoptoz mekanizmasında görev almaktadırlar, Çoşkun ve Özgür (44), Fan ve ark (45).

4.2.3. Apoptoz ve D vitamini İlişkisi

1,25(OH)₂D₃'nin normal doku ve tümör dokularında apoptoza neden olduğu bilinmektedir. Bu etkisini de VDR'ler aracılığı ile göstermektedir.

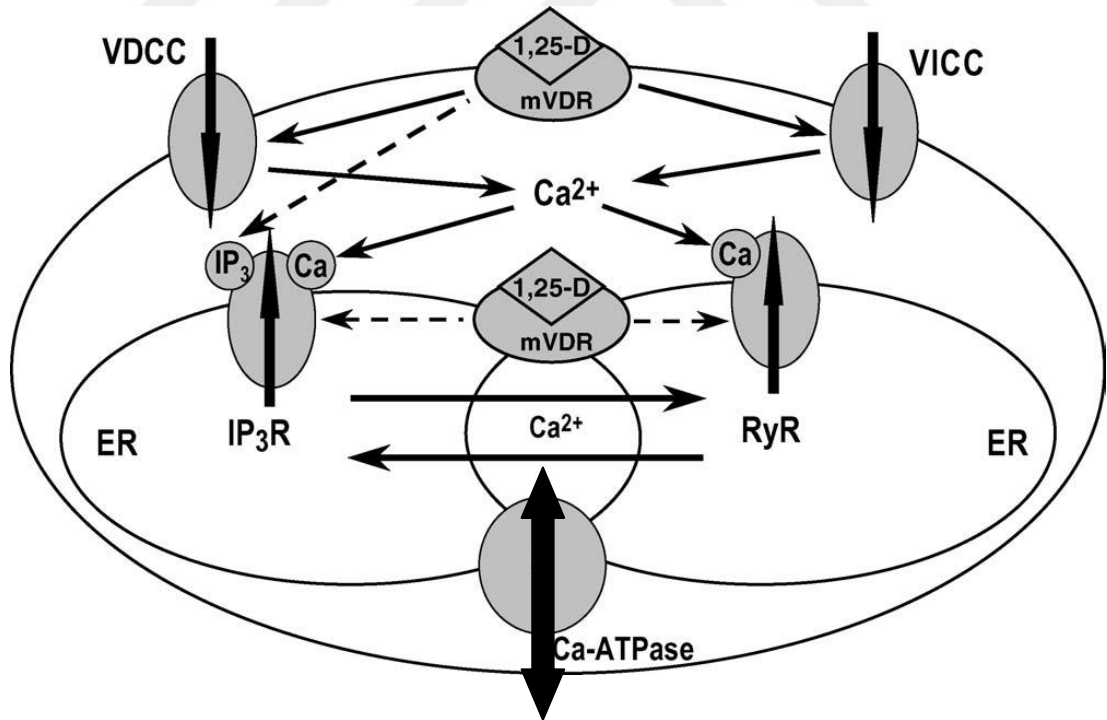
Apoptoz değişik sinyal yolları üzerinden indüklenmekte ve hücrelerin ölümünü sağlamaktadır. Apoptozda etkili olduğu düşünülen faktörlerden birisi de hücrel kalsiyumdur. Kalsiyum apoptoz için önemli bir düzenleyecedir ve apoptozun başlatılması ve apoptoz sinyal yollarının düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Hücre içi kalsiyum artışı apoptoz üzerinden hücre ölümünü tetiklemektedir. Ancak kalsiyumun etki ettiği apoptoz sinyal yolağı ve hedefleri tam olarak aydınlatılamamıştır. Olası hedefler olarak kaspazlar ve kalsiyum bağımlı nötral proteaz olan kalpainler bugün için düşünülmektedir, Sergeev (46).

Kalsiyum iyonlarının apoptoza olan etkisinde ilk yol olarak, sitokrom c IP₃R'e bağlanmakta ve büyük bir sitokrom c salınımı ile apoptoza yol açan bir amplifikasyon prosesi ortaya çıkmaktadır. İkinci yol olarak, proapoptotik ve antiapoptotik Bcl-2/Bax aile üyeleri arasındaki denge endoplazmik retikulum (ER)'un kalsiyum içeriğini regüle ederek ve ER'den mitokondriye kalsiyum aktarımı hücre ölümünü tetiklemektedir. Ayrıca antiapoptotik bir protein olan Bcl-2 direkt olarak IP₃R ile etkileşime girebilir ve kalsiyum salınımını ve apoptozu inhibe edebilir, Tordjmann (47).

Kalsiyum homeostatik mekanizması; voltaja bağımsız ve voltaja bağımlı kalsiyum kanalları üzerinden ekstraselüler alandan kalsiyum girişini, ER depolarından kalsiyum salınımı ve kalsiyum sinyallerini yok eden sitozolik kalsiyum tamponlama sistemlerini içermektedir, Sergeev (48).

1,25(OH)₂D₃ değişik hücre tiplerinde kalsiyum girişini, transferini ve kalsiyum tamponlamasını uyarmaktadır. 1,25(OH)₂D₃ voltaja bağımlı ve voltaja duyarsız kalsiyum girişini aktive eder ve ryanodin reseptörleri (RyR) ve IP₃R sayesinde ER'den kalsiyum salınımını tetikler. Ayrıca nükleer ve membran VDR'lerine bağlanan 1,25(OH)₂D₃ kalsiyum sinyallerini tetiklemektedir, Sergeev (49).

Kanser hücrelerinde ve gelişmiş adipositlerde $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ yüksek geçirgenlikte olan voltaja bağımlı kalsiyum kanalı (VICC) üzerinden kalsiyum akışını indüklemekte ve ER’de bulunan IP_3 reseptör/kalsiyum salınım kanalı üzerinden kalsiyum salınımı gerçekleştirmektedir. Bu sayede intraselüler kalsiyum artışı olmaktadır. Bu da kalpain/kaspaz 12’ye bağımlı apoptotik yolağı aktive ederek apoptozu sağlamaktadır. Normal epitel hücrelerinde ise $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ etkisi ile kalsiyum hücre içine düşük geçirgenlikte olan VICC ve voltaja duyarlı kalsiyum kanalı (VDCC) üzerinden ve ER’de bulunan Ryr reseptörleri tarafından hücre içine kalsiyum girişi sağlanmaktadır. Ancak VDCC’nin aktivasyonu ile intraselüler kalsiyumun artışının durdurulması için vitamin D’ye bağımlı Kalbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ eksprese edilmektedir ve hücrenin apoptoza gitmesi durdurulmaktadır. Kalbindin $\text{D}_{28\text{k}}$ sadece normal epitel hücrelerinde sentezlenmektedir. Ayrıca, intraselüler kalsiyum miktarının düşürülmesi için $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kalsiyum ATPaz miktarını artırarak hücre dışına kalsiyum pompalaması yapmaktadır, Sergeev (46), Sergeev (48), Sergeev (49). (Şekil 5)



Şekil 4.2.3.1: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün apoptoza etkisi

$1,25(\text{OH})_2\text{D}$ anti-apoptotik Bcl-2 ve Bcl-x_L'in ekspresyonunu bastırıp, pro-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu indükler. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, HL-60 lösemi hücreleri ve MCF-7 meme kanseri tümöründe Bcl-2 ekspresyonunu down regüle eder iken

karsinomal hücreleri, kolorektal adenoma ve prostat kanserinde Bax ve Bak ekspresyonunu upregüle ederek sonlandırıcı kaspazları aktive ederek hücreleri apoptoza götürürler, Deeb ve ark (50).

4.2.4. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

80'li yıllarda morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz daha sonra DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle belirlenmeye başlandı. 90'lı yıllarda apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştığının bulunması üzerine kaspaz aktivasyonu ölçülerek apoptoz belirlendi. 90'lı yılların sonunda fosfotidilserin translokasyonu ile apoptoz saptandı. 2000'li yıllarda sadece apoptotik epitelyal hücrelerde kaspaz aktivitesi ile kırılan bir protein olan keratin 18'in özgün formunu saptayan antikolar kullanılarak apoptoz daha spesifik olarak saptandı. Altunkaynak ve Özgen (4).

Apoptozun belirlenmesinde kullanılan çok sayıda yöntem vardır:

- 1- Morfolojik görüntüleme yöntemleri
 - Işık mikroskobu (hematoksilen boyama , giemsa boyama)
 - Floresan mikroskobu
 - Elektron mikroskobu
 - Faz-kontrast mikroskobu
- 2- İmmüno histokimyasal yöntemler
 - Annexin V yöntemi
 - Tunnel yöntemi
 - M30 yöntemi
 - Kaspaz 3 yöntemi
- 3- Biyokimyasal yöntemler
 - Agaroz jel elektroforezi
 - Western blotting
 - Flow sitometri (DNA azalması – Annexin V)
- 4- Moleküler biyoloji yöntemleri
 - DNA microarray
- 5- İmmünolojik yöntemler

ELİSA (DNA fragmentasyonu, M30 düzeyi, Annexin V)

Fluorimetrik yöntem (Kaspaz aktivasyonu), Altunkaynak ve Özbek (4).

4.2.4.1.M30

Bu yöntemde, apoptotik hücreler kaspaz aktivasyonu ile bozulması sonucu sitokeratin 18'in yeni epitopunun ortaya çıkması sonucu belirlenir. Sitokeratinler, yalnızca epitelyal hücrelerinden salınan proteinler ve epitelyal hücre ölümü için kullanılan biyobelirteçlerdir. Apoptoz sırasında kaspazlar sitokeratin 18'i parçalamaktadır. Parçalanmış CK18 varlığı plazmada epitelyal hücre apoptozunu gösterir. M 30 tayini apoptoz için spesifik kantitatif bir testtir, Tas ve ark (51).

4.2.4.1.1.Sitokeratinler

Hücre iskeleti İntermediate filamentler (IF), aktin içeren filamentler (MF) ve mikrotübüler (MT) olmak üzere farklı filament sisteminden oluşmaktadır, Ueno ve ark (52), Fuchs ve Cleveland (53). İntermediate filamentler Tip I ile Tip 5 arasında sınıflanmaktadır. Tip I ve Tip II keratin ya da sitokeratin grubu olarak adlandırılmaktadır. Tip I keratinleri (ufak ve asidik grup) keratin 9 - 20 arasını ve Tip II keratinleri (geniş, nötr ya da bazik grup) keratin 1 – 8 arasını kapsamaktadır, Ueno ve ark (52), Ditzel (54). Keratinler hücrelere yapısal olarak destek olurlar ve hücrelerin stresle baş etmesine yardım ederler. Keratinler son derece dinamikler ve diferansiyasyon, mitoz bölünme ve apoptoz sırasında tekrardan organize olmaya başlayarak bu sistemler üzerine etki etmektedirler, Schutte ve ark (55). Sitokeratin zincirleri yapılarına bakıldığında bir merkezi α -sarmal zengin etki alan ile sarmal olmayan bir N- grubu ve C terminal etki alanlarından oluşmaktadır, Fuchs ve Cleveland (53).

4.2.4.1.2.Sitokeratin 18

Tip I intermediate filament proteini olan sitokeratin 18 (CK-18) tek katlı ve glanduler epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Lenfoid ve nöral hücrelerde bulunmayan CK-18, karaciğer, akciğer, prostat, göğüs, ve kolon dokularında salgılanabilmektedir çünkü bu dokular epitelyal kökenli doku özelliği taşımaktadır, Güleş ve Eren (56).

4.2.4.2. Annexin V

Rekombinant fosfotidilserin bağlayıcı protein olan Annexin V apoptozu belirleyebilmekte ve spesifik olarak fosfotidilserin kalıntıları ile etkileşime girebilmektedir, Elmore (41). Fosfolipid fosfotidilserin (PS) translokasyonu apoptozun saptanması için kullanılmaktadır. Apoptozun en erken safhada görülen değişimi membran fosfolipidi olan fosfotidilserinin membranın iç kısımdan membranın dış kısmına çıkması ile gerçekleşmektedir. Dış membrandaki fosfotidilserin ekspresyonunda değişim olmakta ve bu değişim üzerinden bir apoptoz göstergesi olan Annexin V ile apoptoz saptanmaktadır. Annexin V kalsiyum varlığında PS'e bağlanarak apoptozu saptamaktadır, Tilborg ve ark (57), Akar ve ark (58). Annexin V yöntemi kullanılarak dokuda, embriyoda ve kültürde apoptoz saptanabilmektedir, Elmore (41). Annexin V kullanılarak apoptozun saptanması immünokimyasal, biyokimyasal ve immünolojik yöntemler için kullanılmaktadır.

4.3. Oksidatif Stres

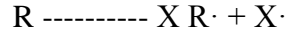
Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu lipid peroksidasyonu ve reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkarak organizmada hücrel hasara yol açması şeklinde tanımlanabilir, Fearon ve Faux (59). Bu durum, aşırı miktarda reaktif oksijen radikali ve/veya nitrojen radikallerinin oluşumu veya antioksidan tampon sisteminin yetersizliği sonucu ortaya çıkar. Reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin seviyelerindeki artış ise hücrelere toksik etki yapar ve hücrenin lipid, protein ve DNA benzeri moleküllerine zarar verir, dolayısı ile birçok hastalığın patogeneğinde öneme sahiptir, Erel (60), Işık ve Selek (61).

4.3.1. Serbest Radikaller

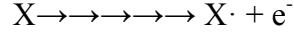
Serbest radikaller, üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran kararsız yapıda moleküller olarak tanımlanmaktadır. Bu gruba örnek olarak hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksid gibi radikaller gösterilebilir, Mercan (62).

Serbest radikallerin oluşum yollarına bakıldığında;

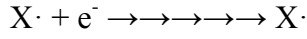
1- Homolitik bağ kırılması ile



2- Molekülden bir elektronun ayrılması ile



3- Moleküle bir elektronun katılması ile oluştuğu gösterilmiştir.



Serbest radikaller, hücre büyümesi ve gelişmesinde etkili olduklarından dolayı damar sertliği, kanser, romatizmal hastalıklar ve yaşlılık hastalıkları üzerine etkilidirler, Ögüt ve Atay (63).

4.3.2.Reaktif Oksijen Türleri(ROT)

Reaktif oksijen türleri (ROT) serbest radikallerin dış yörüngesinde eşleşmemiş bir elektron ve bir oksijen atomu bulunması ile karakterize olan türlerdir. Reaktif oksijen türleri endojen ve ekzojen olarak oluşabilmektedirler. Endojen olarak oksidasyon ve redüksiyon ile oluşabildikleri gibi ekzojen olarak stres, virüs, enfeksiyon, çevresel faktörler ve radyasyon ve benzeri etkiler sonucu oluşmaktadır, Çaylak (64), Atmaca ve Aksoy (65). Oksidan maddeler hücre ölümüne neden olan olayların en önemlilerindedir ve bu etkiyi hücrede lipidler, proteinler ve DNA'ya karşı oluşturdukları toksik etkileri ile göstermektedirler, Yerer ve Aydoğan (66).

