

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

**DENEYSEL DİYABETİK RAT MODELİNDE RETİNAL
DOKUDA KOLEKALSİFEROL'ÜN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Seda LİMAN UZUN

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üy. Onur ÇATAK

ELAZIĞ

2018

DEKANLIK ONAYI

Prof. Dr. Ahmet KAZEZ

DEKAN

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Fatma Ülkü ÇELİKER

Göz Hastalıkları Anabilim Dalı

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

Dr. Öğr. Üy. Onur ÇATAK _____ Danışman

Uzmanlık Sınavı Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....

.....

TEŞEKKÜR

İhtisasım boyunca iyi bir eğitim almamı sağlayan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Ülkü ÇELİKER, Sn. Prof. Dr. Orhan AYDEMİR, Sn. Prof. Dr. Tamer DEMİR, Sn. Doç. Dr. Burak TURGUT, Dr. Öğr. Üy. Mehmet BALBABA ve Sn. Dr. Öğr. Üy. Onur ÇATAK başta olmak üzere eğitimimde emeği geçen tüm öğretim üyelerine en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalışmama katkılarını esirgemeyen Sn. Dr. Öğr. Üy. Tuncay KULOĞLU ve Sn. Prof. Dr. Süleyman AYDIN' a ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Asistanlık sürem boyunca birlikte çalıştığım kliniğimiz personellerine ve asistan doktor arkadaşlarıma teşekkür ederim.

*Bu çalışma Fırat Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

Diyabetik retinopati en yaygın diyabet komplikasyonlarından biridir. Dünya genelinde çalışma yaşındaki erişkinlerde, önde gelen körlük nedenleri arasındadır. Diyabetin retinopati etkisini arttıran değişikliklerin patofizyolojisinde; oksidatif stres, apoptozis ve kontrolsüz vasküler proliferasyon yer almaktadır.

Bu çalışmanın amacı; streptozotosin ile deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratların retina dokusunda VEGF, TRPM2, PCNA immünreaktivitelerini, apoptozisi ve oksidatif stres düzeylerini incelemek ve Kolekalsiferol'ün bu parametreler üzerine etkisini araştırmaktır.

Çalışmada 41 adet, 8-10 haftalık, Wistar Albino cinsi erkek ratlar rastgele seçilerek beş gruba ayrıldı. Deney hayvanları grup I, II ve III'te 7'şer tane; grup IV ve V'te 10'ar tane olacak şekilde ayrıldı. Kontrol grubuna (grup I) 10 haftalık deney süresince herhangi bir uygulama yapılmadı. Sitrata tampon grubundaki (grup II) ratlara deney başlangıcında tek doz 0,1 M sodyum sitrat intraperitoneal olarak uygulandı. Kolekalsiferol grubundaki (grup III) ratlara deney süresince her gün 200 IU/gün kolekalsiferol oral yolla uygulandı. Grup IV ve V'te bulunan ratlara deney başlangıcında 60 mg/kg tek doz streptozotosin 0,1 M sodyum sitratta (pH:4,5) çözdürülerek intraperitoneal uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kanda, glikoz düzeyi 250 mg/dl'nin üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Diyabet grubuna (grup IV) herhangi bir tedavi uygulanmadı. Diyabet+Kolekalsiferol grubundaki (grup V) ratlara deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresince her gün oral kolekalsiferol 200 IU/gün uygulandı. On hafta sonunda anestezi altında dekapitasyon yapıp, gözler enükle edildi. Parafin bloklara gömülü doku kesitlerinden VEGF, PCNA ve TRPM2 için immünohistokimyasal boyama yöntemi kullanıldı ve TUNEL yöntemiyle apoptozise giden hücreler belirlendi. Boyamalarda immünreaktivitenin yaygınlığı ve şiddeti esas alınarak histoskorlama yapıldı. Serumdaki TAS ve TOS düzeyleri ELİSA yöntemiyle değerlendirildi.

Diyabet grubunda diğer gruplara göre TOS, VEGF, PCNA, TRPM2 ve apoptozis düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış; TAS düzeyinde ise azalma izlendi ($p<0.05$).

Diyabet grubu ile kıyaslandığında, diyabet+kolekalsiferol grubunda TAS düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı artma; TOS, VEGF, PCNA, TRPM2 düzeylerinde ve apoptotik hücrelerde ise azalma gözlemlendi ($p<0.05$).

Bu çalışma sonucunda deneysel diyabetin retina dokusunda apoptotik hücreleri, VEGF, PCNA ve TRPM2 seviyelerini arttırdığı; tedavi olarak verilen kolekalsiferolün bu parametreleri azalttığı görüldü. Diyabetin retina dokusunu etkilemesinin patofizyolojisinde VEGF'in yanı sıra TRPM2 ve PCNA'nın da önemli rol oynayabileceği kanaatine varıldı. Çalışmamızda kolekalsiferolün diyabetin retina üzerine etkilerini azaltabileceği kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Rat, Diyabetik retinopati, Kolekalsiferol, TRPM2, PCNA, VEGF

ABSTRACT

INVESTIGATION OF EFFECT OF CHOLECALCIFEROL ON RETINAL TISSUE IN EXPERIMENTAL DIABETIC RAT MODEL

Retinopathy is one of the most common complication of diabetes. It is among the leading causes of blindness in worldwide at working aged adults. In the pathophysiology of changes that increase the effect of diabetes on retinopathy; oxidative stress, apoptosis, and uncontrolled vascular proliferation.

The aim of this study is investigate the effects of VEGF, TRPM2, PCNA immunoreactivity, apoptosis and oxidative stress levels in retinal tissue at streptozotocin induced diabetic rats, also effect of cholecalciferol on this parameters. In the study, a total of 41, 8-10 weeks old male Wistar albino rats were randomly selected and divided into 5 groups. Experimental animals in groups I, II and III consisted of 7 rats; group I (Control group received no administration during the 10-week experiment), II (Citrate Buffer; single dose 0.1 M sodium citrate buffer i.p) and III (Vitamin D; 200 IU/day orally), with 10 animals in groups IV and V; group IV (Diabetes; i.p in single dose 60 mg/kg STZ 0.1 M sodium citrate buffer (pH:4.5) and V (Diabetes+Vitamin D; in a single dose 60 mg/kg STZ 0.1 M sodium citrate buffer (pH:4.5) and vitamin D 200 IU/day orally). After 72 hours, blood was obtained from the tail vein of the rat and whose glucose level is over 250 mg/dl is considered diabetic. After 10 weeks, after the decapitation, all eyes were enucleated. The VEGF, TRPM2 and PCNA of the retinal tissues were examined by immunohistochemical method by taking sections from the tissues embedded in paraffin blocks. The TUNEL method was used to the tissue sections to identify apoptosis progressing cells. Histocorrection was performed based on the prevalence and severity of immunoreactivity in the stain. Total oxidant and antioxidant capacity was analyzed in serum by ELISA method.

There was a statistically significant increase in TOS, VEGF, PCNA, TRPM2 and apoptosis levels in diabetes group compared to other groups; decrease in TAS level was observed ($p < 0.05$).

There was a statistically significant increase in TAS levels in the diabetes+cholecalciferol group when compared with the diabetes group; TOS, VEGF, PCNA, TRPM2 levels and apoptotic cells decreased ($p < 0.05$).

As a result of this study, experimental diabetes increased apoptotic cells, VEGF, PCNA and TRPM2 levels in retinal tissue; it has been observed that cholecalciferol given as a treatment has reduced these parameters. It has been concluded that TRPM2 and PCNA may play an important role in the pathophysiological mechanism of diabetic retina effect as well as VEGF. In our study, it was concluded that cholecalciferol could reduce the effects of diabetes on the retina.

Keywords: Rat, Diabetic retinopathy, Cholecalciferol, TRPM2, PCNA, VEGF



İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
DEKANLIK ONAYI	ii
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı	1
1.1.1. Retinanın Topografik Anatomisi	1
1.1.2. Retinanın Histolojik Katları	2
1.1.3. Retinanın Hücresel Yapısı	5
1.1.4. Retinanın Kanlanması	6
1.1.5. Kan- Retina Bariyeri	7
1.2. Diabetes Mellitus	7
1.3. Diyabetik Retinopati	8
1.3.1. Epidemiyoloji	9
1.3.2. Risk Faktörleri	10
1.3.3. Patogenez ve Klinik Bulgular	10
1.3.4. Sınıflandırma ve Komplikasyonlar	13
1.3.4.1. Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDP)	13
1.3.4.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR)	14
1.3.4.3. Diyabetik Makülopati	14
1.3.5. Diyabetik Retinopati Tedavisi	15
1.4. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	17
1.5. Transient Reseptör Potansiyeli (TRP) Kanalları	19
1.5.1. TRPM Kanalları	20
1.5.2. TRPM2 Kanalları	21

1.6. Apoptozis	23
1.7. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	24
1.7.1. Diyabet ve Oksidatif Stres	26
1.7.2. Total Oksidatif Stres (TOS)	28
1.7.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)	28
1.7.4. Antioksidanlar	29
1.8. Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)	30
1.9. Vitamin D	31
1.9.1. Vitamin D'nin Moleküler Yapısı ve Kaynakları	31
1.9.2. Vitamin D Metabolizması	32
1.9.3. Vitamin D Transportu ve Depolanması	33
1.9.4. Vitamin D'nin Etki Mekanizmaları	33
1.9.5. Vitamin D'nin Klasik Olmayan Etkileri	34
1.9.6. Vitamin D ve Oküler Hastalıklarla İlişkisi	35
1.9.7. Vitamin D ve Retina	36
1.9.8. Vitamin D ve Diyabetik Retinopati	36
1.9.9. Vitamin D Eksikliği ve Takviyesi	37
2. GEREÇ VE YÖNTEM	39
2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	39
2.2. Diyabet İndüksiyonu	39
2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması	39
2.4. Örneklerin Alınması	40
2.5. Biyokimyasal Çalışma	40
2.5.1. Kan glikoz düzeyleri	40
2.5.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Seviyesi Ölçümleri	41
2.5.2.1. TAS Ölçümü	41
2.5.2.2. TOS Ölçümü	41
2.6. Histolojik Çalışma	42
2.7. İmmünohistokimya	42
2.8. TUNEL Metodu	43
2.9. İstatistiksel Analiz	44

3. BULGULAR	45
3.1. Klinik Bulgular	45
3.2. Biyokimyasal Bulgular	45
3.2.1. Kan glikoz miktarları	45
3.2.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Düzeyleri	46
3.2.2.1. TAS Düzeyleri	46
3.2.2.2. TOS Düzeyleri	47
3.3. TUNEL Bulgular	48
3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	52
3.4.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi	52
3.4.3. PCNA İmmünreaktivitesi	59
4. TARTIŞMA	63
5. KAYNAKLAR	77
6. ÖZGEÇMİŞ	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Histolojik takip serileri	42
Tablo 2. TUNEL boyama prosedürü	47



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	TRP kanalları	20
Şekil 2.	TRPM iyon kanalları ve olası fizyolojik fonksiyonları	21
Şekil 3.	Vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edilen TRPM alt tipleri ve fizyolojik rolleri	21
Şekil 4.	TRPM2 kanalının moleküler yapısı	22
Şekil 5.	ADPR ve TRPM2 kanal aktivasyonu ile oksidatif stres arasındaki ilişki	23
Şekil 6.	Diyabetik retinopati ve oksidatif stres mekanizması	27
Şekil 7.	Poliol yolu aktivasyonu	28
Şekil 8.	Vitamin D'nin metabolizması	32
Şekil 9.	Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları	45
Şekil 10.	Deney hayvanlarının başlangıç ve final kan glikoz miktarları	46
Şekil 11.	Serum TAS düzeyleri	47
Şekil 12.	Serum TOS düzeyleri	48
Şekil 13.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler	49
Şekil 14.	Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler	49
Şekil 15.	Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler	50
Şekil 16.	DM grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler	50
Şekil 17.	DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler	51
Şekil 18.	Apoptotik İndeks	51
Şekil 19.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi	52
Şekil 20.	Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi	53
Şekil 21.	Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi	53
Şekil 22.	DM grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi	54
Şekil 23.	DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi	54
Şekil 24.	TRPM2 Histoskoru	55
Şekil 25.	Kontrol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi	56

Şekil 27.	Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi	57
Şekil 28.	DM grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi	57
Şekil 29.	DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi	58
Şekil 30.	VEGF Histoskoru	58
Şekil 32.	Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi	60
Şekil 33.	Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi	60
Şekil 34.	DM grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi	61
Şekil 35.	DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi	61
Şekil 36.	PCNA Histoskoru	62

KISALTMALAR LİSTESİ

ABTS	: Etil benzotiazolin sulfonik asit
AGE	: Advanced Glycolisylation Endproducts (İleri glikolizasyon ürünleri)
ADP	: Adenin dinükleotid fosfat
ADPR	: ADP riboz
AMP	: Adenozin monofosfat
Ca	: Kalsiyum
DAG	: Diaçilgliserol
DBP	: Vitamin D bağlayıcı protein
DHC	: Dehidrokolesterol
DM	: Diabetes Mellitus
DMÖ	: Diyabetik maküla ödemi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DR	: Diyabetik retinopati
DRS	: Diabetic Rethinopathy Study
DRVS	: Diabetic Rethinopathy Vitrectomy Study
EPO	: Eritropoetin
ETDRS	: Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study
FFA	: Fundus flöresein anjiyografi
FGF	: Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)
FÜBAP	: Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi
G6PD	: Glikoz- 6- Fosfat Dehidrogenaz
GSH	: Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HbA1c	: Hemogloblin A1c
HIF-1	: Hypoxia inducible factor (Hipoksinin indüklediği faktör)
IGF	: İnsülin like Growth Factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü)
IL	: İnterlökin
ILM	: İç limitan membran
İRMA	: İntraretinal mikrovasküler anomaliler

KAMÖ	: Klinik olarak anlamlı maküla ödemi
MDA	: Malondialdehit
MMP	: Matriks metalloproteinaz
MT	: Metallothionein
NAD	: Nikotinamid dinükleotid
NO	: Nitrik oksit
NPDR	: Non- proliferatif diyabetik retinopati
OCT	: Optical Cohrens Tomography
PAF	: Platelet aktive edici faktör
PARP	: ADP riboz polimeraz
PCNA	: Proliferatif hücre nükleer antijeni
PDGF	: Plasental Derivated Growth Factor
PDR	: Proliferatif diyabetik retinopati
PKC	: Protein kinaz C
PLC	: Fosfolipaz C
PTH	: Paratiroid hormon
PVR	: Proliferatif vitreoretinopati
RAS	: Renin anjiyotensin sistemi
ROS	: Reaktif oksijen türevleri
RPE	: Retina pigment epiteli
RXR	: Retinoid X reseptörü
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
STZ	: Streptozotosin
TAS	: Total antioksidan kapasitesi
TF	: Tissue Factor (Doku faktörü)
TGF-β	: Transforming Growth Factor β
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü α
TOS	: Total oksidatif stres
TRP	: Transient (geçici) reseptör potansiyeli
TRPM	: TRP Melastatin
UVB	: Ultraviyole B
VDR	: Vitamin D reseptörü

VEGF : Vascular endothelial growth factor
VEGFR : VEGF reseptörü
YBMD : Yaşa bağlı makula dejenerasyonu



1. GİRİŞ

1.1. Retinanın Anatomik ve Histolojik Yapısı

1.1.1. Retinanın Topografik Anatomisi

Retina (ağ tabaka), gözün sinir tabakası olup, globun arka dörtte üçlük iç yüzeyini örten saydam bir tabakadır. Optik sinirle birleştiği yer en kalın bölgesidir. Kalınlığı optik disk yakınında 0,56 mm, fovea kenarında 0,25 mm, ekvatorunda 0,18 mm ve ora serratada 0,11 mm'dir. En ince olduğu lokalizasyon olan foveadaki kalınlığı 0,1 mm'dir. Retinal yüzey alanının 1206 mm² olduğu hesap edilmektedir. Retinanın dış yüzeyi koroidin Bruch zarıyla, iç yüzeyi vitreusla temas halindedir.

Retina, embriyolojik olarak nöroektodermden köken alan iki tabakadan oluşur. Bunlardan dıştaki pigment epiteli katı, içteki ise duyuşal retinadır. Retinanın sensöryel kısmı optik sinirden siliyer cismin arkasına kadar uzanır. *Nörosensöryel retina*, görme yollarının üç önemli hücresi olan fotoreseptör hücreler, bipolar hücreler ve gangliyon hücrelerini içerir. *Retina pigment epiteli (RPE) tabakası*, altındaki koroid tabakasına yapışmış tek sıra altıgen şekilli hücrelerden oluşur. İki tabaka arasında potansiyel bir boşluk olan subretinal aralık bulunur. Nörosensöryel tabaka önde siliyer cismin pigmentsiz epitel hücrelerine, RPE tabakası ise siliyer cismin pigmentli epitel hücrelerine dönüşerek sonlanır. Retinanın sinir tabakasının bittiği ön kısmına *ora serrata* denir. Retina, pigment epiteline optik disk ve ora serratada sıkı yapışıklık gösterir.

Fovea (maküla lutea, sarı nokta), arka kutbun merkezinde 1,5 mm çapındaki alandır. Optik sinir başı merkezinin 4 mm temporalinde ve 0,8 mm aşağısında yer alır. Foveada ikinci ve üçüncü nöronların kenara doğru itilmesine bağlı olarak 22 derecelik klivus adlı bir çukurluk meydana gelir. Fovea, renkli ve keskin görmeyi sağlayan bir hücresel yapıya sahiptir. Fovea üzerinde kan damarları, rod ve mavi koni hücreleri bulunmaz; kırmızı ve yeşil koni konsantrasyonu ise en üst düzeydedir. Bu bölgedeki koniler birbirine paralel, retina yüzeyine dik bir şekilde dizilmişlerdir. Foveada ışık dağılımını azaltmak amacıyla iç nükleer kat, iç pleksiiform kat, gangliyon hücreleri ve sinir lifi katları bulunmaz. Sinir lifi tabakasının en kalın olduğu yer, foveanın nazalindeki papillomaküler demettir.

Foveola, merkezi fovea çöküntüsüdür ve kapiller damarları içermez. 0,4 mm'lik fovea damarsız bölgesi koryokapillaristen beslenir. Santral koni demetini çevreleyen foveola, 350 µm çap ve 150 µm kalınlığındadır.

Foveal alanı çevreleyen 0,5 mm genişliğindeki halkaya *parafovea* denir. Gangliyon hücresi, iç nükleer ve dış pleksiform tabakalarının en kalın olduğu bölümdür. Dış pleksiform katı Henle tabakasını bu bölgede oluşturur. *Henle tabakası*, parafoveolar bölgeden foveanın kenarına kadar paralel seyreden fotoreseptör liflerinin oluşturduğu yapıdır. Rodlar parafovea bölgesinde görülmeye başlar.

Parafoveayı çevreleyen, foveanın en dış kısmındaki 1,5 mm'lik halkasal alan *perifovea* bölgesidir. Gangliyon hücre tabakası tek sıraya düştüğünde sonlanır ve rod hücrelerinin yoğunluğu bu bölgede artar. Bu bölgeden sonra 3 mm genişliğindeki *orta çevresel alan* başlar.

İki temporal retina arteri arasında bulunan, 5,5 mm çaplı alana *maküla* (arka kutup, merkezi alan) denilmektedir. Retinanın sadece bu bölümünde birden fazla gangliyon hücre tabakası bulunur. Maküla sarı rengini, dış nükleer kattan içe doğru retina katlarında bulunan *ksantofil* isimli karotenoid pigmentinden alır. Ksantofil pigmenti foveadaki kromatik sapmayı önler, toksik olan mavi ışığı emer ve reaktif oksijen türlerini baskılar.

Fovea çapı (1,5 mm) + 2 x parafovea kalınlığı (2x0,5 mm) + 2 x perifovea kalınlığı (2x1,5 mm) = makula çapını oluşturur (5,5 mm).

Uzak çevresel alan, orta çevresel alandan temporalde 10 mm'ye, nazalde 16 mm'ye kadar uzanır, ardından ora serrata başlar. Dış sınırleyıcı zar öne doğru ilerleyerek pigmentli ve pigmentsiz siliyer epiteli birbirinden ayırır. Vitreus tabanının olduğu 4 mm'lik bölgede iç sınırleyıcı zar kalınlaşır. *Ora serrata*, foveadan sonra retinanın en ince olduğu bölgedir. Limbustan uzaklığı temporalde 7 mm, nazalde 6 mm'dir (1).

1.1.2. Retinanın Histolojik Katları

Retina, ışık mikroskopunda laminer yapıda izlenir, histolojik olarak dıştan içe doğru on kattan oluşur:

1. Pigment epiteli
2. Rod ve koniler
3. Dış limitan membran
4. Dış nükleer kat
5. Dış pleksiform kat
6. İç nükleer kat
7. İç pleksiform kat
8. Gangliyon hücreleri katı
9. Sinir lifi katı
10. İç limitan membran (İLM)

Retina pigment epiteli; nöroektodermal kökenli, altıgen şekilli, koroidin Bruch zarına yapışık tek sıra küboidal hücre tabakasıdır. Optik disk kenarından ora serrataya uzanır ve siliyer cismin pigmentli epiteli ile devamlılık gösterir. Hücre membranları bazal bölgede *zonula adherens*, apikal bölgede *zonula okludens* tipi bağlantılar kurarlar. Hücreler arasındaki bağlantıların sıkı olması, retina damarlarıyla birlikte, pigment epitelinin ikinci kan-retina bariyerini oluşturmasını sağlar. Sıkı bağlantılar, okludin ve klaudin gibi spesifik proteinlerden oluşmakta ve bariyer fonksiyonunun devamlılığını sağlamaktadır. Hücrelerin apikal kısmındaki villöz çıkıntılar, fotoreseptör hücrelerinin dış kısımlarını sarar ve aralarında bağlantı bulunmaz. RPE hücrelerinin apikal yüzeylerinde aktif Na-K pompası ve bazal membranlarında bikarbonat-klorid pompası bulunur ve negatif basıncın korunmasını sağlarlar. RPE hücrelerinde melanin granülleri ve lipofuskin pigmenti bulunur. *Melanin* serbest radikal stabilizatörü bir ajandır ve retinotoksik maddeleri de tutar. *Lipofuskin* fotoreseptör dış segmentlerinin tamamlanmamış fagositoz artığı olarak değerlendirilmektedir.

Retina pigment epitelinin işlevleri; dağılan ışığın absorpsiyonu, subretinal alandan sıvı transportu, fotoreseptör hücrelerinin dış segmentlerinin fagositozu, A vitamini depolanması ve salınımı, interfotoreseptör matriks sentezi ve hücre içine girip çıkacak olan materyallerin aktif geçişinin sağlanmasıdır. Ayrıca toksik ve oksidatif hasara karşı koruyucu görevi vardır ve kan-retina bariyerini oluşturur (2).

Bruch membranı, 7 μ kalınlığında koryokapillaris tabakasını retina pigment epitelinden ayıran koryokapillarisin bazal membranıdır ve kolajen yapıdadır.

Fotoreseptör hücreleri, gözün kırıcı ortamları tarafından yönlendirilen görüntüyü nöral sinyallere dönüştürerek görme olayını başlatan hücrelerdir. *Koniler ve basiller (rodlar)* olmak üzere iki tip fotoreseptör hücresi vardır. Rodların sayısı 110-125 milyon, konilerin sayısı ise 6,3-7 milyondur. Optik diskte rod ve koni yoktur, bu nedenle ışığa duyarsızdır.

Dış limitan membranda fotoreseptörlerin Müller hücreleriyle yaptığı bağlantılar bulunur, gerçek bir zar değildir. Optik diskin kenarında fotoreseptör dış segmentleriyle birlikte sonlanır.

Dış nükleer katta rod ve konilerin hücre gövdeleri bulunur. Çevresel retinal alanlarda bu katın kalınlığı ve çekirdek sayısı azalır.

Dış pleksiform tabaka rod ve koni hücrelerinin uzantıları, bipolar hücreler ve horizontal hücreler arasındaki sinapslardan oluşmaktadır. Retinanın birinci ve ikinci sıra nöronlarının sinaps yaptığı bölgedir. Işık mikroskopunda sinaptik yoğunluklar olarak görülen ve *orta sınırlayıcı zar* da denilen yapı, retina tarafından uzanan damarların uç sınırını oluşturur. Retinal dolaşımın sınırında kalan gevşek yapıdaki bu bölgede, kistik oluşumlar, eksuda ve hemorajiler birikme eğilimindedir.

İç nükleer katta horizontal, bipolar, amakrin, interpleksiform hücreler ve Müller hücrelerinin çekirdekleri yer alır. Foveada bu tabaka yoktur.

İç pleksiform tabakada bipolar ve gangliyon hücreleri sinaps yapar. Retinanın ikinci ve üçüncü sıra nöronlarının sinaptik bağlantı bölgesidir, retinal kan damarlarını içerir, foveolada bulunmaz.

Gangliyon hücre katı, çevresel retinada tek kat, maküla bölgesinde sekiz kat hücre çekirdeği bulundurulur. Bu tabaka foveolada kaybolur (3).

Korpus genikulatum lateralede sonlanan gangliyon hücre aksonları, optik diske uzanarak *sinir lifi tabakasını* (stratum optikum) oluştururlar. Normalde bu lifler lamina kribrozaya uzanincaya dek miyelin içermez ve aralarında glia hücresi bulunmaz. Bu tabakada bulunan astrosit, mikroglia ve oligodendrositler retinanın arter, ven ve kapillerleri çevresinde kümelenmişlerdir. Sinir lifi katı optik diskin üst temporal ve alt temporal kenarlarında kalındır.

İç limitan membran, retinadaki tek gerçek bazal membran yapısıdır. Müller hücrelerinin bazal zarından oluşmaktadır. Nöral retina ile vitreus arasında difüzyon bariyeri oluşturur. Fovea da dahil tüm retinal yüzeyi örter; önde siliyer epitel

üzerinde, arkada optik disk kenarında sonlanır. İçeriğinde laminin, fibronektin, tip I ve tip IV kolajen bulunmaktadır.

1.1.3. Retinanın Hücresel Yapısı

Retinada yaklaşık 1 milyon gangliyon hücresi bulunur ve her gangliyon hücresi başına 100 fotoreseptör hücresi düşer. Foveada rodlar bulunmaz, koniler ise en yüksek konsantrasyondadır. Koni pigmentleri ışık spektrumunun 419 nm (mavi), 531 nm (yeşil), 558 nm (kırmızı) dalga boylarındaki fotonları maksimum düzeyde absorbe ederler. Her üç koninin eşit oranda uyarılması beyaz ışık olarak algılanır.

Koniler aydınlıkta renk ayırımından ve keskin görmeden, basiller karanlıkta görmeden ve siyah/beyaz görüntü algılamadan sorumludurlar. Rodların, fotosensitif olan dış kısmı *rodopsin* proteinini içerirken, koniler *iyodopsin* içerir. Fotoreseptör hücrelerinin dış segmentleri görme pigmenti içeren diskleri taşıyan kısımdır, mukopolisakkarid yapıda bir örtüyle kaplıdır ve retina pigment epiteliyle temas halindedir. Fotoreseptörlerin iç segmentleri, dış segmentlere metabolik destek sağlamaktadır. Dış segment ile iç segment arasındaki bağlantıya silyum denir. İç segment hücre içi organellerin yerleştiği bölgedir, *elipsoid* ve *miyoid* bölümlerden oluşmaktadır. Elipsoid bölüm dış segmente yakındır ve mitokondri içerir, miyoid bölüm ise hücre gövdesinin yakınında ribozom, golgi kompleksi, vezikül ve vakuoller içermektedir. Protein sentezi miyoid bölümünde gerçekleşir. İç lif rodlarda *sferül*, konilerde *pedikül* adlı sinaptik genişlemelerle sonlanır ve bipolar hücrelerin dendritleriyle sinaps yapmalarını sağlar. Fotoreseptörler nörotransmitter olarak *glutamat* kullanırlar (4).

Bipolar hücreler, dendritleri dış pleksiform tabakada koni ve basillerle; aksonları iç pleksiform tabakada gangliyon ve amakrin hücreleriyle sinaps yapan hücrelerdir.

Gangliyon hücreleri multipolar hücrelerdir. Dendritleri bipolar hücreler ve amakrin hücreleriyle sinaps yapar. Optik sinir, gangliyon hücre uzantılarının bir araya gelmesiyle oluşmuştur. Lateral genikülat cisimdeki sonlanış yerine göre P (Parvoselüler, X hücreleri) ve M (Magnoselüler, Y hücreleri) gangliyon hücreleri mevcuttur. P tip hücreler keskin ve renkli görmeden sorumlu iken, M tip hücreler kaba hareketlerin, hareket ve ışık şiddetindeki değişimlerin, stereopsisin

algılanmasında görevlidirler. X hücreleri, uyarıldıkları sürece impuls oluştururlar. Y hücreleri ise geçici impuls yaratan gangliyon hücreleridir. W hücreleri, yavaş ileti yapar, hareketi fark etmeyi ve karanlıkta görmeyi sağlayan sinyalleri taşırlar. Fotoresptör gangliyon hücreleri ise suprakiazmatik çekirdeğe uzanırlar; pupilla boyutunun ayarlanması, melatonin salgılanması ve günlük ritmlerin ayarlanmasında rol alırlar (5).

Horizontal hücreler, basil ve konilerin terminal genişlemelerinin yakınında yer alan multipolar hücrelerdir. Horizontal hücrelerin görme stimulusunun integrasyonunda rol oynadıkları düşünülmektedir. *Amakrin hücreler*, gangliyon ve bipolar hücreleriyle sinaps yapar ve uyarıyı engelleyici yönde düzenleme yaparlar. Bu olaya lateral inhibisyon denir.

Nöral retinanın destekleyici glia hücreleri iki gruba ayrılır. *Makroglia* grubunda olan *Müller hücreleri* ve *astroitler* nöral krestten köken alırlar. *Mikroglia* hücreleri ise *damar endoteli* ve *perisitler* gibi mezoderm kökenlidir. Duyusal (nöral) retinadaki boşlukları Müller hücreleri doldurur, retina nöronları ve damar duvarları ile yakın ilişki içindedirler. Retinayı baştan başa kat ederek destek görevi görürler ve beslenmeye yardımcı olurlar. Müller glia hücreleri embriyogenezde, iç sınırlayıcı membran ve fotoresptör farklılaşmasına öncülük eder. Astroitler retinanın sadece iç katlarında bulunurlar. Mikroglia hücreleri, sinir lifi katından dış pleksiform kata kadar uzanırlar ve premaküler bölgedeki Henle katında bulunan tek glia hücreleridir.

1.1.4. Retinanın Kanlanması

Retina, vücuttaki birim doku ağırlığı başına en fazla oksijen tüketen dokudur ve iki kaynaktan kan desteği alır. *Arka siliyer arterler*, optik sinir çevresindeki sklerada anastomoz yaparlar. Dış pleksiform tabakaya kadar olan katlar; rodlar, koniler ve dış nükleer tabaka koroid kapillerlerinden doku sıvısı aracılığıyla beslenir. Dış pleksiform ve dış nükleer tabakalarda damar yapısı izlenmez. Retinanın üçte ikilik iç kısmının ise santral retinal arter ve ven ile dolaşımı sağlanır. *Santral retinal arter*, oftalmik arterin ilk dalıdır. Santral retinal arter disk içinde ya da üzerinde superior ve inferior dallarına ayrılır (6).

Retina arterleri uç arterler olup normal şartlarda arteriyovenöz anastomoza rastlanmaz. Bu nedenle damar tıkanıklıkları ciddi problemlerle seyreder. Retinal damarlar birbirine kapillerlerle bağlanır.

