

Deneysel diabet modeli oluşturulan farelerde tirozin kinaz inhibitör uygulananın testis dokusu üzerine olan etkilerinin pluripotensi kapasitesi ve hücre adezyonu özelinde araştırılması

The investigation of effects of tyrosine kinase inhibitor on testicular tissue in terms of pluripotent capacity and cell adhesion in experimental diabetic mice

Kaan Özdedeli¹ Hüseyin Aktuğ² Fatih Oltulu² Gülperi Öktem² Altuğ Yavaşoğlu²
Eda Açıkgöz³ Gürkan Yiğittürk² Kenan Demir² Ayşegül Uysal²

¹Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Edirne, Türkiye

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

³Yüzüncüyıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

Öz

Amaç: Tirozin kinaz inhibisyonunun diyabet etkisi altındaki testis dokusu üzerine göstereceği etkileri araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 31 adet CD1 türü erkek fare kullanıldı ve dört gruba ayrıldı: Grup 1'de (kontrol grubu) 7, Grup 2'de tirozin kinaz inhibitörü uygulanan 7, Grup 3'te diyabetik ve SF uygulanan 8, Grup 4'te diyabet + tirozin kinaz inhibitörü uygulanan 9 denek hayvanı yer aldı. Grup 1'de herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup 2'deki farelere 3 hafta boyunca tirozin kinaz inhibitörü verildi. Diyabet oluşturulması için 0.1mol/L tek doz streptozotosinin intraperitoneal olarak verildi. 250 mg/dL ve üzeri kan glikoz seviyesi diyabetik olarak kabul edildi. Deneysel diyabet modeli oluşturulan farelere 1 hafta beklendikten sonra, Grup 3'e SF, Grup 4'e 3 hafta boyunca tirozin kinaz inhibitörü verildi. Sonunda tüm denek hayvanları anestezisi altında sakrifiye edilerek histopatolojik inceleme için testis dokuları alındı. İstatistiksel analiz için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi yapıldı, 0.05'ten küçük p değerleri, istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Testis dokusu histopatolojik olarak incelendiğinde deneysel diyabete bağlı olarak seminifer tübülün germ hücre serilerinde kayıp, hücre bütünlüklerinde ise bozulma saptandı.

Sonuç: Bu çalışma, diyabetin testiste germ hücre serilerinde sayısal olarak azalmaya ve hücre adezyon mekanizmasında bozulmaya yol açtığını göstermektedir. Tirozin kinaz inhibitörü uygulamasının, bu hasarlanmada tamir edici etkisinin olduğu düşünülmektedir. Bu hasarın tedavisinin derecesi, uygulanan tirozin kinaz inhibitörünün dozu ve süresine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Ancak, klinik diyabet uygulamalarında tirozin kinaz inhibitörü kullanılabilmesi için bu konuda moleküler çalışma sayılarının artışına ihtiyaç vardır.

Anahtar Sözcükler: Tirozin kinaz inhibisyonu, diyabetes mellitus, testis, deneysel çalışma.

Abstract

Aim: The aim of the study is to investigate the effects of tyrosine kinase inhibition on testicular tissue under the effects of diabetes mellitus.

Materials and Methods: Thirty one CD-1 male mice were divided into four groups: Group 1 (control group) consisted 7, Group 2 (tyrosine kinase inhibitor given group) 7, Group 3 (diabetic group treated with SF) 8 and Group 4 (diabetic group treated with tyrosine kinase inhibitor) 9 experimental mice. No application was made to the animals in Group 1. In Group 2, mice were given tyrosine kinase inhibitor for 3 weeks. Diabetes was induced by intraperitoneal injection of single dose of streptozotocin 0.1mol/L. Mice with 250 mg/dL and higher blood glucose levels were accepted as diabetic. After waiting for 1 week, experimental diabetic mice in Group 3 were treated with SF and those in Group 4 were treated with tyrosine kinase inhibitor for 3 weeks. Then, all the experimental animals were sacrificed and the testicular tissue was removed for histopathological examination. The one-way analysis of variance (ANOVA) is used for statistical analysis, a p value less than 0.05 was considered statistically significant.