ROT, reaktif nitrojen türleri (RNT) ve sülfür merkezli radikaller oksidan sınıfına girmektedir. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildirler, Antmen (67). Aşağıdaki görülen Tablo 4.3.1'de radikal ve radikal olmayan ROT'lar gösterilmiştir.

Tablo 4.3.1. Radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri, Büyükuslu ve Yiğitbaşı (68).

Radikaller		Radikal olmayanlar	
Hidroksil	HO·	Hidrojen peroksit	H ₂ O ₂
Alkoksil	RO·	Singlet oksijen	*O ₂
Peroksil	ROO·	Ozon	O ₃
Süperoksit	O ₂ ·-	Hipoklorit asit	HOCl
Nitrikoksit	NO·	Lipit hidroperoksit	LOOH
Azot dioksit	NO ₂ ·	Peroksinitrit	ONOO·

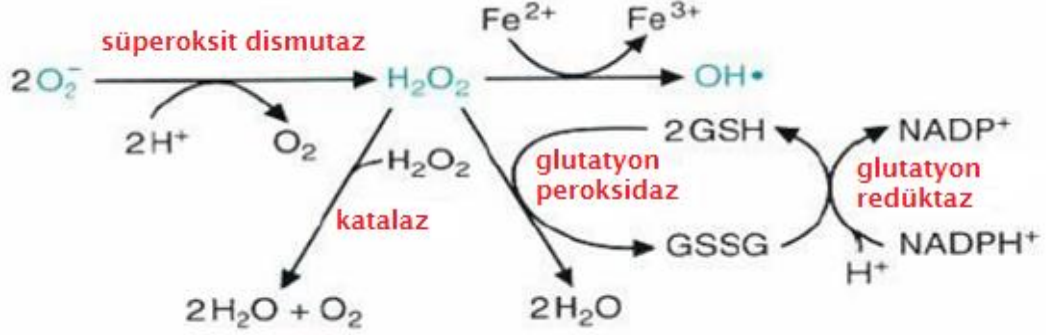
4.3.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, insan vücudunda ROT'lar tarafından oluşturulan oksidatif hasarın azaltılması ve birçok kronik hastalıkların ilerlemesini yavaşlatan ya da durduran koruyucular olarak tanımlanmaktadır, Köksal ve Gülçin (69).

Vücutta ROT ve RNT'lerin belli bir oranda kalması gerektiğinden serbest radikal toksisitesini azaltmak üzere antioksidan savunma sistemleri devreye girmektedir. Bunlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz, glutatyon S-transferaz, katalaz, tiyoredoksin redüktaz, peroksi redoksinler (Prx) ve NAD(P)H:ubiquinonoksido redüktaz (NQO1) gibi antioksidan enzimlerdir, Büyükuslu ve Yiğitbaşı (68).

Vücutta ROT düzeyini azaltan antioksidanlar enzimatik ve non-enzimatik olmak üzere sınıflandırılırlar.

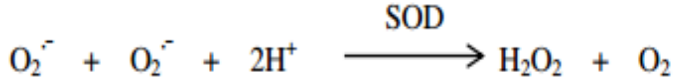
4.3.3.1. Enzimatik Antioksidanlar



Şekil 4.3.3. Antioksidan enzimler

Süperoksit Dismutaz (SOD)

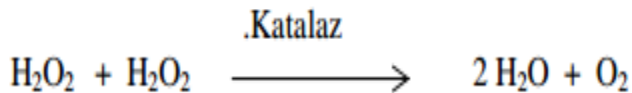
Önemli bir antioksidan olan SOD tüm oksijen metabolize eden hücrelerde mevcuttur. Bu enzim süperoksit serbest radikallerinin oksijen ve hidrojen perokside dönüşümünü katalizlemektedir, Büyüksü ve ark (70).



Süperoksit dismutaz süperoksit radikalini substrat olarak kullanılır. Oksijen kullanımını fazla olan dokularda SOD aktivitesi fazladır, Yalçın (71), Şimsek (72).

Katalaz

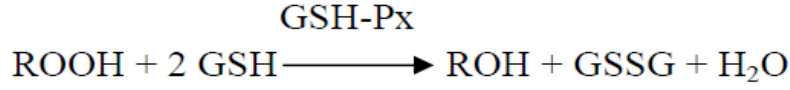
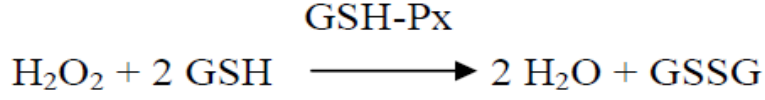
Katalazın görevi hücreleri hidrojen peroksidi su ve oksijene çevirerek korumaktır. Bu enzim aktivitesi genellikle peroksizom adı ile bilinen subselüler organellerde lokalize olmuştur, Weydert ve Cullen (73).



Katalaz bitki, hayvan ve mikroorganizmalarda mevcuttur. Peroksizom, karaciğer, böbrek, kemik iliği, eritrosit ve çeşitli başka dokularda da bulunmaktadır, Çimen ve ark (74).

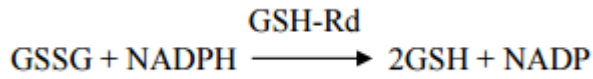
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)

Glutasyon Peroksidaz hidrojen peroksid ve lipid peroksidlerinin etkisizleştirmektedir. Bu enzim sitozolde çok fazla ancak mitokondride az miktarda bulunmaktadır, Çaylak (64).



Glutasyon redüktaz

GSH-Px aracılığı ile hidrojen peroksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan glutasyonun okside formunun (GSSG) tekrar glutatyona (GSH) indirgenmesini glutasyon redüktaz sağlamaktadır, Çaylak (64).



4.3.3.2. Non enzimatik antioksidanlar

Endojen ve ekzojen yollarla alınabilen non enzimatik antioksidanlar, düşük molekül ağırlığında olup okside olarak başka bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktirmekte veya önlemektedir, Derviş (75).

Tablo 4.3.3.2.Endojen ve ekzojen non enzimatik antioksidanlar

Endojen	Diyetle alınan
Bilirubin	α Tokoferol (E vit)
Tioller lipoikacid, N-asetilsistein indirgenmiş glutatyon	Askorbik asit (C vit)
NADPH, NADH	β karoten (provit A)
Ubiquinon(koenzimQ10)	Diğer karotenoid ve oksikarotenoidler(likopen, lutein)
Ürik asit	Polifenoller

4.3.4.Total Oksidan Seviye (TOS)

Total oksidan seviye (TOS) Serum ya da plazmada birçok oksidan türü ayrı ayrı metodlarla ölçülebilmektedir. Ancak bu ölçümler zaman alıcı ve pahalıdır. Bu sebepten dolayı tüm oksidanların seviyesini göstermek için total oksidan seviye ölçüm yöntemi kullanılmaktadır, Erel (92).

4.3.5.Total Antioksidan Kapasite (TAK)

Plazma ve vücut sıvılarında bulunan bütün antioksidanların toplam etkisini total antioksidan kapasite (TAK) yansıtır. Plazmada antioksidanlar etkileşim içindedir. Bu antioksidanların bir kısmının bir arada etki etmesi sonucu her birinin tek başına oluşturduğundan daha fazla antioksidan etki ortaya çıkar yani aralarında sinerjik etki vardır. Bu nedenle vücuttaki oksidan antioksidan dengenin belirlenmesi için tek tek antioksidanların ölçülmesinden total antioksidan kapasitenin ölçülmesi daha uygundur, Bustamante ve ark (77), Tuma (78).

Total antioksidan kapasiteyi oluşturan başlıca moleküller proteinlerin sülfidril grupları, vitamin C, ürik asit, vitamin E ve bilirubindir. Oksidatif stres altında total antioksidan kapasitenin tükenmesi durumunda başlangıçta karaciğer ve yağ dokusu gibi depolandıkları organlardan endojen antioksidanların salınımı artar, antioksidan enzimler aktive olur. Oksidatif stresin daha ileri dönemde ise antioksidanların tükenmesine bağlı olarak TAK düşer, Psotova ve ark (79)

4.3.6.D vitamini ve Oksidatif Stres Arasındaki İlişki

Vitamin D'nin antioksidan özelliği hakkında yeterli veri olmasa da yapılan bazı çalışmalar vitamin D'nin vitamin E ve melatoninden daha kuvvetli antioksidan potansiyele sahip olduğunu düşündürmektedir, de Almeida (80).

Oksidatif stres birçok kronik hastalığın patofizyolojisinde rol oynamasına rağmen, vitamin D ve oksidatif stres ilişkisini açıklayan sınırlı sayıda veri mevcuttur ve antioksidan-oksidan denge üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir. Vitamin D plazma membranının stabilizasyonunu sağlayarak lipid peroksidasyonu azaltır ya da GSH, GSH peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan sistemlerin nükleer reseptörleri üzerinden upregülasyonunu sağlayarak antioksidan özellik göstermektedir, Salum (81).

4.5.Kalsiyum

Vücutta en fazla miktarda bulunan element olma özelliğini taşıyan kalsiyum, hidroksiapatit kristalleri şeklinde kemik ve dişlerde bulunmaktadır. Yetişkin bir insanın vücudunda yaklaşık olarak 1-1,5 kg kalsiyum bulunmaktadır. Kalsiyum metabolizması vücutta 3 şekilde düzenlenmektedir; bağırsaktan kalsiyum emilimi, böbrekten geri emilimi ve kemik döngüsü. Ayrıca bu dokulardaki kalsiyum PTH, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, iyonize kalsiyum ve kalsiyum algılayan reseptör gibi hemostatik hormonal sistem tarafından regüle edilmektedir, Weaver (82).

PTH ve $1,25$ dihidroksi vitamin D plazma kalsiyum düzeyini yükseltirken, kalsitonin ve kateksin kalsiyum düzeyini azaltma yönünde hareket edebilmektedir, Emekli (83).

Kalsiyum düzeyleri kolorimetrik yöntemlerle ölçülmektedir.

Serum kalsiyum düzeyleri yaşa bağlı olarak değişmektedir (Tablo 4.5.1). Ayrıca bu çalışmada kullanılan Balb/c türü farelerde normal serum kalsiyum düzeyleri literatürde 8,5 – 10,5 mg/dL arasında kabul edilmektedir, Pakkala ve ark (84).

Tablo 4.5.1.Serum kalsiyum düzeyleri

YAŞ	KONSANTRASYON
Prematüre	7.6 – 10.0 mg/dL
0 – 1 ay	7.2 – 11.2 mg/dL
2 – 12 ay	8.0 – 10.8 mg/dL
1-4 yaş	8.4 – 10.5 mg/dL
5 – 20 yaş	9.2 – 11.0 mg/dL
21 – 50 yaş	8.8 – 10.2 mg/dL
>50 yaş	8.4 – 10.0 mg/dL

Serum kalsiyum düzeyinin 6 mg/dL'nin altında olması tetani gibi durumlara yol açarak yaşamsal tehlike oluşturmaktadır. 14 mg/dL'nin üstündeki kalsiyum düzeyleri ise aşırı yüksek değerler olarak kabul edilmektedir, Şahin (85).

Hiperkalsemi ve hipokalsemi durumları çeşitli hastalıklar neticesi meydana gelmektedir.

Hiperkalsemiye neden olan durumlar

Hiperkalsemi, serum kalsiyum düzeyinin aşırı yükselmesi olarak tanımlanmaktadır.

- 1- Paratroid hastalıkları (PTH)
- 2- Kemik hastalıkları
- 3- Kalsiyum metabolizmasının bozuk olduğu durumlarda
- 4- Aşırı D vitamini ya da kalsiyum alımı hiperkalsemiye neden olmaktadır.

Hipokalsemiye neden olan durumlar

Hipokalsemi, serum kalsiyum düzeyinin aşırı düşmesi olarak tanımlanmaktadır.

- 1- Paratroid hastalıkları (PTH)
- 2- Hipoproteinemiler
- 3- Böbrek yetmezliğine bağlı böbrek hastalıklarında
- 4- Beslenmede D vitamini ve kalsiyum eksikliği varsa hipokalsemiye neden olmaktadır, Emekli (82).



5.MATERYAL VE METOD

5.1.Kullanılan Araç ve Gereçler

Tablo 5.1.1.Deney sırasında kullanılan araç ve gereçler

Santrifüj	96 kuyucuklu plate
SpektraMax Mikroplate Spektroflorometre	Roche Cobas 6000 Biyokimya analizörü
Kırmızı kapaklı kan tüpleri	Otomatik pipet
Hassas Terazi	Distile su
pH metre	Enjektör
-80 °C buzdolabı	Annexin V Eliza kiti
Balon joje	Hematoksilen Eozin-Pas boyası
Doku Kaseti	Lam ve Lamel
Işık mikroskobu	Mikrotom doku kesiti alma cihazı
Diseksiyon seti	

5.2.Deney Grubunun Demografik Özellikleri

Çalışmada İstanbul Medipol Üniversitesi REMER bünyesinde yer alan Deney Hayvanları Merkezi'nden (MEDİTAM) alınan 50 adet 10 haftalık Balb/c türü erkek fare kullanıldı. Deney grupları her bir grup 10 adet fareden oluşmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Tablo 5.2.1.Oluşturulan deney grupları

Grup Numarası	Grup Adı (n=10)	Verilen D vitamini dozu ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Grup 1	Kontrol Grubu	Serum fizyolojik
Grup 2	Düşük Doz D vitamini	0.5
Grup 3	Orta Doz D vitamini	1
Grup 4	Orta-Yüksek Doz D vitamini	5
Grup 5	Yüksek Doz D vitamini	10

Farelerin ağırlıkları ise 0, 7. ve 14. günlerde ölçüldü.

Grupların bakımı normal laboratuvar koşullarında sağlandı. Deney hayvanları araştırmaya başlamadan bir hafta önce laboratuvara alındı ve ortama alıştırdı. Fareler 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamda yaşatıldı ve ortam sıcaklığı $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de tutuldu. Ortamın nem oranı % 65 – 70 arasında idi. Beslenmeleri ve su (musluk suyu) konusunda hiçbir kısıtlama yapılmadı (ad-libitum).