Arter dalları sinir lifi katında iç sınırlayıcı zara yakın seyir gösterir. Sadece prekapiller arteriyoller iç pleksiform kata kadar uzanır. Arteriyoller arasında da anastomoz yoktur ve yaygın bir kapiller ağ oluştururlar. Kapillerlerin duvarları deliksiz endotel hücrelerinden oluşur. Endotel bazal membranının altında perisitler bulunur. *Perisit hücreleri*, kontraktil özellikleriyle retinal dolaşımın otoregülasyonunda görev alırlar. Sağlıklı damarlarda her bir endotelyal hücreye bir adet perisit karşılık gelir.

Kapiller ağ, afferent arteriyol ve efferent venül arasında meydana gelir. Derin kapillerler iç nükleer tabakada, yüzeyel kapillerler ise sinir lifleri ve gangliyon hücre tabakaları arasında yer alırlar. Kapiller ağların en yoğun olduğu bölge maküladır, ancak foveada damar izlenmez. 250-350 µm genişliğindeki bu alan *foveal avasküler zon* olarak tanımlanır.

Santral retinal ven, santral retinal artere eşlik eder. Optik sinirde ven arterin lateralinde seyreder ve kavernoöz sinüse veya süperior oftalmik vene drene olur. Retinada lenf damarı bulunmaz (7).

1.1.5. Kan- Retina Bariyeri

1. Dış Kan-Retina Bariyeri: Retina pigment epiteli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur.
2. İç Kan-Retina Bariyeri: Retinal kapiller endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur.

Hücreler arası bağlantılar adezyon moleküllerini de içermektedir. Adezyon molekülleri hücreleri bağlamanın yanı sıra proteinler ve sinyal moleküllerinin aktarımını, kontakt inhibisyonla hücre büyümesini ve apoptozisin düzenlenmesini de sağlarlar (8).

1.2. Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), dünya genelinde milyonlarca insanın hayatını etkileyen epidemik bir sağlık sorunudur. Yapılan çalışmalarda 2011 yılında 366 milyonun üzerinde kişinin diyabet hastası olduğu bildirilmiştir (9). Diyabet

hastalığının görülme sıklığı artmakta ve 2050 yılında her üç kişiden birinde görülmesi beklenmektedir. Bu nedenle fiziksel, psikososyal ve finansal bir sorun haline gelmiştir.

Diabetes Mellitus endojen insülinin yokluğu, eksikliği veya dokulardaki etkisinin azalması sonucu ortaya çıkan kronik hiperglisemiyle seyreden progresif bir multisistem hastalığıdır. Karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozulmayla seyreder. Diyabet hastalarının %85-90'ını insuline bağımlı olmayan tip 2 grubu oluşturur. %10-15'i insuline bağımlı tip 1 grubundadır. Tip 1 diyabet genellikle 40 yaş altında tanı alır, ancak yaşlı hastalar da zamanla insuline bağımlı hale gelebilir.

Hastalığın seyri sırasında mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonlar gelişebilmektedir. Başlıca komplikasyonları damar endotelini direkt olarak etkilemesi ile böbrek, göz ve kalp üzerinedir. Diyabet komplikasyonları hastaların morbiditesinden ve erken ölümlerinden sorumludur. Akut komplikasyonları diyabetik ketoasidoz, nonketotik hiperosmolar koma, hipoglisemik koma ve laktik asidozdur. Kronik komplikasyonları ise mikrovasküler ve makrovasküler olarak incelenebilir. Diyabetik retinopati, nefropati, periferik simetrik polinöropati, otonom nöropatiler, mononöropatiler gibi nöropatiler mikrovasküler komplikasyonlar iken, koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, diyabetik ayak ve enfeksiyonlar makrovasküler komplikasyonlar olarak sıralanabilir.

Diyabetin neden olabildiği oküler komplikasyonlar; azalmış gözyaşı üretimi, üçüncü, dördüncü, altıncı kraniyal sinir paralizileri, korneada iyileşmeyen punktat epitelyopati, rubeosis iridis, neovasküler glokom, katarakt oluşumu, proliferatif retinopati, optik nöropati ve refraksiyon değişiklikleridir.

1.3. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati (DR) retinada kapillerlerin, venüllerin ve arteriyollerin etkilendiği mikroanjyopati ve buna eşlik eden bir nöropati tablosudur. DR, en yaygın görülen diyabet komplikasyonlarından biridir ve dünya genelinde çalışma yaşındaki erişkinlerde önde gelen körlük nedenleri arasındadır (10).

1.3.1. Epidemiyoloji

Dünya nüfusunun yaklaşık %2'si diyabetiktir, bunların %25'inde herhangi bir düzeyde DR izlenmekte ve bunun da %5'ini proliferatif DR (PDR) oluşturmaktadır. DR'nin prevalansı hastanın yaşı ve hastalık süresi ile ilişkilidir. DR, 5 yıl süresince diyabeti olanların %27'sinde, 10 yıldan uzun süre diyabeti olanların %71-90'ında izlenmektedir. Hastalığın başlangıcından 20 yıl sonra tip 1 diyabetli hastaların tamamında, tip 2 diyabetli hastaların ise %60'ından fazlasında DR bulgularına rastlanmaktadır. Bu nedenle tip 1 diyabette tanı konulduktan ortalama 4 yıl sonra, tip 2 diyabette ise hemen retinopatinin kontrol edilmesi gerekli görülmektedir (11).

Tip 1 diyabetli hastalarda tip 2'ye göre şiddetli retinopati gelişme riski daha yüksektir, ancak diyabet hastalarının yaklaşık %95'ini tip 2 hastalar oluşturduğundan, şiddetli retinopati gelişen olguların büyük kısmı bu gruptadır. PDR'nin prevalansı 15 yıllık tip 1 diyabetiklerde %50'dir, tip 2'de ise daha düşüktür. Diyabetik maküler ödem ise iki grupta da benzer oranlarda görülür.

Wisconsin Diyabetik Retinopati Epidemiyolojik Araştırması'nda, diyabetik hastalar 30 yaş altı ve üstü olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Otuz yaş altındaki diyabetiklerde; hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda %17, 15 yıldan fazla olanlarda %98 retinopati saptanmıştır (12). Otuz yaş üstünde diyabet tanısı alanlarda; insüline bağımlı olmayan grupta, hastalık süresi 5 yıldan az olanlarda %17-29, 15 yıldan fazla olanlarda %50-63 retinopati saptanmıştır. İnsüline bağımlı olan grupta ise 5 yıl altında retinopati oranı %40 iken, 15 yıl üstünde %85 olarak bildirilmiştir (13).

Diyabetik Retinopati Epidemiyolojisi Araştırma Grubu tarafından yapılan bir çalışmada, Türkiye'de diyabetik hastalarda DR prevalansı %30,5 olarak bildirilmiştir. Otuz yaş üstü diyabet tanısı olan tip 1 ve tip 2 diyabet hastalarında DR saptanma oranları sırasıyla; 0-4 yıl tanı süreli grupta %18,7 ve %9,7 iken, 15 yıldan uzun tanı süresi olanlarda %77,6 ve %57,1 olarak saptanmıştır (14).

Diyabetik hastalarda 10 yaş altında retinopati genellikle izlenmez, ancak puberte çağında büyüme hormonlarının etkisiyle retinopati gelişimi hızlanır. Tip 1 diyabette başlangıç yaşı ilerledikçe retinopati gelişim hızı da azalmaktadır. Yetmiş yaş üstü diyabetiklerde ise retinopati gelişimi nadiren görülür.

1.3.2. Risk Faktörleri

Tüm popülasyonlarda DR ile güçlü ve tutarlı bir şekilde ilişkilendirilen başlıca risk faktörleri; uzun diyabet süresi, kötü glisemik kontrol ve hipertansiyondur (15).

Diyabetin süresi, retinopati gelişimi için en önemli risk faktörüdür. Kontrolsüz diyabet, hipertansiyon, puberte, gebelik, nefropati, hiperlipidemi, obezite, sigara bağımlılığı, anemi ve geçirilmiş katarakt cerrahisi de DR progresyonunu hızlandıran diğer faktörlerdir.

Glokomlu ve miyopik gözlerde DR gelişiminin daha az olduğu gösterilmiştir (16). Retinitis Pigmentosa tanılı diyabet hastalarında, PDR gelişme riskinin azaldığı belirtilmiştir. Bunun azalan rod hücre sayısı nedeniyle enerji gerektiren metabolik reaksiyonların azalmasıyla ve oksidatif strese bağlı olarak üretilen reaktif oksijen radikallerinin birikiminde azalmayla ilişkili olduğu düşünülmüştür (17).

1.3.3. Patogenez ve Klinik Bulgular

Diyabetik retinopati; mikroanjyopati, enflamasyon ve nöroglial dejenerasyonla seyretmektedir. Vasküler patolojiler temel olarak uzamış hiperglisemiyle ilişkilendirilmiştir.

Kapiller hasarın gelişiminde; perisit ve düz kas hücrelerinin kaybı, bazal membranda kalınlaşma, endotel hücre proliferasyonunun artışı rol oynamaktadır. Ayrıca vasküler hücrelerin yapısının bozulması, hiperviskozite gelişimi ve trombosit adezyonunu arttıran faktörler kapiller disfonksiyon gelişiminden sorumludur. Kapiller yapının bozulması sonucu vasküler yatakta sızıntı ve tıkanıklıklar gelişir. Endotelyal hücre ve bağlantılarının hasarı, iç kan-retina bariyerinin de bozulmasına neden olur. Erken safhadaki diyabetik maküler ödemde, iç kan-retina bariyerindeki bozulma, dış kan-retina bariyerindeki bozulmadan daha baskın şekilde ortaya çıkar. Dış kan-retina bariyeri genellikle kronik dönemde hasar görmektedir.

Kapiller geçirgenlik artışının neden olduğu klinik bulgular; hemoraji, sert eksuda (serum lipoproteinleri) ve retina ödemidir. *Perisit kaybı*, retinopatinin en erken bulgusu olan mikroanevrizmaların gelişimine neden olur (18). Hemodinamik otoregülasyondaki bozulma sonucu venöz dilatasyon ve boğumlanmalar meydana gelir.

Kapiller tıkanıklıklar, retinal perfüzyonun bozulmasıyla hipoksi gelişimine neden olur. *Retinal iskemi*, anjiyogenik faktörler aracılığıyla neovaskülarizasyonu stimüle etmektedir. DR’de görülen neovasküler proliferasyondan sorumlu olan primer mediatörün Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olduğu düşünülmektedir. Retinal hipoksi klinik olarak; neovaskülarizasyon, arteriyovenöz şantlar (intraretinal mikrovasküler anomaliler-İRMA) ve yumuşak eksudalar (sinir liflerinin infarktı) ile kendini gösterir. *Neovaskülarizasyon*, iç retina katlarının iskemisine sekonder olarak, venöz endotelin proliferasyonu ile başlamakta ve optik disk/retina yüzeyi ile İLM arasında gelişmektedir. İleri evrelerde preretinal/intravitreal kanama, fibrozis, traksiyonel retina dekolmanı gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. Tüm bu patolojik bulguların yaygınlığı ve şiddeti DR’nin evresini belirlemektedir.

Hücre hasarının gelişiminde; hücre içi sorbitol birikimi, ileri glikolizasyon ürünlerinin birikimi, protein kinaz C (PKC) izoformlarının aktivasyonu, nitrik oksit seviyesinin artması, enflamasyon ve oksidatif stres gelişimiyle serbest oksijen radikallerinin açığa çıkması etkili bulunmuş metabolik yollardır.

Hipergliseminin hücre içinde *poliol (aldoz redüktaz) yolunu* aktive ettiği, oluşan sorbitolün hücre içi elektrolit imbalansı ve Na-K ATPaz pompasında bozukluğa yol açarak osmotik vasküler hasara neden olduğu düşünülmektedir.

Uzamış hiperglisemi hücre fonksiyonlarını düzenleyen genlerin de yapısını bozmaktadır. Hiperglisemiye maruz kalan vasküler dokularda, hücre içi glikoliz artar, bu da diaçilgliserol (DAG) sentezini artırır. DAG, PKC’nin aktivatörüdür. PKC, gen transkripsiyonu seviyesinde büyüme faktörleri ve vasküler permeabiliteyle ilişkili faktörleri regüle etmektedir. DAG ve PKC; endotelial hücre aktivasyonuna, vasküler geçirgenlik artışına, lökosit adezyonuna, düz kas hücrelerinin kontraksiyonuna, tümör büyüme faktörü- β (TGF- β), VEGF ve endotelin sentezine, hücre dışı matriks protein sentezinde artışa neden olan hücre içi moleküllerdir. Ayrıca histamin ve büyüme faktörleri sinyalizasyonunu da bozarlar.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarda PDR ve plazma eritropoetin (EPO) yüksekliğinin birlikteliği de ilişkili bulunmuştur. EPO, VEGF’ten bağımsız bir anjiyogenetik faktör olarak bildirilmiştir (19).

Glikozun proteinlerin amino gruplarına enzimatik olmayan yolla kimyasal olarak bağlanmasıyla *ileri glikolizasyon ürünlerinin* (AGE-Advanced Glycosylation Endproducts) oluşumu, proteinlerin yapı ve fonksiyonunu bozar. Parçalanmaya dirençli bu ürünler, transmembran reseptörlere bağlanıp hücre sinyalizasyonunu ve fonksiyonlarını değiştirir. Oluşan reseptör komplekslerinin oksidatif stres, PKC aktivasyonu ve enflamatuar sitokinlerin artışıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Üç aylık diyabetik kontrolün göstergesi olan *Hemoglobin-A1c*, bu mekanizmayla oluşmaktadır.

Kallikrein-kinin sisteminin de DR patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir. DR’de karbonik anhidrazın artarak intraoküler pH’ı yükselttiği, *kallikrein-kinin sistemini* aktive ettiği ve bradikinin reseptör aktivasyonuna neden olarak kan-retina bariyerinde bozulmaya neden olduğu düşünülmektedir (20).

Diyabetik komplikasyonlardan sorumlu tutulan mekanizmalardan biri *oksidatif strestir*. Serbest radikaller hücrede lipid peroksidasyonuna, DNA hasarına, proteinlerin yanlış katlanmasına ve mitokondriyal hasara neden olmaktadır (21). Serbest radikallerin artışı, aminoasit bağlarını değiştirerek okside proteinlerin gelişimine neden olur. Ayrıca plazma ve hücre membranı lipoproteinleri, kolajen, laminin gibi proteinler oksidasyona uğrar. Bunun sonucunda kan hücrelerinin aglütinasyon ve agregasyonlarında artış ve mikrotrombozlar meydana gelir. *Reaktif oksijen türevlerindeki artışın*, aldoz redüktaz ve PKC’yi aktive edebildiği ve AGE üretimiyle DAG düzeyini arttırabildiği belirtilmiştir (22). Serbest radikal miktarındaki artış, antioksidanların kan ve doku düzeyinde azalmasına da neden olmaktadır.

Diyabetik retinopatide erken evrelerden itibaren apoptozis artışı, glial hücre reaktivitesi, mikrogial aktivasyon ve glutamat metabolizmasında değişiklikler sonucu nöroglial dejenerasyon gelişimi de izlenmektedir (23). İskemi nedeniyle biriken fazla miktardaki glutamat, nörotoksiktir ve nöronal hücre ölümüne neden olur. Diyabetik retinalarda apoptozis ile ilişkili olan bax proteini düzeyinde artış saptanmıştır (24). Gangliyon hücre ve iç pleksiform tabakalarında hücre kaybı sonucu retina incelmektedir. Diyabetik farelerde tipik vasküler lezyonlardan uzun zaman önce artmış nöral hasarın mevcudiyeti gösterilmiştir (25). Nörodejeneratif bu

değişimlerin; kliniğe elektroretinografi değişiklikleri, retinada incelme, renkli görme ve kontrast duyarlılıkta bozulma şeklinde yansıdığı düşünülmektedir.

Diyabetik retinada enflamatuar moleküller ve akut faz reaktanlarının ekspresyonunda artış, lökosit adezyonunda artış, makrofaj infiltrasyonu, mikrogial hücre ve kompleman aktivasyonu izlenmekte, bu bulgular sürecin enflamatuar boyutunu göstermektedir (26).

1.3.4. Sınıflandırma ve Komplikasyonlar

Diyabetik retinopatide, takip ve uygun tedavi yönteminin şekli ve zamanlaması, Diabetic Rethinopathy Study (DRS), Early Treatment Diabetic Rethinopathy Study (ETDRS), Diabetic Rethinopathy Vitrectomy Study (DRVS) çalışmalarıyla sınıflandırılmıştır (27).

Diyabetik retinopati iki ana grupta sınıflandırılır:

- I. Nonproliferatif diyabetik retinopati (NPDR)
- II. Proliferatif diyabetik retinopati (PDR)

1.3.4.1. Nonproliferatif Diyabetik Retinopati (NPDP)

İlk bulgusu *mikroanevrizmalardır*. Yuvarlak/mum alevi şeklinde retinal hemoraji, sert eksuda bulguları eşlik eder. Klinik olarak dört alt gruba ayrılır.

1.Hafif NPDR:

Retinal hemorajiler ve mikroanevrizmaların izlendiği retinopatinin başlangıç dönemidir. %15’inde 5 yıl içerisinde PDR gelişme riski vardır.

2.Orta NPDR:

Mikroanevrizmalar ve retinal hemorajiler daha geniş bir retinal alanı kaplar, *venöz boncuklanmalar*, *IRMA* ve yumuşak eksudalar eşlik eder. IRMA ve venöz boncuklanma bir kadrandan daha fazla alan kaplamaz. %33’ünde 5 yıl içerisinde PDR gelişme riski vardır.

Hafif ve orta dereceli NPDR’li hastalar “*background retinopati*” olarak da isimlendirilir ve 6-12 ay aralıklarla takip edilebilirler. Diyabetik maküla ödemi (DMÖ) varlığında takip sıklığı arttırılır. Klinik olarak anlamlı maküla ödemi varsa fokal laser tedavisi önerilir.

3.Ağır NPDR:

- *Dört kadranda retinal hemoraji*
- *En az iki kadranda venöz boncuklanma*
- *En az bir kadranda IRMA*

bulgularından bir veya birden fazlasının birlikteliğiyle karakterizedir. Retinada iskemik alanlar mevcuttur. %60'ında 5 yıl içerisinde PDR gelişme riski vardır. 4 ayda bir takip edilir. KAMÖ mevcutsa laser fotokoagülasyon yapılabilir.

4.Çok Ağır NPDR:

Bulgular oldukça yaygındır ancak henüz neovaskülarizasyon gelişmemiştir. 2-3 ayda bir takip edilir. %75'inde 1 yıl içerisinde PDR gelişme riski vardır.

Ağır ve çok ağır NPDR “*preproliferatif retinopati*” olarak da adlandırılır ve *artmış iske*mi izlenmektedir.

1.3.4.2. Proliferatif Diyabetik Retinopati (PDR)

Retina yüzeyinde ve/veya optik disk üzerinde yeni damar oluşumu ve fibröz doku proliferasyonunun varlığı PDR tanısında belirleyicidir. Neovasküler doku venöz endotelin proliferasyonu ile başlayıp, iç sınırlayıcı membranın altında ilerler ve vitreus boşluğuna açılma eğilimindedir.

PDR klinik olarak iki aşamada gözlenir:

1.Erken PDR:

Retinal yüzeyde *neovasküler doku* ve preretinal hemorajiler mevcuttur.

2.Yüksek Riskli PDR:

Neovasküler doku vitreusa doğru yönelmiş ve *fibröz doku* belirginleşmiştir. Fibröz doku kontraksiyonu sonucu ağır *preretinal ve intravitreal hemorajiler* gelişmektedir. *Traksiyonel retina dekolmanı* eşlik edebilir. *Rubeosis iridis*; iris yüzeyi ve ön kamara açısında yeni damar oluşumlarıyla seyredebilir. En yakın zamanda tedavi başlanması gereklidir, panretinal laser fotokoagülasyon yapılır.

1.3.4.3. Diyabetik Makülopati

Diyabetik retinopatinin her döneminde gelişebilir. Nonproliferatif evrede görme kayıplarının %80'inden sorumludur. *Maküla ödemi ve iskemik makülopati* şeklinde izlenebilir ve bu bulguların ayrımı fundus flöresein anjiyografi (FFA) tetkikiyle yapılır.

Diyabetik maküla ödeminin prevalansı %10'dur; diyabetin süresiyle, şiddetiyle ve yaşla orantılı olarak artış gösterir. DMÖ; fokal, diffüz veya mikst tip ödem şeklinde görülebilir.

Maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500 µ) retinal alanlarda, retina kalınlaşması veya sert eksuda varlığı *fokal diyabetik maküla ödemi* olarak tanımlanır. ETDRS tarafından klinik uygulamada fokal bir ödemin şiddet ve seviyesini belirlemek ve tedavi kriterlerini saptamak için *klinik olarak anlamlı maküla ödemi (KAMÖ)* tanımı belirlenmiş ve retinal kalınlaşma esas alınmıştır. Buna göre fokal bir maküla ödeminin KAMÖ kabul edilebilmesi için;

1. Maküla merkezinde veya merkezin 500 µ çevresinde retina kalınlaşması,
2. Maküla merkezinde veya merkezin 500 µ çevresinde, bitişiğindeki retinanın kalınlaşmasıyla birlikte olan sert eksudaların varlığı,
3. Herhangi bir bölümü maküla merkezinden bir disk çapı uzaklıktaki (1500 µ) bir alanda yerleşmiş, bir disk çapı veya daha büyük retinal kalınlaşma bölgesinin varlığı gereklidir (28).

Maküla merkezini de içine alan iki ya da daha fazla disk çapı büyüklüğündeki retina kalınlaşmaları *diffüz diyabetik maküla ödemi* olarak isimlendirilir. Fokal ödemden farklı olarak diffüz tipte kan-retina bariyeri büyük moleküllerin geçişine engel olduğu için sert eksuda plakları nadiren görülür. Diffüz tipte makulada kistoid değişiklikler izlenir, FFA'da çiçek paterni izlenebilir, ayrıca erken fazda retinal kapiller yatağın görünürlüğü artmıştır. Optik kohorens tomografi'de (OCT) retinal kalınlaşma düzeyi ve kistoid değişiklikler ayrıntılı olarak değerlendirilebilir (29).

1.3.5. Diyabetik Retinopati Tedavisi

Günümüzde DR'nin gelişimi ve progresyonu tam anlamıyla ortadan kaldırılamamakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleriyle hastalarda ortaya çıkabilecek görme kayıplarının engellenmesi veya en aza indirgenmesi amaçlanmaktadır. DR ve DMÖ'de erken teşhis ve tedaviyle görme keskinliğinde artış veya stabilizasyon sağlanabilir. Tedavi, diyabetin ve varsa hipertansiyonun regülasyonu ile başlar. HbA1c'nin % 6,5, açlık kan glikoz düzeyinin 110 mg/dl, kan basıncı düzeyinin 130/85 mmHg değerlerinin altında olması önerilmektedir. Kan lipid profilinin de takibi önerilir. ETDRS çalışmasında total kolesterol seviyesi 240 mg/dl üzerinde olan

hastalarda sert eksuda görülme olasılığı, 200 mg/dl 'nin altında total kolesterol düzeyi olan hastalara göre 2 kat daha fazla saptanmıştır (28).

Laser fotokoagülasyon tedavisi, santral tutulumu olmayan ödem veya görme azalması yapmayan erken ödem tedavisinde standarttır. KAMÖ varlığında fokal ödem için uygulanan laser tedavisi, maküladaki ödemi azaltmayı ve sert eksudaların rezorbsiyonunu hızlandırmayı amaçlar. Panretinal fotokoagülasyonda amaç, neovaskülarizasyon ve fibröz doku gelişiminin engellenmesi, durdurulması ve gerilemesinin sağlanmasıdır. Panretinal laser fotokoagülasyonun PDR'de 5 yıl içinde ağır görme kaybı gelişme olasılığını %50 azalttığı gösterilmiştir (30).

Laser fotokoagülasyon sonrası; görmede geçici bulanıklık, baş ağrısı, korneal abrazyon ve yanıklar, iris yanıkları, lens opasiteleri, ön kamarada sığlaşma, göz içi basıncı artışı, fovea ve optik sinir hasarı, iskemik papillopati, maküler ödem, Bruch membranında rüptür, koroidal kanama ve neovaskülarizasyon, subretinal neovaskülarizasyon, görme alanında skotomlar, epiretinal membran oluşumu, vitreus hemorajisi, retinal yanık alanlarında genişleme gibi komplikasyonlar gelişebilmektedir.

Diffüz ödemin tedavisinde laserin etkisi sınırlıdır ve farmakoterapi üstünlük kazanmıştır. İntravitreal olarak *kortikosteroidler* ve *Vasküler endotelyal büyüme faktörü blokörleri (anti-VEGF ajanlar)* uygulanmaktadır (29). Bu tedavilerle enflamatuar mediatörlerin ve vasküler permeabilite artışına neden olan faktörlerin salınımının engellenmesi hedeflenmektedir.

Triamsinolon asetonid, fluosinolon asetonid, deksametazon, intravitreal olarak uygulanan steroid yapısındaki ajanlardır. Enflamasyonu baskılamakla birlikte VEGF düzeyini azaltırlar. Kortikosteroidlerin glokom, arka subkapsüler katarakt, pitozis, midriyazis, skleral incelme, göz kapağı cildinde atrofi, bağışıklık mekanizmalarının baskılanması sonucu enfeksiyonlara yatkınlık gibi yan etkileri vardır. Ayrıca intravitreal uygulamaya bağlı endoftalmi ve retina dekolmanı riski mevcuttur (31).

Ranibizumab ve *aflibercept* DMÖ tedavisinde onaylı anti-VEGF ajanlardır. Aflibercept, VEGF-A dışında plasental büyüme faktörünü (PDGF) de bloke etmektedir. *Pegaptanib sodyum* ve *bevacizumab* da bu gruptaki diğer ajanlardır. Antianjiyogenetik ilaçların etkisi geçici olduğundan laser tedavisiyle kombine

edildiğinde etkinliğinin arttığı düşünölmektedir. Bu ilaçların miyokard enfarktüsü, serebral enfarktüs, hipertansiyon, menströel düzensizlikler gibi sistemik yan etkilerinin olabileceği düşünölmektedir.

Kalıcı vitreus hemorajileri, premaküler hemoraji, traksiyonel retina dekolmanı, vitreomaküler traksiyon, aktif fibrovasküler proliferasyon gelişiminde uygulanan *vitreoretinal cerrahi* ile komplikasyonların önlenmesi ve ortadan kaldırılması amaçlanmaktadır.

Diyabetik retinopatinin medikal tedavisinde; antioksidanlar (E vitamini, C vitamini), aldoz redüktaz inhibitörleri (Sorbini, Ponalrestat), ileri glikolizasyon son ürün inhibitörleri (Aminoguanidin, Pimagedin), PKC inhibitörleri (Reboksitaurin, PKC-412), büyüme hormonu inhibitörleri, somatostatin analogları (Octreotid) gibi diğer ajanlar çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (32). Medikal tedavideki gelişmelerle DR gelişimi, progresyonu ve komplikasyonlarının önlenmesi, laser fotokoagölasyon ve vitreoretinal cerrahiye gereksinimin azaltılması hedeflenmektedir.

1.4. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü, retina anjiyogenezinde anahtar mediatör olan 46 kDa, homodimerik, glikoprotein yapısında heparin bağlayan bir büyüme faktörüdür. Retina iskemisine cevap olarak stimöle olur, endotel proliferasyonunu ve permeabilityi düzenler. Proteolitik aktivite, endotel hücre çoğalması, kapiller tüp oluşumu, anjiyogenezi olaylarında etkindir. VEGF retinada; gangliyon hücreleri, astrositler, Müller hücreleri, vasküler endotel hücreleri, retina pigment epitel hücreleri ve retinaya göç etmiş lökositler tarafından salınmaktadır. Ayrıca kornea endoteli, iris pigment epitel, üveal melanositler ve koroidal fibroblastlarda da VEGF üretimi mevcuttur.

Gen ailesinin içinde 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır; VEGF-A, B, C, D, E, F ve PlGF. *VEGF-A'nın anjiyogenezi*de en önemli faktör olduğu düşünölmektedir. VEGF-A endotel hücrelerini ve monositleri uyarak doku faktörü (TF) yapımını artırır ve koagölasyon zincirini aktive eder. Farelerde VEGF-A'nın tek bir allelinin hedefli inaktivasyonu vasküler gelişimin belirgin bir şekilde bozulmasına neden olur. VEGF-A, altıncı kromozomda (6p21.3) kodlanmıştır. VEGFR-1 üzerinden pozitif ve negatif anjiyogenetik etki gösterir. VEGFR-2 üzerinden de mitojenik, anjiyogenetik

ve vasküler geçirgenlik artışı gibi etkileri vardır. VEGF hücre dışına salgılanarak reseptörüne bağlandığında spesifik PKC izoformunu ($\beta 2$) aktive ederek *ödem* ve *neovaskülarizasyon* oluşturur.

İnsanlarda VEGF-A'nın 9 izoformu tespit edilmiştir. *VEGF 165 izoformu*, en güçlü biyoaktiviteye sahip olan ve in vivo en çok görülen alt tipidir. VEGF ekspresyonu RPE'de daha fazladır. Özellikle VEGF 121 ve VEGF 165 izoformları retinada bulunmakta ve koryopakiller fenestrasyonun devamlılığını sağlamada yer aldığı düşünülmektedir. VEGF, normal damar gelişimi için gereklidir. VEGF, VEGFR-1 veya VEGFR-2'yi kodlayan genlerin hasara uğratıldığı sıçanlarda erken intrauterin ölümler meydana gelmiş ve histopatolojik incelemelerde yetersiz endotel farklılaşması, tamamlanmamış damar oluşumunu gösteren bulgular saptanmıştır (33).

Yapılan çalışmalarda, VEGF salınımını düzenleyen çok sayıda faktör araştırılmıştır. *Oksidatif stres ve hipoksik ortamda* düzeyi artan hipoksinin indüklediği faktör-1 (HIF-1), VEGF gen ekspresyonunda ana düzenleyicidir. VEGF düzeyi; p53 gen mutasyonu, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, fibroblast büyüme faktörü-4 (FGF-4), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü (TGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), TNF- α ve nitrik oksit (NO) gibi endojen ajanlarla da düzenlenmektedir (34).

Anjiyogenezin bir mediatörü olan NO, VEGF'in nitrik oksit sentaz enzimi üzerindeki uyarıcı etkisi sonucu oluşarak endotel hücre toplanmasında rol alır. Endotelial VEGFR-2 salınımı da lokal hipoksiyle direkt uyarılabilmektedir. İn vitro VEGFR-2 gen ekspresyonu, kardiyovasküler hemostazda önemli bir faktör olan, aynı zamanda DR progresyonunda da rol oynayan *anjiyotensin-II* ile direkt arttırılmaktadır. DR ileri evrelerinde, VEGFR-2'nin arttığı iskemik alanlarda yüksek miktarlardaki VEGF-A üretimi, bulguların gelişiminde rol oynamaktadır.

Hipoksik hücrelerden salgılanan adenozinin, adenzin A2 reseptörlerine bağlanarak, c-AMP bağımlı protein kinaz A yolağı üzerinden VEGF düzeyinde artışa neden olduğu bulunmuştur (35).

Vasküler endotelial büyüme faktörünün prematüre retinopatisi, yaşa bağlı maküla dejenerasyonu (YBMD), DR, retinal ven oklüzyonu hastalıklarında, iris ve kornea neovaskülarizasyonu gelişiminde ve patolojik damar oluşumunda yer aldığı gösterilmiştir (36).

1.4.1. Diyabetik Retinopati ve VEGF

Diyabetik retinopati patogeneğinde enflamasyon etkindir. VEGF-A *proenflamatuvar* özelliğe sahip olup, retinal adezyon moleküllerinin ekspresyonunu ve lökosit adezyonunu artırarak enflamasyonu kısır bir döngü haline getirmektedir. Primat gözüne yapılan intravitreal VEGF enjeksiyonu retina ve iris neovaskülarizasyonu ile birlikte neovasküler glokomu içeren şiddetli PDR benzeri bir klinik durum ortaya çıkarmıştır (36). VEGF inhibisyonu ile kan-retina bariyerinde bozulmanın ve hastalığın progresyonunun engellenebileceği düşünülmüştür.