Yazışma Adresi: Fatih Oltulu⁶
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye
Makalenin Geliş Tarihi: 19.01.2016 Kabul Tarihi: 27.07.2016

Results: Histopathologic examination of the testes revealed loss of germ cells series in the seminiferous tubules and deterioration in cellular integrity depending on experimental diabetes.

Conclusion: By the study, it was demonstrated that diabetes lead to a decrease in the number of germ cells in testes and deterioration in cell adhesion mechanism. The administration of tyrosine kinase inhibitor could be considered to have a regenerative effect in this damage. The degree of treatment of this injury varies depending to the dose and time of the tyrosine kinase inhibitors. But, for the use of tyrosine kinase inhibitors in clinical practice of diabetes mellitus, more molecular studies are needed.

Keywords: Tyrosine kinase inhibition, diyabetes mellitus, testis, experimental study.

Giriş

Diyabetes mellitus, kandaki glikoz seviyesinin düşmesi ile karakterize edilmiş bir grup metabolik hastalıktır (1).Yüksek hasta sayısı ve hastalığın sonuçları birçok araştırmacıyı yüksek masraflı birçok tedavi geliştirme sürecine itmiştir. Diyabetin en sık karşılaşılan sonucu reaktif oksijen partiküllerinin (ROS) üretilmesidir (2). ROS, β -hücrelerinin yetmezliğine neden olurken insülin direncinin gelişmesini tetikler (3). Öte taraftan diyabet oksidatif stres yaratmasıyla direk olarak erkek infertilitesini de etkiler. Subfertilite yaygınlık oranı diyabetik hastalarda yüksektir (4). Diyabetin sperm sayısı, kalitesi ve fonksiyonunu negatif bir şekilde değiştirdiği de yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (5). Erkek fertilitasını (örneğin ejakülasyon, spermatogenezde endokrin kontrolü, ereksiyon, semen hacmi, spermatozoa canlılık ve hareketi gibi) birçok seviyede negatif olarak etkiler (6). Temel işlevi erkek üreme hücreleri, spermatozoaları oluşturmak olan testisler, bireye erkeklik özelliklerini kazandıran testesteron üretir (7).

Tirozin kinaz (TK), protein fosforilasyonunu sağlayan protein kinaz ailesine mensup bir enzimdir. Kinazlar yoluyla proteinlerin fosforilasyonu, sinyal iletim mekanizmasında önemli rol oynar. Sinyal iletimi hücrelerin çoğalması ve apoptozisi gibi işlevleri kontrol ettiğinden, burada meydana gelen değişimler kanser gelişiminde ve metastazlarda önemli rol oynar. TK'lar buldukları yere göre 2 gruba ayrılır; membran yerleşimli (reseptör) ve sitoplazmik yerleşimli (non-reseptör). Membranda yerleşenlere reseptör tirozin kinazlar (RTK) denir. Bu reseptörler arasında insülin reseptörü, büyüme faktörleri reseptörleri ve efrin reseptörleri örnek gösterilebilir (8). Bilinen yaklaşık 2000 kinaz arasında, 90'dan fazla TK insan genomunda bulunmaktadır. Bunların hücrel aktivitelere (büyüme, diferensiyasyon, metabolizma, adezyon, motilite, ölüm vs.) önemli rolü vardır. Birçok RTK, gen mutasyonu veya kromozom translokasyonu nedeniyle değişime uğrayarak kanser gelişimde etkin rol oynar. Bu patolojik durum kısaca aşırı-ekspresyon olarak da tanımlanabilir (9).

*Cadherin*ler, büyük bir transmembran ailesini ya da membrana bağlı glikoproteinleri içermektedir ve Ca^{+2} ye bağlı olarak özel hücre-hücre bağlantılarını sağlayıp birçok organın morfogenezinde anahtar molekül olarak