5.3.Deney Hayvanlarına Uygulanan İşlemler

50 adet Balb/c türü fare deneye başlamadan önce Tablo 5.2.1'de yazıldığı gibi her grup 10 hayvandan oluşacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Oluşturulan deney gruplarından düşük doz D vitamini grubuna ($0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$), orta doz D vitamini grubuna ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$), orta yüksek doz D vitamini grubuna ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) ve yüksek doz D vitamini grubuna ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) D₃ vitamini (Calcijex ampul) intraperitoneal olarak 14 gün boyunca haftada 3 kez (Pazartesi, Çarşamba, Cuma) uygulandı, Souli ve ark (86), Swami ve ark (87), Lim ve ark (88). 1.Gruba kontrol amaçlı aynı miktarda serum fizyolojik yine intraperitoneal olarak verildi.

5.4.Kan Örneklerinin Alınması ve Saklanması

D vitamini uygulamasının sonlanmasından 3 gün sonra fareler anestezi altına (Ketamin ve Rampon karışımı) alındı ve kardiyak ponksiyon yöntemi ile kırmızı kapaklı biyokimya tüplerine kanları alındı, Lim ve ark (88).

Alınan kanlar 3500 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen serumlar analiz gününe kadar -80°C 'de saklandı.

5.5.Doku Örneklerinin Alınması ve Saklanması

Balb/c türü farelerin anestezi altında kardiyak ponksiyon yöntemi ile kanları alındıktan sonra farelerin karaciğer ve böbrek dokuları alındı. Alınan dokular doku kasetlerine konuldu ve doku takibi yapılana kadar formalin fiksatifinde bekletildi. Doku takibi yapıldıktan sonra dokular parafinize edilerek çalışılacakları güne kadar oda sıcaklığında saklandı.

5.6.Kan Örneklerinde İncelenen Parametreler ve Yöntemleri

Farelerden elde edilen serumlarda TAK ve TOS tayini, kalsiyum düzeyleri ve Annexin V Eliza kiti ile apoptoz ölçümü yapıldı. Kalsiyum düzeyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Mega Hastaneler Kompleksi'nde Roche Cobas 6000 biyokimya analizörü ile çalışılır iken, total antioksidan ve oksidan tayini ve Annexin V Eliza apoptoz ölçümü İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Merkezi'nde (REMER) SpektraMax Mikroplate Spektrofluorometre cihazı kullanılarak yapıldı.

5.7.Eliza Yöntemi ile Serumda Annexin V Ölçülmesi

Çalışma Prensibi:

Annexin V, Bioassay Technology Laboratory ürünü olan Mouse annexin V (ANX – V) ELİZA kiti (Kat no: E0502Mo) ile çalışıldı.

Bu ELİSA kiti Mouse annexin V (ANX – V)'i biotin çift antikör sandviç teknolojisi ile ölçmektedir. Bu yöntemde önceden annexin V monoklonal antibody ile kaplanmış kuyucuklara annexin V eklenir ve inkübe edilir. Daha sonra streptavidin-HRP eklenir ve biotin ile işaretlenmiş anti annexin V eklenir. İnkübasyondan sonra bağlanmamış antikörler yıkanır. A ve B kromojen konjugatları eklenir ve solüsyonun rengi maviyeye döner. Sonra asidik durdurma solüsyon eklenerek solüsyon sarı rengi alır ve reaksiyon durdurulur. Oluşan rengin şiddeti Mouse annexin V (ANX – V) konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan materyaller:

Tablo 5.7.1.ELİZA çalışması için kit ile gelen malzemeler

Reaktif	Sayı
Standart Solüsyon	0,5 ml
96'lık well plate	1 Adet
Standart Seyreltme Çözeltisi	3 ml
Streptavidin – HRP	6 ml
Durdurma solüsyonu	6 ml
Kromojen A solüsyonu	6 ml
Kromojen B solüsyonu	6 ml
Washing Buffer (30x)	20 ml
Biotin ile işaretlenmiş anti ANX – V antibodyleri	1 ml

Deney Prosedürü

1- Standart solüsyonların dilüsyonu:

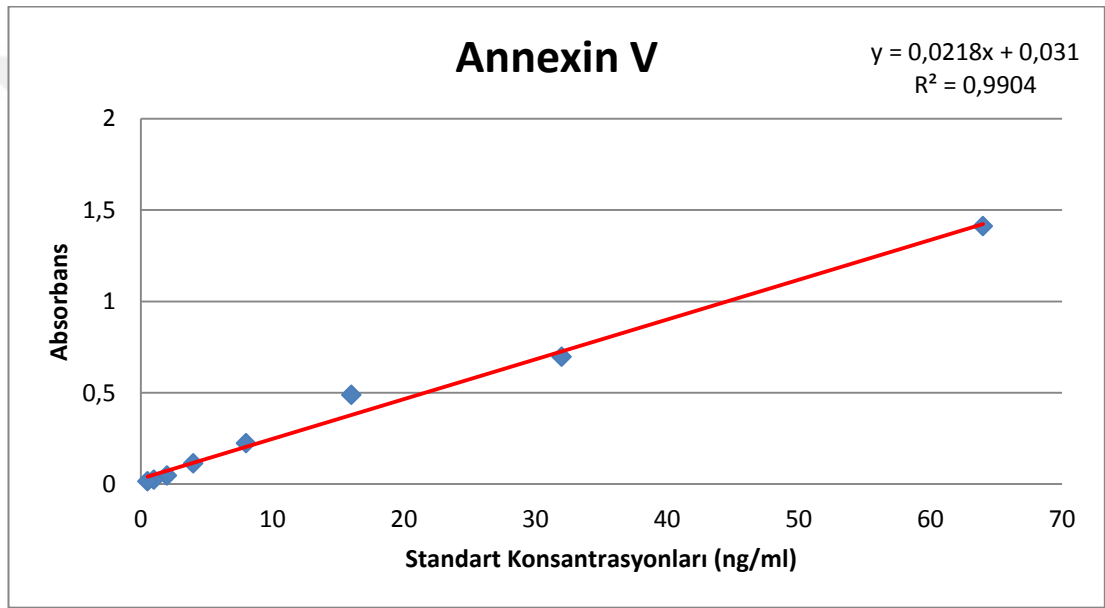
Tablo 5.7.2.Standartların hazırlanma prosedürü

128 ng/ml	Orijinal Standart	
64 ng/ml	Standart No. 1	120 µl Orijinal Standart + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
32 ng/ml	Standart No. 2	120 µl Standart No. 1 + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
16 ng/ml	Standart No. 3	120 µl Standart No. 2 + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
8 ng/ml	Standart No. 4	120 µl Standart No. 3 +

		120 µl Standart seyreltme çözeltisi
4 ng/ml	Standart No. 5	120 µl Standart No. 4 + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
2 ng/ml	Standart No. 6	120 µl Standart No. 5 + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
1 ng/ml	Standart No. 7	120 µl Standart No. 6 + 120 µl Standart seyreltme çözeltisi
0,5 ng/ml	Standart No. 8	120 µl Standart No. 7+ 120 µl Standart seyreltme çözeltisi

- 2- Hazırlanan standart ve kör çözeltisi kendileri için ayrılmış kuyucuklara pipetlendi.
- 3- Örnek enjeksiyonu: Kör için ayrılan kuyucuğa sadece kromojen solüsyonu A ve B ve durdurucu solüsyon eklendi. Standart solüsyon kuyucuğuna 50 µl standart ve 50 µl sterptavidin – HRP eklendi. Örnek kuyucuklarına ise 40 µl örnek, sonra 10 µl ANX – V antibody ve 50 µl streptavidin – HRP eklendi. Sonra kuyucukların üstü plate membranı ile çevrildi. Plate dikkatlice karıştırıldı ve 37°C’de 60 dakika inkübe edildi.
- 4- Yıkama solüsyonunun hazırlanması: Sonraki adımlarda distile su ile yıkama solüsyonu (30x) distile su ile dilue edildi.
- 5- Yıkama: plate membranı çıkarıldı ve kuyucuklar içindeki sıvı atıldı. Sonra her bir kuyucuk yıkama solüsyonu ile dolduruldu ve solüsyon 30 dakika sonra kuyucuklardan atıldı ve işlem 5 defa daha tekrarlandı.
- 6- Renk oluşumu: İlk olarak 50 µl kromojen A solüsyonu eklendi sonra 50 µl kromojen B solüsyonu eklendi. Plate dikkatlice karıştırıldı. Daha sonra 37°C’de 10 dakikada karanlık ortamda renk oluşumu için beklendi.

- 7- Reaksiyonu durdurma: Her bir kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklendi ve kuyucuklarda solüsyonun renginin maviden sarıya döndüğü gözlemlendi.
- 8- Kuyucuklara uygulanan işlemler son bulduktan sonra 450 nm'de 10 dakika içinde absorbans ölçümü yapıldı.
- 9- Çalışılan standartlar ile kalibrasyon eğrisi oluşturuldu ve örneklerin konsantrasyon değerleri $y = 0,0218x + 0,031$ denklemi kullanılarak hesaplandı.
- 10- Bu yöntemin ölçüm aralığı 0,5 ng/ml → 100 ng/ml, sensitivitesi ise 0.27 ng/ml'dir.



Şekil 5.6.1.1. Annexin Kalibrasyon Eğrisi

5.8. Histolojik Değerlendirme

Farelerden çıkarılan böbrekler ve karaciğerlerden birisi % 10 nötral formalinde tespit edildi. Daha sonra rutin ışık mikroskopi takip yöntemleri kullanılarak parafine gömüldü. Mikrotom (Thermo Microm HM 340E) yardımı ile 5 mikrometre kalınlığında alınan parafin kesitler ışık mikroskopi yöntemi için lamlara alındı. Doku kesitlerine Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Hematoksilen-Eosin (HE) boyama yöntemleri uygulandı.

5.8.1.Doku Takip Protokolü

1. Fiksatif için formaline alınmış dokular doku takibi başlayacağı günde 1 saat akan çeşme suyu altında bekletildi.
2. Dokular sırası ile %70, %90, %96'lık alkol serilerinde 1'er saat etüvde olmak koşulu ile bekletildi.
3. Daha sonra yarım saat %100 alkolde ve yarım saat %100 II'de etüvde bekletildi.
4. Alkolden alınan dokular toluen I ve toluen II'de yarım saatlik periodlar halinde bekletildi.
5. Toluenden alınan dokular sıvı parafin içerisinde 1 saat etüvde bekletildi.
6. Parafin II'ye alınarak etüv içerisinde bir gece bekletildi.
7. Ertesi gün sıvı parafinden alınan dokular bloklara parafin ile gömülerek donduruldu.

5.8.2.Periyodik Asit Schiff (PAS) Boyama

Karbonhidratlardan zengin yapıların, özellikle glikojen ve bazal membran boyamalarını göstermek amacı ile PAS boyaması aşağıda belirtilen sıra ile uygulandı.

1. Kesitler parafini giderilmesi için 1 saat toluende bekletildi.
2. Azalan alkol serilerinden (%100 - %70) geçirildi ve distile suya alındı.
3. Periyodik asitte (Sigma) 5 dk. bekletildi.
4. Akarsuda 10 dakika bekletildi ve daha sonra 3 kez distile su ile çalkalandı.
5. Schiff solüsyonunda (Sigma), karanlıkta 10 dakika bekletildi.
6. Yıkama solüsyonunda 3×5 dakika bekletildi.
7. Akarsuda 5 dakika bekletildi.

8. Hemaluanda (çekirdek boyası) 5 dakika bekletildi.
9. Artan alkol serilerinden (%70 - %100) geçirildi.
10. 3 kez toluenden geçirildi
11. Preparatlar bio mount solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı.

5.8.3.Hematoksilen – Eosin (HE) Boyama

1. Preparatlar 1 saat 60°C'de etüvde bekletildi (Deparafizasyon işlemi).
2. Etüvden çıkarılan preparatlar 30 dakika Ksilen/toluen içerisinde bekletildi.
3. Preparatlar sırası ile %100, %96, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.
4. Preparatlar 1 kez distile sudan geçirildi.
5. Hematoksilen içerisinde 15 dakika bekletildi.
6. Mordanlama için akan çeşme suyu altında 10 dakika bekletildi.
7. Eosin boyası içerisinde 1,5 dakika bekletildi.
8. Distile su içerisinde boyanın rengi şeffaf olana kadar yıkandı.
9. Preparatlar sırası ile %70, %96, %100'lük alkolden geçirildi.
10. Ksilen/Toluen içinde 10 dakika preparatlar parlaklaştırıldı.
11. Preparatlar bio mount solüsyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı.

5.8.4.Böbrekte Gomerul Mezengial matriks Oranı

Pas boyası yapılan böbrek dokusu kesitlerinde glomerül mezengial matriks oranı Nikon Eclipse Ni araştırma mikroskobu ile X40 büyütmede rastgele alanlardan seçilen 20 adet düzgün şekilli glomerül üzerinde çift kör çalışma ile yapıldı. Her glomerülde lezyonun oranı 0 ila +4 arasında derecelendirildi.

0: Mezengial matriks oranı normal

+1: Mezengial matrikste %25 artış

+2: Mezengial matrikste %50 artış

+3: Mezengial matrikste %75 artış

+4: Mezengial matrikste %100 artış

Bu skorlamaya göre kaydedilen değerler her preparat için, kendi aralarında ayrı ayrı toplandı. Örneğin; 20 glomerülden 5 tanesi +3, 10 tanesi +2, 5 tanesi +1 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar, literatürdeki formülde yerlerine konup, her bir preparat için sonuçlar elde edildi. Yukarıdaki değerleri formülde yerine koyarsak: $(3 \times 5/20) + (2 \times 10/20) + (1 \times 5/20) \times 100 = 125$. Her iki araştırmacı tarafından elde edilen sonuçlar toplanıp 2'ye bölündü. Elde edilen rakam, mezengial matriks hasar skoru olarak kaydedildi, Raij ve ark (89).

5.8.5.Karaciğerde Histopatolojik Skorlama

Grade 0: minimal veya hiç hasarlanma bulgusu yok.

Grade 1: Hafif hasarlanma ile karakterize sitoplazmik vakuolizasyon ve fokal nükleer piknoz.

Grade 2: Orta derece hasarlanma hafif mononükleer hücre infiltrasyonu, sitoplazmik vakuolizasyona ilaveten, hepatositlerde şişme, nekrozis yok, sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon, intersellüler sınırlarda bulanıklık.

Grade 3: Hafif şiddetli hasarlanmada koagülasyon nekrozu, şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonu, sitoplazmik hipereosinofili, geniş sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon.

Grade 4: Şiddetli hasarlanmada şiddetli koagülasyon nekrozu ve hepatik hücre kordonlarında disintegrasyon ve hemoraji, doku yapısında bozulma, Amara ve ark (90).

5.9.Total Antioksidan Tayini

Total antioksidan tayini serumda kolorimetrik olarak Erel tarafından geliştirilen metotla ölçüldü, Erel (91).