Erken dönem diyabette, retinal proliferatif değişikliklerden önce VEGF artışı izlenmiştir. DR'de neovaskülarizasyonun başlamasıyla proliferatif evreye geçilmiş olur. Deneysel hayvan modellerinde, VEGF salınımı *neovaskülarizasyon* gelişimiyle korelasyon göstermiştir. Diyabet hastalarından alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde, NPDR'li gözlerle oranla VEGF-A konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir (37). Yine neovaskülarizasyon nedeniyle başarılı panretinal fotokoagülasyon tedavisi sonrası hastalarda intraoküler VEGF seviyesinin % 75 oranında azaldığı gözlenmiştir.

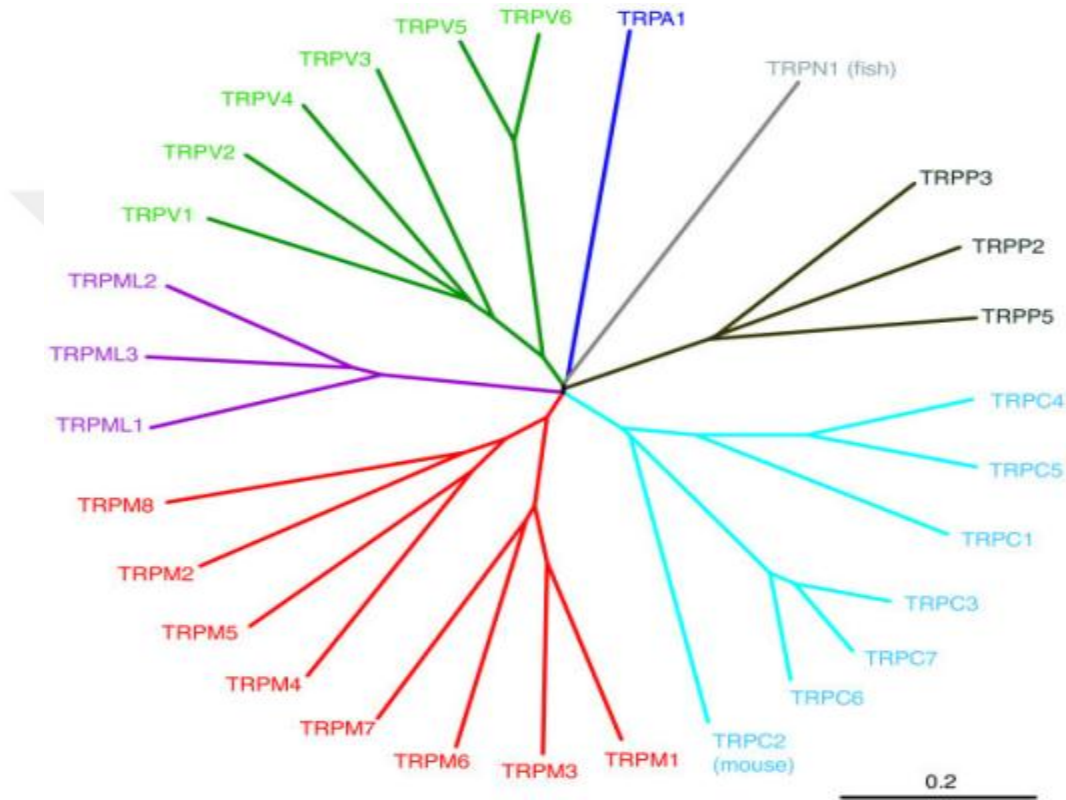
1.5. Transient Reseptör Potansiyeli (TRP) Kanalları

Transient reseptör potansiyeli kanalları, yakın zamanda keşfedilen hücre zarı kanal proteinleri ve iyon kanalları süper ailesidir. İlk kez *Drosophila melanogaster* türü sirke sineklerinin fotoreseptör hücrelerinde saptanmıştır. TRP geni, *Drosophila*'nın vizüel transdüksiyon mutasyonu çalışmalarında tanımlanmıştır (38). Mutasyona uğratılmış kanalların sürekli ışık maruziyetine rağmen elektroretinogramda kesintili bir gerilim oluşturduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle *geçici (transient)* olarak adlandırılmıştır.

Kanallar, altı transmembran etki alanından oluşmakta, voltaj kapılı iyon kanallarına benzerlik göstermektedirler. TRP kanalları; fiziksel faktörler (sıcaklık, voltaj, mekanik), kimyasal faktörler (pH, iyonlar), salgısal faktörler (bradikinin, anjiyotensin II, aldosteron) ve sinyal ileti molekülleri [fosfolipaz C (PLC), PKC] aracılığıyla aktive olmaktadır (39). TRP süper ailesi seçici olmayan katyon kanallarından oluşur. Memeli hücrelerinde 28 TRP kanalı saptanmıştır, bunlar; TRPC (canonical), TRPV (vanilloid) ve TRPM (melastatin) olmak üzere üç temel

gruba ayrılır. Alt aile grupları ise TRPP (polisistin), TRPML (mukolipin), TRPN (nompc) ve TRPA'dır (ankirin) (40).

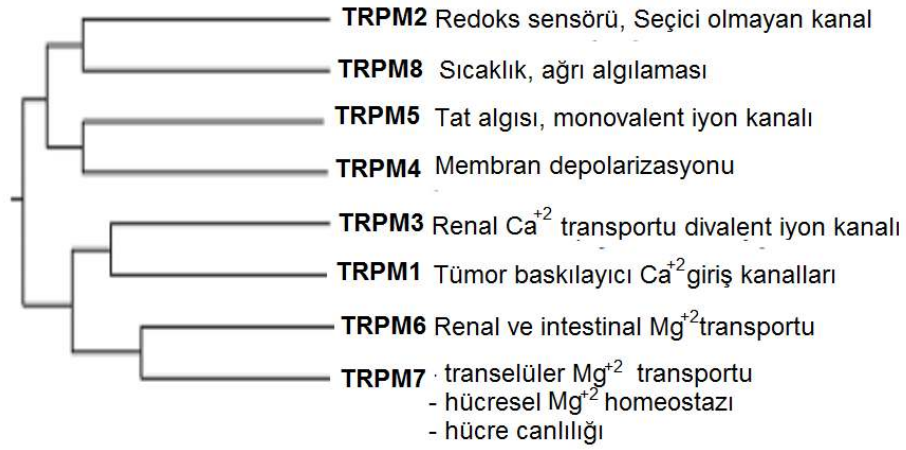
Transient reseptör potansiyeli kanalları; renal Ca-Mg iletimi, kan basıncının düzenlenmesi, tat, koku, ses algısı, gen ekspresyonu ve salgılanması, apoptozis, ikincil haberci sistemi, iyon giriş çıkışı gibi çeşitli hücresel süreçlerde rol alırlar. TRPM4 ve TRPM5 dışındaki tüm işlevsel TRP kanalları Ca^{+2} için geçirgendir.



Şekil 1. TRP kanalları (41)

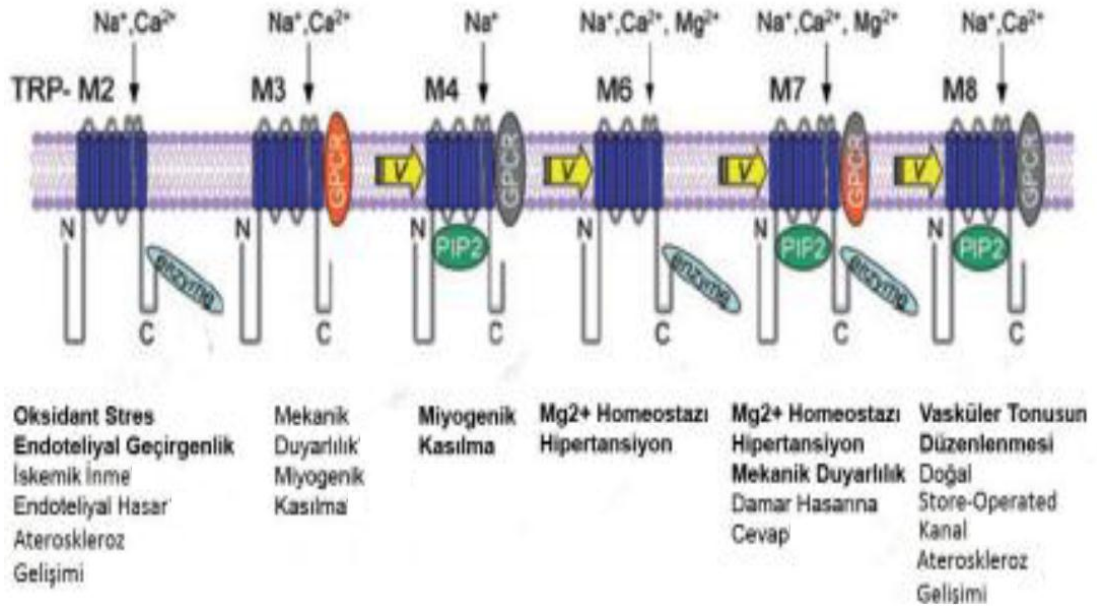
1.5.1. TRPM Kanalları

Melastatinle ilişkili kanal, ilk TRP üyesi olup metastatik melanomda tanımlanmış tümör baskılayıcı protein olarak bildirilmiştir. TRP melastatin, çoğunlukla beyinde ve nöronal hücrelerde bulunur. TRPM ailesinin üyeleri 8 gruptan oluşur ve dört ana grupta değerlendirilir, bunlar; TRPM1/3, TRPM2/8, TRPM4/5 ve TRPM6/7'dir. Bu kanallar farklı katyon geçirgenliğine sahiptirler.



Şekil 2. TRPM iyon kanalları ve olası fizyolojik fonksiyonları (42)

Transient reseptör potansiyeli Melastatin 1'in retinal bipolar hücrelerde nonselektif katyon iyon iletiminde rol aldığı ve mutasyonlarının insanda konjenital durağan gece körlüğü ile ilişkili olduğu saptanmıştır (43).



Şekil 3. Vasküler düz kas hücrelerinde eksprese edilen TRPM alt tipleri ve fizyolojik rolleri (44)

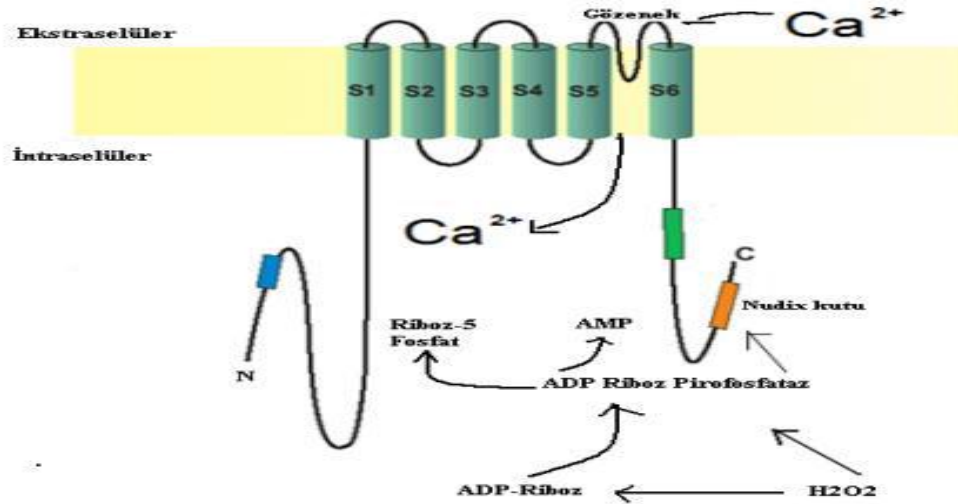
1.5.2. TRPM2 Kanalları

Nonselektif olarak Na^+ , Ca^{+2} , K^+ ve Cl^+ iyonlarına geçirgenlik gösteren bir katyon kanalıdır. Ağırlıklı olarak beyin dokusunda saptanmış olup vasküler endotel, kemik iliği, böbrek, bağırsak, karaciğer, akciğer, kalp kası, testis, prostat, pankreas,

iskelet kası, lökositler gibi birçok doku ve hücrede gösterilmiştir. *ADP-riboz pirofosfataz* aktivitesine sahiptir. H_2O_2 ile aktive olur ve *hücrel redoks sensörü* fonksiyonu görür. İlk olarak 2002 yılında tanımlanmış, diğer TRP kanallarından farklı olarak H_2O_2 ile aktive olduğu görülmüş ve uzun bir süre oksidatif stresin indüklediği katyon kanalı adıyla anılmıştır (45).

Oksidatif stres, reaktif oksijen türevleri ve $TNF-\alpha$ sinyali sonucu, hücre içine Ca^{+2} akışını uyarır ve hücre ölümünde rol oynar (46). ADP riboz (ADPR), NAD^+ ve intraselüler Ca^{+2} ile de aktive olur (47).

Transient reseptör potansiyeli Melastatin 2; 21q22.3 gen bölgesinde bulunan, 1503 aminoasitten oluşan, 170kDa ağırlığında, altı transmembran segment içeren, iyon akışı 5. ve 6. segmentleri arasından gerçekleşen bir katyon kanalıdır. Kanalin karboksil ucunda ADPR pirofosfataz enzimi bulunmaktadır. Bu enzim, ADPR'dan AMP ve Riboz 5-fosfat oluşumunu katalizler ve TRPM2 kanallarının açılmasına neden olur. Enzimatik aktiviteye sahip olması, kanal aktivitesinin negatif geri bildirim yoluyla kontrolüne olanak sağlamaktadır. Bu kanallar, direkt plazma membranındaki kalsiyum iyon kanalı yapısında olabilmekle birlikte, sitozolik serbest Ca^{+2} kanallarında değişim yoluyla da membran potansiyelinde değişiklik yapabilirler (48).



Şekil 4. TRPM2 kanalının moleküler yapısı (49)

Transient reseptör potansiyeli Melastatin 2, H_2O_2 aracılı endotel hücresi ölümünde kritik rol oynar. Apoptozis; hücre içi ve mitokondriyal Ca^{+2} birikimi sonucu, mitokondriyal membran hasarı, sitokrom C açığa çıkması ve kaspaz-3

sonuçlanabilir. Dokularda normal hücre popülasyonunun dengeli devamlılığı sağlanırken, immün sistem reaksiyonlarında korunma mekanizması olarak, kalıcı hücre hasarında ve yaşlılıkta apoptozis görülür. Hücrelerin programlı yıkımı, hormon bağımlı involüsyonu, tümörler, enflamatuar olaylar gibi birçok fizyolojik, adaptif ve patolojik olay apoptozisi tetikleyebilir.

Büyüme faktörlerinin yetersizliği, sitokinler aracılığıyla hücre membranındaki ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, hipoksi, ısı, antineoplastik ilaçlar, radyasyon, gamma ve ultraviyole ışınları gibi dış etkenler; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, pH'da düşme, metabolik sistem ve hücre siklus bozuklukları gibi hücre içi etkenler apoptozu başlatabilir.

Apoptozisin indüklenmesiyle hücre içi *kaspaz* adlı proteazlar aktive olur ve mitokondrinin dış zar geçirgenliği artar. Stoplazmaya pro-apoptotik proteinler salınır. Hücrede inaktif olarak bulunan kaspazlar, birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskadın başlamasına neden olurlar.

Apoptozda hücreler sıvı kaybederek küçülür ve büzüşür, kromatin kondansasyonu gelişir. Hücre, zarla çevrili küçük parçalara bölünerek *apoptotik cisimcikler* oluşturur. Apoptotik cisimcikler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagositozla temizlenir.

Serbest oksijen radikalleri, apoptotik süreci başlatan yolları aktifleyerek hücre ölümüne neden olan etkenlerden biridir. *Hipoksi ve iskemi* varlığında oksidatif hasar şiddetlenir. Hücrede oksidatif fosforilasyon azalır ve enerji depoları boşalır. Bunun sonucunda hücre zarında bulunan Na-K-ATPaz pompası inhibe olur. Oksidatif strese kalsiyum dengeleri ve mitokondriyal membran potansiyeli değişir. Bu değişiklik mitokondride ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi apoptoza sürükler. ADPR polimeraz (PARP) bağımlı *TRPM2* kanal aktivasyonunun da apoptozis sürecinde etkili olduğu düşünülmektedir.

1.7. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

Nötr bir atomda, proton sayısı elektron sayısına eşittir ve atom bu halde reaktif değildir. Elektron alan ya da veren atom, elektriksel olarak yüklü hale (iyon) geçer. İyonlar *reaktif* yapıda olup, yüksek enerjilerinden kurtulmak için ortamdaki başka iyon veya atomlarla etkileşime girme eğilimindedirler. *Serbest radikaller* de,

dış yörüngesinde bir veya birden fazla eşlenmemiş elektron içeren yüksek enerjili reaktif bileşiklerdir. Herhangi bir moleküle etkileşime girer, bu moleküllerden elektron alır veya ona elektron vererek yapısını bozarlar.

Reaktif özellik, organizmada birçok biyolojik yapıya zarar verir. Serbest oksijen radikalleri ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasıyla oluşan *oksidatif stres*; kalp-damar hastalıkları, kanserler, katarakt, diyabet, immünsüpresyon, iskemi/reperfüzyon hasarı, enflamatuar hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi birçok patolojinin gelişimine neden olmaktadır (53).

Organizma içinde oksijen kullanılarak enerji üretimi sırasında oluşan reaktif moleküllere, *serbest oksijen radikalleri* (oksidan moleküller- SOR; reaktif oksijen türevleri- ROS) denir. Tekli oksijen ($1O_2$), süperoksit anyonu ($\cdot O_2^-$), hidroksil ($\cdot OH$), peroksil ($ROO\cdot$) ve alkoksil ($RO\cdot$) radikalleri bu grup moleküllerdendir. Aşırı üretimleri veya indirgenmelerinin yetersiz kalması, hücre makro moleküllerinin okside olmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle protein, lipid, karbonhidrat ve DNA hasarlarına neden olan metabolik reaksiyonlara yol açarak hücre ve doku hasarı oluşturmaktadırlar.

Serbest radikaller, hücre membranlarındaki Ca^{+2} , Mg^{+2} ve ATPaz ile etkileşim sonucunda hücre içi kalsiyum düzeyini artırır. Kalsiyum düzeyindeki artış, fosfolipaz aktivitesini stimüle ederek araşidonik asit düzeyini yükseltir. Siklooksijenaz ve lipoksijenaz yolları üzerinden *prostoglandinler*, *lökotrienler* ve *toksik lipid peroksitleri* oluşur. Oluşan peroksitler, siklooksijenaz aktivitesi aracılığıyla vazokonstriktör tromboksan oluşumunu artırmaktadır. Lipoksijenaz aktivitesiyle oluşan lökotrienler ve platelet aktivasyon faktörü (PAF) vazokonstriksiyona, kemotaksise, lökosit adezyonuna ve sonuçta endotel hasarına neden olmaktadır (53). Ayrıca, hücre içi Ca^{+2} düzeyinin artışı proteolitik enzimleri aktive ederek apoptozisi indüklemektedir.

Serbest radikallerin hücre ve dokularda oluşturduğu patolojiler; hücre organelleri ve membrandaki lipid ve protein yapısında bozulma, hücre zarı yapısı ve fonksiyonunda değişim, hücre içi enzim fonksiyonlarında bozulma, nükleik asit hasarı, lipid peroksidasyonu, mitokondriyal aerobik solunumun bozulması, hücre içi proteazların aktivasyonu, hücrenin potasyum kaybında artış, trombosit

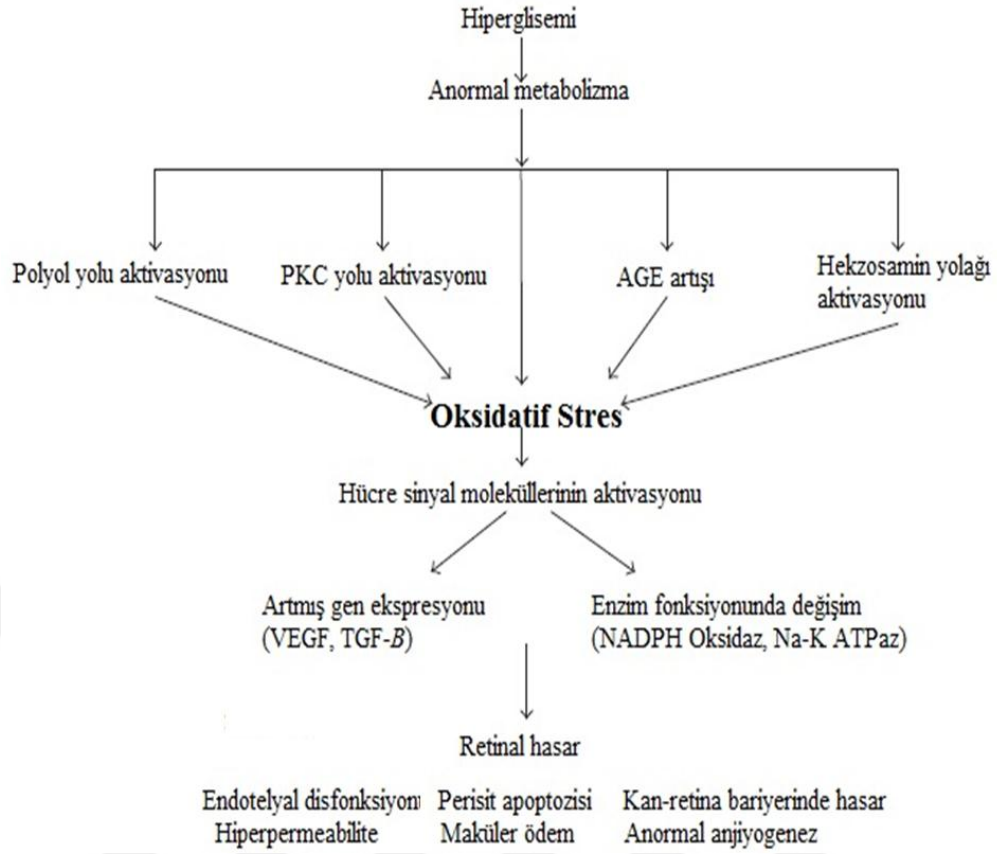
agregasyonunun ve dokularda fagosit birikiminin artması, hücre dışı kolajen, elastin, doku komponentlerinin, mukopolisakkaritlerin ve transmitterlerin yıkımıdır.

1.7.1. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabet, kronik metabolik bir bozukluk olmakla birlikte, oksidatif stres sonucu gelişip ilerleyebilen ve oksidatif hasarı şiddetlendirebilen bir hastalıktır.

Sağlıklı bireylerde, antioksidanlar ve serbest radikaller arasında denge mevcuttur. Hiperglisemide, otooksidatif glikozilasyon, proteinlerin enzimatik olmayan glikozilasyonu, enerji metabolizmasının değişmesiyle oluşan metabolik stres, poliol yolu aktivasyonu, hipoksi, iskemi ile meydana gelen doku hasarı sonucu serbest radikallerin oluşumunun hızlanması ve antioksidan savunma sisteminin değişmesi bu dengeyi bozmakta, diyabetik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır.

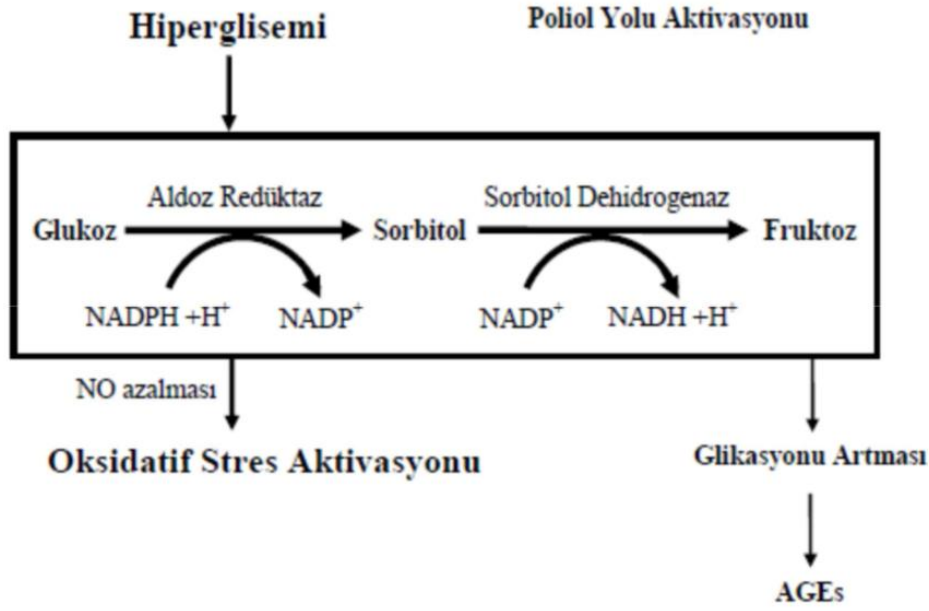
Deneyssel diyabet oluşturulan ratlarda ve diyabet hastalarında serbest oksijen radikalleri ile lipid peroksidasyonunun artışı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Pankreas β hücreleri oksidatif hasara duyarlıdır. Ayrıca pankreas hücrelerindeki antioksidan kapasitenin, karaciğer, böbrek, iskelet kası ve adipoz doku gibi diğer dokulara kıyasla oldukça düşük düzeyde olduğu bilinmektedir (54). Enflamatuvar hücrelerin β hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir (55).



Şekil 6. Diyabetik retinopati ve oksidatif stres mekanizması (56)

Oksidatif stresin insülin direnciyle ilişkili olduğu ve insülin direncinin patogeneğinde rol oynadığı da bilinmektedir. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin de insülinin gen transkripsiyonunu azalttığı ve pankreas β hücre apoptozuna yol açtığı düşünülmektedir. Diyabetik kişilerin serum ve dokularında lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir (57).

Diyabetik retinopatide hücresel düzeyde hiperglisemi halinde, mitokondriyal elektron transport zincirinde, hücre içi enerji metabolizması sırasında normal şartlarda meydana gelen süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunun daha da arttığı bildirilmiştir (58).



Şekil 7. Poliöl yolu aktivasyonu (59)

Diyabette serbest radikal artışının ve radikal bağlayıcı sistemde bozulmanın saptanmasıyla, diyabetik hastaların antioksidanlara daha çok ihtiyaç gösterebileceği düşünülmüş, hastalık gelişiminin engellemesi ve tedavisinde radikal oluşumunu önleyici antioksidan vitaminlerin kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

1.7.2. Total Oksidatif Stres (TOS)

Oksidatif stres, reaktif oksijen ve nitrojen türlerinin aşırı üretimi veya antioksidan tampon mekanizmalarının eksikliği sonucu oluşur. Oksidatif stresin toplam değerinin ölçüm tekniği şu şekildedir; numunedeki oksidanlar ferröz iyon şelatör kompleksini *ferrik iyon*a dönüştürürler, ferrik iyon asidik ortamda kromojenle birlikte renkli bir kompleks oluşturur, *spektrofotometrik* olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekteki oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H_2O_2) ile kalibre edilir ve sonuçlar litrede mikromolar H_2O_2 eşivalan ($\mu mol H_2O_2 equiv/L$) olarak verilir.

1.7.3. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS)

Kan antioksidanların tüm vücuda dağıtılmasını sağlayarak vücuttaki oksidasyon reaksiyonlarının tamponize edilmesinde önemli bir rol oynar. Antioksidanların toplam değerine en büyük katkısı serumda bulunan antioksidan

moleküller sağlar. Serumda antioksidanların etkileşimiyle tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla olan sinerjik bir antioksidan etki oluşmaktadır. Bu nedenle total antioksidan seviyesinin ölçümü daha değerli bilgiler verir.

Total antioksidan kapasitesinin ölçümü, numunedeki tüm antioksidan moleküllerin renkli *ABTS (Etilbenzotiazolin Sulfonik Asit)* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalın antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Numunelerdeki antioksidanlar lacivert yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna indirger, ABTS solüsyonun 660 nm dalga boyunda absorbands değişikliği ölçülür. *Absorbans değişikliği* numunenin TAS ile ilişkilidir. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan *Trolox* kullanılır.

1.7.4. Antioksidanlar

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumlarını inhibe eden, zararlı etkilerini azaltan, oksidasyon olaylarını engelleyen maddelerdir. Serbest radikallerin DNA, protein ve lipidler gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini sınırlandırmaktadırlar. Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-s-transferaz (GST), glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), mitokondriyal sitokrom oksidaz ve hidroperoksidaz intrasellüler savunma sisteminin *enzimatik antioksidanları* olarak tanımlanırken; glutatyon (GSH), bilirubin, seruloplazmin, askorbat, transferrin, β -karoten, α -tokoferol, melanin, ürik asit ve albümin ise *enzimatik olmayan antioksidanlar* olarak sınıflandırılmıştır.

Antioksidanlar dört temel yolla oksidanları etkisiz hale getirmektedir:

1.Süpürme etkisi: Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. *Antioksidan enzimler* bu yolla etki eder.

2.Söndürme etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktarıp inaktive etme olayıdır. *Vitaminler ve mannitol* bu şekilde etki eder. Oksidatif stres sonucu gelişen lipid peroksidasyonunu önleyen antioksidan vitaminlerden bazıları C ve E vitaminleridir.

3.Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi: *Hemoglobin ve ağır mineraller* oksidanları kendilerine bağlayıp inaktive eder.

4.Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onararak etki eder.

Antioksidanlar hücrelere saldırmadan serbest radikalleri stabilize ve inaktive etme özelliği olan moleküllerdir. İyi bir antioksidanda bulunması gereken özellikler; serbest radikallerin etkinliğini ortadan kaldırma, redoks metalleriyle şelat oluşturabilme, diğer antioksidanlarla ilişkide bulunarak onları yenileyebilme ve sinerji gösterme, gen ekspresyonu üzerine onarıcı etkilere sahip olma, kolayca emilme, doku ve vücut sıvılarında uygun fizyolojik seviyelerde bulunma, sıvı ve zarlarda fonksiyon gösterebilmedir (60).

Oksidatif stresin diyabetin kronik komplikasyonlarının oluşumunda önemli bir yeri vardır. Ekzojen olarak verilen antioksidanların bu komplikasyonları önleme ve progresyonunu engellemede kullanılabileceği, diyabet tedavisinde antioksidan özelliğe sahip ajanların kullanımının oksidatif stresi azaltmada gerekli olabileceği düşünülmektedir (58).

1.8. Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni (PCNA)

İmmünohistokimyasal olarak çalışılan ve *cyclin* adıyla da bilinen PCNA, DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunda görev alan *DNA polimeraz deltanın kofaktörü* olup, 36 kD ağırlığında, 262 aminoasit içeren bir nükleer proteindir. DNA polimeraz delta S fazında, DNA replikasyonunda rol alır ve hücre siklusunda düzenleyici bir proteindir. DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu kontrolünde görevli birçok protein, PCNA'ya bağlanarak görev yaptığından, bu olayların düzenlenmesinde PCNA önemli etkiye sahiptir (61). Replikasyonun G1 fazında salınımı başlar, S fazında en üst düzeye ulaşır ve G2, M fazında azalır.

Proliferatif hücre nükleer antijeni, akut lösemi ve kronik myelositer lösemi krizinde *immünohistokimyasal proliferasyon markırı* olarak kullanılmaktadır. Aşırı PCNA tutan dokularda hiperplazi, displazi veya skuamöz hücreli karsinom saptanabilir. Son yıllarda parafinde bloklanan doku örneklerinden hazırlanan kesitlerde, PCNA ekspresyonunun belirlenmesinde monoklonal PCNA antikorları da kullanılmaktadır.