Prensip: ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) reaktifi; tampon çözelti varlığında ortamın pH'sı sabit tutularak; hidrojen peroksit ile radikal hale getirilir. Oluşan çözelti kendine özgü koyu yeşil-lacivert arası bir renge sahiptir. Serum ilave edildiğinde serumun içerisindeki antioksidanlar mevcut ABTS radikallerini nötralize eder. Nötralizasyon gerçekleştiği ölçüde çözeltinin rengi açılır. Dolayısıyla serumda bulunan total antioksidan miktarı ile çözeltinin renk şiddeti orantılıdır. 658 nm'de çözeltinin absorbansı ölçülür. Standart olarak kullandığımız çözeltinin absorbans molarite verileri kullanılarak; numunenin total antioksidan molaritesi hesaplanır.

Kullanılan Reaktifler:

Reaktif 1: 0,4 M Asetat Tamponu (pH:5,8): Asetat tamponun 0,4 M Na-Asetat ve 0,4 M CH₃COOH içerir.

Reaktif 2: 30 mM Asetat Tamponu (pH: 3,6)

10 mM ABTS reaktifi

1000 ml içi 278 µL H₂O₂

% 10'luk Etilen Glikol hazırlanan 30 mM asetat tamponu içerisine eklenir ve karıştırılıp 24 saat beklenir. 24 saat sonunda reaktif 2'nin ördek başı yeşili rengi alması hedeflenir.

Standart: 01M (pH:8) Tris tamponu içinde 1mM Potasyum heksosiyanoferat (C₆FeK₃N₆) hazırlanır.

Reaktiflerin hazırlanmasından sonra Tablo 5.9.1'de ki deney prosedürü takip edilir.

Tablo 5.9.1. TAK deney prosedürü

	Reaktif I (µL)	Reaktif II (µL)	Standart (µL)	Serum (µL)
Numune	100 µL	15 µL	-	6 µL
Standart	100 µL	15 µL	6 µL	-
Kör	100 µL	15 µL	-	-

Yukarıdaki tabloda belirtilen miktarlarda çözelti ve örnekler 96'lık platelere pipetlendi ve SpektraMax Mikroplate Spektrofluorometre cihazında spektrofotometrik olarak 658 nm'de ölçüm yapıldı. Numunelerin Total Antioksidan Molariteleri ise aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Numunelerin Total Antoksidan Molaritesi} = \left(\frac{\text{Numunenin Absorbansı}}{\text{Standartın Absorbansı}} \right) \times \text{Standartın Molaritesi}$$

5.10.Total Oksidan Tayini:

Total antioksidan tayini serumda kolorimetrik olarak Erel tarafından geliştirilen metodla ölçüldü, Erel (92).

Prensip: Fe_2SO_4 suda çözünür ve Fe^{2+} açığa çıkar. Serumda bulunan oksidanlar Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} e yükseltgenmesini sağlar. Kullanılan X-orange reaktifi Fe^{3+} ile renkli bir kompleks verir. Oluşan rengin şiddeti; total oksidan miktarı ile orantılıdır. 658 nm'de absorbans ölçülür. Standart olarak kullandığımız çözeltinin absorbans molarite verileri kullanılarak; numunenin total oksidan molaritesi hesaplanır.

Kullanılan Reaktifler

Reaktif 1: Fox solüsyonu: 140 Mm NaCl ve 25 mM H_2SO_4 içerir.

Hazırlanan Fox solüsyonun 225 ml'si reaktif 1'in hazırlanması için 25 ml'si ise reaktif 2'nin hazırlanması için kullanılır. Reaktif 1'in hazırlanması için 225 ml Fox solüsyonunun içine 150mM D-Sorbitol+25µM X-orange ilave edilir.

Reaktif 2: 25 ml Fox solüsyonu içine 10mM 4-Hidroksibenzoik asit + 5 mM Amonyum Fe²⁺SO₄ ilave edilir.

Standart: 20µM H₂O₂ standart olarak hazırlanır.

Reaktiflerin hazırlanmasından sonra Tablo 5.10.1’de ki deney prosedürü takip edilir.

Tablo 5.10.1.TOS deney prosödürü

	Reaktif I (µL)	Reaktif II (µL)	Standart (µL)	Serum (µL)
Numune	112,5 µL	5 µL	-	17,5 µL
Standart	112,5 µL	5 µL	17,5 µL	-
Kör	112,5 µL	5 µL	-	-

Yukarıdaki tabloda belirtilen miktarlarda çözelti ve örnekler 96’lık platlere pipetlendi ve SpektraMax Mikroplate Spektrofluorometre cihazında spektrofotometrik olarak 658 nm’de ölçüm yapıldı. Numunelerin Total Oksidan Molariteleri ise aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\text{Numunelerin Total Oksidan Molaritesi} = (\text{Numunenin Absorbansı} / \text{Standartın Absorbansı}) \times \text{Standartın Molaritesi}$$

5.11.Oksidatif Stress İndeksinin Hesaplanması

TAK’ın birimi mmol Trolox ekivalent/L’ye çevrildi ve ve aşağıdaki formül kullanılarak oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı, Erel (91), Erel (92).

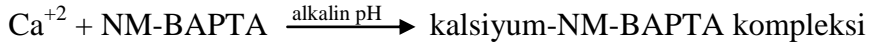
$$\text{OSİ} = \text{TOS} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ ekivalent/L}) / \text{TAK} (\text{mmol Trolox ekivalent/L}) \times 100$$

OSİ Referans Aralığı: 0-3’tür.

5.12.Kalsiyum

Serum Kalsiyum düzeyleri İstanbul Medipol Üniversitesi Mega Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına'nda fotometrik yöntemle Roche Cobas 6000 otoanalizörü ile (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) orjinal kitleri kullanılarak ölçüldü.

Kalsiyum iyonları, alkalın koşullar altında 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks ikinci adımda EDTA ile reaksiyona girer.



Absorbanstaki değişim, kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

5.13.İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan 50 adet Balb/c türü fareden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için Windows işletim sistemi SPSS (versiyon 22, Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Çalışmamızda Annexin V, TAK, TOS, OSİ, kalsiyum, 0, 7 ve 14. günlerdeki vücut ağırlığı, böbrekte glomerul mezengial matriks oranı ve karaciğerde histopatolojik skorlama değerleri, kontrol grubu ile 0,5, 1, 5, 10 µg/kg kalsitriol uygulanan deney grupları karşılaştırıldı ve korelasyon analizi yapıldı. Öncelikle SPSS programında tanımsal istatistikler yapıldı. Sonra parametrelerin normal dağılıma uygunlukları Shaphiro-Wilk testi ile araştırıldı. Normal dağılıma uygun olan grupların farklılıkları Tek Yönlü Anova uygun olmayanlar Kruskall Wallis testiyle değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi p <0,05 olarak kabul edildi.

Parametreler arasındaki ilişkiyi araştırmak için Pearson korelasyon analizi kullanıldı.

6.BULGULAR

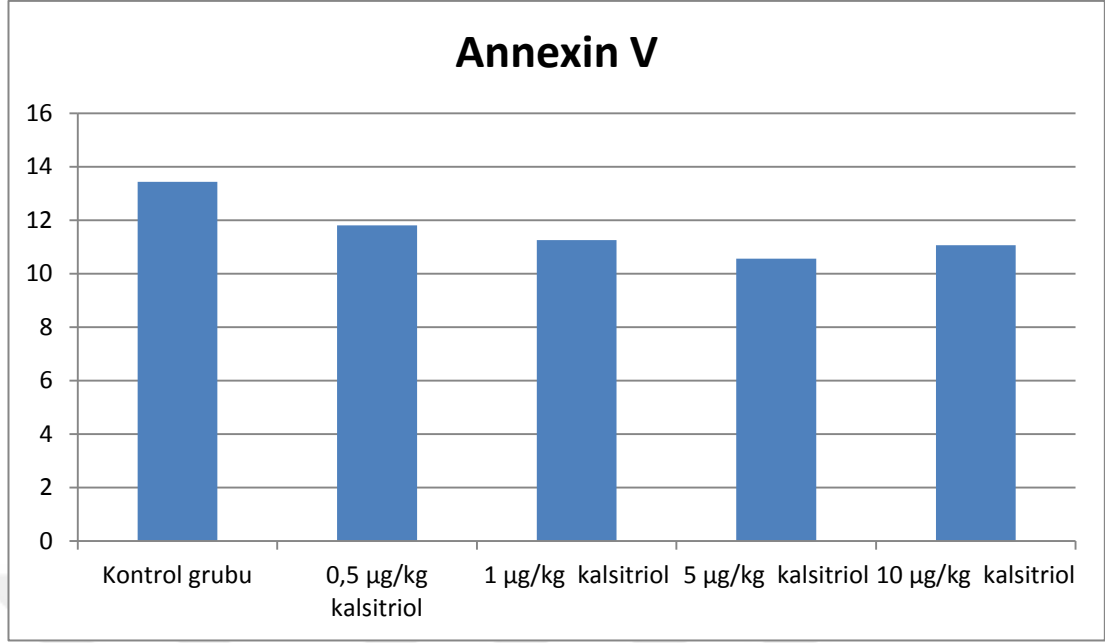
Bu çalışmada 10 haftalık 50 adet Balb/c türü erkek fare kullanıldı. Çalışmada fare serumlarında; kalsiyum, TAK, TOS, OSİ, Annexin V ölçüldü. Histopatolojik olarak böbrekte glomerul mezengial matriks oranı, karaciğerde histopatolojik skorlama yapıldı. Ayrıca farelerin 0, 7 ve 14. günlerdeki vücut ağırlıkları ölçüldü.

Tablo 6.1.Gruplardaki farelerin ortalama ağırlıkları

Günler	Kontrol grubu (g)	Düşük doz D vitamini grubu (g)	Orta doz D vitamini grubu (g)	Orta yüksek doz D vitamini grubu (g)	Yüksek doz D vitamini grubu (g)
0.gün	32,5	34,4	33,3	32,1	33,1
7.gün	32,8	33,9	34,3	33	33,5
14.gün	34,1	34,5	33,1	33,5	34,1

İstatistiği yapılan 0, 7 ve 14. gün kontrol grubu ve deney grubu Balb/c türü farelerin vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 6.1).

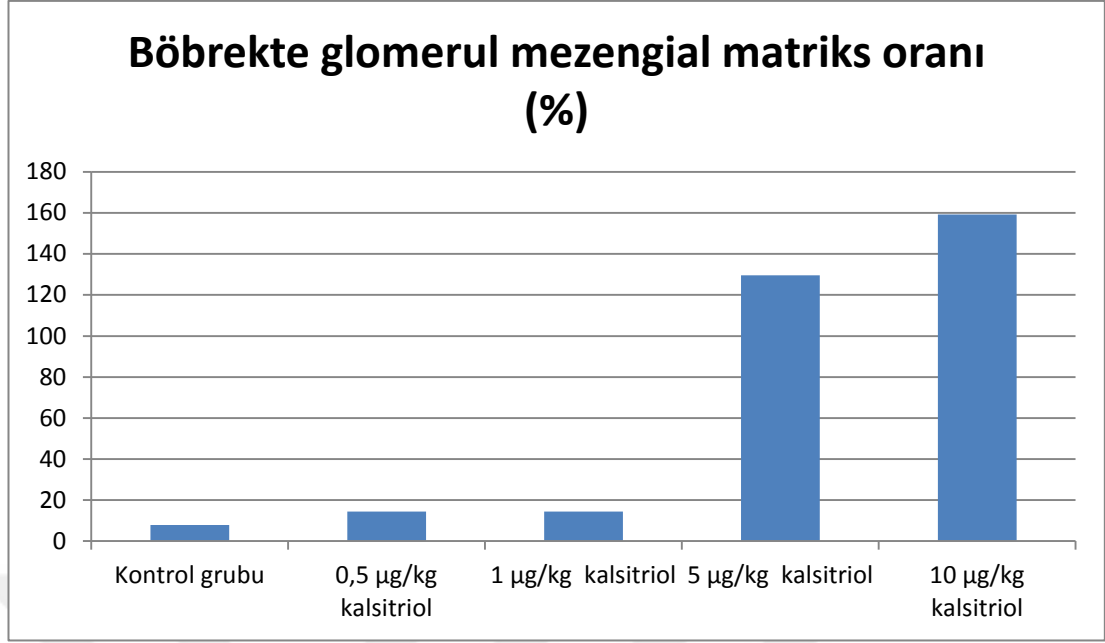
Annexin V değerlerine göre kontrol grubu ($13,44\pm 1,02$) ve deney grubu karşılaştırıldığında; orta doz ($11,26\pm 1,32$),orta-yüksek doz ($10,56\pm 2,23$) ve yüksek doz ($11,06\pm 1,84$) D vitamini verilen grublarda Annexin V değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek ($p<0,05$) bulundu. Düşük doz D vitamini($11,81\pm 1,26$) grubunda ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmayan, rakamsal olarak düşük değer gözlendi ($p>0,05$) (Tablo 6.2) (Şekil 6.1).



Şekil 6.1. Annexin V değerlerinin doza bağlı değişimi

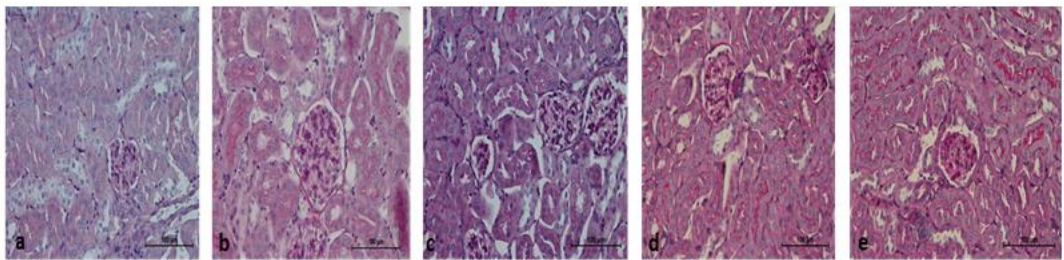
Yapılan PAS boyamasında, böbrekte glomerul mezengial matriks oranı deney grubunda kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 6.2) (Şekil 6.2).

Orta-yüksek ($129,5 \pm 33,3$) ve yüksek doz ($159,2 \pm 51,7$) kalsitriol uygulanan deney grubunun değerleri kontrol grubu ($7,80 \pm 7,50$), düşük doz ($14,5 \pm 4,97$) ve orta doz ($14,50 \pm 4,97$) kalsitriol uygulanan grubun değerlerinin göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p < 0,05$) (Tablo 6.2) (Şekil 6.2).