İmmünohistokimyasal boyamalarda önemli ölçüde çekirdek lokalizasyonu gösteren PCNA'nın, lenfoma ve osteosarkom hücrelerinde, fetal dönemdeki yüksek farklılaşma kapasitesine sahip hücrelerde, plasentanın sitotrofoblastlarında hem çekirdek hem de sitoplazmada lokalizasyon gösterdiği saptanmıştır. PCNA,

farklılaşma işlemine giren hücrelerden çoğalma özelliği olanları ayırıp tanımlamada, hücre döngü oranını ve hücre proliferasyonunu göstermede kullanılabilen iyi bir belirteçtir.

Proliferatif hastalıklarda hücre siklusunu regüle eden antijenler yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. Proliferatif retinal hastalıklardan olan PDR ve proliferatif vitreoretinopatide gözlenen epiretinal membranların yapısında da hücre proliferasyon markırlarının arttığı gösterilmiştir (62).

1.9. Vitamin D

1.9.1. Vitamin D'nin Moleküler Yapısı ve Kaynakları

Vitamin D, yağda çözünen bir *sekosteroid*dir. Moleküler yapısı steroid hormonlara (östradiol, kortizol ve aldosteron) benzer olup, aynı kök yapıya (*siklopentanoperhidrofenantren halkası*) sahiptir ve steroid hormonlarda olduğu gibi *genomik* ve *nongenomik* yollarla etki gösterir. Deride üretilip hedef hücre ve dokulara kan yoluyla taşındığından *prohormon* özelliği taşır. Vitamin D'nin çok sayıda metabolitleri olmakla birlikte yan zincirleri açısından farklı olan iki ana formu vardır. Bunlar; deride 7-dehidrokolesterolün (7-DHC) dönüştürülmesiyle üretilen *vitamin D3 (kolekalsiferol)* ve yalnızca gıdalarla alınan *vitamin D2'dir (ergokalsiferol)*.

Vitamin D'nin temel kaynağı deridir. Güneş ışınları spektrumunun UVB (290-315nm) aralığındaki radyasyon, epidermisin stratum spinosum ve bazale tabakalarında bulunan 7-DHC'yi fotokimyasal olarak previtamin D3'e dönüştürür, bu da ısıya bağımlı bir reaksiyonla vitamin D3'e dönüşür ve henüz aktif değildir. Aşırı miktarları inaktif metabolitlerine dönüştürülerek hipervitaminoz önlenir. Vitamin D'nin diğer kaynağı gıdalardır ve yağlı balıklar haricindeki birçok gıda ürünleri zenginleştirilmedikleri takdirde az miktarda içerirler.

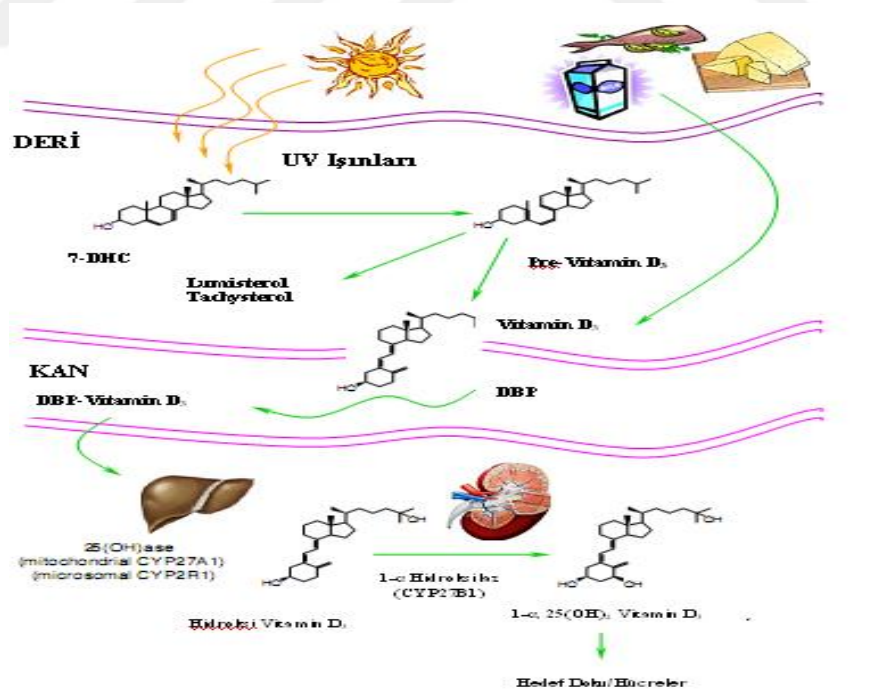
Deride kolekalsiferol oluşumu yaşa, deri yüzeyine, deri pigmentasyonuna, mevsim, enlem ve boylama göre değişkenlik gösterebilir. Para-aminobenzoik asit içeren güneş kremleri, endojen üretimi büyük oranda azaltmaktadır. Derideki melanin konsantrasyonu arttıkça vitamin D düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Kolekalsiferol üretimi 70 yaşına kadar yaklaşık %75 oranında azalmaktadır (63).

1.9.2. Vitamin D Metabolizması

Vitamin D'nin biyolojik aktivasyonu, karaciğer ve böbrekte gerçekleştirilen enzimatik *hidroksilasyon* reaksiyonlarıyla meydana gelir.

Kan dolaşımında *vitamin D bağlayıcı proteini (DBP)* ile taşınır. Öncelikle karaciğerde 25-hidroksilaz aktivitesiyle *25(OH)D (kalsidiol)* oluşur. Vitamin D2 ise 24-hidroksilasyona uğrar. 24-hidroksilasyonun amacı kalsitriolün toksik düzeyde birikimini önlemektir. *25(OH)D*, dolaşımdaki ana form olup, yarı ömrünün daha uzun (iki hafta) ve serum konsantrasyonunun bin kat daha yüksek olması nedeniyle klinikte düzeyi en sık ölçülen vitamin D metabolitidir (64).

Böbrek proksimal tübüllerinde *25(OH)D*, *1-alfa-hidroksilaz* etkisiyle *aktif* metaboliti olan *1,25(OH)₂D'*ye (*kalsitriol*) dönüştürülür. Kalsitriolün plazmadaki yarı ömrü 4 saattir. Kalsitriolün *endokrin, parakrin ve otokrin etki* gösterebildiği düşünülmektedir. Kalsitriol sentezi, serum Ca düşüşüne sekonder paratiroid hormon (PTH) tarafından ve serum fosfat düzeyinin düşmesiyle uyarılır. Kemikte osteositler tarafından salgılanan fibroblast büyüme faktörü-23 (FGF-23), kalsitriol sentezini baskılar (65).



Şekil 8. Vitamin D'nin metabolizması (65).

1.9.3. Vitamin D Transportu ve Depolanması

Gıdalarla vücuda alınan vitamin D, gastrointestinal sistemden emilip, lenf sisteminden şilomikronlar içinde venöz dolaşıma aktarılır. Endojen olarak sentezlenen vitamin D3 yalnızca DBP'ye bağlı olarak plazmada taşınır, bu nedenle karaciğere alımı yavaş olur; vitamin D2'nin ise bağlanma afinitesi düşük olduğundan hızlı elimine edilir. Oral yolla uygulanan vitamin D (kolekalsiferol) ise, karaciğere reseptör aracılı olarak ve daha hızlı taşınmaktadır (66). 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D dolaşımında yaklaşık %90 oranında DBP ile taşınır. %10'luk kısım albümine zayıf olarak bağlanmaktadır.

1.9.4. Vitamin D'nin Etki Mekanizmaları

Vitamin D, selüler proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozun regülasyonundan sorumlu çok sayıda genin ekspresyonunu kontrol eder. Vitamin D, steroid hormonlara benzer şekilde genomik ve nongenomik etki gösterir. Farklı vitamin D izomerlerinin analogları da genomik ve/veya nongenomik yanıtları sağlayacak biçimde geliştirilmiştir.

*Genomik etki*de, kalsitriol nükleer veya membran vitamin D reseptörlerine (VDR) bağlanır. Retinoid X reseptörü (RXR) ile genlerin promotör bölgelerine bağlanır ve RNA polimeraz II ile gen transkripsiyonu ve ardından translasyon gerçekleşir.

Kalsitriol *nongenomik etki*yle, ikincil haberci sistemini uyararak kalsiyumun plazma membranı boyunca taşınmasını da uyarabilir. Bu şekilde kemik, karaciğer, kas ve bağırsak gibi dokularda, hücrelerde kalsiyum ve klor aktivitesini, *protein kinaz C* dağılımını, *fosfolipaz C* aktivitesini düzenlediği bilinmektedir (67).

Biyolojik olarak aktif olan vitamin D paratiroid, bağırsak, böbrek ve kemik gibi birincil hedef organlara endokrin etki göstererek, kalsiyum ve fosfat metabolizmasını regüle etmektedir. Aktivitesini spesifik *vitamin D reseptörleri* (VDR) ile göstermektedir ve bu reseptörler birçok dokuda bulunmaktadır. Kalsitriol, intestinal ve renal kalsiyum ve fosfat absorpsiyonunu uyarırken, kemikte rezorpsiyonu stimüle ederek *kalsemik etki* göstermektedir. Bu etkilerini; *kalsiyum kanalları* (TRPV5, TRPV6), *kalbindin* ve *kalsiyum ATPaz* indüksiyonunuyla yaptığı gösterilmiştir (68). Ayrıca osteoblast proliferasyonu ve diferansiyasyonunu

destekleyerek kemik sağlığının korunması ve osteoporozun önlenmesinde etkin bir rol oynar.

1.9.5. Vitamin D'nin Klasik Olmayan Etkileri

Vitamin D, kemik üzerindeki klasik etkisinin dışında, farklı etkilere de sahiptir. Bunlar; hormon sekresyonunun, immün fonksiyonun, selüler proliferasyonun ve diferansiyasyonun regölasyonudur. Kalp, mide, pankreas, beyin, deri, gonadlar, retina ve immün sistem hücreleri gibi birçok doku ve hücrenin *VDR* ve *1-alfa-hidroksilaz* ürettiği bilinmektedir.

Retrospektif çalışmalar vitamin D düzeyinin düşüklüğüyle, *enflamatuvar ve immün hastalıklar*; tip 1 DM, Crohn, multipl skleroz, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, astım, psöriyazis, bazı kanserler, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, ateroskleroz, diyabet, depresyon, demans gibi birçok hastalıkla ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Bu durum, vitamin D analoglarının hastalıkların tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmasına ve vitamin D takviyesinin etkinlik ve güvenilirliğini değerlendirmek üzere klinik çalışmaların yoğunlaşmasına zemin hazırlamaktadır.

Vitamin D; IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, TNF α , TGF β gibi proenflamatuvar sitokinlerin üretimini azaltırken, IL-10 gibi *anti-enflamatuvar* sitokinlerin üretimini artırır. Makrofaj aktivasyonu ve T hücre proliferasyonunu inhibe ederek immün ve enflamatuvar süreçleri düzenler (69). Vitamin D'nin akut respiratuvar enfeksiyonları önlemede ve tedaviyi desteklemede etkili olduğu düşünülmektedir (69). Özellikle yaşlı erişkinlerde, vitamin D'nin immün regölasyon için gerekli olduğu bilinmektedir. Vitamin D'nin insan keratinosit proliferasyonunu inhibe ettiği ve farklılaşmayı hızlandırdığı saptanmış, topikal analoglarının geliştirilmesiyle klinikte psöriatik lezyonların şiddetini azalttığı bildirilmiştir (70).

İn vitro çalışmalarda meme, kolon, prostat kanseri hücreleri ve melanom, osteosarkom hücrelerinin kalsitriolün *antiproliferatif* ve *prodiferansiyatif* fonksiyonlarından etkilendiği belirtilmekle beraber, klinik çalışmalarda henüz yeterli destek bulunmamaktadır.

Vitamin D eksikliği, PTH düzeyinde meydana gelen artış ile insülin direncini arttırmaktadır. Diyabet, hipertansiyon, enflamasyon, ateroskleroz ve kardiyovasküler

hastalık riskinde artışa neden olduğundan, vitamin D eksikliği risk faktörü olarak kabul edilmektedir (71).

Vitamin D'nin nörotrofin ekspresyonunu, nöral hücrelerin sağ kalımını regüle ettiği, apoptozu azalttığı, bu nedenle nöroprotektif etkisinin olabileceği düşünülmektedir.

Diyabet gelişiminde vitamin D'nin etkisi üzerine çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Pankreas β hücrelerinde VDR ekspresyonu saptanmıştır. Vitamin D'nin insülin sekresyonunu düzenlediği ve vitamin D eksikliğinin insülin direncini arttırdığı düşünülmektedir. Vitamin D eksikliği, DR'de olduğu gibi mikrovasküler komplikasyonlarla da ilişkilendirilmiştir (71).

1.9.6. Vitamin D ve Oküler Hastalıklarla İlişkisi

İnsan gözünde *immünohistokimyasal* boyama ile kornea, lens, siliyer cisim, retina pigment epiteli, kornea endoteli, gangliyon hücre tabakası ve fotoreseptör hücrelerinde VDR varlığı gösterilmiştir (72). Ayrıca oküler hücrelerde vitamin D *hidroksilaz* aktivitesi gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda, korneal limbal epitel hücre kültürünün UVB'ye maruz bırakılması sonucu de-novo vitamin D üretimi gözlenmiştir. Göz içi sıvılarında vitamin D ve metabolitlerinin bulunduğu ve oral uygulama sonrası düzeylerinin yükseldiği bildirilmiştir (72).

Vitamin D, hücre proliferasyonu ve apoptozu düzenlemesi ve anjiyogenezi inhibe etmesi nedeniyle *antineoplastik* özellik göstermektedir. Vitamin D analoglarının, daha az sistemik toksik etkiyle *koroidal melanom* ve *retinoblastom* gibi oküler tümörlerin tedavisinde adjuvan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (71).

Vitamin D, *TGF β inhibisyonu*yla fibrozisi baskılamaktadır. Patogenezinde fibröz proliferasyon ve skar gelişimi izlenen YBMD'de, enflamasyon, neovaskülerizasyon ve fibrozisi baskılamak amacıyla yakın zamanda destek tedavisine vitamin D eklenmiştir. Subkutanöz vitamin D tedavisinin amiloid ve kompleman birikimini azalttığı saptanmıştır (73).

Deneyisel *otoimmün üveit* modellerinde, vitamin D uygulaması retinal enflamasyon bulgularını azaltmıştır. Deneyisel kornea neovaskülerizasyonu ve keratoplasti çalışmalarında, vitamin D inflamasyonu azaltarak greft rejeksiyonu ve anjiyogenezi baskılamıştır (74).

Miyopi, düşük vitamin D düzeyi ve gen polimorfizmleri ile ilişkili bulunmuştur. Tüm bu bulgular, vitamin D'nin *immün regülatif, antiproliferatif, antienflamatuar, antianjiyogenik, apoptozisi düzenleyici, diferansiyasyonu artırıcı* etkilerinin bulunduğunu ve oküler hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği düşüncesini desteklemektedir.

1.9.7. Vitamin D ve Retina

Vitamin D reseptörlerinin retina ve koroidin vasküler *endotel* hücrelerinde, vitamin D bağımlı kalsiyum bağlayıcı proteinin (kalbindin) insan retinasında eksprese edildiği saptanmıştır (75). RPE hücrelerinde hidroksilaz ekspresyonunun varlığı, vitamin D'nin dönüştürülebildiği düşüncesini doğurmuştur.

Vitamin D'nin antienflamatuar ve antianjiyogenik özelliğe sahip olup, proliferatif retinopatilerin oluşum ve progresyonunu önleyebileceği düşünülmektedir. Özellikle patogenezinde enflamatuar ve neovasküler olayların izlendiği DR ve YBMD'de vitamin D takviyesinin hastalıkların progresyonunu önleyebileceği düşünülmektedir (76).

1.9.8. Vitamin D ve Diyabetik Retinopati

Vitamin D ve DR ile ilgili birçok klinik çalışma mevcuttur. Serum vitamin D düzeyi ile DR'nin şiddeti ve progresyon hızı arasında ters orantı olduğu, aynı zamanda ilerlemiş retinopatisi olan diyabetiklerde vitamin D eksikliğinin sık görüldüğü saptanmıştır. Diyabetik hastalarda serum 25(OH)D düzeyinin 15 ng/mL'nin altında olması, retinopati varlığıyla anlamlı düzeyde ilişkili bulunmuştur. 20 ng/mL'nin altında PDR riskinin arttığı görülmüştür (77).

Diyabet hastalarında TNF- α , TGF- β ve IL-6 gibi enflamatuar sitokinler artmaktadır. Vitamin D, proenflamatuar sitokin üretimini azaltmakta, T hücre ve makrofaj aktivitesini azaltarak *antienflamatuar* özellik göstermektedir.

Vitamin D, endotelial hücre proliferasyonunu, VEGF ve PDGF (platelet türevi büyüme faktörü) ekspresyonunu azaltmaktadır. Deneysel diyabetik rat modellerinde vitamin D'nin retinada VEGF ve TGF- β ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır (78). Kalsitriolün in vivo olarak retinal neovaskülarizasyonu inhibe ettiği, *in-vitro* olarak da anjiyogenik sürecin spesifik evrelerini inhibe ettiği gösterilmiştir. *Antianjiyogenik* etkilerini, endotel hücrelerinde apoptoz indüksiyonu

mekanizmasıyla da yapması olası görülmektedir. Bunun yanı sıra, HIF-1 ve VEGF gen ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Bu nedenle vitamin D'nin kalsitriol aracılığıyla VEGF'i azaltarak DR komplikasyonlarını önleyebileceği, antienflamatuar ve antianjiyogenik etkileriyle de DR gelişimini önleyebileceği düşünülmektedir (79).

Vitamin D, DR patogenezinde rol oynayan matriks metalloproteinazların (MMP) gen ekspresyonunu da baskılamaktadır. VDR'lerinde görülen genetik polimorfizmin DR insidansını ve şiddetini değiştirdiği görülmüştür.

Vitamin D eksikliği saptanan erken evre diyabet hastalarında retina sinir lifi tabakası kalınlığının anlamlı düzeyde azalmış olarak saptanması, vitamin D'nin olası *nöroprotektif* etkisini düşündürmektedir (80). Vitamin D'nin hiperglisemi ve hipertansiyon üzerine koruyucu etkilerinin de DR gelişimi ve progresyonunun önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir.

Vitamin D3'ün *antioksidan* etkilere sahip olduğu, dokularda oksidatif hasara karşı koruyucu özelliğini redüktan özellikteki G6PD ekspresyonunu arttırarak meydana getirdiği saptanmıştır (81).

Hücre içi elektron dengesinin bozulması, oksidatif stres, mitokondriyal defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptozis sürecini aktive etmektedir. Oksidatif strese, kalsiyum dengesi ve mitokondriyal membran potansiyeli değişmekte, mitokondrilerde ve DNA'da hasar oluşumu sonucu apoptozis uyarılmaktadır. Bu durum oksidatif stres, vitamin D ve kalsiyum arasındaki dengenin patogenezdaki önemini göstermektedir (82). Bu çalışmalar, vitamin D'nin biyolojik fonksiyonlarından antienflamatuar, antianjiyogenik, antiapoptotik, antioksidan etkilerini desteklediğinden DR destek tedavisindeki yeri araştırılmaktadır.

1.9.9. Vitamin D Eksikliği ve Takviyesi

Vitamin D, son yıllarda üzerine çok sayıda çalışma yapılması, klinik tetkiklerinin daha sık takip edilmesi ve zenginleştirilmiş gıda takviye ürünlerinin sayısındaki hızlı artış nedeniyle dikkati çekmektedir. Türkiye'de %90 oranında vitamin D eksikliği saptanmıştır (83). Avrupa popülasyonunun yaklaşık %40'ında serum vitamin D düzeyleri yetersiz olarak saptanmıştır ve takviyesi önerilmektedir (84).

Genel olarak optimal serum 25(OH)D düzeyleri 30-80 ng/mL (75-200 nmol/L) doz aralığındadır. Serum 25(OH)D düzeyi; 20-30 ng/mL ise D vitamini yetmezliği, < 20 ng / mL (50 nmol/mL) *D vitamini eksikliği*, >150 ng/mL ise *D vitamini intoksikasyonu* olarak değerlendirilir (85). Sağlıklı bir insanda tavsiye edilen günlük diyetle vitamin D alımının 600 IU/gün düzeyinde, 70 yaş üstü erişkinlerde ise 800 IU/gün olması gerektiğini belirtilmektedir (86). Diyetle takviye alım miktarının daha yüksek tutulmasını öneren çalışma grupları da mevcuttur. Ayrıca, vitamin D'nin vücuttaki döngüsü yavaş olduğundan günlük dozlar yerine haftalık dozların uygulanması da önerilmiştir.

Çok yüksek serum 25(OH)D konsantrasyonu hiperkalsemiye yol açabilir. *Hiperkalsemi* toksisite indikatörü olarak belirlenmiştir. Bu nedenle tolere edilebilir üst alım düzeyleri hesaplanmıştır. Hiperkalsemiyle ilişkili klinik semptom ve bulgular; kas güçsüzlüğü, anoreksi, kusma, konstipasyon, taşikardik aritmi, yumuşak doku kalsifikasyonu, hiperkalsiüri, nefrolitiazis, nefrokalsinozistir. *Tolere edilebilir üst alım düzeyleri*; erişkinlerde 4000 IU/gün, çocuklarda 2000 IU/gün, bir yaş altındaki bebeklerde 1000 IU/gün olarak belirlenmiştir (87, 88).

Bu çalışmada, streptozotosin indüksiyonu ile diyabet oluşturulmuş ratların retina dokusunda; VEGF, TRPM2, PCNA immünreaktivitelerini, oksidatif stres düzeyini ve apoptozisi değerlendirmek ve bu parametreler üzerine vitamin D'nin etkisini incelemek amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 31.01.2018 tarih ve 22 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı.

2.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Deneysel çalışmada kullanılan 41 adet 8-10 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında bulundukları ortamın sıcaklığı 22–25°C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00- 07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Deney başlangıcı ve sonunda hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı.

2.2. Diyabet İndüksiyonu

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak 20 adet sıçanda diyabet oluşturmak için 26 gauge'lık insülin enjektörüyle 60 mg/kg dozunda STZ (Streptozosin, Zanosar, Pharmacia, France) intraperitoneal (i.p) olarak 0,4 ml (0,1 M) sodyum-sitrat tamponunda (pH:4,5) çözündürülerek tek doz uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan alınarak, glukometre cihazındaki ölçüm sonucu açlık kan glikozu > 250 mg/dl'yi geçen sıçanlar diyabetik olarak kabul edildi. Kan şekeri ölçümü Chemstrip bG (Bio-Dynamics, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ile yapıldı. Sıçanların açlık kan glikoz düzeylerini saptamak için kan örnekleri, 8-10 saatlik açlık sonrasında sabah 8-10 arasında alındı.

2.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 8-10 haftalık 41 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar 5 gruba ayrıldı;

Grup I (Kontrol grubu) (n=7); Deney süresi olan 10 hafta boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II (Sitrata tampon grubu) (n=7); Tek doz 0,1 M sodyum sitrat tamponu i.p uygulandı.

Grup III (Kolekalsiferol grubu) (n=7); 10 Haftalık deney süresi boyunca her gün kolekalsiferol 200 IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı.

Grup IV (Diabetes Mellitus grubu) (n=10); 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum sitrat tamponunda (Ph:4,5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden kan glikoz düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi.

Grup V (Diabetes Mellitus + Kolekalsiferol) (n=10); 60 mg/kg olacak şekilde tek doz STZ 0,1 M sodyum sitrat tamponunda (Ph:4,5) çözündürülerek i.p olarak uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan glikozu düzeyi 250 mg/dl üzerinde olanlar diyabetik kabul edildi. Deneysel diyabet oluşturulduktan sonra deney süresi boyunca her gün kolekalsiferol 200IU/gün oral yolla damlalık aracılığıyla uygulandı.

2.4. Örneklerin Alınması

Tüm gruplardaki sıçanlar onuncu hafta sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg)+xylazine (10 mg/kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edildiler. Dekapitasyonun ardından sıçanların göz dokuları hızla çıkarıldı. Tüm gruplara ait göz dokuları histolojik çalışma için % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi.

2.5. Biyokimyasal Çalışma

2.5.1. Kan glikoz düzeyleri

Kan glikoz düzeyleri çalışma süresince glukometre [Chemstrip bG (Bio-Dynamics, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN)] ile ölçüldü. Bununla birlikte diğer biyokimyasal çalışmalar Aydın (89)'nin kullandığı moleküler teknikler modifiye edilerek aşağıdaki gibi yapılmıştır.

2.5.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Seviyesi Ölçümleri

2.5.2.1. TAS Ölçümü

Serum TAS düzeyleri Olympus AU2700 otoanalizöründe Rel Assay Total Antioksidan Status Test Kiti (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (90).

Çalışma Prensibi: Örnekteki antioksidanlar, asetat tampon (0,4 mol/L, pH:3,6) solüsyonunun içerisinde bulunan konsantre haldeki koyu mavi-yeşil renkli ABTS•+(30 mmol/L) [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] radikalini indirgenmiş renksiz ABTS şekline çevirir. Yüksek pH'daki asetat tampon (0,4 mol/L, pH:5,8) solüsyonu ile dilüe edildiğinde örneklerde bulunan antioksidanlar sayesinde ABTS molekülü indirgenir ve renk açılır. Örneklerde bulunan antioksidan maddelerin konsantrasyonu ile renkteki açılma arasında ters orantı vardır. Spektrofotometrik olarak saptanan absorbans değişikliği örnekteki antioksidan seviyesiyle ilişkilidir. Stabil antioksidan standart solüsyonu (Trolox equivalent) ile kalibrasyon yapılır. Vitamin E analogu olan Trolox ile reaksiyon hızı ayarlanır ve birimi Trolox equivalent/L'dir (90).

2.5.2.2. TOS Ölçümü

Serum TOS düzeyleri Olympus AU2700 otoanalizöründe Rel Assay Total Oksidan Status Test Kiti (Mega Tıp San. ve Tic. Ltd. Şti. Gaziantep, Türkiye) kullanılarak ölçüldü (91).

Çalışma Prensibi: Örnekte bulunan oksidan ajanlar ferröz iyon şelatör kompleksini ferrik iyonla okside ederler. Reaksiyon okside edici moleküller tarafından sürdürülür. Ferik iyonu, asidik ortamda bulunan kromojen ile renkli bir kompleks yapar. Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örneklerde bulunan oksidan maddelerin miktarı ile doğru orantılıdır. Bu ölçüm yöntemi hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar litrede mikromolar hidrojen peroksit equivalent ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv/L) olarak ölçülür.

2.6. Histolojik Çalışma

Her gruptan alınan göz dokuları, % 10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra musluk suyunda yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden geçirildi (Tablo 1). Daha sonra dokular parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında kesitler alındı.

Tablo 1. Histolojik takip serileri

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

2.7. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan 4–6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6,0'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Kaynatma sonrası oda ısısında yaklaşık 20 dakika soğutmak için bekletilen dokular PBS (Phosphate Buffered Saline, P4417, Sigma-Aldrich, USA) ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için hidrojen peroksid blok solüsyonu ile 5 dakika inkübe edildi (Hydrogen Peroxide Block , TA-125-HP, Lab Vision Corporation, USA). PBS ile 3x5 dakika yıkanan dokulara zemin boyasını engellemek için 5 dakika Ultra V Block (TA-125-UB, Lab Vision Corporation, USA) solüsyonu uygulandıktan sonra 1/200 oranında dilüe edilen TRPM2, VEGF ve PCNA primer antikolar (Rabbit Anti-TRPM2 antibody, ab101738, Abcam, Cambridge, UK, Vascular endothelial growth factor, E2611, Spring Bioscience, USA, Monoclonal MouseAnti-Proliferating Cell Nuclear Antigen, M0879, Dako, Baltimore, MD, USA) ile 60 dakika nemli ortamda oda

ısısında inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkandıktan sonra sekonder antikor (biotinylated Goat Anti-Poliyvalent (anti-mouse / rabbit IgG), TP-125-BN, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildi. Dokular, Sekonder antikor uygulanmasından sonra PBS ile 3x5 dakika yıkayıp Streptavidin Peroxidase (TS-125-HR, Lab Vision Corporation, USA) ile 30 dakika nemli ortamda oda ısısında inkübe edildikten sonra PBS içerisine alındı. Dokulara 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) Substrate + AEC Chromogen (AEC Substrate, TA-015 ve HAS, AEC Chromogen, TA-002-HAC, Lab Vision Corporation, USA) solusyonu damlatılıp ışık mikroskopunda görüntü sinyali alındıktan sonra eş zamanlı olarak PBS ile yıkamaya alındı. Mayer's hematoksilen ile zıt boyaması yapılan dokular PBS ve distile sudan geçirilerek uygun kapatma solusyonu (Large Volume Vision Mount, TA-125-UG, Lab Vision Corporation, USA) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295).

Boyamada immünreaktivitenin yaygınlığı (0.1: <%25, 0.4:%26-50, 0.6:%51-75, 0.9:%76-100) ve şiddeti (0:yok, +0.5: çok az, +1:az, +2: orta, +3:şiddetli) esas alınarak *histoskor* oluşturuldu.

Histoskor= yaygınlık x şiddet

2.8. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptozise giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. % 0,05'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3'lük hidrojen peroksit ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solusyonu (%70 µl Reaction Buffer+%30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer'da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Perosidaz ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler

görüntülendi. Harris hematoksilin ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DM500 mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı (Leica DFC295). TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde 10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplanarak istatistiksel analizleri yapıldı.

Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3).

2.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirlendi. İstatistiksel analiz için SPSS version 22 programı kullanıldı. Gruplar arası değerlendirme One-way ANOVA ve Posthoc Tukey testi ile yapıldı. $p < 0.05$ değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

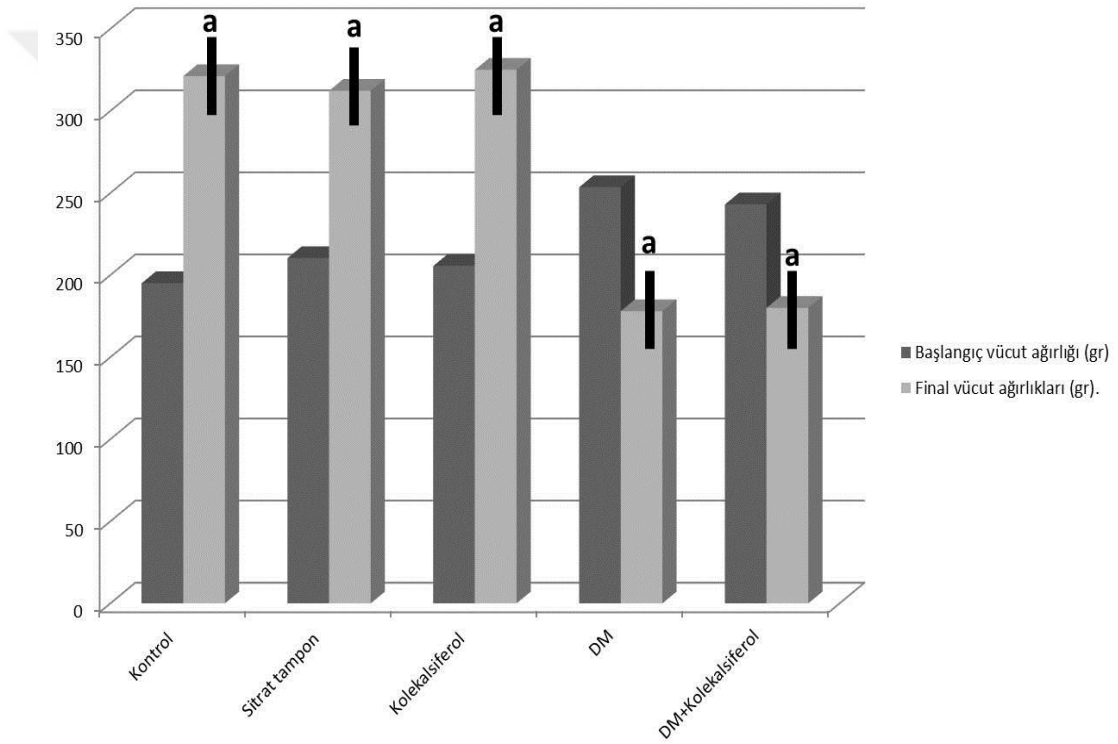
Tablo 2. TUNEL boyama prosedürü.