Şekil 6.2. Böbrekte glomerul mezengial matriks oranı yüzdesinin dozlara bağlı değişimi

Kontrol, 0,5µg/kg D vitamini (düşük doz), 1µg/kg D vitamini (orta doz) uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı. Bu grupta glomerüller bazal membran ve mezengial matriks oranları normaldi (Şekil 6.3 a,b,c). 5µg/kg D vitamini (orta-yüksek doz), 10µg/kg D vitamini (yüksek doz) uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde mezengial matrikste artış (Şekil 6.3), bowman kapsülü pariyetal yaprak hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi, glomerüllerde hipertrofi gözlemlendi (d,e).



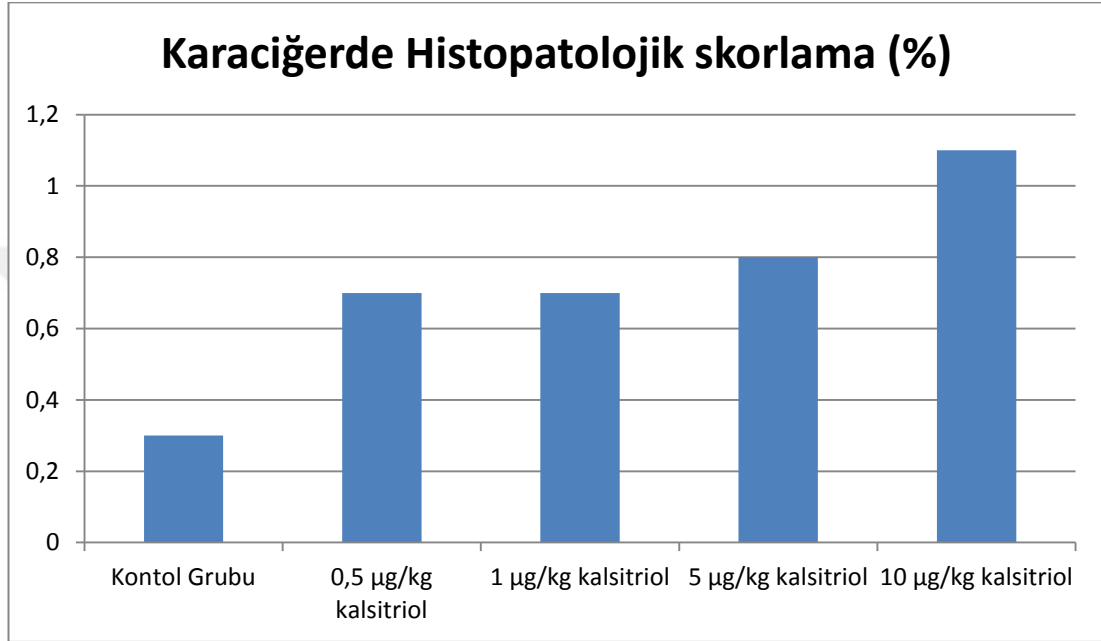
a. Kontrol b. Düşük doz c. Orta doz d. Orta yüksek doz e. Yüksek doz

Şekil 6.3. Böbrek PAS boyama

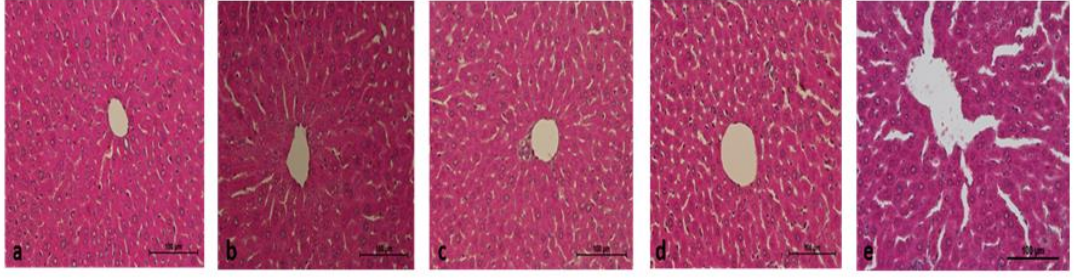
Hematoksilen – Eozin boyaması ile yapılan karaciğerde histopatolojik skorlamasında 10 µg/kg D vitamini (yüksek doz) ($1,1 \pm 0,57$) uygulanan grubun değerlerinde kontrol

grubu ($0,3\pm0,48$) değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlemlendi. ($p<0,05$) (Tablo 6.2) (Şekil 6.4).

5 $\mu\text{g/kg}$ D vitamini (orta-yüksek doz) ($0,8\pm0,42$) uygulanan grubun değerleri de kontrol grubuna ($0,3\pm0,48$) göre rakamsal olarak yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark bulunamadı ($p>0,05$) (Tablo 6.2) (Şekil 6.4).



Şekil 6.4. Karaciğerde yapılan histopatolojik skorlama yüzdesinin doza bağlı değişimi. Kontrol, 0,5 $\mu\text{g/kg}$ D vitamini (düşük doz), 1 $\mu\text{g/kg}$ D vitamini (orta doz) uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı. Bu grupta doğal görünümde karaciğer parankimi gözlemlendi, hepatositler santral ven etrafında ışınal hücre kordonları tarzında izlendi ve sinüzoidler normal yapıda idi (Şekil 6.5 a,b,c). 5 $\mu\text{g/kg}$ D vitamini (orta-yüksek doz), 10 $\mu\text{g/kg}$ D vitamini (yüksek doz) uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde, karaciğer parankiminde hafif bir dejenerasyon gözlemlendi, hepatosit kordonlarının düzensizleştiği ve mononükleer hücre infiltrasyonunda hafif bir artış izlendi, sinüzoidlerde dilatasyon ve santral venin doğal yapısını kaybettiği gözlemlendi (d,e).



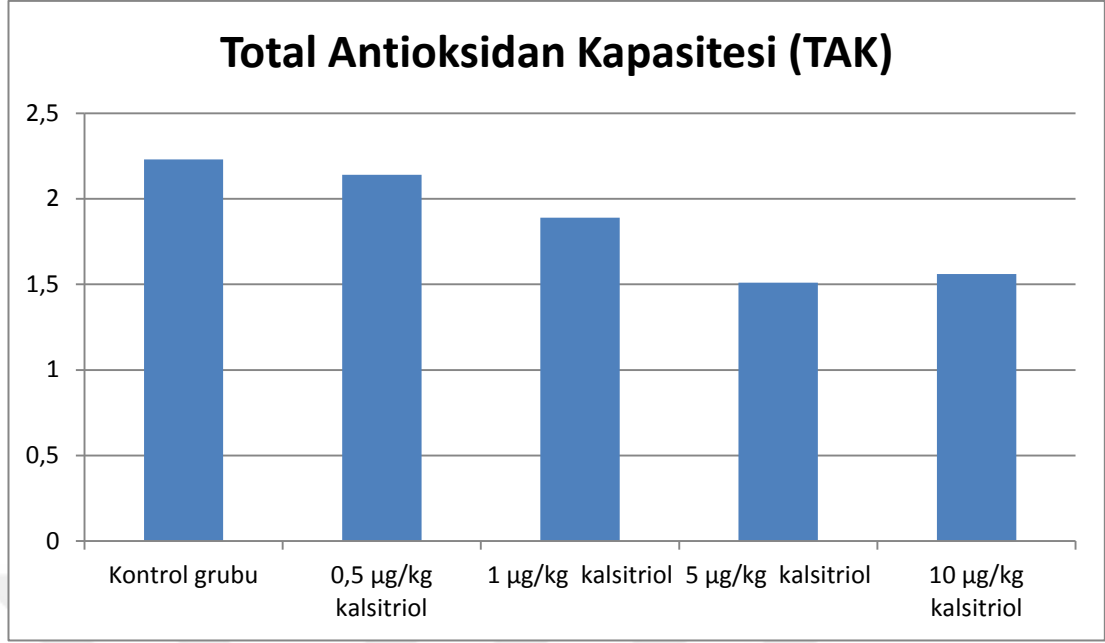
a. Kontrol b. Düşük doz c. Orta doz d. Orta yüksek doz e. Yüksek doz

Şekil 6.5.Karaciğer HE boyama

TAK değerlerine bakıldığında; orta-yüksek doz ($1,51\pm 0,24$) ve yüksek doz D vitamini ($1,56\pm 0,37$) grubunun değerleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük bulundu ($p<0.05$).

Düşük doz ($2,14\pm 0,43$) ve orta doz D ($1,89\pm 0,40$) vitamini uygulanan grupların da TAK değerleri kontrol grubuna ($2,23\pm 0,41$) göre rakamsal olarak düşük bulundu ancak istatistiksel bir anlamlılık gözlenmedi ($p>0.05$).

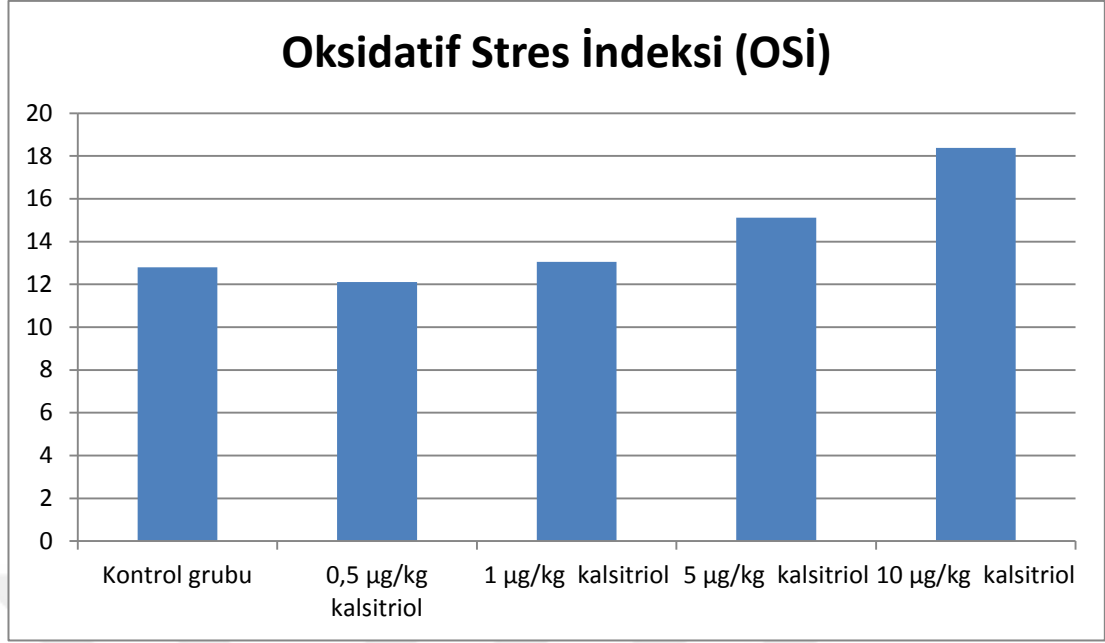
Düşük doz D vitamini uygulanan grubun TAK değerleri, orta-yüksek ve yüksek doz D vitamini uygulanan grubun TAK değerlerine göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p<0.05$).



Şekil 6.6.TAK değerlerinin değişimi

Kontrol grubunun TOS değerleri ile deney grubunun TOS değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı görüldü ($p>0,05$).

OSI değerleri kontrol grubuna ($12,80\pm 2,38$) göre orta-doza ($13,05\pm 2,45$) ve orta yüksek doz D vitamini ($15,11\pm 2,05$) gruplarında rakamsal olarak giderek artan değerlere ulaşsa da sadece yüksek doz ($18,38\pm 5,16$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı yükseklik gözlemlendi ($p<0,05$). Yüksek doz D vitamini ($18,38\pm 5,16$) uygulanan grubun OSI değerleri, kontrol grubunun yanında ($12,80\pm 2,38$) düşük doz ($12,11\pm 1,52$) ve orta doz D vitamini ($13,05\pm 2,45$) gruplara göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p<0,05$).



Şekil 6.7.OSİ değerlerinin doza bağlı değişimi

Kontrol grubunun kalsiyum değeri $9,12 \pm 0,36$ iken düşük, orta, orta-yüksek, ve yüksek doz kalsitriol uygulanan grubun kalsiyum değerleri sırası ile $9,29 \pm 0,59$, $9,20 \pm 0,37$, $9,06 \pm 0,57$, $9,19 \pm 0,38$ idi. Kontrol grubu ve deney grupları arasında kalsiyum değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p > 0,05$).

Tablo 6.2.Kontrol ve doz gruplarının laboratuvar bulgularının karşılaştırılması

	Kontrol grubu (g)	Düşük doz D vitamini grubu	Orta doz D vitamini grubu	Orta yüksek doz D vitamini grubu	Yüksek doz D vitamini grubu	P
Kalsiyum(mg/dl)	9,12±0,36	9,29±0,59	9,20±0,37	9,06±0,57	9,19±0,38	>0,05
TAK(mmol Trolox eq.)	2,23±0,41	2,14±0,43	1,89±0,40	1,51±0,24	1,56±0,37	<0,05
TOS(μmol H₂O₂)	28,36±7,26	25,66±4,92	24,29±5,65	22,53±3,10	28,01±7,37	>0,05
OSİ	12,80±2,38	12,11±1,52	13,05±2,45	15,11±2,05	18,38±5,16	<0,05
Annexin V (ng/ml)	13,44±1,02	11,81±1,26	11,26±1,32	10,56±2,23	11,06±1,84	<0,05
Böbrekte glomerul mezengial matriks oranı (%)	7,80±7,50	14,5±4,97	14,50±4,97	129,5±33,3	159,2±51,7	<0,05
Karaciğerde Histopatolojik skorlama (%)	0,3±0,48	0,7±0,48	0,7±0,48	0,8±0,42	1,1±0,57	<0,05

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 6.3.Parametrelerin birbirleri ile arasında olan korelasyon ilişkisi

	Kalsiyum	TAK	TOS	OSI	Annexin V	Böbrek (PAS)	Karaciğer (HE)	0.gün Vücut ağırlığı	7.gün Vücut ağırlığı	14.gün Vücut ağırlığı
Kalsiyum	1									
TAK	0,27	1								
TOS	-,011	,555**	1							
OSI	,057	-,534**	,379**	1						
Annexin V	-,117	,376**	,379**	-,035	1					
Böbrekte glomerul mezengial matriks oranı	,002	-,258	,063	,335*	-,229	1				
Karaciğerde Histopatolojik Skorlama	-,085	-,568**	-,058	,566**	-,318*	,269	1			
0.gün Vücut ağırlığı	,087	-,073	-,042	,131	-,136	,148	-,072	1		
7.gün Vücut ağırlığı	-,037	,028	-,116	-,141	-,224	,000	,005	-,052	1	
14.gün Vücut ağırlığı	,009	-,009	-,024	-,061	-,079	-,080	,009	-,064	,119	1

$p < 0,05$ *, $p < 0,01$ ** anlamlılık düzeyini göstermektedir.