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

3. BULGULAR

3.1. Klinik Bulgular

Tüm gruplara ait sıçanların başlangıç ve final vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde; Kontrol, Sitrat tampon ve Kolekalsiferol gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıç vücut ağırlıklarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.001$). Bununla birlikte, Diyabet ve Diyabet+Kolekalsiferol gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıkları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p<0.001$) (Şekil 9).



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Başlangıç vücut ağırlığına göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

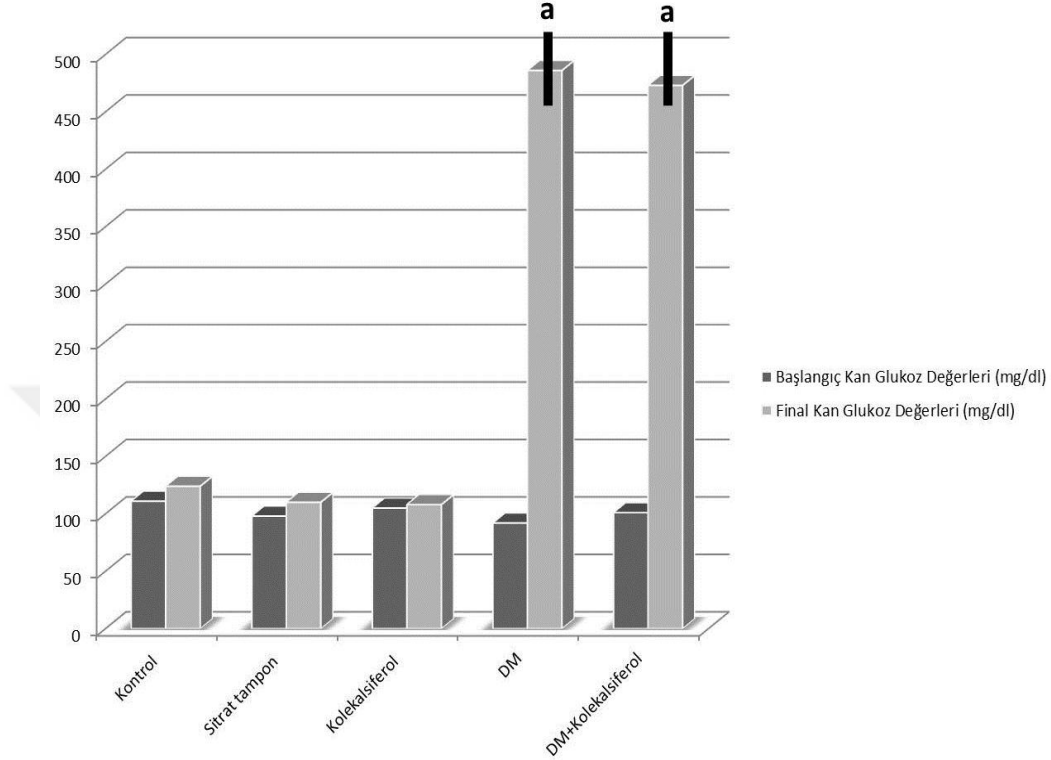
Şekil 9. Deney hayvanlarının başlangıç ve final vücut ağırlıkları (gr).

3.2. Biyokimyasal Bulgular

3.2.1. Kan glikoz miktarları

Tüm gruplara ait sıçanların başlangıç ve final kan glikoz miktarları değerlendirildiğinde; Kontrol, Sitrat tampon ve Kolekalsiferol gruplarındaki sıçanların kan glikoz miktarlarında başlangıca göre bir değişiklik gözlenmedi.

Bununla birlikte, Diyabet ve Diyabet+Kolekalsiferol gruplarındaki sıçanların kan glikoz miktarları başlangıca göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak izlendi ($p<0.001$) (Şekil 10).



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

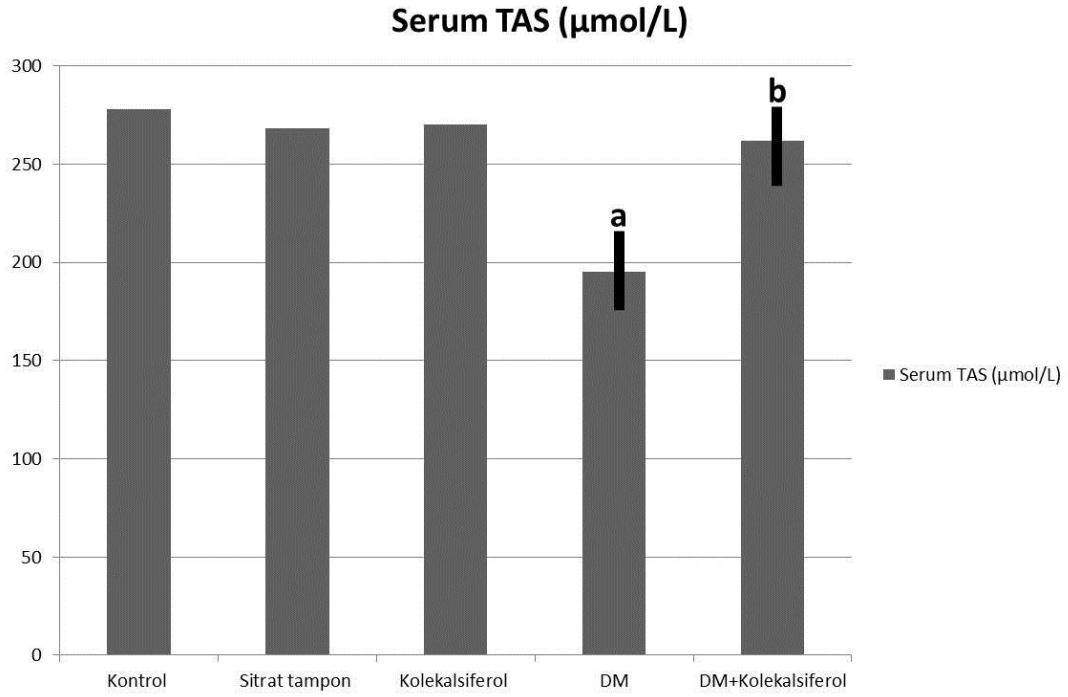
^a Başlangıç vücut kan-glikoz değerlerine göre karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

Şekil 10. Deney hayvanlarının başlangıç ve final (10. hafta) kan glikoz miktarları (mg/dl)

3.2.2. Total Antioksidan Kapasitesi (TAS) ve Total Oksidatif Stres (TOS) Düzeyleri

3.2.2.1. TAS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum TAS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TAS düzeyleri; Kontrol, Sitrat tampon ve Kolekalsiferol gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış izlendi ($p<0.006$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Kolekalsiferol grubunda TAS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış gözlemlendi ($p<0.004$) (Şekil 11).



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

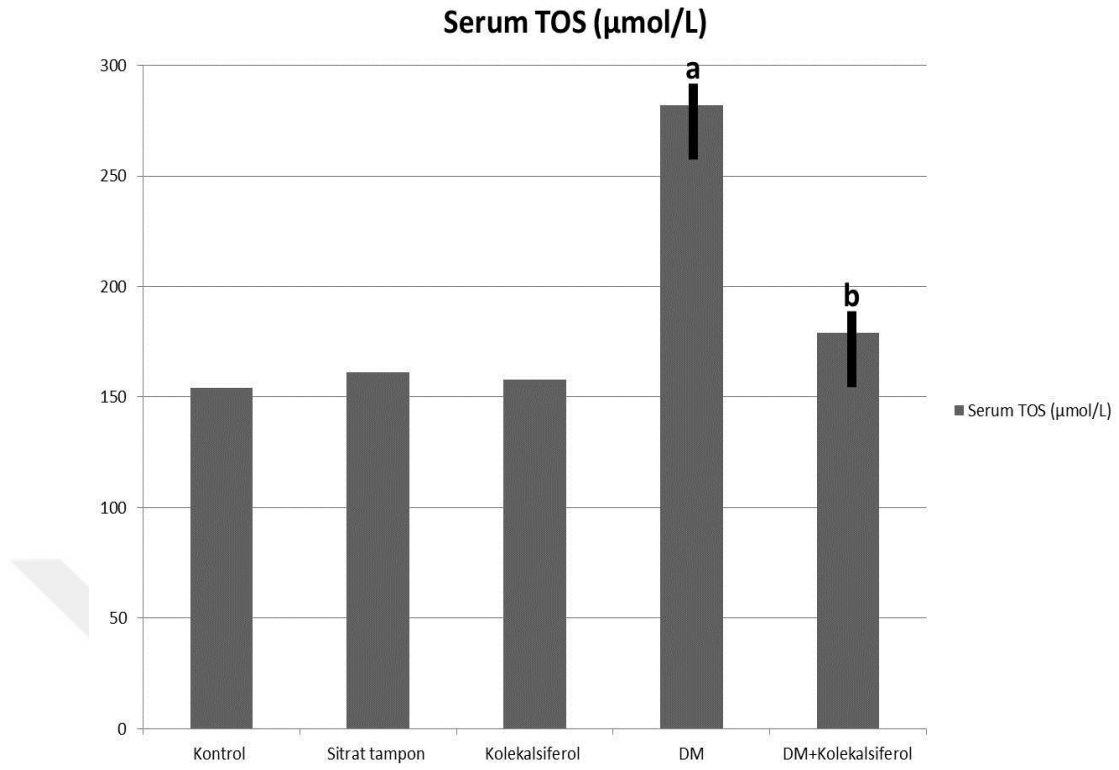
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 11. Serum TAS düzeyleri

3.2.2.2.TOS Düzeyleri

Tüm gruplara ait serum TOS düzeylerinin değerlendirilmesi için yapılan biyokimyasal çalışmada; TOS düzeyleri; Kontrol, Sitrat tampon ve Kolekalsiferol gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış izlendi ($p < 0.001$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+Kolekalsiferol grubunda TOS düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış gözlemlendi ($p < 0.001$) (Şekil 12).



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 12. Serum TOS düzeyleri

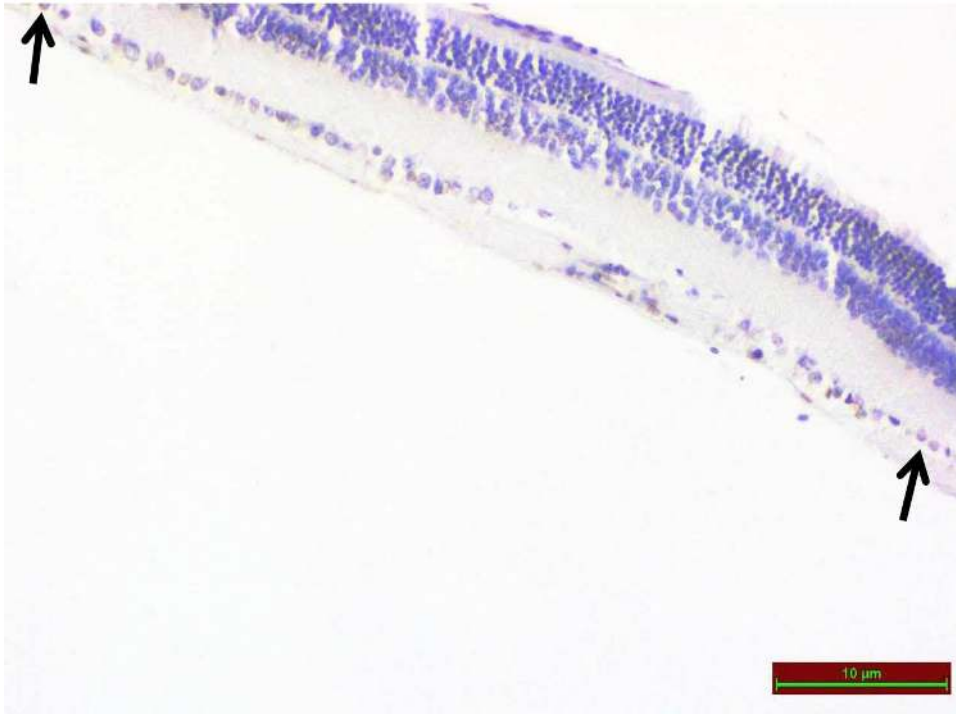
3.3. TUNEL Bulgular

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği retina dokusunda gangliyon hücre tabakasında (siyah ok) gözlemlendi.

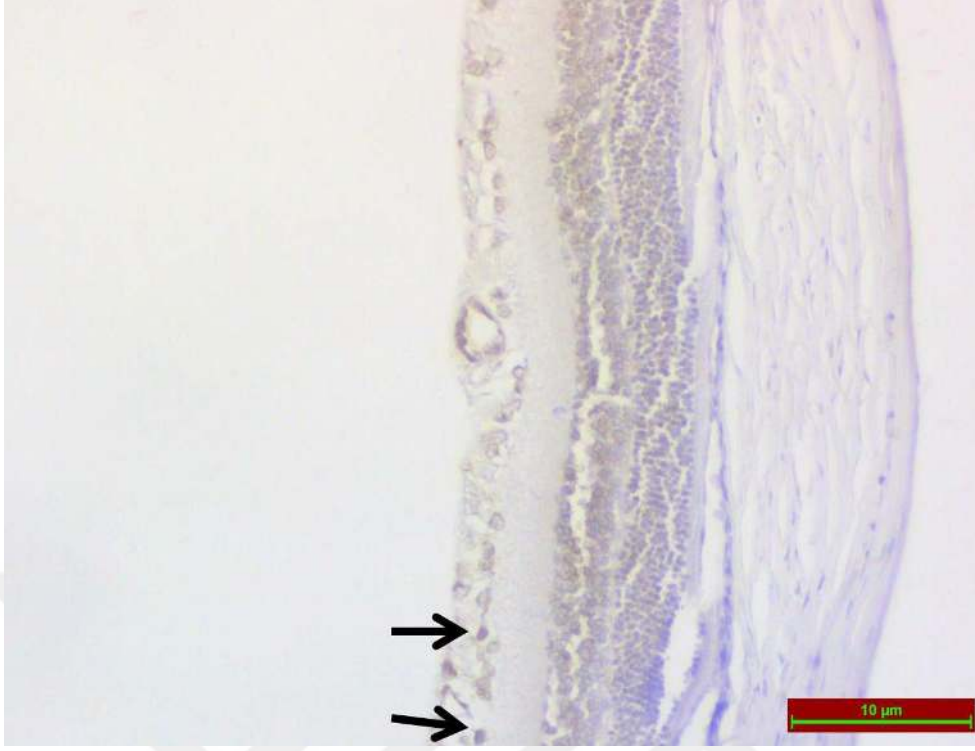
TUNEL pozitifliği; Kontrol (Şekil 13), Sitrat tampon (Şekil 14) ve Kolekalsiferol (Şekil 15) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 16) grubunda TUNEL pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p < 0.001$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise TUNEL pozitifliği Diyabet+Kolekalsiferol (Şekil 17) grubunda belirgin olarak azalmıştı ($p < 0.001$). Bu grupta DM grubuna kıyasla apoptotik indeksin azalmış olduğu saptandı (Şekil 18).



Şekil 13. Kontrol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler



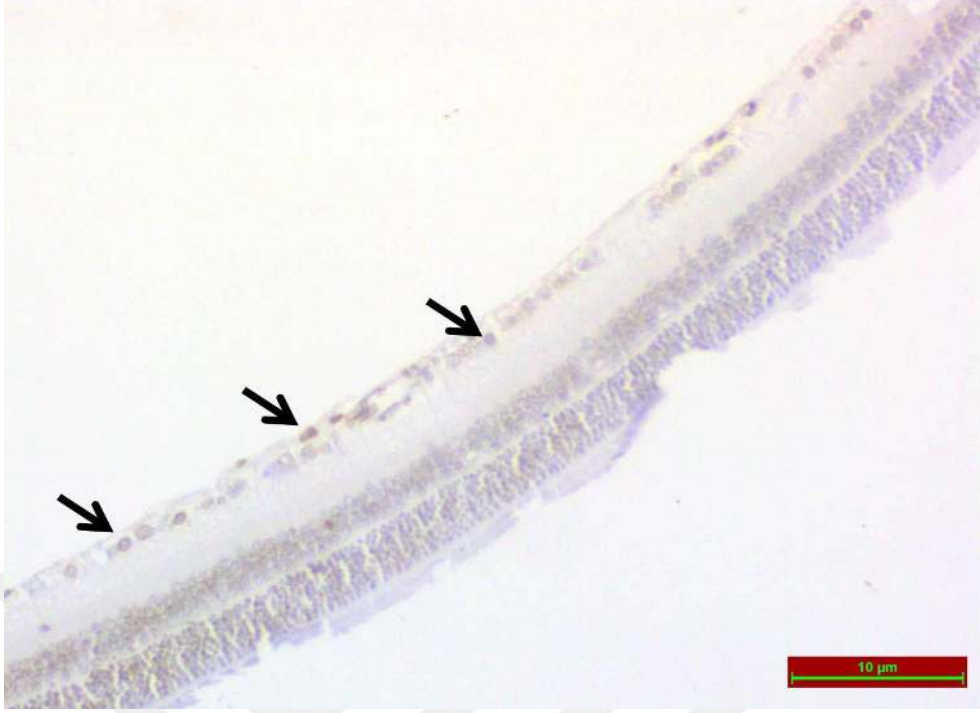
Şekil 14. Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler



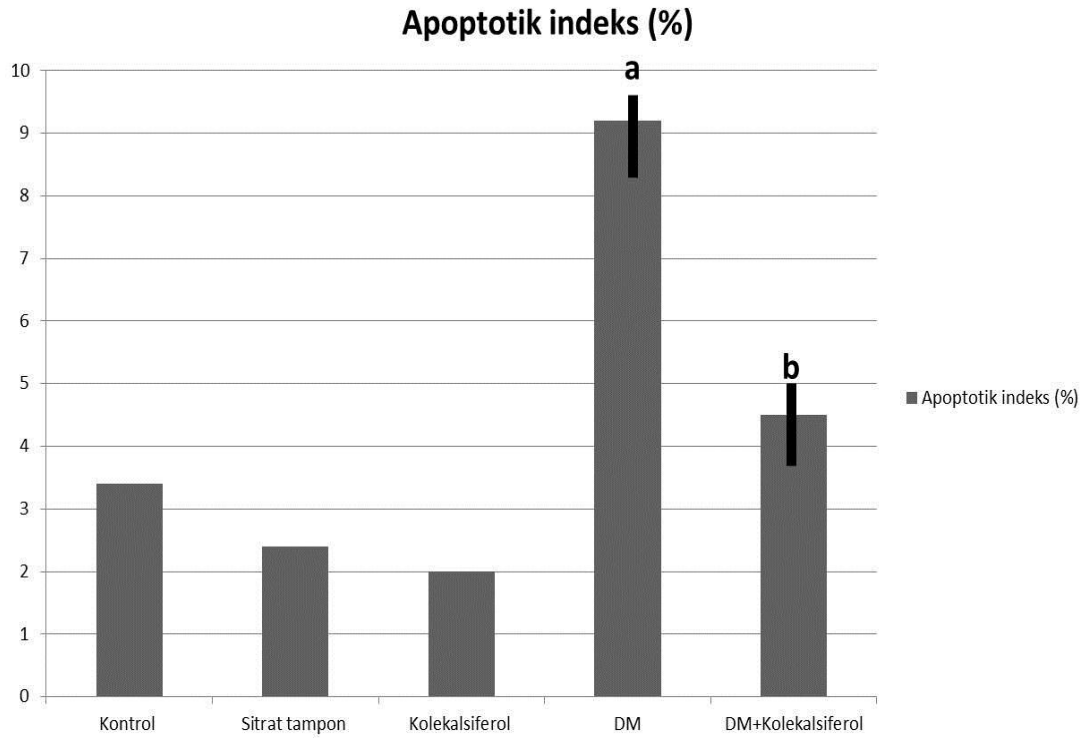
Şekil 15. Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler



Şekil 16. DM grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler



Şekil 17. DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TUNEL pozitif hücreler



Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

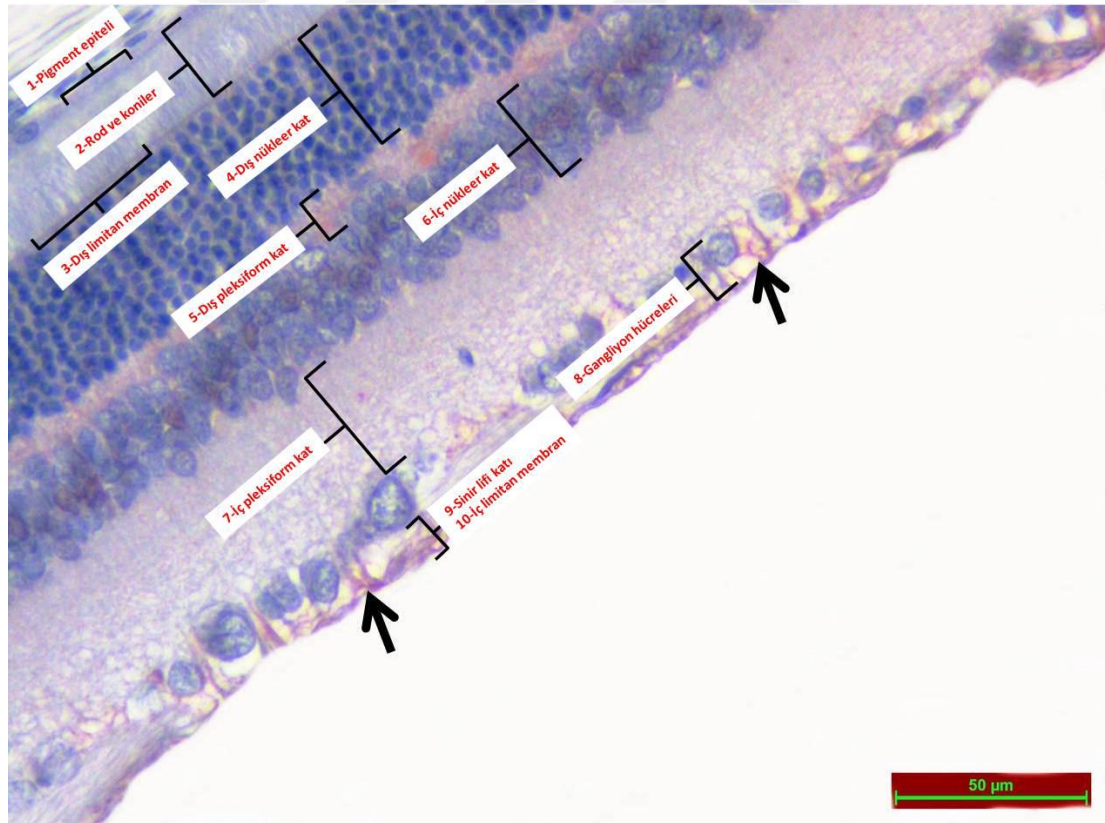
Şekil 18. Apoptotik İndeks

3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

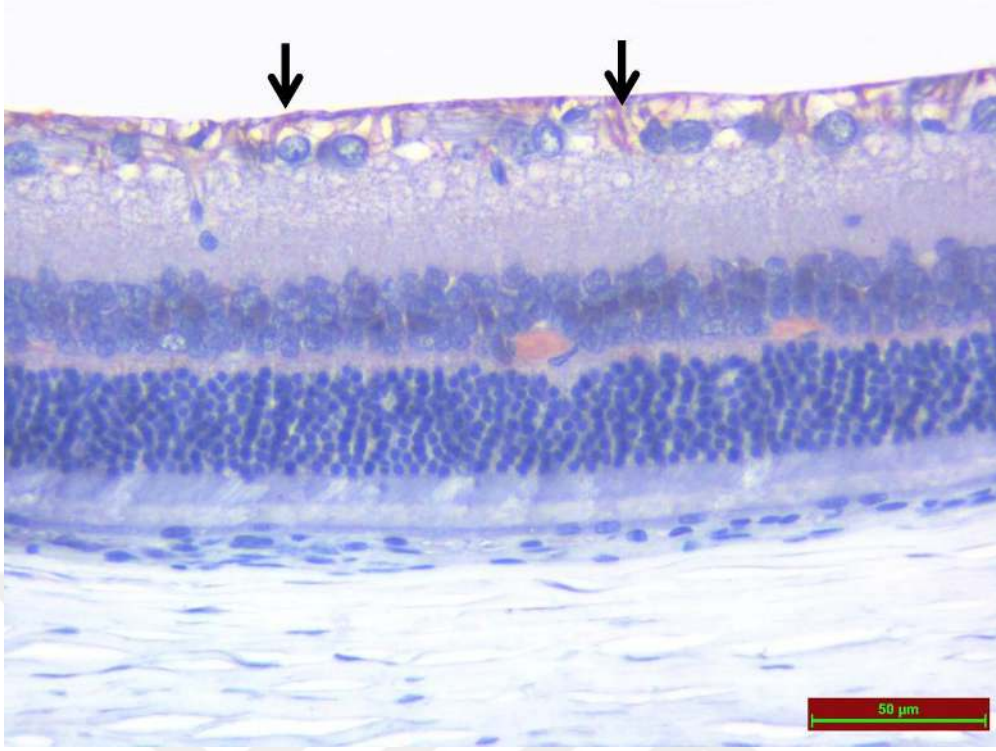
3.4.1. TRPM2 İmmünreaktivitesi

Transient reseptör potansiyeli Melastatin 2 immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TRPM2 immünreaktivitesi gangliyon hücre tabakası ve sinir lifi tabakasında (siyah ok) gözlemlendi.

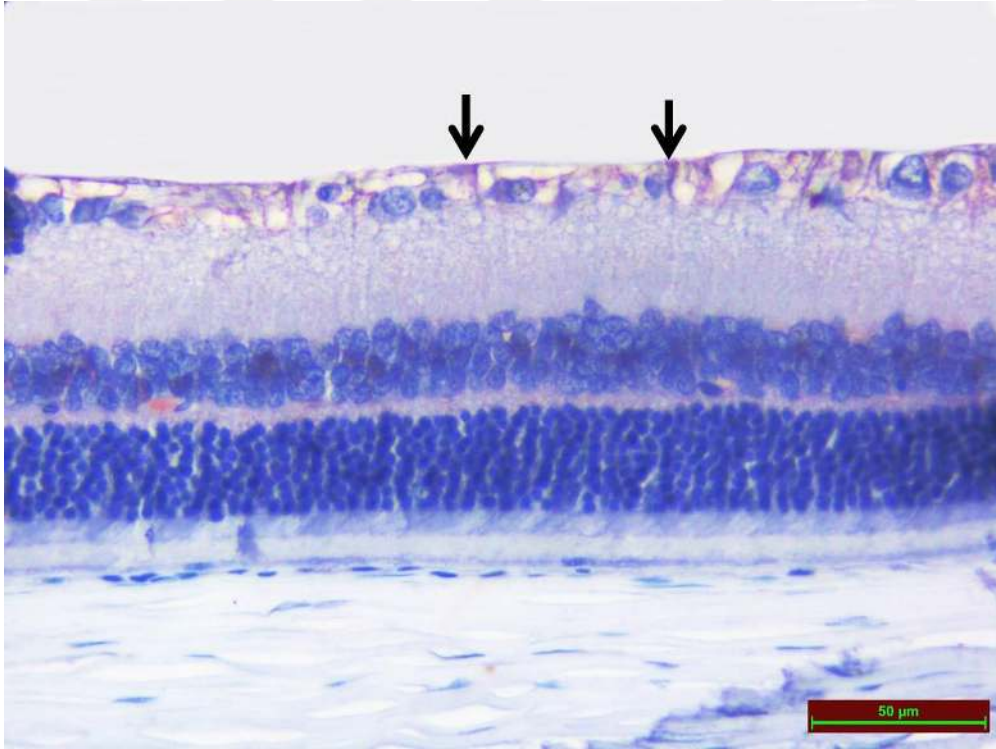
Transient reseptör potansiyeli Melastatin 2 immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 19), Sitrat tampon (Şekil 20) ve Kolekalsiferol (Şekil 21) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 22) grubunda TRPM2 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p<0.007$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+ Kolekalsiferol (Şekil 23) grubunda TRPM2 immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış bulundu ($p<0.019$). TRPM2 histoskorlamasıyla bu azalma gösterildi (Şekil 24).