Parametreler arasındaki ilişkiler Tablo 6.3’de korelasyon kat sayıları ile birlikte yer almaktadır. Tablo 6.3’e göre:

TAK ile TOS arasında pozitif yönlü bir korelasyon görüldü ($p<0,01$)

OSİ ile TAK arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon görüldü ($p<0,01$).

OSİ ile TOS arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon görüldü ($p<0,01$).

Annexin V ile TAK ve TOS arasında pozitif yönlü bir korelasyon görüldü ($p<0,01$).

Annexin V ile karaciğer histopatolojik skora arasında negatif yönlü bir korelasyon görüldü ($p<0,05$).

Böbrekte glomerul mezengial matriks oranı ile OSI arasında pozitif yönde bir korelasyon görüldü ($p<0,05$).

Karaciğer histopatolojik skora ile TAK ($p<0,01$) ve Annexin arasında negatif yönde bir korelasyon görüldü ($p<0,05$).

Karaciğer histopatolojik skora ile OSI arasında pozitif yönde bir korelasyon görüldü ($p<0,01$).

7.TARTIŞMA

D vitamini bir hormon olarak kemik mineralizasyonu ve metabolizmasında, nöromüsküler fonksiyonlarda ve kalsiyum fosfor dengesinin düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir, Kutsal ve ark (93). Vitamin D'nin kalsiyuma bağlı etkilerinin yanında karsinogenez, immün fonksiyon, otoimmün hastalıklar ve kardiyovasküler hastalıklar üzerine kalsiyumdan bağımsız etkileri de vardır. Ayrıca vitamin D bileşiklerinin proliferasyon, diferansiasyon, apoptoz ve hücre döngüsü üzerine etkileri olduğu bilinmektedir, Sam ve Sitrin (94), Bennet ve ark (95).

Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü tüm çok hücreli canlıların normal gelişimi ve homeostazı için gerekli, doğal olarak oluşan bir hücre ölüm süreci olarak tanımlanmaktadır, Kannan ve Jain (96). 1,25(OH)₂D vitamini, apoptoz ilişkisi ile ilgili yapılan hücre kültürü çalışmalarında D vitamininin apoptotik ya da anti-apoptotik etkileri olduğu söylenmektedir. Apoptozu ölçmek amacıyla kullanılan Annexin V'in anti inflamatuvar ve antikoagülan özelliğe sahip, hücre proliferasyon prosesine dahil bir proteindir. Annexin V akciğer, böbrek, karaciğer ve iskelet kaslarında bulunabilir, Kaneko ve ark (118).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri ve antioksidanların arasında olan dengenin oksidanlardan yana kayması ile oluşmaktadır, Özben (103). Oksidatif stresin 100'den fazla hastalığa yol açtığı bilinmektedir ve bunların önlenmesinde antioksidan mekanizma önemli bir rol oynamaktadır. D vitaminin de antioksidan özellik gösterdiği düşünülmektedir. D vitamini izoformları olan 7-dehidrokolekalsiferol, kolekalsiferol, D₂ vitamini, ve kalsitriol lipid peroksidasyonunu düşürerek antioksidan özellik gösterebilmektedir, Nikooyeh ve Neyestani (104).

Aşırı oksidatif stres, hücreleri nekroz veya apoptoz yolu ile öldürebilir. Serbest radikaller özellikle de ROS'ların apoptozu başlatıcı oldukları düşünülmektedir. Ayrıca, çeşitli ajanlarla başlatılan apoptozda ROS'ların ani üretimi ve geçici ROS artışı gözlemlenebilmektedir, Özben (103).

Yapılan çalışmalarda genel olarak oksidatif stresteki artışın apoptozu neden olduğu ve antioksidanların bu olayı inhibe ettiği görülmüştür, Yücel ve ark (116).

Bu çalışmada 1,25(OH)₂D₃ vitaminin apopitoz ve oksidatif stres üzerine doza bağlı olarak değişen etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Balb/c türü 50 adet erkek farenin kullanıldığı bu çalışmada her grup 10 hayvandan oluşacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol grubu, Grup 2-5 çalışma grubu olarak tanımlandı. Grup 2 (0.5 µg/kg), Grup 3 (1 µg/kg), Grup 4 (5 µg/kg) ve Grup 5 (10 µg/kg)'e D₃ vitamini (Calcijex ampul) intraperitoneal olarak 14 gün boyunca haftada 3 kez uygulandı.

Çalışmada fare serumlarında; kalsiyum, TAK, TOS, OSİ, Annexin V ölçüldü. Histopatolojik olarak böbrekte glomerul mezengial matriks oranı, karaciğerde histopatolojik skorlama yapıldı. Ayrıca farelerin 0, 7 ve 14. günlerdeki vücut ağırlıkları ölçüldü.

Bizim çalışmamızda ise apopitoz seviyesinin değerlendirilmesi için ELİZA serum Annexin V kiti kullanıldı. Çıkan sonuçlarda Balb/c türü farelere uygulanan 1µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg kalsitrol dozlarında Annexin V değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde doz arttırımı ile düştüğü bulundu.

Byrne ve ark. Çalışmasında 1,25(OH)₂D₃'ün meme kanseri hücreleri, prostat kanseri, squamoz karsinoma, glioma ve diğer birçok hücrede hücrelerin apopitozuna etkisi olduğu gösterilmektedir, Byrne ve Welsh (97).

Thompson ve ark.'larının 2011 yılında yaptığı çalışmada osteokarsinom hücre hatları SaOS-2 ve 143B üzerinde 1, 10, 100, 1000 nM 1,25(OH)₂D₃'ün etkileri araştırılmıştır. Annexin V – FITC boyaması ile apopitoz araştırması yapılmış ve 100 nM 1,25(OH)₂D₃ tedavisinin apopitotik 143B hücrelerindeki apopitoz oranını anlamlı derecede arttırdığı bulunmuştur, Thompson ve ark (98).

Yapılan diğer bir çalışmada MCF-7 meme kanseri hücre hattına 1, 10, 100 nM 1,25(OH)₂D ve EB1089 D vitamini analogu uygulaması yapılmıştır. 1 nM EB1089 ve 100 nM 1,25(OH)₂D vitamini uygulaması ile 48 saat sonunda antiapopitotik protein olan Bcl-2 ekspresyonu azaldığı ve apopitozun indüklendiği gözlenmiştir, Campbell ve ark (99).

Ancak 2004 yılında Morales ve ark.'ları yaptığı çalışmada Sıçan osteosarkoma hücreleri (UMR 106) üzerinde 10nM 1,25(OH)₂D₃'ün erken apopitotik hücrelerinin yüzdesini 4 gün tedavi süresinden sonra % 20 ile % 60 arasında azalttığını göstermişlerdir. Ayrıca geç apopitotik/nekrotik hücrelerin popülasyonunu, Annexin V ve yüksek propidiumiodid boyası ile boyandığında, % 26 ila % 9 arasında azalttığı vurgulanmıştır. Araştırmada 1,25(OH)₂D₃'ün anti-apopitotik etkisi olduğu vurgulanmıştır. Ayrıca 2 gün 1,25(OH)₂D₃ tedavisi ile kaspaz 3'ün aktivitesi azalırken kaspaz 8 ve 9'un inhibe olduğu ve 24 saatlik 1,25(OH)₂D₃ tedavisinde ise Bcl-2 ekspresyonunun arttığı bulunmuştur, Morales ve ark (100).

Sergeev ve ark. larının 4 haftalık C57BL/6 farelerde yaptıkları çalışmada, farelere diyetle yüksek doz kalsiyum (%1.2), yüksek doz D vitamini (1000IU/kg) ve her ikisi aynı anda verilmiş. D vitamini ve kalsiyumun adipoz dokuda kalsiyum bağımlı apopitotik proteazlar, kalpain ve kaspaz 12 aktivasyonu yoluyla apopitozu indüklediği gösterilmiştir, Sergeev ve Song (119).

Gürpınar ve ark.'larının 2009 yılında diyabet modeli oluşturulmuş erkek Wistar sıçanları üzerinde oksidatif stres ve apopitoz arasındaki ilişkiyi anlamaya yönelik yaptığı çalışma sonunda sıçanlarda diyabete bağlı oksidatif stres artışı görülmüştür. Dokularda yapılan TUNEL immünokimyasal testi ile de deney gruplarında oksidatif strese bağlı artış nedeni ile dokularda apopitoz seviyesinin kontrol grubuna göre arttığı bulunmuştur, Gürpınar ve ark (117).

Kaneko ve ark.'larının yaptığı çalışmada, Annexin V serum konsantrasyonunun myokard infarktüsü olanlarda, kalp kapak hastalıklarında, akciğer hastalıkları ve böbrek hastalıklarında normal limitlerde (0,4 – 2,5 ng/ml) olduğu, ancak karaciğer hastalıkları ve travma durumlarında ise konsantrasyonunda çok az bir yükselme olduğu bulunmuştur, Kaneko ve ark (118).

Teorik olarak apopitozun başlangıcında serumda annexin V seviyesinin düşük, apoptozun artışıyla birlikte ise yükselme eğiliminde olduğu düşünülebilir, Tokatlı (101).

Bizim çalışmamızda annexin V seviyesinin düşük olması apoptozun başlangıç evresinde olması ile açıklanabilir. Çalışmamızda Annexin V ile TAK ve TOS değerleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulunmuştur. D vitamininin orta-yüksek ve yüksek dozlarında istatistik olarak anlamlı şekilde artan oksidatif stres ile Annexin V'in güçlü korelasyonu bize Annexin V'in apoptoz esnasındaki pro-inflamatuar aktivite gösterdiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda TAK değerlerinin kontrol grubu ve 0,5 µg/kg kalsitriol uygulanan grubun, 5µg/kg ve 10 µg/kg kalsitriol uygulanan grubun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bu çalışmanın sonucunda daha önce D vitamininin antioksidan özelliği açıklamaya çalışan araştırmaların aksine D vitamininin doza bağlı olarak TAK değerlerini düşürdüğü saptanmıştır.

Marie ve ark.'larının 2016 yılında yaptığı in vivo çalışmada insan umbilikal damar endotel hücrelerinde (HUVEC) 1,25(OH)₂D₃ vitamininin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlarda uygulanan 25nM 1,25(OH)₂D₃ vitamininin anlamlı bir şekilde ROS üretimini düşürerek ve GSH seviyelerini arttırarak oksidatif stresi düşürdüğü bulunmuştur, Marie ve Jain (105).

Hamden ve ark.'larının yaptığı çalışmada 1,25(OH)₂D₃ vitamininin diyabetik wistar ratların üzerine olan antioksidan özelliğine bakılmıştır. Yem içinde verilen 5000IU/kg 1,25(OH)₂D₃ takviyesinin sıçanlarda karaciğer ve böbrek dokusunda SOD, CAT ve GPX seviyeleri anlamlı derecede yüksek çıkmıştır. Ayrıca lipid peroksidasyonunu anlamlı derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir. Sonuç olarak 1,25(OH)₂D₃ vitamininin oksidatif stresi inhibe edebileceği düşünülmüştür, Hamden ve ark (106).

MCF-7 meme kanseri hücreleri kullanılarak yapılan çalışmada hücrelere 100nM kalsitriol verilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda MCF-7 hücrelerinde ROS üretiminde bir artış ve total GSH içeriklerinde bir azalma meydana gelmektedir. SOD, GPx ve KAT aktivitelerinde 1,25(OH)₂D₃ tedavisinden sonra artış gözlemlenmiştir, Marchionatti ve ark (107).

Ancak Koren ve ark.'larının yaptığı çalışmada ise 1,25(OH)₂D₃ (10 – 100nM) tedavisinden sonra MCF-7 hücrelerinin GSH içeriklerinde, katalazda ve GPx'te bir değişimi gözlenmediğini göstermiştir, Koren ve ark (108).

Bizim çalışmamızda ise TAK, TOS değerleri Erel tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntemle ölçüldü ve OSİ değerleri TAK VE TOS değerlerine bağlı olarak hesaplandı. Vücudun antioksidan/oksidan durumu, antioksidan enzimlerin aktivitesi ve antioksidan/oksidan moleküllerin konsantrasyonu ayrı şekillerde ölçülerek değerlendirilebilmekle beraber, genel antioksidan/oksidan durumu total antioksidan kapasite (TAK), Erel (90) ve total oksidan seviye (TOS), Erel (91) ölçümü ile daha kolay değerlendirilebilmektedir. OSI oksidatif stresi değerlendirirken TAK ve TOS'a göre daha anlamlı bir indekstir.

Çalışmamızda yüksek doz D vitamini grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek OSI değerlerinin bulunması D vitaminin yüksek dozlarda oksidan özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda istatistiksel olarak OSİ ve TAK değerleri arasında beklendiği gibi negatif yönde bir korelasyon ve OSİ ve TOS değerleri arasında da pozitif yönde bir korelasyon görülmüştür.

Vücutta en fazla bulunan mineral olan kalsiyum, çeşitli mekanizmalar içinde görev olarak düzenleyici rol oynamaktadır, Emekli (83). Ayrıca kalsiyumun apopitoz, hücre proliferasyonu ve diferansiasyonunun düzenlemesine katıldığı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir, Chen ve ark (109).

1,25(OH)₂D₃ vücutta kalsiyum seviyesinin düzenlenmesinden sorumludur, Leiben ve Carmelliet (110). Ancak, 1,25(OH)₂D₃'nin hiperkalsemiye yol açtığı çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir, El Abdaimi ve ark (111). Yüksek dozda D vitamini alınımı toksik etki göstermekte ve hiperkalsemiye neden olmaktadır. Hiperkalsemi yaygın ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden bir durum olarak tanımlanmaktadır, Kinder ve Stewart (112).

D vitaminin doz cevap ilişkisini araştıran çalışmalara bakıldığında Chen ve ark.'larının 2014 yılında yaptığı çalışmada C57BL/6 türü farelere D vitamini

analogları uygulanmıştır. Bu çalışmada pozitif kontrol olarak ise 2 µg/kg 1,25(OH)₂D₃ uygulaması 3 hafta süreyle yapılmıştır. deney grubunda hiperkalsemi görülmüştür ve farelerin vücut ağırlığını hiperkalsemik etkiye bağlı olarak azalmıştır, Chen ve ark (113).

Swami ve ark.'larının 2011 yılında yaptığı çalışmada 4 – 6 haftalık Nude farelerine meme kanseri hücresi olan MCF-7 hücre hatları enjekte ediliyor. Tedavi amacı ile 4 hafta boyunca çok düşük doz (0,025 µg), düşük doz (0,05 µg), ve yüksek doz (0,1 µg) kalsitriol tedavisi yapılıyor. Bu dozlardan 0,05 µg ve 0,1 µg'lık kalsitriol tedavisinde kalsiyum miktarlarında istatistiksel olarak anlamlı ufak bir artışa rastlanmıştır. Kontrol grubunun kalsiyum seviyeleri 9,5 ± 0,3 mg/dl, düşük doz (0,05 µg) kalsitriol tedavisi sonrası 10,9 ± 0,2 mg/dl ve yüksek doz (0,1 µg) kalsitriol tedavisi sonrası ise 11 ± 0,3 mg/dl olarak ölçülmüştür, Swami ve ark (114).

Ancak 2014 yılında Ajibade ve ark.'larını yaptığı çalışmada hibrit olarak oluşturulan 4 haftalık Tramp farelerine 14 hafta boyunca 20 µg/kg 1,25(OH)₂D₃ uygulanmıştır. Bu süre içinde kalsitriolün kalsiyum seviyelerinde ve vucüt ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadığı bulunmuştur, Ajibade ve ark (115).

Bizim çalışmamızda ise Balb/c türü farelere uygulanan kalsitriolün Ajibade ve ark'larının çalışmasında olduğu gibi kalsiyum düzeylerini değiştirmediği görülmüştür. Bu durum D vitamini uygulama süresinin kısa olmasına bağlanabilir.

Yapılan çalışmalarda hiperkalsemik etki nedeniyle farelerden kilo kaybı yaşanmıştır. Ancak bizim çalışmamızda D vitamini hiperkalsemik etkiye neden olmadığından farelerde kilo kaybı da görülmemiştir (Tablo 6.1).

Glomerüler bazal membran ve mezengial matriks oranları PAS boyası ile histopatolojik olarak incelendiğinde, Kontrol, düşük doz ve orta dozD vitamini uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı.

Orta-yüksek doz ve yüksek doz D vitamini uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde mezengial matrikste artış, bowman kapsülü pariyetal yaprak hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi, glomerüllerde hipertrofi gözlemlendi.Bu durum D vitaminin yüksek dozlarının böbrekte toksik etkiye sebep olduğu şeklinde yorumlanabilir.

Hematoksilen – Eozin boyaması ile yapılan karaciğerde histopatolojik skorlamasında yüksek doz D vitamini ($1,1\pm 0,57$) uygulanan grubun değerlerinde kontrol grubu ($0,3\pm 0,48$) değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlemlendi.

Kontrol, düşük doz D vitamini, düşük doz D vitamini uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmadı, doğal görünümde karaciğer parankimi gözlemlendi, hepatositler santral ven etrafında ışınal hücre kordonları tarzında izlendi ve sinüzoidler normal yapıda idi. Orta-yüksek doz ve yüksek doz D vitamini uygulanan gruba ait karaciğer kesitlerinde, karaciğer parankiminde hafif bir dejenerasyon gözlemlendi, hepatosit kordonlarının düzensizleştiği ve mononükleer hücre infiltrasyonunda hafif bir artış izlendi, sinüzoidlerde dilatasyon ve santral venin doğal yapısını kaybettiği gözlemlendi. Yine orta-yüksek ve yüksek D vitamini dozlarının karaciğerde histolojik yapıyı bozduğu söylenebilir.

Sonuç olarak; D vitamininin farklı dozlarının apoptoz ve oksidatif strese etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, orta-yüksek doz D vitamini ($5 \mu/kg$) uygulaması sonucu istatistiksel olarak anlamlı şekilde serumda TAK değerlerinin azaldığı, Anexin V değerinin düştüğü, Böbrekte glomerül mezengial matriks oranının yükseldiği gözlemlenmiştir. Bu bulgulara ilave olarak yüksek doz D vitamini ($10 \mu/kg$) uygulamasında OSI değerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldiği, karaciğerde histopatolojik olarak hasarlanmanın meydana geldiği görülmüştür.

Yüksek doz D vitamini ($10 \mu/kg$) kullanımı oksidatif stresi arttırmış, karaciğer ve böbrekte ciddi histopatolojik toksisite belirtilerine sebep olmuştur.

8.SONUÇ

Bu çalışmada 1,25(OH)₂D₃ vitaminin apopitoz ve oksidatif stres üzerine doza bağlı olarak değişen etkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Balb/c türü 50 adet erkek farenin kullanıldığı bu çalışmada; Grup 1 kontrol grubu olarak tanımlanmış, Grup 2 (0.5 µg/kg), Grup 3 (1 µg/kg), Grup 4 (5 µg/kg) ve Grup 5 (10 µg/kg)'e D₃ vitamini (Calcijex ampul) uygulanmıştır.

Çalışmada fare serumlarında; kalsiyum, TAK, TOS, OSI, Annexin V ölçülmüştür. Histopatolojik olarak böbrekte glomerul mezengial matriks oranı, karaciğerde histopatolojik skorlama yapılmış, ayrıca farelerin 0, 7 ve 14. günlerdeki vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

Balb/c türü farelere uygulanan 1µg/kg, 5 µg/kg, 10 µg/kg kalsitrol dozlarında Annexin V değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde doz arttırımı ile düştüğü bulunmuştur.

Annexin V ile TAK ve TOS değerleri arasında pozitif yönde güçlü korelasyon bulunmuştur.

TAK değerlerinin kontrol grubu ve 0,5 µg/kg kalsitriol uygulanan grubun, 5µg/kg ve 10 µg/kg kalsitriol uygulanan grubun değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olduğu bulunmuştur(p<0,05).

Bu çalışmanın sonucunda daha önce D vitamininin antioksidan özelliğini açıklamaya çalışan araştırmaların aksine D vitamininin doza bağlı olarak TAK değerlerini düşürdüğü saptanmıştır.

OSI oksidatif stresi değerlendirirken TAK ve TOS'a göre daha anlamlı bir indekstir

Çalışmamızda yüksek doz D vitamini grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek OSI değerlerinin bulunması D vitamininin yüksek dozlarda oksidan özellik gösterdiğini düşündürmektedir.

Ayrıca çalışmamızda istatistiksel olarak OSİ ve TAK değerleri arasında beklendiği gibi negatif yönde bir korelasyon ve OSİ ve TOS değerleri arasındada pozitif yönde bir korelasyon görülmüştür.

Balb/c türü farelere uygulanan kalsitriolün kalsiyum düzeylerini değiştirmedeği görülmüştür.

D vitamini hiperkalsemik etkiye neden olmadığından farelerde kilo kaybı da görülmemiştir.

Glomerüler bazal membran ve mezengial matriks oranları PAS boyası ile histopatolojik olarak incelendiğinde, Kontrol, düşük doz ve orta doz D vitamini uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde anormal bulgulara rastlanmamıştır.

Orta-yüksek doz ve yüksek doz D vitamini uygulanan gruba ait böbrek kesitlerinde mezengial matrikste artış, bowman kapsülü pariyetal yaprak hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi, glomerüllerde hipertrofi gözlenmiştir.

Hematoksilen – Eozin boyaması ile yapılan karaciğerde histopatolojik skorlamasında yüksek doz D vitamini ($1,1 \pm 0,57$) uygulanan grubun değerlerinde kontrol grubu ($0,3 \pm 0,48$) değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir yükselme gözlenmiştir.

Orta yüksek ($5 \mu/kg$) ve yüksek doz D vitamini ($10 \mu/kg$) kullanımı oksidatif stresi arttırmış, karaciğer ve böbrekte ciddi histopatolojik toksisite belirtilerine sebep olmuştur.

9.KAYNAKLAR

- 1- Holick MF. McCollum award lecture, 1994: vitamin D-new horizons for the 21st century. *Am J Clin Nutr.* 60:619-630, 1994.
- 2- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancer and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 80(6):1678- 1688, 2004.
- 3- Goltzman D. Vitamin D action. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1192(2010):145-152, 2010.
- 4- Altunkaynak BZ, Özgen E. Programlanmış hücre ölümü: apopitoz nedir?. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 6(2): 93-104, 2008.
- 5- Öztürk F. Apopitoz. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 9(2): 143-148, 2002.
- 6- Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *J Clin Pathol.* 53: 55-63, 2000.
- 7- Preiser JC. Oxidative stress. *Jpen J Parenter Enteral Nutr.* 36(2):147-154, 2012.
- 8- Fidan F, Meryem B, Tosun A. Çağın pandemisi: D vitamini eksikliği ve yetersizliği. *Türk Osteoporoz Dergisi.* 20: 71-4, 2014.
- 9- Emekli, N. *Temel ve Uygulamalı Biyokimya* p.47-50, Marmara Yayınları. İstanbul, 2006.
- 10- Chen TC. Vitamin D autocrine system and prostate cancer prevention and treatment. R.R. Watson (ed.), *Handbook of vitamin D in human health: Prevention, treatment and toxicity*, Human Health Handbooks no. 4, Wageningen Academic Publishers 2013,
- 11- Vuolo L, Somma DC, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Frontiers in Endocrinology.* 3(58), 2012.
- 12- Akpınar P, İçağasıoğlu A. D vitamininin yaşam kalitesi ile ilişkisi. *Türk Osteoporoz Dergisi.* 18: 13-8, 2012.
- 13- Holick MF. Vitamin D deficiency. *N. Engl. J. Med.* 357: 266 – 281, 2007.
- 14- Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chemistry and Biology.* 21(3):319-329, 2014.
- 15- Donkena KV, Young CYF. Vitamin D, sunlight and prostate cancer risk. *Adv Prev Med.* 2011: 281863, 2011.

- 16- Özçelik DÇ, Koçer H, Kasım İ, Şencan İ, Kahveci R, Özkara A. D vitamini. Turkish Medical Journal. 6(2): 61-67, 2012.
- 17- Öngen B, Kabaroglu C, Parıldar Z. D vitamini'nin biyokimyasal ve laboratuvar değerlendirmesi. Türk Biyokimya Derneği Derg. 6(1): 23-31, 2008.
- 18- Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. Altern Med Rev. 10(2): 94-111, 2005.
- 19- Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. Ann Epidemiol. 19(2): 73-78, 2009.
- 20- Zempleni J. Handbook of vitamins. 4th ed. CRC Press. New York. 2008: 608.
- 21- Nakanishi T, Saito R, Taniguchi M, Oda H, Soma A, Yasunaga M et al. In vivo determination of vitamin D function using transgenic mice carrying a human osteocalcin luciferase reporter gene. BioMed Research International. 2013: 6 pages, 2013.
- 22- Shui IM, Mucci LA, Kraft P, Tamimi R, Lindstorm S, Penny K et al. Vitamin D-related genetic variation, plasma vitamin D and risk of lethal prostate cancer: a prospective nested case-control study. J Natl Cancer Inst. 104: 690-699, 2012.
- 23- Chow EC, Quach HP, Pang KS. Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃, vitamin D receptor target genes, and calcium and PTH levels after 1,25(OH)₂D₃ treatment mice. Am J Physiol Endocrinol Metab. 304(9): 977-989, 2013
- 24- Bhan I. Vitamin D binding protein and bone health. International Journal of Endocrinology. 2014: 5 pages, 2014.
- 25- Ying HQ, Sun HL, He BS, Pan YQ, Wang F, Deng QW et al. Circulating vitamin D binding protein, total, free, and bioavailable 25-hydroxyvitamin D and colorectal cancer. Scientific Reports. 5: 7956, 2015.
- 26- Akkoyun HT, Bayramoğlu M, Ekin S, Çelebi F. D vitamini ve metabolizma için önemi. Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 9(3): 213-219, 2014.
- 27- Özkorkmaz EG. Vitamin D ve biyolojik önemi. Biyolojik Birimleri Araştırma Dergisi. 2(2):11-15, 2009.
- 28- Naqpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic action of vitamin D receptor ligands. Endocr Rev. 26(5): 662-687, 2005.

- 29- Dowd DR, McDonald PN. The molecular biology of the vitamin D receptor. Humana Press. 135-152, 2010.
- 30- Morris HA. Vitamin D activities for health outcomes. Ann Lab Med. 34(3): 181-186, 2014.
- 31- Boron D, Kaminski A, Kotrych D, Bogacz A, Uzar I, Mrozikiewicz PM, Czerny B. Polymorphism of vitamin D₃ receptor and its relation to mineral bone density in premenopausal women. Osteoporos Int. 26(3): 1045- 1053, 2015.
- 32- Yavuz D, Mete T, Yavuz R, Altunoğlu A. D vitamini, kalsiyum ve mineral metabolizması, D vitamininin iskelete dışı etkileri ve kronik böbrek yetmezliğinden nutrisyonel D vitamini kullanımı. Ankara Med J. 14(4): 162-171, 2014.
- 33- Uçar F, Taşlıpınar MY, Soydaş A, zcan N. Ankara etlik ihtisas ve eğitim araştırma hastanesine başvuran hastalarda 25- (OH) vitamin D düzeyleri. Eur J Basic Med Sci. 2(1):12-15, 2012.
- 34- Lips P. Vitamin D physiology. Prog Biophys Mol Bio. 92(1):4-8, 2006.
- 35- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincotts illustrated reviews; Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, 2007.
- 36- Mutlu GY, Hatun ř. Perinatal D vitamini yetersizliği. ocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 54: 87-98, 2011.
- 37- Kibar AE, Arhan E, zaydın E, Kılıç G, akır B, etinkaya E, Köse G. D vitamini intoksikasyonuna bağlı hiperkalsemi. Yeni Tıp Dergisi. 24: 120-122, 2007.
- 38- Samur EG. Vitaminler, Mineraller ve Sağlığımız p.3-5, T.C. Sağlık Bakanlığı Yayınları, Ankara, 2006.
- 39- Ulukaya E, Apoptosiz ders notları. www20.uludag.edu.tr/~eulukaya. Erişim tarihi 30.08.2016.
- 40- Yazıcı P, Alizadehshargh S, Akdoğan GG. Apoptoz: düzenleyici moleküller, hastalıklarla ilişkisi ve apoptozu saptama yöntemleri. Türkiye Klinikleri J Med Sci. 29(6): 1677-1686, 2009.
- 41- Elmore L. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 35(4), 495-516, 2007.
- 42- Sperandio S, Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. PNAS. 97(26), 14376-14381, 2000.