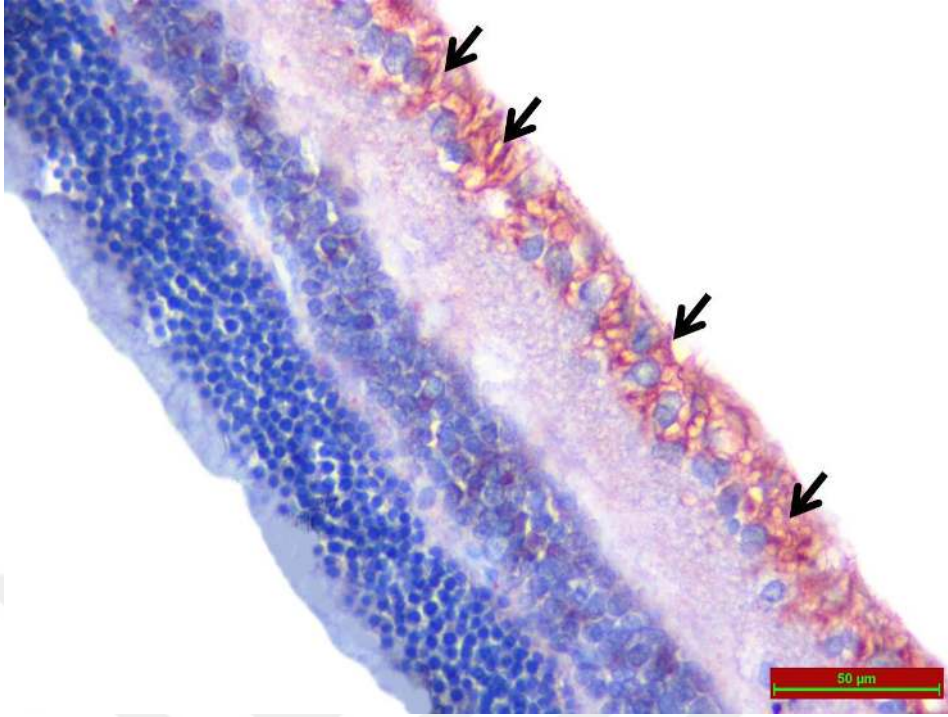
Şekil 19. Kontrol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi



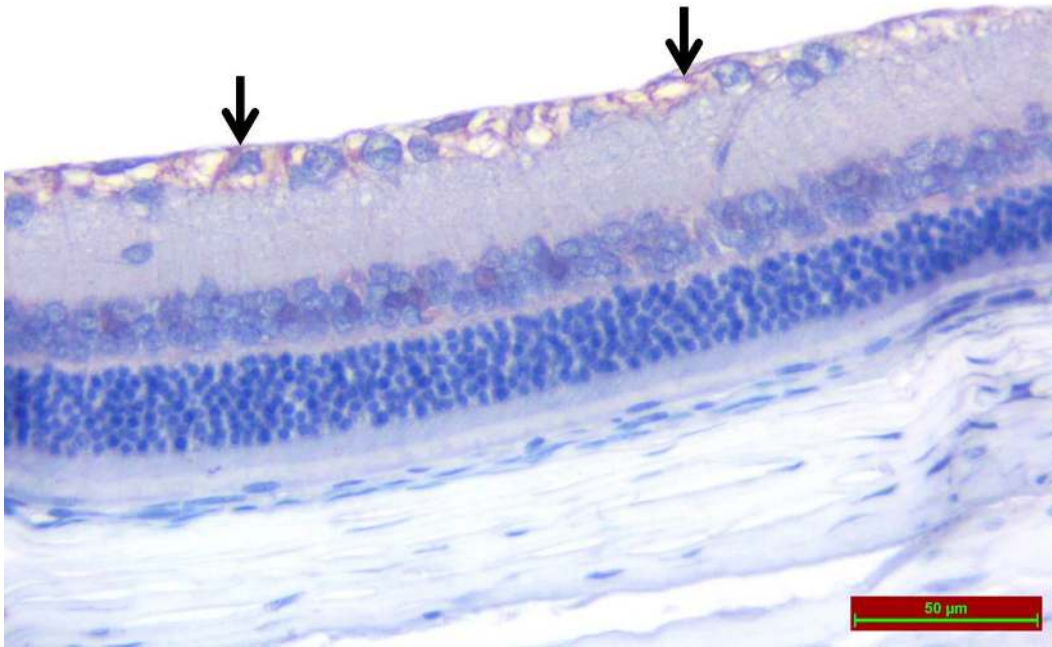
Şekil 20. Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi



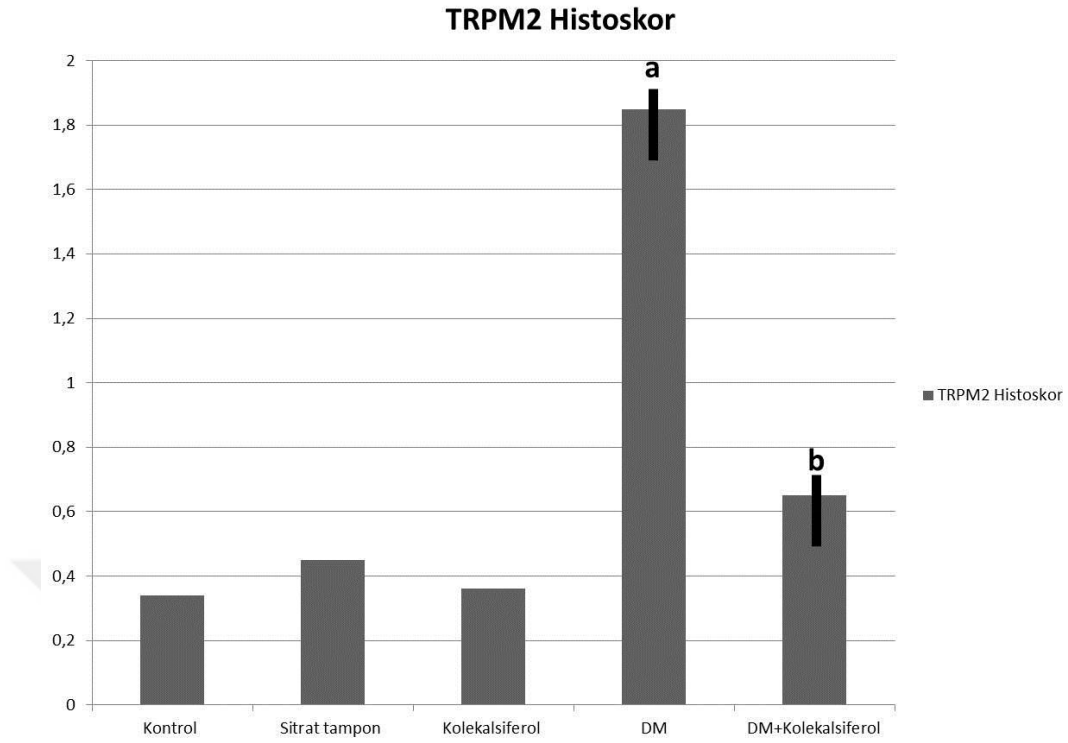
Şekil 21. Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi



Şekil 22. DM grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi



Şekil 23. DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda TRPM2 immünreaktivitesi



Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

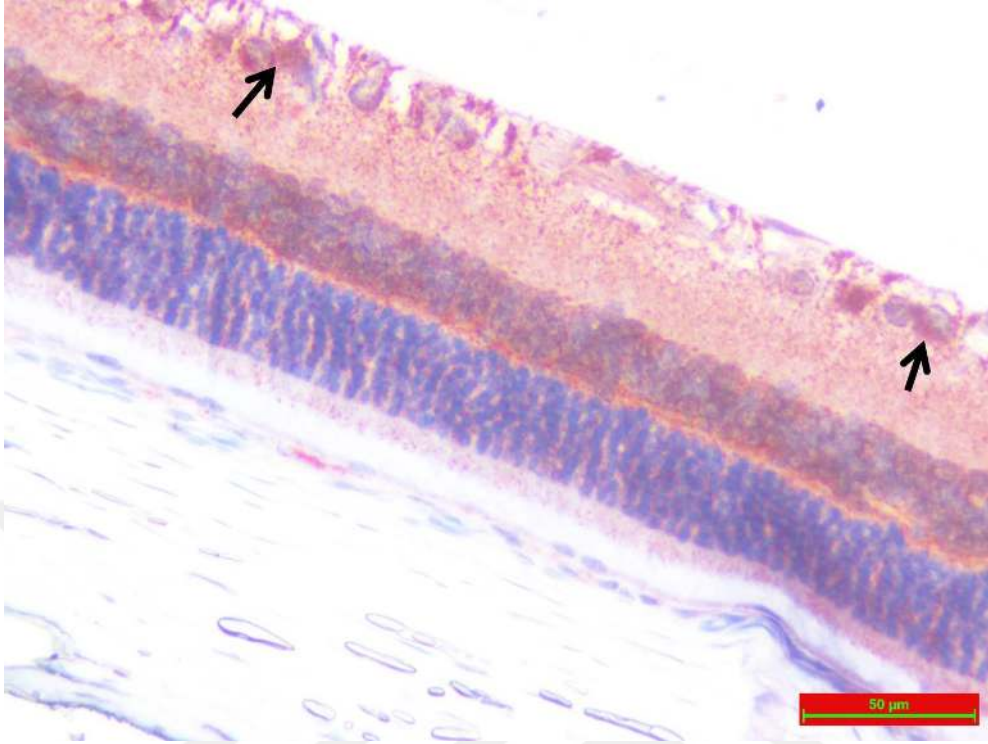
^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 24. TRPM2 Histoskoru

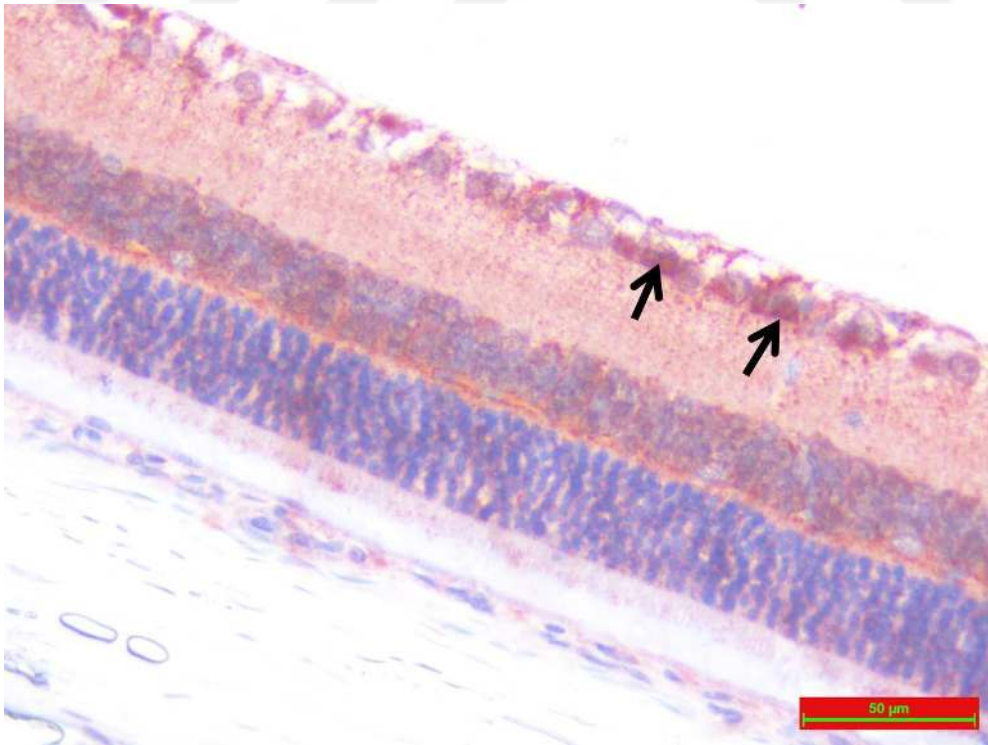
3.4.2. VEGF İmmünreaktivitesi

Vasküler endotelyal büyüme faktörü immünreaktivitesi için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; VEGF immünreaktivitesi gangliyon hücre tabakası ve sinir lifi tabakasında (siyah ok) gözlemlendi.

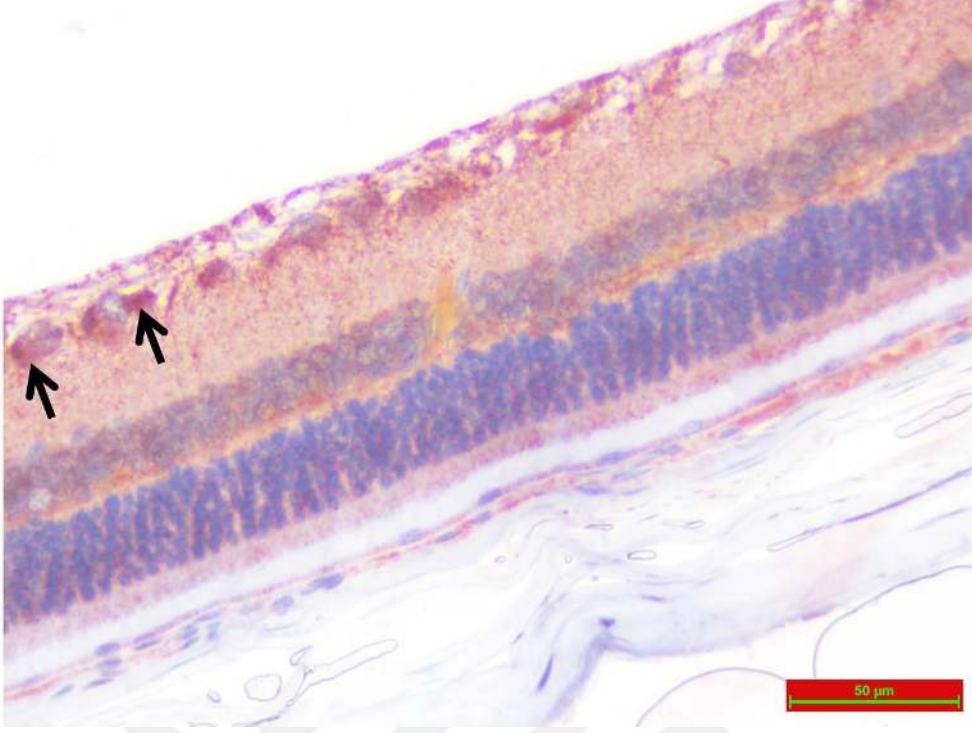
Vasküler endotelyal büyüme faktörü immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 25), Sitrat tampon (Şekil 26) ve Kolekalsiferol (Şekil 27) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 28) grubunda VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış bulundu ($p < 0.007$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+ Kolekalsiferol (Şekil 29) grubunda VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p < 0.007$). VEGF histoskorlamasında da bu gruptaki azalmanın anlamlılığı gösterildi (Şekil 30).



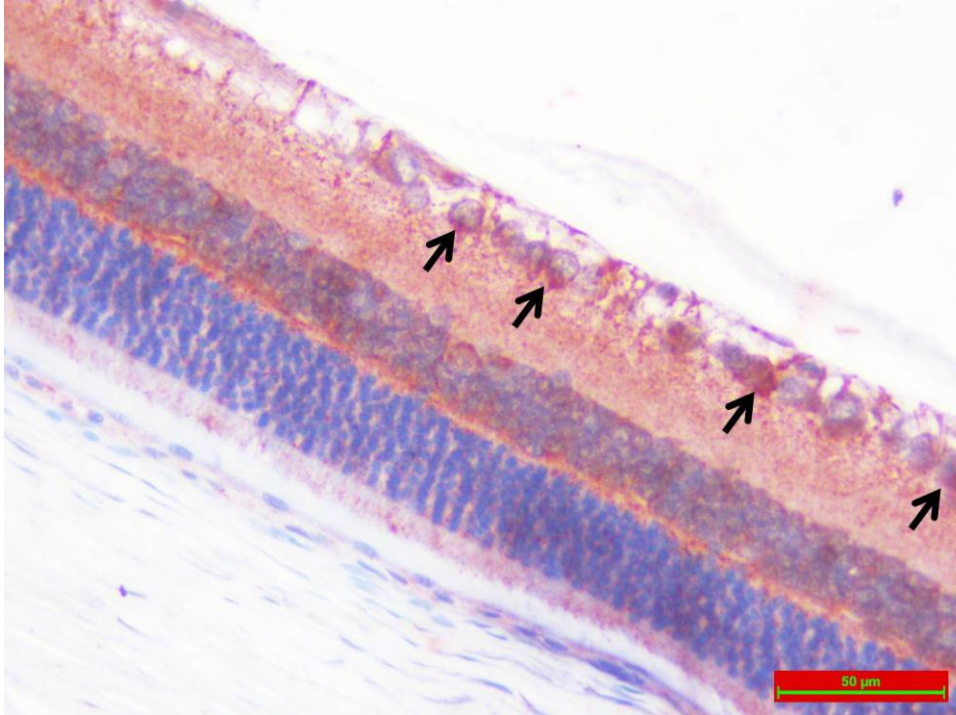
Şekil 25. Kontrol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi



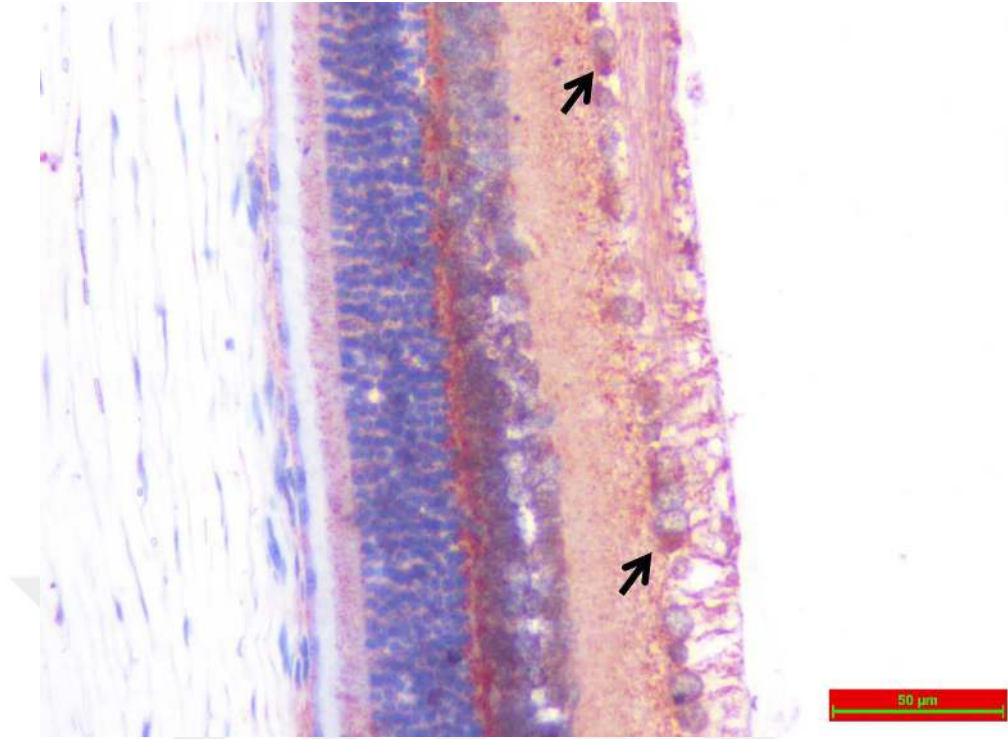
Şekil 26. Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi



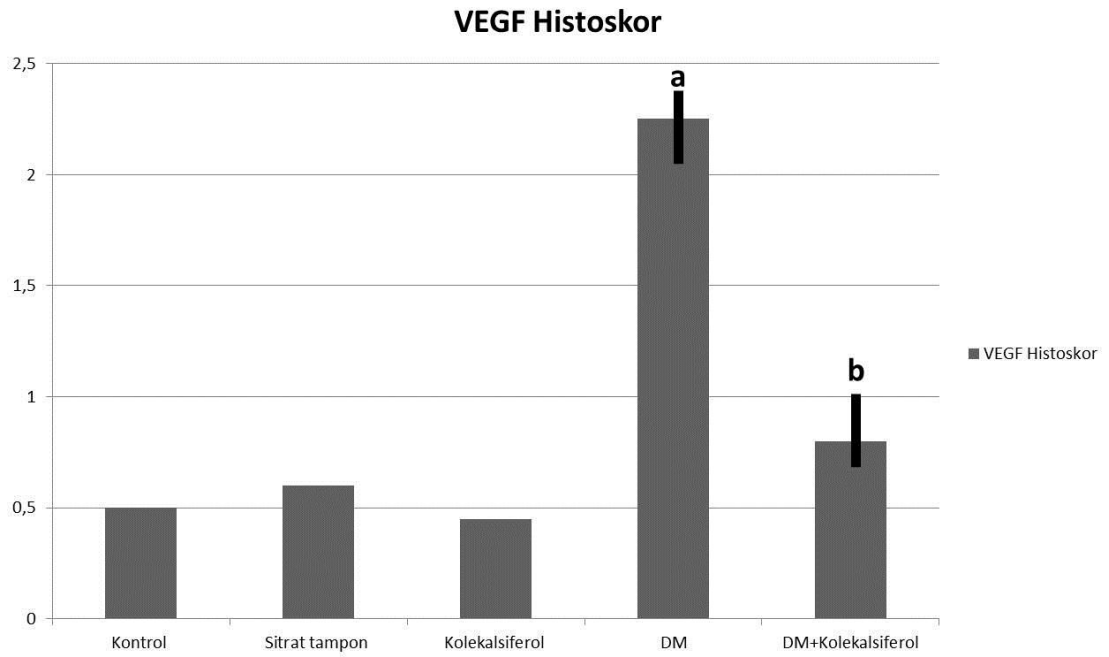
Şekil 27. Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi



Şekil 28. DM grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi



Şekil 29. DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda VEGF immünreaktivitesi



Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

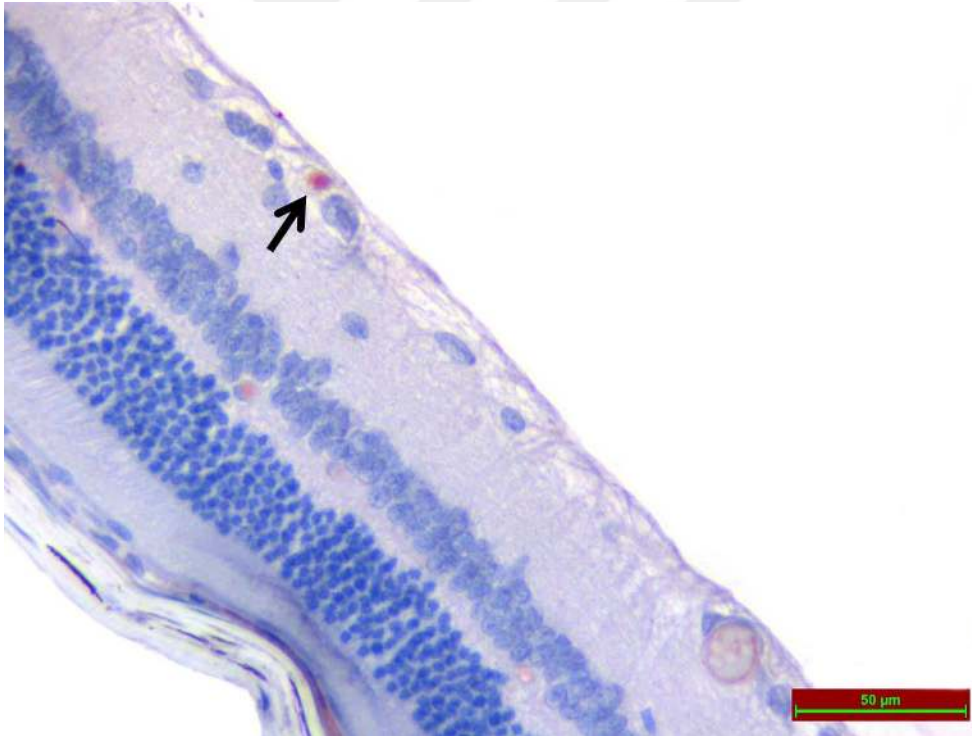
^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 30. VEGF Histoskoru

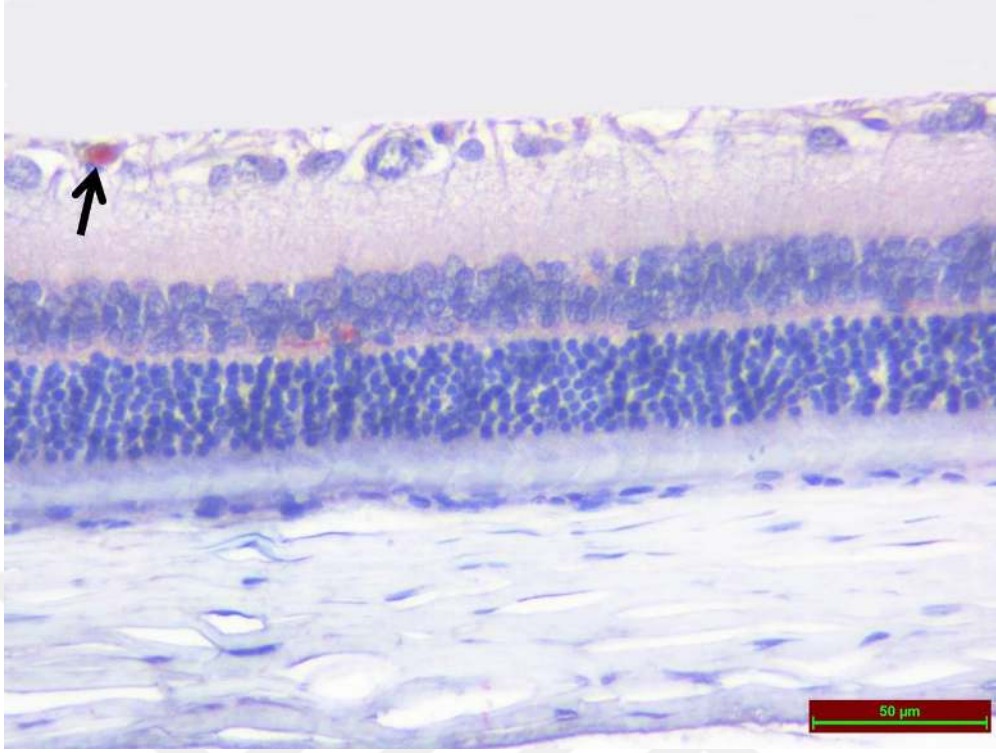
3.4.3. PCNA İmmünreaktivitesi

Proliferatif hücre nükleer antijeni immünreaktivitesi (PCN) için yapılan immünohistokimyasal boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; PCNA immünreaktivitesi sinir lifi tabakasında ve iç limitan membranda (siyah ok) gözlendi.

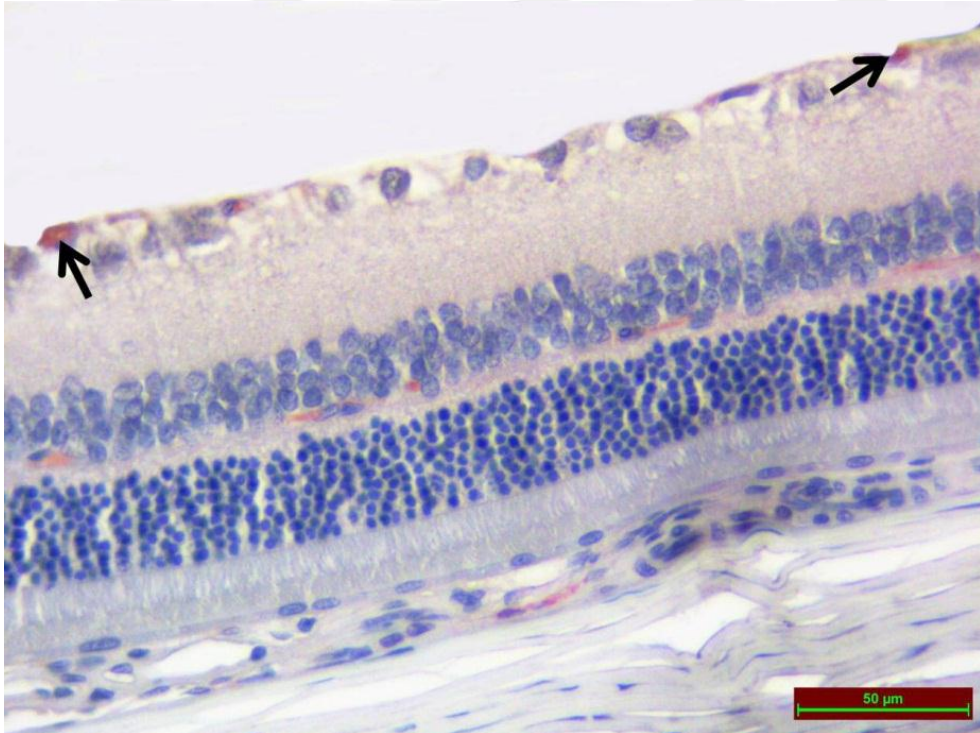
Proliferatif hücre nükleer antijeni immünreaktivitesi; Kontrol (Şekil 31, Sitrat tampon (Şekil 32) ve Kolekalsiferol (Şekil 33) gruplarında benzerdi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında Diyabet (Şekil 34) grubunda PCNA immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olarak bulundu ($p<0.007$). Diyabet grubu ile kıyaslandığında ise Diyabet+ Kolekalsiferol (Şekil 35) grubunda PCNA immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p<0.019$). PCNA histoskorlaması yapılarak azalma oranı gösterildi (Şekil 36).



Şekil 31. Kontrol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi



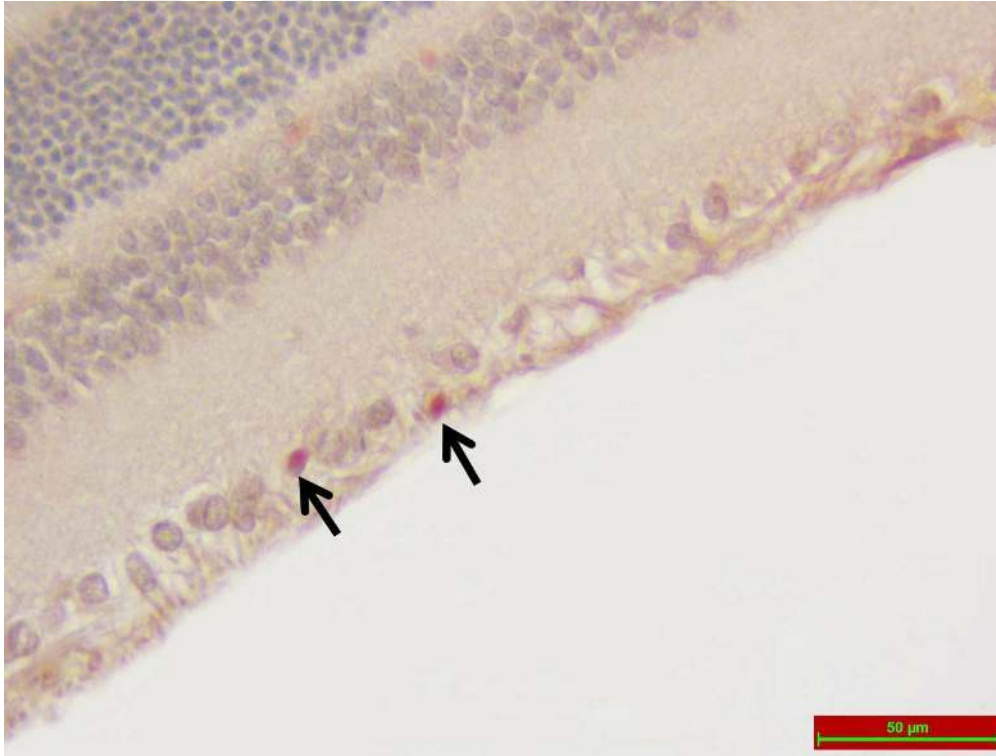
Şekil 32. Sitrat tampon grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi



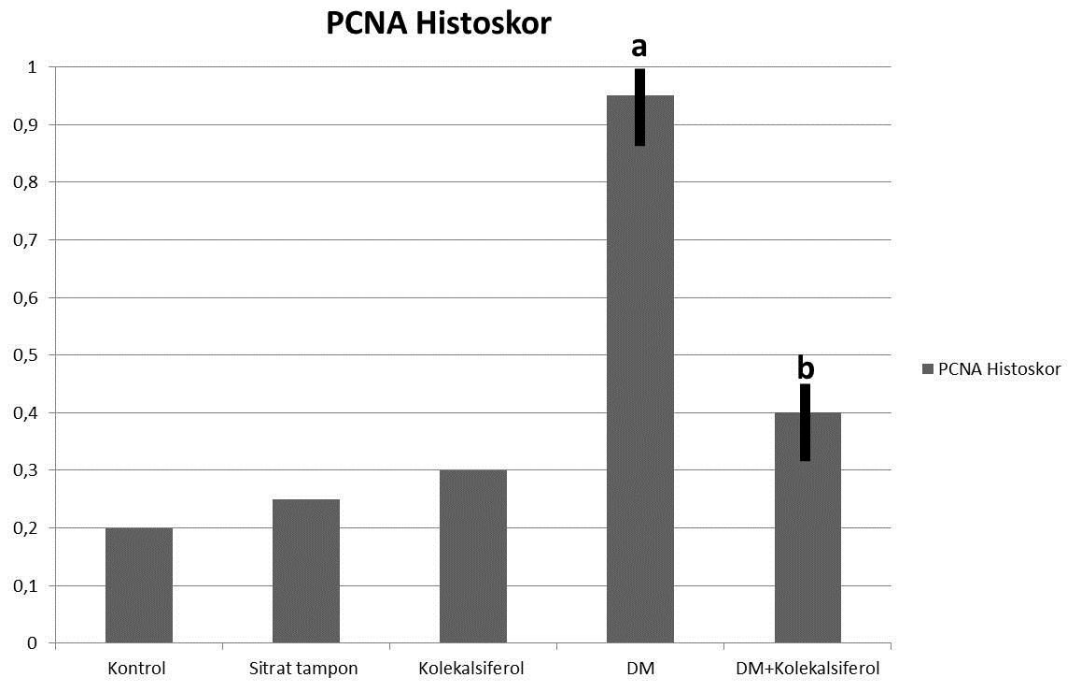
Şekil 33. Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi



Şekil 34. DM grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi



Şekil 35. DM+ Kolekalsiferol grubuna ait retina dokusunda PCNA immünreaktivitesi



Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

^b Diyabet grubu ile karşılaştırıldığında, ($p < 0.05$).

Şekil 36. PCNA Histoskoru

4. TARTIŞMA

Diabetes Mellitus, insülin eksikliği ya da insülinin etkisindeki sorunlar nedeniyle karbonhidrat, yağ ve proteinlerin yeterli düzeyde kullanılmadığı, sürekli olarak tıbbi yardım gerektiren, vasküler ve nöropatik komplikasyonlarla karakterize kronik bir hastalıktır. Diyabetteki temel metabolik bozukluk hiperglisemidir.

Diyabetin görülme oranı her geçen yıl hızlı bir şekilde artmakta olup, Uluslararası Diyabet Federasyonu'na (IDF) göre, 2030 yılında diyabetli insan sayısının 435 milyon kişiye yükselmesi beklenmektedir (92). Diyabetli hasta sayısının gittikçe artmasıyla birlikte, ülkelerin sağlık harcamaları da orantılı biçimde artmakta, hastalığın ve komplikasyonlarının tedavisi için ekonomik ve etkili alternatif çözüm yolları araştırılmaktadır.

Diyabetin uzun dönemde oluşan komplikasyonlarının neden olduğu morbidite ve mortalite; kapiller bazal membran kalınlaşmasıyla ilişkili olan mikrovasküler hastalık, hızlanmış aterosklerozla birlikte görülen makrovasküler hastalık, somatik ve otonom sinir sisteminin ikisini de içeren nöropatiler, kas zayıflığıyla birlikte görülen nöromüsküler disfonksiyon ve enfeksiyonlara direncin azalmasıyla oluşmaktadır. Gelişen kronik komplikasyonlar göz, böbrek, kalp, sinir ve kan damarlarını etkilemektedir (93).

Diyabette insülinin kullanımı kısmi olarak problemin çözümüne katkı sağladıysa da, günümüzde kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi birçok hastalığa zemin hazırladığı ve retinopati bulgularını ağırlaştırdığından dolayı hala gündemdeki yerini korumaktadır. Çünkü diyabet sadece insülin eksikliğinden değil, aynı zamanda insülin direncinden veya her ikisinin birlikteliğinden kaynaklanan komplike olaylar zincirinden oluşmaktadır. Günümüzde bu komplike olaylar zincirinin altında yatan mekanizmaları ortaya çıkarmak için çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Tüm bunlara rağmen henüz diyabetin etyopatogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır.

Diyabette mevcut tedavi modaliteleri olan oral antidiyabetikler, insülin tedavisi ve glisemik kontrol, mikrovasküler komplikasyonların progresyonunu önlemede yetersiz kalmaktadır. Regülasyona rağmen hiperglisemik vasküler stres devam etmektedir ve bu durum “metabolik hafıza” olarak adlandırılmaktadır.

Diyabetik retinopati, gelişmiş ülkelerde görme azlığının en önde gelen nedenlerinden biridir. Özellikle toplumun aktif çalışan 20 - 50 yaş arası nüfusunda

görme kaybı nedenlerinin başında gelmektedir. Gelişmiş toplumlarda diyabetin görülme oranının giderek artması, ayrıca modern tedavi yöntemleriyle diyabetlilerde yaşam süresinin uzaması, DR ve diyabetik makülopati görülme sıklığını arttıran en önemli faktörlerdir. Hastalığın tanısı konulduktan sonraki ilk 5 yıl içerisinde retinopati görülme olasılığı çok düşük olmakla birlikte, 5 yılda ortalama %27, 10 yılın üzerinde ise %71-90 oranında görülmektedir (11).

Mikroanjiyopati ve makroanjiyopati gelişimindeki en önemli faktör vasküler endotelial disfonksiyondur. DR patogenezinde; hiperglisemi sonrası retina kapillerlerinde gelişen dejenerasyon, endotelde perisit kaybı ve endotel proliferasyonu, bazal membranda kalınlaşma ve oklüzyon etkilidir. DR ve komplikasyonlarının gelişiminde, enflamasyon, toksisite, anjiyogenez ve apoptozisin önemli yeri olduğu bilinmektedir.

Su ve ark. (94)'nın çalışmalarında, streptozotosin ile diyabet oluşturulan ratların retinopati progresyonunun izleminde, erken dönemde hiperglisemi ve mikroanjiyopati gelişimi görülmüş, ratlar normoglisemik hale getirilerek uzun dönem takipleri değerlendirildiğinde, normoglisemiye rağmen retinopati progresyonunun devam ettiği saptanmıştır. Diyabetin erken döneminde, dördüncü haftaya kadar vasküler yapılarda henüz fonksiyonel ve spesifik değişimler başlamadan morfolojik değişikliklerin başladığı belirtilmiş, geç dönemde de kan şekeri regülasyonuna rağmen progresyonun devam ettiği gözlenmiştir (95). Bu durum DR progresyonundaki diğer etkenlerin önemini ortaya koymaktadır.

Serbest oksijen radikalleri, apoptozis sürecini başlatan yolları aktive ederek hücre ölümüne neden olur. SOR ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin bozulmasının, çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasında, kanser oluşumunda, diyabette, iskemi-reperfüzyon hasarında, enflamatuar rahatsızlıklarda, nörodejeneratif hastalıklarda ve yaşlanmanın etyopatogenezinde rol oynadığı bilinmektedir (53).

Diyabet ve diyabete bağlı gelişen komplikasyonların reaktif oksijen türleri ile olan bağlantısını açıklamaya yönelik yapılan çalışmalarda; enzimatik olmayan glikasyon, enerji metabolizmasında gelişen değişiklikler sonucunda ortaya çıkan metabolik stres, sorbitol yolunun aktivasyonu, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucunda meydana gelen doku hasarlarının serbest radikal oluşumunu arttırdığı saptanmıştır (96). Deneysel olarak diyabet oluşturulan ratlarda veya diyabetik

hastalarda serbest oksijen radikallerinin ve lipid peroksidasyonunun önemli derecede arttığı ve oksidatif stresin diyabet etiyojisinde ve ilerlemesinde rolü olduğu bildirilmiştir (97).

Birçok klinik ve deneysel çalışmada, diyabette oksidatif stres markır düzeylerinin artmış olduğu bildirilirken, hipergliseminin de oksidatif stresi artırdığı vurgulanmıştır (99). Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında bağlantı olduğu görüşü yapılan in vivo çalışmalarla gösterilmiş olup, vasküler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem lipidlerin oksidasyonunda hem de enzimatik olmayan glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışın olduğu görülmüştür. Du ve ark. (99)'nın çalışmasında, streptozotosinle diyabet modeli oluşturulan ratlarda sekizinci haftadan itibaren, endotel hücrelerinin yüksek glikoz konsantrasyonlarına maruz kalması sonucu, retinal dokuda süperoksit radikallerinin üretildiği gösterilmiştir. Diyabetik olgularda, lipidlere ilave olarak proteinlerin oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kolajen, elastin ve miyelin kılıfındaki ekstraselüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlar gelişmektedir (100).

Diyabetik retinopatinin progresyonuna oksidatif stresin etkisini incelemek amacıyla yapılan Beyazyıldız ve ark. (101)'nin çalışmasında; DR'li grupta kontrol grubuna göre serumdaki oksidatif stres ürünlerinin arttığı, antioksidan enzim aktivitesinin ise azaldığı bildirilmiştir. Yüksek TOS düzeyi ve düşük TAS düzeyinin DR progresyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda, kontrol grubu ile kıyaslandığında DM grubuna ait retinal dokularda apoptozisin belirgin olarak artmış olduğunu, tedavi olarak verilen kolekalsiferolün apoptozisi anlamlı düzeyde azalttığını saptadık. Diyabetik gruba ait retina dokularındaki artmış apoptozisin oksidatif hasara bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Nitekim kontrol grubu ile kıyasladığımızda DM grubunda TOS düzeylerinde anlamlı bir artışın olduğunu gördük. Bununla birlikte DM grubu ile kıyasladığımızda DM+Kolekalsiferol grubunda, apoptozisteki belirgin azalma kolekalsiferolün antioksidan etkisine bağlı olabilir. Çünkü bu grupta, TOS seviyelerinde belirgin bir azalma ve TAS düzeylerinde artış olduğu izlenmiştir.

Diyabetin oluşturduğu oksidatif streste rol oynayan serbest radikaller süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, nitrik oksittir. TOS'u oluşturan temel

komponentler hidrojen peroksit ve lipid hidroperoksittir (90). Lipid peroksidasyonu ve peroksidasyon sonrası meydana gelen ürünler membran yapısına ve çeşitli hücre bileşenlerine hasar verir; membran geçirgenliği ve mikroviskozitesi anlamlı şekilde etkilenir (53, 102). Pek çok çalışmada diyabetin komplikasyonları ile lipid peroksidasyonu arasındaki ilişkinin gösterilmiş olmasından dolayı lipid peroksidasyonunun kontrolü önem taşımaktadır (103).

Çalışmamızda diyabetik gruptaki, TOS düzeylerinin artmış olması; hipergliseminin glikoz otooksidasyonunu, glikolize proteinleri, lipid peroksidasyonunu arttırması ve sonuç olarak diyabetin organizmada serbest radikal oluşumunu arttırmasıyla açıklanabilir.

Diabetes Mellitus reaktif oksijen türlerinin artmış üretimi, antioksidan savunma mekanizmalarının yetersizliği ve sonuçta artmış oksidatif stresle ilişkilidir (104, 105). Klinik ve deneysel çalışmalar, SOR'un diyabetin iki tipinde de arttığını ve diyabetin erken dönem bulgularının oksidatif stresle ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Diyabette oksidatif stresin kaynağı olarak; redoks dengesinin bozulması, düşük molekül ağırlıklı antioksidan moleküllerin (glutatyon, vitamin E) azalması ve antioksidan savunma enzimlerinin (SOD ve Katalaz) aktivitelerinin bozulması gösterilmiştir (106). Hücre içi elektron dengesinin bozulması, kalsiyumun artışı, oksidatif stres, mitokondriyal defektler ve antioksidan sistemin yetersiz kalması apoptozisi indükleyebilmektedir (107).

Çalışmamızda saptanan DM grubundaki artmış TUNEL pozitifliği, oksidatif stresin DNA hasarına yol açığının bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Hiperglisemi sırasında hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Oksidatif streste hücre içi kalsiyum dengeleri ve mitokondriyal membran potansiyeli değişmekte, bu değişiklik mitokondrilerde ve DNA'da hasara yol açarak hücreyi programlı ölüme yani apoptozise sürüklemektedir. Çalışmamızda DM grubunda artan apoptozisin TUNEL yöntemiyle gösterilmiş olması, literatür bilgilerini desteklemektedir.

Vitamin D'nin aktif metaboliti olan vitamin D3'ün değişik biyolojik olaylarda önemli rol oynadığı çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (108, 109). Wiseman (110) çalışmalarında vitamin D'nin antioksidan etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Lin ve ark. (111) çinko ile serebral oksidatif stres oluşturmuş ve vitamin

D'nin etkilerini antioksidan özellikleri iyi bilinen melatonin, β -östradiol ve vitamin E ile karşılaştırmışlardır. Vitamin D'nin diğer antioksidanlardan daha güçlü bir antioksidan olduğunu ve bunun da lipid peroksidasyonunu ve otooksidasyonu azaltıcı etkileriyle ilişkili olabileceğini göstermişlerdir.

Vitamin D3'ün birçok dokuda oksidatif strese karşı koruyucu etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur. Reaktif oksijen türevlerinin inaktivasyonu yoluyla nöronal yaşamın korunabileceği bildirilmiştir (112). Vitamin D'nin nöroprotektif etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür. Güngör ve ark. (80)'nın yaptığı bir klinik çalışmada, vitamin D eksikliği olan hastalarda kontrol gruplarına kıyasla retinal sinir lifi kalınlığı azalmış olarak saptanmış, vitamin D'nin erken evre DR'si olan hastalarda nöroprotektif etki gösterebileceği vurgulanmıştır. Wang ve ark. (113) vitamin D3'ün nöronal hücre kültürlerinde H_2O_2 'nin indüklediği nöronal hasarı azalttığını bildirmişlerdir. Ratlarda sistemik vitamin D3 uygulamasının, 6-hidroksidopamin ve demir tarafından indüklenen kortikal infarkt ve nörotoksisiteyi azalttığını göstermişlerdir. Bunun yanı sıra Brewer ve ark. (114)'na göre vitamin D, nitrik oksit sentaz aktivitesini azaltarak rat astrositlerinde serbest radikal oluşumunu azaltmakta, bunu kalsiyum iyon kanallarını baskılayarak gösterdiği nöroprotektif etkisi ile yapmaktadır. Ayrıca vitamin D3'ün karaciğer hücrelerinde glutatyon içeren peroksidaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan savunma sistemlerini aktive ederek oksidatif stresi azalttığı rapor edilmiştir (115).

Fareler üzerinde yapılan bir çalışmada vitamin D'nin, NMDA'nın intravitreal enjeksiyonuyla oluşturulan oksidatif hasara bağlı olarak gelişen retinal doku hasarına karşı, serbest radikalleri uzaklaştırma kapasitesini ve oksidatif stresi azaltan metallothionein (MT) genlerinin üretimini arttırarak koruyucu özellik gösterdiği bildirilmiştir (116). Oral vitamin D alımının karaciğer, böbrek ve deride MT genlerini arttırdığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (117). Bao ve ark. (81) SOR ile ilgili araştırma yaparken benign prostat hiperplazisinde vitamin D3'ün antioksidan özelliğini vurgulamışlar, ayrıca vitamin D3'ün prostat kanseri insidansını azalttığını bildirmişlerdir. Vitamin D3'ün, dokularda redüktan bir madde olduğu bilinen ve oksidatif strese karşı koruyucu özelliği olan G6PD ekspresyonunu arttırarak antioksidan etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (118).

Eksojen olarak verilen antioksidanların diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasının engellenmesi ve azaltılmasında yararlı olabileceği fikri ileri sürülmüştür. Yapılan birçok çalışmada tip 2 diyabetli hastalarda krom, C ve E vitamini gibi antioksidan uygulamalarının açlık kan glikoz değerleri, HbA1c düzeyleri, TOS ve insülin direnç indekslerinde önemli oranda düşüşe neden olduğu belirtilmiştir (119).

Diyabetik retinopati tedavisinde antioksidan tedavinin etkinliği çalışmalarla desteklenmiştir. Daha önce vitamin C ve E'nin, reaktif oksijen türevleri üretimini ve lipid peroksidasyonunu azaltarak, DR progresyonunu önlemede etkili olduğu ve destek tedavisinde fayda sağladığı bildirilmiştir. Yakın dönemde klinik, randomize, çift körleme olarak dizayn edilen DiVFuSS çalışmasında, multikomponentten oluşan nutrisyonel bir formül geliştirilmiş, çalışma sonuçları paylaşılmış ve diyabetik hastalarda serumdaki enflamatuvar proteinlerin azaldığı ve görme keskinliğinin iyileşebileceği belirtilmiştir. Bu formülün içeriğinde vitamin D'ye de yer verilmiş, VEGF'i azaltması, HbA1c ve dislipidemi üzerine olumlu etkisi belirtilmiştir (120). Son yıllarda yapılan çalışmalar, vitamin D'nin DR'ye etkisi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Araştırmalar, vitamin D eksikliğinin diyabet hastalarında sık görüldüğünü ve retinopati riskini arttırdığını göstermektedir (77). Ren ve ark.(78) gelecekteki çalışmalarla, retinal dokularda VEGF ve TGF- β ekspresyonundaki azalmanın yanı sıra, vitamin D'nin antienflamatuvar etkilerinin açıklanabileceğini, retinada neovaskülarizasyon ve hücre proliferasyonuna karşı koruyucu etkilerinin gösterilebileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bizim çalışmamızda kolekalsiferol verilen gruplarda kan glikozu düzeyinde herhangi bir düşüş saptanmadı. Diyabet oluşturulan gruplarda kan glikozunun yüksek seyretmeye devam ettiği görüldü. Ancak serum TOS düzeylerinin, DM grubunda artarken, DM+Kolekalsiferol grubunda azaldığını gördük. Bu nedenle vitamin D diyabette kan glikozunu düşürerek değil, oksidatif stresi azaltarak etkili olabilir.

Çalışmamızda TRPM2 immünreaktivitesine bakılarak Kontrol grubuyla kıyaslandığında, DM grubuna ait retina dokularında belirgin olarak artmış olduğu, DM+Kolekalsiferol grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olduğu tespit edildi.

Hücresinin canlılığını koruyabilmesi ve gerekli olan fonksiyonlarını devam ettirmesinde hücre zarı iyon kanalları çok önemli bir role sahiptir. Hücre zarında

bulunan iyon kanallarından biri de oksidatif stres ile aktifleşebilen TRPM2 kanallarıdır (121). TRPM2 kanalları başlıca kemik iliği ve beyin olmak üzere bağırsak, karaciğer, böbrek, pankreas, akciğer, iskelet kası, testis, prostat, lökositler ve arka kök gangliyonları gibi birçok doku ve hücrede saptanmıştır (122). Bu kanallar sodyum ve potasyuma geçirgen olmasının yanı sıra hücreye kalsiyumun girmesinde de oldukça önemli bir role sahiptir. Oksidatif stres ile aktifleşen TRPM2 katyon kanalları doku, organ ve sistemlerde çeşitli fonksiyon bozuklukları meydana getirebilmektedir (123).

Hücre dışı etkenlerin TRPM2 katyon kanalı aktivasyonunda rolü olduğu bilinmektedir. Bunlar; oksidatif stres, ADPR/NAD⁺ metabolizması ve TNF- α 'dır (45). Oksidatif stres, TRPM2 iyon kanallarının açılmasına ve hücre içinde Ca⁺² artışına neden olmaktadır (124). Hücre içi kalsiyum artışı sonucu intrinsik ve ekstrinsik apoptozis yolları indüklenmekte ve kaspaz-3 aktive olmaktadır. Hücre içi sekonder yolların aktivasyonu DNA parçalanması gerçekleşmektedir. Bu süreç kemokinlerin üretimine neden olmakta, monosit, makrofaj ve nötrofillerin uyarısı ile enflamatuar yanıtı ağırlaştırmaktadır. Rat insülinoma hücrelerinin yanı sıra birçok memeli hücresinde oksidatif stresin uyarıldığı çalışmalarda, TRP kanallarının aktive olduğu gösterilmiştir (124).

Oksidatif stresle aktive olduğu için TRPM2 kanalı son yıllarda, diyabet, enflamasyon, miyokard enfarktüsü ve nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere, oksidatif stresle ilişkili hastalıklara karşı terapötik bir hedef olarak ortaya çıkmıştır. Hücre ölümü, sitokin üretimi ve insülin sekresyonu süreçlerindeki sinyal kaskadında TRPM2'nin fizyolojik rolü olduğu düşünülmektedir (125).

Alzheimer hastalığının patogeneğinde öneme sahip olan senil plakların gelişiminde TRPM2 kanallarının; oksidanlar, TNF- α , amiloid β -peptid aracılığıyla nöronal hücre ölümünde etkili olduğu gösterilmiştir (126). Ayrıca bipolar bozukluk, amiotropik lateral skleroz, parkinson-demans kompleksi gibi hastalıklarda TRPM2'de genetik varyasyonlar saptanmıştır.

Ülseratif kolit, TRPM2 aracılı kemokin uyarısı ile monosit/makrofaj aktivasyonunun ön planda olduğu enflamatuar süreçle seyreden bir hastalıktır. Yamamoto ve ark. (127)'na göre TRPM2 enflamatuar süreçlerle yakın ilişkiye sahiptir. Oluşturdukları deneysel ülseratif kolit modelinde, TRPM2 gen işlevi

baskılanmış farelerin enflamatuar kolit gelişimi açısından yüksek oranda korunduğunu göstermişlerdir. TRPM2 aracılı hücre içine Ca^{+2} girişinin enflamatuar nötrofil infiltrasyonuna neden olan kemokin üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Diyabet hastalarında travma ve sepsis gibi hastalıkların ardından yüksek oranda akut akciğer hasarı gelişmekte, kronik hipergliseminin endotelial süperoksit düzeylerini arttırması sonucu gelişen kapiller geçirgenliğin ödem gelişimiyle patogeneizde rol aldığı düşünülmektedir. İn vitro süperoksit uygulamasının pulmoner endotel hücrelerinde TRPM2 ve pulmoner filtrasyon katsayısını arttırdığı saptanmıştır. Lu ve ark. (128)'nin bunun gelişim mekanizmasını araştırdıkları bir çalışmada, kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında hiperglisemik ratlarda TRPM2 aktivasyonu ve pulmoner filtrasyon katsayısında artış gösterilmiştir. Ayrıca, TRPM2 kanallarının inhibisyonu sonucu hiperglisemik ratlarda pulmoner geçirgenliğin azaldığını göstermişlerdir. Bu nedenle oksidatif stresin, diyabetik ratlarda TRPM2 düzeyini arttırarak pulmoner vasküler geçirgenliği arttırdığı ve tedavide TRPM2 inhibitörlerinin fayda sağlayabileceği sonucuna varılmıştır.

Zhang ve ark. (129)'nin çalışmalarında insan monosit hücre kültürlerinde, TNF- α ve oksidatif strese maruziyetin ardından apoptozis sürecine giren hücrelerde, TRPM2 baskılanması sonucu hücre içi kalsiyum artışının önlenemediği, apoptozisin baskılanarak hücrenin canlılığın sürdürülebildiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda artan TOS düzeyleri, retinadaki fosfolipitlerin bu yolla okside olabileceğini göstermektedir. Ayrıca retinada TRPM2 ekspresyonlarındaki artış da bu bilgiyi doğrulamaktadır (130). Çünkü yapılan birçok çalışmada oksidatif hasara bağlı TRPM2'nin arttığı ve bunun da doğrudan oksidatif stres düzeyiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (131). Vitamin D ve TRPM2 iyon kanalları arasındaki ilişkiye dair henüz çalışma bulunmamakla birlikte, oksidatif hasar mekanizmaları üzerinden gösterdikleri ters etkilerin çalışmamız sonuçlarında etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz. DM+Kolekalsiferol grubumuzdaki TRPM2 immünreaktivitesinin ve TOS düzeylerinin DM grubuna kıyasla azalmış olması, kolekalsiferolün bu kanallar üzerinden etki edebilme olasılığını düşündürmektedir.

Oksidatif stresle aktive olan TRPM2 kanallarının vücuttaki birçok fizyolojik yanıtta etkili olduğu bildirilmiştir. Diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve enflamatuar hastalıklar gibi reaktif oksijen türevleri üretiminin patogenezinde etkili

olduğu hastalıkların tedavisinde, TRPM2 fonksiyonunu inhibe eden ajanların kullanımı amaçlanabilir. Nitekim yakın geçmişte TRP'ye spesifik modülatörlerin yeni tedavi hedeflerinde yer aldığı görülmektedir (51).

Çalışmamızda VEGF immünreaktivitesi; kontrol grubu ile kıyaslandığında DM grubuna ait retina dokularında belirgin olarak artmış olup, DM+Kolekalsiferol grubunda ise VEGF immünreaktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak saptandı. Bu durumda DR'de neovaskülarizasyon gelişiminin güçlü bir uyarıcısı olan VEGF'in azalması, vitamin D'nin neovaskülarizasyon gelişimini ve sekonder komplikasyonlarını önlemesi açısından umut vericidir. Çalışmamızda diyabetik grupta saptanan artmış VEGF immünreaktivitesi oksidatif hasara bağlı olabilir. Zira hiperglisemi oksidatif stresi tetiklemekte ve endotel disfonksiyonuna yol açmaktadır (32). DM+Kolekalsiferol grubunda retinal VEGF miktarının azalması da vitamin D'nin antioksidan etkisi ile endotelial disfonksiyonu azaltabileceği yönünde yorumlanabilir.

Klinik, deneysel hayvan ve in vitro hücre çalışmalarında, VEGF'in retinal vasküler geçirgenliği arttırdığı gösterilmiştir. Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş ratların gözlerinde, kan-retina bariyerinin hasarına paralel olarak retinal VEGF protein ekspresyonunda artış izlenmiştir ve tüm retinal katlarda VEGF immünreaktivitesi saptanmıştır (132).

Diyabetin retinal mikrovasküler komplikasyonlarında başlıca rol oynayan faktör anjiyogenezis ve vasküler geçirgenlik faktörü olan VEGF'tir. Ayrıca VEGF retinal iskemi ile seyreden retinal neovaskülarizasyon durumlarında da önemli bir role sahiptir. Hayvan modellerinde VEGF salınımının neovaskülarizasyon gelişimiyle korele olduğu gösterilmiştir (133). VEGF'in yüksek konsantrasyonları kan-retina bariyerinin yıkılmasından ve DR'de fibrovasküler proliferasyondan sorumlu tutulmaktadır. Bu nedenle VEGF, DR'nin tedavisinde önemli bir hedeftir.

Hammes ve ark. (134) diyabetik ve diyabetik olmayan ratlar üzerinde VEGF salınımının derecelendirildiği bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonucunda diyabetik ratların retinalarında VEGF mRNA düzeylerinde artış saptanmıştır. Diyabetik olmayan ratlarda VEGF immünreaksiyonunun çok zayıf olduğu belirlenmiştir. VEGF salınımının özellikle retinanın gangliyon hücreleri, iç ve dış nükleer tabakalarında yoğun olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda DM grubundaki

ratların gangliyon hücre ve sinir lifi tabakalarında immünohistokimyasal olarak VEGF tutulumu diğer retina tabakalarına göre daha yüksek düzeyde izlendi.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü bilindiği üzere, DR gelişiminde önemli bir role sahiptir. Bu rolünü de endotel hücrelerinde mitoz, göç, vasküler permeabilite artışı ve kapiller damar oluşumunu arttırarak yapar. Yapılan çalışmalarda alınan vitreus örneklerinde PDR'li gözlerde NPDR'li gözlere oranla VEGF konsantrasyonunun daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çalışmalar VEGF'in bloke edilmesi üzerine yoğunlaşmıştır (135). Anti-VEGF ilaçlar retinada neovaskülarizasyonla seyreden hastalıklarda kullanılmaktadır. Diyabetik retina neovaskülarizasyonu ve proliferatif retinopatide bu ilaçların proliferasyonu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Ancak yarı ömürlerinin kısa olması, tekrarlayan intravitreal enjeksiyonlar gerektirmektedir.

Diyabete bağlı meydana gelen iskemiye sekonder vitreusa salgılanan VEGF'in vasküler geçirgenliği arttırarak anjiogenezise ve maküler ödeme yol açtığı ve bunu önlemek için de çoklu intravitreal enjeksiyonların gerekli olduğu belirtilmiştir (136).

Manzano ve ark. (137)'nin yaptığı bir çalışmada, kimyasal yanık sonrası neovaskülarizasyon oluşturulan ratlarda topikal uygulanan bevacizumabın korneal neovaskülarizasyonu sınırlandırdığı görülmüştür. Klettner ve ark. (138)'nin domuz retinal pigment epiteli hücre kültüründe yapmış olduğu çalışmada da bevacizumab ve ranibizumabın VEGF'i güçlü bir şekilde nötralize ettiği gösterilmiştir.

Vasküler endotelyal büyüme faktörü vasküler endotel hücreleri için spesifik bir mitojendir ve anjiyogenezisin patogenezinde ana rol oynar. VEGF konsantrasyonu aktif proliferatif DR'li hastalarda retina, vitreus, ön kamara sıvısında yükselmiştir. VEGF, proliferatif ve non-proliferatif diyabetik retinopatinin patogenezinde rol oynamaktadır (139). Literatür çalışmalarında DR saptanan gözlerde VEGF düzeyi kontrol grubuna ve NPDR olan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır (140). Cohen ve ark. (141) enflamatuar bir sitokin olan IL-6'nın VEGF salınımını arttırarak indirekt olarak anjiyogenezisi uyurabileceğini bildirmişlerdir. Vitreustaki IL-6 düzeyinin aktif PDR'de inaktif PDR'ye göre daha yüksek olduğu ve VEGF üzerinden PDR'de anjiyogenezisi uyurabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda antienflamatuar özellik taşıyan

vitamin D'nin IL-6'yı azalttığı saptanmıştır. Vitamin D antienflamatuar etkisiyle VEGF'i azaltmış olabilir. Nitekim bizim sonuçlarımız da vitamin D grubunda VEGF'in azaldığını doğrulamaktadır. Bu bulgular, vitamin D'nin antianjiyogenetik ve antienflamatuar özelliğini destekler niteliktedir.

Müller glia hücreleri diyabetik retinada, HIF-1α tarafından regüle edilen VEGF indüksiyonundan sorumludur. HIF-1α oksidatif stres tarafından aktive edilebilir. Renin anjiyotensin sisteminin (RAS) da diyabetik retinada VEGF indüksiyonunda etkili olduğu bilinmekte ve Müller hücreleri tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (142). Diyabet tek başına retinal vaskülopatiyeye neden olmayıp retinal nöral dejenerasyonun da eşlik ettiği bulgularla seyretmektedir. Daha ileri çalışmalarla RAS-ROS arası ilişkinin ortaya konması, diyabetik retinal dejenerasyonun izlendiği hastalarda tedavi hedefi olarak görme fonksiyonunun iyileştirilmesine katkı sağlayabilir. RAS ve ROS inhibitörleri, anjiyotensin II reseptör blokörleri ve antioksidanlar nöroproteksiyonun yanı sıra diyabetik hastalarda koruyucu tedaviler olarak görme prognozunu iyileştirebilirler (143).

Renin-anjiyotensin sisteminin oksidatif stresle ilişkisi ve vitamin D takviyesinin bu sistemi baskılamasına ilişkin çok sayıda çalışma yapılmıştır. Vitamin D renin biyosentezini endokrin etkiyle baskılamaktadır. Vitamin D reseptöründe genetik varyasyon oluşturulmuş farelerde, RAS aktivasyonu sonucu kardiyak hipertrofi geliştiği görülmüştür (144). Yine çeşitli çalışmalarda vitamin D'nin RAS inhibitörleriyle sinerjik etki gösterdiği bildirilmiştir ve kombinasyon tedavisinin diyabetik nefropati progresyonuna karşı koruyucu olduğu belirtilmiştir (145).

Diyabette erken dönemden itibaren RAS sisteminin aktivasyonu sonucu vasküler geçirgenliğin ve VEGF düzeylerinin artarak DR gelişimi ve progresyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca RAS'ın anjiyogenez ve proliferasyonu da uyardığı bilinmekte, bu etkisini VEGF aracılığıyla uyardığı belirtilmektedir. DR progresyonunu önlemede RAS inhibisyonunun etkili olduğu bildirilmektedir (146). Tümör anjiyogenez ve proliferasyonunda da RAS ve VEGF birlikteliği suçlanan mekanizmalardandır (147). Diyabetik retinopatide neovaskülarizasyon gelişimi ve buna bağlı komplikasyonların önlenmesi açısından VEGF inhibisyonu önem taşır. Vitamin D, renin-anjiyotensin sistemini baskılayarak VEGF düzeyini düşürüyor olabilir. Çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olarak vitamin D'nin VEGF

düzeylerini azaltıcı etkisinde bu mekanizmanın rolü olabilir. Nitekim diyabetik retinopati patogeneğinde VEGF ve vasküler geçirgenlik artışı baskın mekanizmalardır, bunun vitamin D destek tedavisi ile baskılanabilmesi diyabetin erken aşamalarından itibaren retinopati progresyonunu önlemede fayda sağlayabilir.

Vitamin D'nin antiproliferatif etkiye sahip olduğunu destekleyen çalışmalar da mevcuttur. Vitamin D'nin uterin leiomyom hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği bildirilmiş, hipovitaminozun uterin fibroidler için risk faktörü olabileceği belirtilmiştir (148). Vitamin D reseptör aktivitesinin kolorektal hücrelerde aşırı proliferasyon ve oksidatif stresi önlediği bildirilmiştir. Kallay ve ark.'nın (149) çalışmasında vitamin D reseptörlerinin azaltıldığı fare modelinde kolon hücrelerinde proliferasyonun arttığı, PCNA düzeyinin yükseldiği görülmüştür. Yaptıkları bir diğer çalışmalarında, vitamin D reseptör aktivitesinin kolonik hiperproliferasyon ve oksidatif strese karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (150).