- 43- Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı ya da yokluğu bir hastalık nedeni. Klinik Gelişim, 22 (3): 20-25, 2009.
- 44- Çoşku G, Özgür H. Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. Archives Medical Review Journal. 20(3): 145-158, 2011.
- 45- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 37(11): 719-727, 2005.
- 46- Sergeev IN. Calcium as a mediator of 1,25 dihydroxyvitamin D₃ induced apoptosis. J Steroid Biochem Mol Biol. 89-90(1-5): 419-425, 2004.
- 47- Tordjmann T. Calcium signaling. Signaling Pathways in Liver Diseases. Springer Berlin Heidelberg, 2010. 455-464.
- 48- Sergeev IN. Calcium signaling in cancer and vitamin D. J Steroid Biochem Mol Biol. 97(1-2): 145-151, 2005.
- 49- Sergeev IN. Vitamin D mediated apoptosis in cancer and obesity. Horm Mol Biol Clin Investig. 20(2): 43-49, 2014.
- 50- Deeb KK, Trump DL, Johnson DL. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nat Rev Cancer. 7(9): 684-700, 2007.
- 51- Tas F, Karabulut S, Yıldız İ, Duranyıldız D. Clinical significance of serum M30 and M65 levels in patients with breast cancer. Biomedicine and Pharmacother. 68(2014):1135-1140, 2014.
- 52- Ueno T, Toi M, Linder S. Detection of epithelial cell death in the body by cytokeratin 18 measurement. Biomed Pharmacother. 59(2): 359-362, 2005.
- 53- Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. Science. 279: 514-519, 1998.
- 54- Ditzel HJ, Strik MC, Larsen MK, Willis AC, Waseem A, Kejlving K et al. Cancer-associated cleavage of cytokeratin 8/18 heterotypic complexes exposes a neopeptide in human adenocarcinomas. J Biol Chem. 277: 21712-21722, 2002.
- 55- Schutte B, Henfling M, Kölgen W, Bouman M, Meex S, Leers MP et al. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. Exp Cell Res. 297(1): 11-26, 2004.
- 56- Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008(2):73-78, 2008.

- 57- Tilborg GAFV, Mulder WJM, Deckers N, Strom G, Reutelingsperger CPM, Strijkers GJ et al. Annexin A5-functionalized biomode lipid-based contrast agents for the detection of apoptosis. *Bioconjugate Chem.* 17(3):741-749, 2006.
- 58- Akar U, Chaves-Reyes A, Barria M, Tari A, Sanguino A, Kondo Y et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Autophagy.* 4(5):669-679, 2008.
- 59- Fearon IM, Faux SP. Oxidative stress and cardiovascular disease: novel tools give (free) radical insight. *J Mol Cell Cardiol.* 47:372-81, 2009.
- 60- Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem* 38:1103-11, 2005.
- 61- Işık A, Selek Ş. Total Antioxidant Response and Oxidative Stress in Patients with Rheumatoid Arthritis. *F. Ü. Sağ. Bil. Derg* 21(2):67-73, 2007.
- 62- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *YYU Vet Fak Derg.* 15(1-2):91-96, 2004.
- 63- Ögüt S, Atay E. Yaşlılık ve oksidatif stres. *S.D.Ü Tıp Fak. Derg.* 19(2):68-74, 2012.
- 64- Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. *Tıp Araştırmaları Dergisi.* 9(1):73-83, 2011.
- 65- Atmaca E, Aksoy A. Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. *YYU Vet Fak Derg.* 20(2):79-83, 2009.
- 66- Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif stres ve antioksidanlar. *E.Ü. Journal of Health Sciences.* 9(1):49-53, 2000.
- 67- Antmen EŞ. Beta talasemide oksidatif stres. *T.C.Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD. YLTezi. Adana, 2005.*
- 68- Büyüksu N, Yiğitbaşı T. Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *MÜSBED.* 5(3): 197-203, 2015.
- 69- Köksal E, Gülçin İ. Antioxidant activity of cauliflower (*brassica oleracea* l.). *Turk J Agric For.* 32:65-78, 2008.
- 70- Büyüksu N, Çelik Ö, Atak Ç. The effect of magnetic field on the activity of superoxide dismutase. *Journal of Cell and Molecular Biology.* 5:57-62, 2006.
- 71- Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klin Gelis.* 11: 342-6, 1998.

- 72- Simsek F. Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipit peroksidasyonu. T Klin Pediatri. 8:42-7,1999.
- 73- Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase, and glutathion peroxidase in cultured cells and tissue. Nat Protoc. 5(1):51-66, 2010.
- 74- Çimen Ç, Öter Ç, Demir H, Savran A. Rat eritrositlerinden elde edilen katalaz enziminin karakterizasyonu ve kinetiğinin incelenmesi. YYÜ Vet Fak Derg. 16(1):15-20, 2005.
- 75- Derviş E. Oral antioksidanlar. Dermatoz. 2(1):263-267, 2011.
- 76- Dixon KM, Mason RS. Vitamin D. The International Journal of Biochemistry and cell Biology. 41(2009):982-985, 2009.
- 77- Bustamante J1, Guerra L, Bredeston L, Mordoh J, Boveris A. Melanin content and hydroperoxide metabolism in human melanoma cells. Exp Cell Res 196(2):172-6,1991.
- 78- Tuma DJ1. Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. Free Radic Biol Med 32(4):303-8,2002.
- 79- Psotová J1, Zahálková J, Hrbác J, Simánek V, Bartek J. Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub 145(2):81-3,2001.
- 80- De Almeida JP, Liberatti LS, Barros FE, Kallaur AP, Lozovoy MA, Scavuzzi BM et al. Profile of oxidative stress markers is dependent on vitamin D levels in patient with chronic hepatitis c. Nutrition. 32(3):362-367, 2016.
- 81- Salum E, Kals J, Kampus P, Salum T, Zilmer K, Aunapuu M et al. Vitamin D reduces deposition of advanced glycation end-products in the aortic wall and systemic oxidative stress in diabetic rats. Diabetes Research and Clinical Practice. 100(2013):243-249, 2013.
- 82- Weaver CM. Calcium. Adv Nutr. 2(3):290-292, 2011.
- 83- Emekli N, Temel ve Uygulamalı Biyokimya p.66-70, Marmara Yayınları. İstanbul, 2006.
- 84- Pakkala S, de Vos S, Elstner E, Rude RK, Uskokovic M, Binderup L et al. Vitamin D₃ analogs: effect on leukemic clonal growth and differentiation, and on serum calcium levels. Leuk Res. 19(1):65-72, 1995.
- 85- Şahin A. Klinik laboratuvar testleri. p.471-474, İstanbul 2012.

- 86- Souli E, Machluf M, Morgenstern A, Sabo E, Yannai S. Indole-3-carbinol exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 46:863-870, 2008
- 87- Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Horst R, Arbertelli MA, Feldman D. Dietary vitamin D₃ and 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer. *Endocrinology*. 153(6):2576-2587, 2012.
- 88- Lim JHJ, Ravikumar S, Wang YM, Thamboo TP, Ong L, Chen J et al. Biomodal influence of vitamin D in host response to systemic *Candida* infection vitamin D dose matters. *Journal of Infectious Disease*. Jiv 033, 2015.
- 89- Raj L, Azar S, Keane W. Mesangial immun injury hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int*. 26(2):134-47, 1984.
- 90- Abu-Amara M, Yang SY, Quaglia A, Rowley P, Tapuria N, Seifaliam AM et al. Effect of remote ischemic preconditioning on liver ischemia/reperfusion injury using a new mouse model. *Liver Transpl*. 17(1):70-82, 2011.
- 91- Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 37:277-285, 2004.
- 92- Erel Ö. A novel automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochemistry*. 38:1103-1111, 2005.
- 93- Kutsal GY, Özgüçlü E, Karahan S. Postmenopozal osteoporotik kadınlarda giyim Tercihlerinin D vitamini ve kemik mineral dansiteleri üzerine etkisi. *Türk Osteoporoz Dergisi*. 17:85-88, 2011.
- 94- Sam S, Sitrin MD. Vitamin D's role in cell proliferation and differentiation. *Nutrition Reviews*. 66(2):116-124, 2008.
- 95- Bennett K, Frisby BN, Young LE, Murray D. Vitamin D: an examination of physician and patient management of health and uncertainty. *Qual Health Res*. 24(3): 375-386, 2014.
- 96- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology*. 7(3):153-163, 200.

- 97- Byrne B, Welsh J. Identification of novel mediators of vitamin D signaling and $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ resistance in mammary cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 103(3-5):703-707, 2007.
- 98- Thompson L, Wang S, Tawfik O, Templeton K, Tancabelic K, Pinson D et al. Effect of 25-hydroxyvitamin D₃ and $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D₃ on differentiation and apoptosis of human osteosarcoma cell lines. *Journal of Orthopaedic Research*. 2012.
- 99- Campbell MS, Narvaez CJ, Vanweelden K, Tenniswood M, Welsh JE. Comparative effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ and EB1089 on cell cycle kinetics and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*. 42(1):31-41, 1997.
- 100- Morales O, Samuelsson MKR, Lindgren U, Haldosen LA. Effects of $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D₃ and growth hormone on apoptosis and proliferation in UMR 106 osteoblast like cells. *Endocrinology*. 145(1):87-94, 2004.
- 101- Tokatlı A., Koroner Aterosklerozlu Hastalarda Apoptozisi Gösteren Belirteçlerin Klinik Biyokimyasal ve Anjiyografik Parametrelerle İlişkisi. GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Kardiyoloji Servis Şefliği, Uzmanlık Tezi, s.49, İstanbul, 2010.
- 102- Eröz R, Karataş A, Alkoç OA, Baltacı D, Oktay O, Çolakoğlu S. Apoptozis hakkında bilinenler (literatür taraması). *Düzce Tıp Dergisi*. 14(2):87-101, 2012.
- 103- Özben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *J Pharm Sci*. 96(9):2181-2196, 2007.
- 104- Nikooyeh B, Neyestani TR. Oxidative stress, type 2 diabetes and vitamin D: past, present and future. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*. 32(3):260-267, 2016.
- 105- Marie PK, Jain SK. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibits oxidative stress and monocyte adhesion by mediating the upregulation of GLCC and GSH in endothelial cells treated with acetoacetate(ketosis). *J Steroid Biochem. Mol. Biol*. 159:94-101, 2016.
- 106- 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)*. 55(3):215-222, 2009.

- 107- Marchionatti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh J, Talamoni NG. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)₂D₃ on breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 113(3-5):227-232, 2009.
- 108- Koren R, Hadari-Naor I, Zuck E, Rotem C, Liberman UA, Ravid A. Vitamin D prooxidant in breast cancer cells. *Cancer Res.* 61(4):1439-1444, 2001.
- 109- Chen P, Hu P, Xie D, Qin Y, Wang F, Wang H. Meta analysis of vitamin D, calcium and the prevention of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 121(2):469-477, 2010.
- 110- Lieben L, Carmelliet G. The delicate balance between vitamin D, calcium and bone homeostasis: lessons learned from intestinal and osteocyte-specific VDR null mice. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 136:102-106, 2013.
- 111- El Abdaimi K, Papavasiliou V, Rabbani SA, Rhim JS, Goltzman D, Kremer R. Reversal of hypercalcemia with vitamin D analogue EB1089 in a human model of squamous cancer. *Cancer Res.* 59(14):3325-3328, 1999.
- 112- Kinder BK, Stewart AF. Hypercalcemia. *Current Problems in Surgery.* 39(4):349-448, 2002.
- 113- Chen J, Wang J, Kim TK, Tieu EW, Tang EK, Lin Z et al. Novel vitamin D analogs as potential therapeutics: metabolism, toxicity profiling, and antiproliferative activity. *Anticancer Res.* 34(5):2153-2163, 2014.
- 114- Swami S, Krishnan AV, Wang JY, Jensen K, Peng L, Albertelli MA et al. Inhibitory effects of calcitriol on the growth of MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice: selective modulation of aromatase expression in vivo. *Horm Cancer.* 2(3):190-202, 2011.
- 115- Ajibade AA, Kirk JS, Karasik E, Gillard B, Moser MT, Johnson CS et al. Early growth inhibition is followed by increased metastatic disease with vitamin D (calcitriol) treatment in the TRAMP model of prostate cancer. *PloS One.* 9(2), 2014.
- 116- Yücel D, Şeneş M, Topkaya BÇ, Zengi O. Oxidative/Nitrosative stress in chronic heart failure. *Türk Biyokimya Dergisi.* 31(2):86-95, 2006.
- 117- Gürpınar T, Ekerbiçer N, Uysal N, Barut T, Tarakçı F, Tuğlu Mİ. The histologic evaluation of atorvastatin and melatonin treatment on oxidative stress and

apoptosis of diabetic rat pancreas. Kafkas Uni Vet Fak Derg. 16(4):547-552, 2009.

118- Kaneko N, Matsuda R, Hosoda S, Kajita T, Ohta Y. Measurement of plasma annexin V by ELISA in the early detection of acute myocardial infarction. Clinica Chimica Acta. 251(1996):65-80, 1996.

119- Sergeev IN, Song Q. High vitamin D and calcium intakes reduce diet-induced obesity in mice by increasing adipose tissue apoptosis. Mol. Nutr. Food Res. 58: 1342-1348, 2014.



10.ETİK KURUL ONAYI



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI
E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.710
Konu : Etik Kurulu Kararı

14/01/2016

Sayın Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “1,25(OH)₂D₃'ün Prostat Kanseri Üzerine Doza Bağlı Etkileri” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 14.01.2016 tarihinde e-imzalanmıştır.
Doğrulama Kodu: <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentViewer.aspx?Code=951722B1X6>



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
13/01/2016	05		Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

“1,25(OH) ₂ D ₃ 'ün Prostat Kanseri Üzerine Doza Bağlı Etkileri” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Ülkan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.12050
Konu : Etik Kurulu Hk.

29/07/2016

Sayın Doç. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 13/01/2016 tarihli 05 karar no ile onay verdiği “1,25(OH)₂D₃'ün Prostat Kanseri Üzerine Doza Bağlı Etkileri” isimli çalışmanın başlığı “1,25 D₃ Vitamininin Apoptoz ve Oksidatif Stres Üzerine Doza Bağlı Etkileri” olarak değiştirilmesi talebiniz uygun bulunmuş olup, kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYЕК) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Doc. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 29.07.2016 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 20F9BCD8X4 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto: bilgi@medipol.edu.tr)

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Çağrı	Soyadı	Çakıcı
Doğum Yeri	Edirne	Doğum Tarihi	06.12.1988
Uyruğu	Türk	TC Kimlik No	18644746246
E-mail	cagriicakici@gmail.com	Tel	506-874-9756

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Trakya Üniversitesi / Fen Fakültesi / Kimya	2012
Lise	Babaeski Anadolu Lisesi	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Kimyasal Analiz Laboratuvarı/Stajyer	Edirne Yağ Sanayi (OLİN)	06.2010-08.2010
Biyokimya Laboratuvarı / Asistan	İstanbul Medipol Üniversitesi/Biyokimya ABD	02.2015-09.2015
Kimyager	İstanbul Medipol Üniversitesi/ Biyokimya ABD	09.2015-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	63	60	62

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2015
İstanbul Medipol Üniversitesi	Pratik İstatistik Kursu SPSS	2016
University of Waterloo/Renison University College	Advanced Level İngilizce Sertifikası	2014
Trakya Üniversitesi	GMP(Good Manufacturing Practices)	2010