Çalışmamızda DM grubunda immünohistokimyasal olarak retinada PCNA düzeylerinin artmış olduğunu saptadık. Diyabet+Kolekalsiferol grubunda ise PCNA'nın azaldığını gördük. Bulgularımız kolekalsiferolün olası antiproliferatif etkisiyle uyumludur.

DNA sentezi, tamiri ve hücre siklusu kontrolünde görevli birçok protein, PCNA'ya bağlanarak görev yapmaktadır. PCNA, farklılaşma işlemine giren hücrelerden çoğalma özelliği olanları ayırıp tanımlamada, hücre döngü oranını ve hücre proliferasyonunu göstermede kullanılmaktadır.

Fetomaternal insülin düzeyinin plasental endotel hücrelerinin gelişiminde etkili olduğu bilinmektedir. Diyabetik plasentalarda villuslarda immatürite izlenmekte ve vasküler gelişim anomalilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fetusta bu patolojilere sekonder gelişen çok sayıda komplikasyon bulunmaktadır. Diyabetik ve normal insan plasentalarında hücre siklus proteinlerinin immünohistokimyasal dağılımları karşılaştırıldığında, diyabetik term plaseenta villuslarında ve endotel hücrelerinde PCNA'nın belirgin düzeyde artmış olduğu saptanmıştır (151). Benzer sonuçlar diyabetik olan ve olmayan rat plasentaları karşılaştırıldığında da elde edilmiştir. Diyabetik plasentaların endotel hücrelerinde PCNA immünreaktivitesi beş kat daha yüksek düzeyde saptanırken, villöz sinsiyo trofoblast ve sitotrofoblast hücrelerinin çekirdeklerinde apoptozisin arttığı

izlenmiştir (152). Bu sonuçlar proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozis süreçlerinin aktivasyon belirteci olan PCNA düzeyinin yükselmesinin diyabetiklerde gelişen mikroanjiyopati patogenezinin aydınlatılmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Yapılan çalışmalarla PCNA'nın retinada endotelial proliferasyon markırı olduğu bilinmektedir. Tavşan ve primatlarda intravitreal VEGF uygulamasının ardından retinal yüzeyde gelişen yeni kan damarlarının endotel hücre çekirdeklerinde immünohistokimyasal olarak PCNA boyanması izlenmiştir (153). Nakajima ve ark.(154) deneysel diyabet oluşturdukları ratlarda bir tirozin kinaz inhibitörü olan Genistein'in oral uygulaması sonucu retinal PCNA düzeylerinin azaldığını, bunun diyabette vasküler geçirgenlik artışını sınırlandırabileceğini bildirilmişlerdir.

Mandava ve ark. (155) deneysel tavşan proliferatif vitreoretinopati modelinde, PCNA inhibisyonu için ilk kez kimerik ribozim kullanmış, retina pigment epiteli ve fibroblast hücrelerinde proliferasyonu azalttığını bildirmişlerdir. Ayrıca ratlarda subretinal PCNA-ribozim uygulaması sonucu proliferasyonun azaltılmasıyla, neovaskülarizasyon ve hemorajilere bağlı gelişen fibrotik proliferasyonun önlenebileceği bildirilmiştir (156). Daha önceki çalışmalarda enflamasyon ve fibrin üretimini azaltmak amacıyla 5-fluorourasil, daunorubisin, radyasyon gibi sitotoksik ajanların yanı sıra, steroidler ve doku plazminojen aktivatörleri denenmiştir (156). Dolayısıyla, proliferatif vitreoretinopati hastalarının retinalarında saptanan PCNA'nın düzeyini azaltan bağlayıcı maddelerin verilmesiyle geliştirilebilecek yeni tedavi alternatifleri araştırılmaktadır.

Proliferatif diyabetik retinopatide vitreoretinal ara yüzde neovaskülarizasyon gelişimi epiretinal membran formasyonu oluşumuyla komplike olabilmektedir. Bu bulgu traksiyon ve retina dekolmanı gelişimiyle proliferatif retinal hastalıkların progresyonunda etkilidir. Vitrektomi cerrahisi ile DR ve proliferatif vitreoretinopati hastalarından alınan epiretinal membran örneklerinde hücre proliferasyonunun arttığı izlenmiş ve PCNA yüksekliği bununla ilişkili bulunmuştur. PVR ve DR hastalarında proliferatif indeksin benzer olduğu görülmüştür. Vitrektomi cerrahisiyle epiretinal membranların uzaklaştırılması ve adjuvan medikal uygulamalar PDR tedavisinde önemli yere sahiptir. Bu amaçla deneysel çalışmalarda antiproliferatif ve antienflamatuar ajanlar denenmiştir (157). Proliferasyon düzenleyicilerinden olan

PCNA'nın inhibisyonunun da proliferatif retinal hastalıkların progresyonunu önlemede terapötik hedef olarak kullanılabileceği düşünülebilir.

Yakın zamanda elde edilen veriler, vitamin D'nin retina ve DR üzerine enflamasyonun ve anjiyogenezin inhibisyonu yoluyla etkisinin olduğunu göstermektedir. Son dekatta yapılan kesitsel çalışmalar DR'nin düşük vitamin D düzeyi ile ilişki olduğunu göstermiştir (155). Vitamin D takviyesinin DR üzerindeki etkisini doğrulamak için başka randomize klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Vitamin D eksikliğinin prevalansı oldukça yüksektir ve takviyeleri nispeten ucuz olup genellikle iyi tolere edilmektedir. Vitamin D, proliferatif retinal hastalıkların gelişimi üzerine koruyucu etki gösteriyor olabilir.

Bu çalışma sonucunda, deneysel diyabetin retina dokusunda TOS ve apoptotik hücreleri arttırdığı, TAS'ı azalttığı, tedavi olarak verilen kolekalsiferolün bu parametreleri tersi yönde değiştirdiği saptanmıştır. Çalışmamız on hafta süre ile planlanmış olup, diyabetin retina dokusunu etkilemesinin patofizyolojisindeki rolünün aydınlatılabilmesi için gelecekte daha uzun diyabet süreleriyle yapılacak çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında, STZ ile oluşturulmuş DM'li sıçan retina dokusundaki TRPM2, VEGF, PCNA immünreaktivitelerinde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Diyabette retina dokusunda belirlenen TRPM2 immünreaktivitesindeki bu artış, diyabetik retinopatinin patofizyolojik mekanizmasında TRPM2'nin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Diyabette TRPM2 ile ilişkili patofizyolojik mekanizmalar aydınlatılabildiği takdirde, DR'yi önlemek amacıyla TRPM2 ile ilişkili alternatif tedavi yaklaşımları da denenebilir. VEGF'in baskılanmasının yanı sıra, PCNA inhibitörlerinin kullanılmasıyla da DR'deki progresyon sürecinin önüne geçilebilir. Çalışmamızda DM+Kolekalsiferol grubunda TRPM2, PCNA ve VEGF düzeylerinin azaldığını saptadık. Bu sonuçlar kolekalsiferolün DR patogenezinde etkili ve koruyucu olabileceğini göstermektedir.

5. KAYNAKLAR

1. Recep ÖF. Göz Anatomisi. I. Baskı, Ankara: Dünya Tıp Kitabevi, 2016: 145-166.
2. Marmor MF. The retinal pigment epithelium: Yanoff M, Duker JS (eds). Ophthalmology. 1st ed. London: Mosby, 1999: 8.
3. Akar S, Akyol S. Retina Embriyogenezi-Fizyolojisi. O'dwyer PA, Akova YA (editörler). Temel Göz Hastalıkları. III. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2015: 634-640.
4. Tripathi RC, Wond M. The Eye. Basic and clinical science course. Section 2. American Academy of Ophthalmology, elsevier, 1999: 47-92.
5. Remington LA. Clinical anatomy and physiology of the visual system. 3rd ed. St. Louis: Elsevier Butterworth Heinemann; 2009: 61-92.
6. Snell RS, Lemp MA. The orbital blood vessels. Clinical Anatomy of the Eye. 2nd ed. Blackwell Science, 1998: 277-289.
7. Duker J, Weitter JJ. Ocular circulation. Tasman W, Jaeger EA (editors). Duane's Foundations of Clinical Ophthalmology. New York: JB Lippincott, 1991: 1-34.
8. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, et al. A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. Nature 2005; 437: 426-431.
9. Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2011; 94: 311-321.
10. Bourne RR, Stevens GA, White RA, Smith JL, Flaxman SR, Price H, et al. Causes of vision loss worldwide, 1990-2010: a systematic analysis. Lancet Glob Health. 2013; 1: 339-349.
11. Moss SE, Klein R, Klein BE. Ten-year incidence of visual loss in a diabetic population. Ophthalmology 1994; 101: 1061-1070.

12. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. II. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is less than 30 years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 520-526.
13. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. III. Prevalence and risk of diabetic retinopathy when age at diagnosis is 30 or more years. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 527-532.
14. Taş A, Bayraktar MZ, Erdem Ü, Sobacı G, Uçar M. Prevalence and risk factors for diabetic retinopathy in Turkey. *Gulhane Med J* 2005; 47: 164-174.
15. Bourne RR, Jonas JB, Flaxman SR, Keeffe J, Leasher J, Naidoo K, et al. Prevalence and causes of vision loss in high income countries and in Eastern and Central Europe:1990-2010. *Br J Ophthalmol* 2014; 98: 629-638.
16. Rand LI, Krolewski AS, Aiello LN, Warren J, Baker RS, Maki T. Multiple factors in the prediction of risk of proliferative diabetic retinopathy. *N Engl J Med* 1985; 313: 1433-1438.
17. Arden GB. The absence of diabetic retinopathy in patients with retinitis pigmentosa: implications for pathophysiology and possible treatment. *Br J Ophthalmol* 2001; 85: 366-370.
18. Cogan DG, Toussaint D, Kuwabara T. Retinal vascular patterns. IV. Diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol* 1961; 66: 366-378.
19. Takagi H, Watanabe D, Suzuma K, Kurimoto M, Suzuma I, Ohashi H, et al. Novel role of erythropoietin in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 2007; 77: 62-64.
20. Gao BB, Clermont A, Rook S, Fonda SJ, Srinivasan VJ, Wojtkowski M, et al. Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation. *Nat Med* 2007; 13: 181-188.
21. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010; 107: 1058-1070.
22. Chertow B. Advances in diabetes for the millennium: vitamins and oxidant stress in diabetes and its complications. *Med Gen Med* 2004; 6: 4.

23. Lynch SK, Abràmoff MD. Diabetic retinopathy is a neurodegenerative disorder. *Vision Res* 2017; 139: 101-107.
24. Podesta F, Romeo G, Liu WH, Krajewski S, Reed JC, Gerhardinger C, Lorenzi M. Bax is increased in the retina of Diabetic subjects and is associated with pericyte apoptosis in vivo and in vitro. *Am J Pathol* 2000; 156: 1025-1032.
25. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Penn State Retina Research Group: Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetics: early onset and effect of insulin. *J Clin Invest.* 1998; 102: 783-791.
26. Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, Harris NR. Diabetic retinopathy: Breaking the barrier. *Pathophysiology* 2017; 24: 229-241.
27. Aiello LM. Diagnosis, management and treatment of nonproliferative diabetic retinopathy and macular edema. Albert DM, Jakobiec FA (editors). *Principles and Practice of Ophthalmology*, WB. Saunders Company, 1994: 747-760.
28. Focal photocoagulation treatment of diabetic macular edema. Relationship of treatment effect to fluorescein angiographic and other retinal characteristics at baseline: ETDRS report no:19. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. *Arch Ophthalmol* 1995; 113: 1144-1155.
29. Tigrel G. Retinanın vasküler hastalıkları. O'dwyer PA, Akova YA (editörler). *Temel Göz Hastalıkları. III. Baskı*, Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2015: 655-662.
30. Diabetic Retinopathy Study Research Group: Preliminary report on effects of photocoagulation therapy. *Am J Ophthalmol* 1976; 81: 383-396.
31. Kanski JJ. *Klinik Oftalmoloji Sistemik Yaklaşım*. Yonca A. Akova (çeviri editörü). 7. Baskı, İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri, 2011: 534-551.
32. Lu L, Jiang Y, Jaganathan R, Hao Y. Current Advances in Pharmacotherapy and Technology for Diabetic Retinopathy: A Systematic Review. *J Ophthalmol* 2018; 2018: 1694187.
33. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996; 380: 439-442.

34. Folkman J, Klagsbrun M. Angiogenic factors. *Science*. 1987; 235: 442-447.
35. Takagi H, King GL, Robinson GS, Ferrara N, Aiello LP. Adenosine mediates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor in retinal pericytes and endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996; 37: 2165-2176.
36. Tolentino MJ, Miller JW, Gragoudas ES, Chatzistefanou K, Ferrara N, Adamis AP, et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 964-970.
37. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, Keyt BA, Jampel HD, Shah ST, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331: 1480-1487.
38. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989; 2: 1313-1323.
39. Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. TRP channels: an overview. *Cell Calcium*. 2005; 38: 233-252.
40. Clapham DE, Montell C, Schultz G, Julius D. International Union of Pharmacology. XLIII. Compendium of voltage-gated ion channels: transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2003; 55: 591-596.
41. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011; 12: 218.
42. Touyz RM. Transient receptor potential melastatin 6 and 7 channels, magnesium transport and vascular biology: implications in hypertension. *Am J Physiol* 2008; 294: 1103-1118.
43. Li Z, Sergouniotis PI, Michaelides M, Mackay DS, Wright GA, Devery S, et al. Recessive mutations of the gene TRPM1 abrogate on bipolar cell function and cause complete congenital stationary night blindness in humans. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 711-719.

44. Zholos A. Pharmacology of transient receptor potential melastatin channels in the vasculature. *Br J Pharmacol.* 2010; 159: 1559-1571.
45. Hara Y, Wakamori M, Ishii M. LTRPC2 Ca^{2+} permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol Cell* 2002; 9: 163-173.
46. Perraud AL, Knowles HM, Schmitz C. Novel aspects of signaling and ion homeostasis regulation in immunocytes. The TRPM ion channels and their potential role in modulating the immune response. *Mol Immunol* 2004; 41: 657-673.
47. Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jüngling E, Zitt C, Luckhoff A. Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *J Biol Chem* 2002; 277: 23150-23156.
48. Tong Q. Regulation of the transient receptor potential channel TRPM2 by the Ca^{2+} sensor calmodulin. *J Biol Chem* 2006; 90: 76-85.
49. Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell* 2007; 129: 220-221.
50. Satoh S, Tanaka H, Ueda Y, Oyama J, Sugano M, Sumimoto H, et al. Transient receptor potential (TRP) protein 7 acts as a G protein-activated Ca^{2+} channel mediating angiotensin II-induced myocardial apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2007; 294: 205-215.
51. Naziroğlu M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochem Res* 2007; 32: 1990-2001
52. Togashi K, Hara Y, Tominaga T, Higashi T, Konishi Y, Mori Y, Tominaga M. TRPM2 activation by cyclic ADP-ribose at body temperature is involved in insulin secretion. *EMBO J* 2006; 25: 1804-1815.
53. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.

54. Dierckx N, Horvath G, van Gils C, Vertommen J, van de Vliet J, De Leeuw I, Manuel-y-Keenoy B. Oxidative stress status in patients with diabetes mellitus: relationship to diet. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 999-1008.
55. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
56. Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, Sun J. Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 9702820.
57. Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Konya: Mimoza Yayınları, 1995: 12-16.
58. Kowluru RA, Mishra M. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 2474-2483.
59. Unger J. Screening, diagnosis, and management of diabetes related complications; Diabetes management in the primary care setting. Birinci Baskı, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 516.
60. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
61. Paunesko T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 1007-1021.
62. Heidenkummer HP, Kampik A, Petrovski B. Proliferative activity in epiretinal membranes. The use of the monoclonal antibody Ki-67 in proliferative vitreoretinal diseases. *Retina* 1992; 12: 52-58.
63. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007; 357: 266-281.
64. Schöttker B, Jorde R, Pease A, Thorand B, Jansen EHJM, Groot CPGM, et al. Vitamin D and mortality: meta-analysis of individual participant data from a large consortium of cohort studies from Europe and United States. *BMJ* 2014; 348: 3656.

65. Rosen CJ. Clinical practice: Vitamin D insufficiency. *N Engl J Med* 2011; 364: 248-254.
66. Haddad JG, Matsuoka LY, Hollis BW, Hu YZ, Wortsman J. Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis. *J Clin Invest* 1993; 91: 2552-2555.
67. Bikle DD. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009; 94: 26-34.
68. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR) mediated actions of 1,25(OH)₂vitamin D₃: genomic and nongenomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; 25: 543-559.
69. Yin K, Agrawal DK. Vitamin D and inflammatory diseases. *J Inflamm Res* 2014; 7: 69-87.
70. Hegyi Z, Zwicker S, Bureik D, Peric M, Koglin S, Batycka-Baran A, et al. Vitamin D analog calcipotriol supresses the Th17 cytokine-induced proinflammatory S100 alarmins psoriasin (S100A7) and koebnerisin (S100A15) in psoriasis. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1416-1424.
71. Kassi E, Adamopoulos C, Basdra EK, Papavassiliou AG. Role of vitamin D in atherosclerosis. *Circulation* 2013; 128: 2517-2531.
72. Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Campbell RJ, Kumar R. Immuno-localization of the calcitriol receptor, calbindin-D28k and the plasma membrane calcium pump in the human eye. *Curr Eye Res* 1995; 14: 101-108.
73. Lee V, Rekhi E, Hoh Kam J, Jeffery G. Vitamin D rejuvenates aging eyes by reducing inflammation, clearing amyloid beta and improving visual function. *Neurobiol Aging* 2012; 33: 2382-2389.
74. Reins RY, McDermott AM. Vitamin D: implications for ocular disease and therapeutic potential. *Exp Eye Res* 2015;134: 101-110.
75. Verstappen A, Parmentier M, Chirnoaga M, Lawson DEM, Pasteels JL, Pochet R. Vitamin D-dependent calcium binding protein immunoreactivity in human retina. *Ophthalmic Res* 1986; 18: 209-214.

76. Layana AG, Minnella AM, Garhöfer G, Aslam T, Holz FG, Leys A, Silva R. Vitamin D and Age-Related Macular Degeneration. *Nutrients* 2017; 9: 1120.
77. Aksoy H, Akçay F, Kurtul N, Baykal O, Avcı B. Serum 1,25 dihydroxy vitamin D (1,25(OH)₂D₃), 25 hydroxy vitamin D (25(OH)D) and parathormone levels in diabetic retinopathy. *Clin Biochem* 2000; 33: 47-51.
78. Ren Z, Li W, Zhao Q, Ma L, Zhu J. The impact of 1,25-dihydroxy vitamin D₃ on the expressions of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-β1 in the retinas of rats with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 98: 474-480.
79. Albert DM, Scheef EA, Wang S, Mehraein F, Darjatmoko SR, Sorenson CM, Sheibani N. Calcitriol is a potent inhibitor of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2007; 48: 2327-2334.
80. Gungor A, Ateş O, Bilen H, Kocer I. Retinal nerve fiber layer thickness in early stage diabetic retinopathy with vitamin D deficiency. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015; 56: 6433-6437.
81. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant: ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol, and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS J* 1993; 326: 285-288.
82. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008; 122: 2699-2706.
83. Satman İ, Özbay N, Boztepe H, Kalaca S, Ömer B, Tanakol R, et al. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in Turkish adults. *Endocrine Abstracts* 2013; 32: 135.
84. Cashman KD, Dowling KG, Skrabakova Z, Gonzalez-Gross M, Valtuena J, De Henauw S, et al. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic? *Am J Clin Nutr* 2016; 103: 1033-1044.
85. Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol* 2013; 5: 331-347.

86. Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium. Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D, The National Academies Collection: Reports founded by National Institutes of Health. Washington (DC): National Academies Press (US), 2011.
87. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific opinion on the tolerable upper intake level of vitamin D. EFSA J 2012; 10: 2813.
88. Krefting EA, Jorde R, Christoffersen T, Grimnes G. Vitamin D and intraocular pressure-results from a case-control and an intervention study. Acta Ophthalmol 2014; 92: 345-349.
89. Aydın S. Sıçan Akciğer ve Karaciğerinde Formaldehit Maruziyetiyle Oluşan Oksidatif Hasar ve İrisin Hormon Değişimlerine Karşı Karnozinin Etkisinin Biyokimyasal, Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak İncelenmesi. Elazığ: Doktora Tezi, Fırat üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Anatomi Anabilim Dalı, 2015.
90. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem 2004; 37: 277-285.
91. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem 2005; 38: 1103-1111.
92. Holt RIG, Cockram CS, Flyvbjerg A, Goldstein BJ. Textbook of Diabetes. 4th ed. Singapore: Wiley-Blackwell, 2010: 115.
93. Martínez-Sanchez G, Al-Dalain SM, Menendez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, et al. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. Eur J Pharmacol 2005; 523: 151-161.
94. Su EN, Alder VA, Yu DY, Yu PK, Cringle SJ, Yogesana K. Continued progression of retinopathy despite spontaneous recovery to normoglycemia in a long-term study of streptozotocin-induced diabetes in rats. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2000; 238: 163-173.

95. Su EN, Yu DY, Alder VA, Yu PK, Cringle SJ. Altered vasoactivity in the early diabetic eye: measured in the isolated perfused rat eye. *Exp Eye Res* 1995; 61: 699-712.
96. Boynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
97. Akkuş İ, Kalak S, Vural H, Çağlayan O, Menekşe E, Can G, et al. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clinica Chimica Acta* 1996; 244: 221-227.
98. Soliman GZA. Blood lipid peroxidation (superokside dismutase, malondialdehyde, glutathione) levels in Egyptian type 2 diabetic patients. *Singapore Med J* 2008; 19: 129-136.
99. Du Y, Miller CM, Kern TS. Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med* 2003; 35: 1491-1499.
100. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve Oksidatif stres. *Türk Biyokimya Dergisi* 2006; 31: 51-56.
101. Beyazyildiz E, Cankaya AB, Ergan E, Anayol MA, Ozdamar Y, Sezer S, et al. Changes of total antioxidant capacity and total oxidant status of aqueous humor in diabetes patients and correlations with diabetic retinopathy. *Int J Ophthalmol* 2013; 6: 531-536.
102. Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareño EJ, Romero B, Marín N, Romá J. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1229-1234.
103. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 668-676.
104. Pfaffly JR. Diabetic complications, hyperglycemia and free radicals. *Diabetic Complications*, 2001; 77: 1-18.
105. Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest* 2003; 111: 431-433.

106. Rosen P, Nawroth PP, King G, Moller W, Tritschler HJ, Packer L. The role of oxidative stress in the onset and progression of diabetes and its complications: a summary of a Congress Series sponsored by UNESCO-MCBN, the American Diabetes Association and the German Diabetes Society. *Diabetes Metab Res Rev* 2001; 17: 189-212.
107. Oren M, Rotter V. Introduction: p53 the first twenty years. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 9-11.
108. Norman AW, Nemere I, Zhou LX, Bishop JE, Lowe KE, Maiyar AC, et al. 1, 25(OH)₂-Vitamin D₃, a steroid hormone that produces biological effects via both genomic and nongenomic pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 231-240.
109. Reichel H, Koeffler HP, Norman AW. The role of the vitamin D endocrine system in health and disease. *N Engl J Med* 1989; 320: 980-991.
110. Wiseman H. Vitamin D is a membrane antioxidant: ability to inhibit iron-dependent lipid peroxidation in liposomes compared to cholesterol, ergosterol, and tamoxifen and relevance to anticancer action. *FEBS Lett* 1993; 326: 285-288.
111. Lin AM, Chen KB, Chao PL. Antioxidative effect of vitamin D₃ on zinc-induced oxidative stress in CNS. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053: 319-329.
112. Drukarch B, Schepens E, Stoof JC, Langeveld CH, Van Muiswinkel FL. Astrocyte-enhanced neuronal survival is mediated by scavenging of extracellular reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 217-220.
113. Wang JY, Wu JN, Cherng TL, Hoffer BJ, Chen HH, Borlongan CV, et al. Vitamin D₃ attenuates 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity in rats. *Brain Res* 2001; 904: 67-75.
114. Brewer LD, Thibault V, Chen KC, Langub MC, Landfield PW, Porter NM et al. Vitamin D hormone confers neuroprotection in parallel with downregulation of L-type Ca²⁺ channel expression in hippocampal neurons. *J Neurosci* 2001; 21: 98-108.
115. Sardar S, Chakraborty A, Chatterjee M. Comparative effectiveness of vitamin D₃ and dietary vitamin E on peroxidation of lipids and enzymes of the hepatic antioxidants system in Sprague-Dawley rats. *Int J Vitam Nutr Res* 1996; 66: 39-45.

116. Suemori S, Shimazawa M, Kawase K, Satoh M, Nagase H, Yamamoto T, Hara H. Metallothionein, an endogenous antioxidant, protects against retinal neuron damage in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 3975-3982.
117. Karasawa M, Hosoi J, Hashiba H. Regulation of metallothionein gene expression by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 in cultured cells and in mice. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1987; 84: 8810-8813.
118. Beutler E. The molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. *Annu Rev Med* 1992; 43: 47-59.
119. Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 43: 191-198.
120. Chous AP, Richer SP, Gerson JD, Kowluru RA. The Diabetes Visual Function Supplement Study (DiVFuSS). *Br J Ophthalmol* 2016; 100: 227-234.
121. Lückhoff A. A calcium influx pathway regulated separately by oxidative stress and ADP-Ribose in TRPM2 channels: single channel events. *Neurochem Res* 2008; 33: 56-62.
122. Hecquet CM, Malik AB. Role of H₂O₂-activated TRPM2 calcium channel in oxidant-induced endothelial injury. *J Thromb Haemost* 2009; 101: 19-25.
123. Kühn FJ, Heiner I, Lückhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. *Pflugers Arch* 2005; 51: 12-22.
124. Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, Mori Y, Fleig A, Penner R. TRPM2 functions as a lysosomal Ca²⁺ release channel in beta cells. *Sci Signal* 2009; 2: 23.
125. Takahashi N, Kozai D, Kobayashi R, Ebert M, Mori Y. Roles of TRPM2 in oxidative stress. *Cell Calcium* 2011; 50: 279-287.
126. Marchesi VT. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. *FASEB J* 2011; 25: 5-13.

127. Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, Takahashi N, Wajima T, Hara Y, et al. TRPM2-mediated Ca^{2+} influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration. *Nat Med* 2008; 14: 738-747.
128. Lu S, Xiang L, Clemmer JS, Mittwede PN, Hester RL. Oxidative stress increases pulmonary vascular permeability in diabetic rats through activation of transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) channels. *Microcirculation* 2014; 21: 754-760.
129. Zhang W, Hirschler-Laszkiewicz I, Tong Q. TRPM2 is an ion channel which modulates hematopoietic cell death through activation of caspases and PARP cleavage. *Am J Physiol* 2006; 290: 1146-1159.
130. Miller BA. The role of TRP channels in oxidative stress-induced cell death. *J Membr Biol* 2006; 209: 31-41.
131. Knowles H, Li Y, Perraud AL. The TRPM2 ion channel, an oxidative stress and metabolic sensor regulating innate immunity and inflammation. *Immunol Res* 2013; 55: 241-248.
132. Murata T, Nakagawa K, Khalil A, Ishibashi T, Inomata H, Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab Invest* 1996; 74: 819-825.
133. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1995; 92: 905-909.
134. Hammes HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Upregulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47: 401-406.
135. Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, D'Amico DJ, Folkman J, Yeo TK, Yeo KT. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994; 118: 445-450.
136. Arevalo JF, Garcia-Amaris RA. Intravitreal bevacizumab for diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev* 2009; 5: 39-46.

137. Manzano RP, Peyman GA, Khan P, Carvounis PE, Kivilcim M, Ren M, Lake JC, Chevez-Barrios P. Inhibition of experimental corneal neovascularization by bevacizumab (Avastin). *Br J Ophthalmol* 2007; 91: 804-807.
138. Klettner A, Roider J. Comparison of bevacizumab, ranibizumab, and pegaptanib in vitro: efficiency and possible additional pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4523-4527.
139. Mathews MK, Merges C, McLeod DS, Luttly GA. Vascular endothelial growth factor and vascular permeability changes in human diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38: 2729-2741.
140. Selim KM, Sahan D, Muhittin T, Osman C, Mustafa O. Increased levels of vascular endothelial growth factor in the aqueous humor of patients with diabetic retinopathy. *Indian J Ophthalmol* 2010; 58: 375-379.
141. Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G, Levi BZ. Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 1996; 271: 736-741.
142. Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y. Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappa β pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 4342-4350.
143. Ozawa Y, Kurihara T, Sasaki M, Ban N, Yuki K, Kubota S, Tsubota K. Neural degeneration in the retina of the streptozotocin-induced type 1 diabetes model *Exp Diabetes Res* 2011; 2011: 108328.
144. Xiang W, Kong J, Chen S, Cao LP, Qiao G, Zheng W, et al. Cardiac hypertrophy in vitamin D receptor knockout mice: role of the systemic and cardiac renin angiotensin systems. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 288: 125-132.
145. Zhang Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, Kong J, Li YC. Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 15896-15901.
146. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Cho CS, Kim KW. Blockade of angiotensin II attenuates VEGF-mediated blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29: 621-628.

147. Breier G, Blum S, Peli J, Groot M, Wild C, Risau W, Reichmann E. Transforming growth factor-beta and Ras regulate the VEGF/VEGF-receptor system during tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2002; 97: 142-148.
148. Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T, Nair S, Al-Hendy A. Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via Catechol-O-Methyltransferase. *Fertil Steril* 2011; 95: 247-253.
149. Kallay E, Pietschmann P, Toyokuni S, Bajna E, Hahn P, Mazzucco K, et al. Characterization of a vitamin D receptor knockout mouse as a model of colorectal hyperproliferation and DNA damage. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1429-1435.
150. Kallay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, Cross HS. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 1191-1196.
151. Leach L, Gray C, Staton S, Babawale MO, Gruchy A, Foster C, et al. Vascular endothelial cadherin and beta-catenin in human fetoplacental vessels of pregnancies complicated by Type 1 diabetes: associations with angiogenesis and perturbed barrier function. *Diabetologia* 2004; 47: 695-709.
152. Sgarbosa F, Barbisan LF, Brasil MA, Costa E, Calderan IM, Gonçalves CR, et al. Changes in apoptosis and Bcl-2 expression in human hyperglycemic, term placental trophoblast. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 73: 143-149.
153. Ozaki H, Hideyuki H, Viores SA, Moromizato Y, Campochiaro PA, Oshima K. Intravitreal sustained release of VEGF causes retinal neovascularization in rabbits and breakdown of the blood-retinal barrier in rabbits and primates. *Exp Eye Res* 1997; 64: 505-517.
154. Nakajima M, Cooney MJ, Tu AH, Chang KY, Cao J, Ando A, et al. Normalization of retinal vascular permeability in experimental diabetes with genistein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 2110-2114.
155. Mandava N, Blackburn P, Paul DB, Wilson MW, Read SB, Alspaugh E, et al. Ribozyme to proliferating cell nuclear antigen to treat proliferative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3338-3348.

- 156.** Kayikcioglu OR, Cheng L, Kozak I, Bergeran-Lynn G, Schulteis CT, Rhoades KL, Freeman WR. Toxicity of subretinal ribozyme to the proliferating cell nuclear antigen and 5-fluorouracil in rat eyes. *Curr Eye Res* 2006; 31: 435-440.
- 157.** Zhang X, Barile G, Chang S, Hays A, Pachydaki S, Schiff W, Sparrow J. Apoptosis and cell proliferation in proliferative retinal disorders: PCNA, Ki-67, caspase-3, and PARP expression. *Curr Eye Res* 2005; 30: 395-403.



6. ÖZGEÇMİŞ

07.06.1989 yılında Elazığ’ da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Elazığ ilinde tamamladım. 2013 yılında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi’den mezun oldum. 2014 yılında Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. Halen Fırat Üniversitesi Göz Hastalıkları Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaya devam etmekteyim.