görev alırlar. *Cadherin* ailesi en az beş ana alt aileyi içerir, bunlardan *e-cadherin*, tip I *cadherin* olarak bilinir ve erken tanınması ve karakterizasyonu ile normal ve patolojik durumlarda gözlemlendiği için bütün *cadherin*lerin prototipi olarak düşünülür. Tümör baskılayıcı gen ürünü *e-cadherin*ler ile *cadherin* ve aktin filamentlerini bağlayan alt kaplama proteinleri kateninler epitel hücrelerinin yapışma bölgelerinde yoğunlaşır ve sıkı hücre-hücre bağlantılar oluştururlar. Kanser hücrelerindeki hücrel yapışma sisteminde *e-cadherin*ler birçok mekanizma ile inaktif edilirler ve bu durum hem morfolojik hem de biyolojik olarak tümör karakteristikliğini yansıtır. Yaygın infiltrate kanserlerde, *e-cadherin* ile alfa ve beta katenin genlerinde mutasyonlar bulunur. Kanser invazyonu öncesinde, *e-cadherin* hücre yapışma sistemi onkogen ürünü olan c-erbB-2 proteini tarafından beta katenine direk bağlanarak tirozin fosforilasyonu ile inaktive edilir. *In vivo* ve *in vitro* deney sonuçlarından etkileyici bulgular gösteriyor ki *e-cadherin*/katenin kompleksi invazyon baskılayıcı olarak çalışmaktadır (10).

Temel embriyonik kök hücre transkripsiyon faktörleri SSEA-1 (aşamaya özgü embriyonik antijen 1) kemirgen pluripotent kök hücreler için işaretleyicidir. Bu işaret preimplantasyon embriyodaki hücre yapışması ve hareketinde önemli rol oynar. FUT4 (fukoziltransferaz 4) ve FUT9 tarafından sentezlenir. SSEA-1, yüksek moleküler ağırlıklı (>200 kDa) bir glikoproteindir ve erken fare embriyosunun, fare embriyonel karsinomunun, embriyonik kök hücrelerin ve fare ve insan embriyonik germ hücrelerinin yüzeyinde bulunur. SSEA-1, farklanmamış insan embriyonel karsinomda, embriyonik kök hücrede veya indüklemiş pluripotent kök hücrede; ya da resus maymun embriyonik kök hücre hattında ifadelendirmez. Kemirgen embriyonik kök hücrelerinde farklılaşmaya bağlı olarak ifadelendirme azalmakta, fakat insanlarda farklılaşma sürecinde ifadelendirme artmaktadır. SSEA-1, ayrıca CD15'in ifadelendiği olgun insan granülositinde ve monositinde de bulunur ve yapılan çeşitli çalışmalarda SSEA-1'in hücre yapışması, migrasyon ve hücre farklılaşması olaylarında görev aldığı belirtilmiştir (11).

TK inhibisyonunun diyabet etkisi altındaki testis dokusu üzerine göstereceği etkilerin araştırılması çalışmamızın temel amacını oluşturmaktadır.

Gereç ve Yöntem

Deney Kurgulanması - İn Vivo Uygulamalar

Bu çalışma protokolü Avrupa Birliği'nin deney hayvanları kullanım kurallarına uygundur. Bütün çalışmalar Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından desteklenmiştir.

Çalışmamızda 31 Adet CD1 Türü erkek fare kullanıldı. Fareler, 4 gruba ayrıldı: Grup 1 (kontrol grubu) 7, Grup 2 (TK inhibitörü uygulanan) 7, Grup 3 (diyabet + SF uygulanan) 8, Grup 4 (diyabet + TK inhibitörü uygulanan) 9 denek hayvanı içermektedir.

Grup 1'dekifarelere herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup 2'de 3 hafta boyunca tirozin kinaz inhibitörü 0.5 mL; 1.5mg/kg verildi. Deneysel diyabet oluşturulması için 0.1mol/L sodyum sitrat tamponu içerisinde çözülmüş streptozotisin (STZ) 55 mg/kg olacak şekilde tek doz intraperitoneal enjeksiyon yapıldı (12). STZ'nin verilmesinden sonraki 24. ve 48. saatlerde tüm hayvanlarda kuyruk kan damarı glikoz seviyesi ölçüldü. 250 mg/dL ve üzeri kan glikoz seviyesi diyabet olarak kabul edildi. Deneysel diyabet modeli oluşturulan fareler 1 hafta beklendikten sonra, Grup 3'e SF, Grup 4'e TK inhibitörü 3 hafta boyunca 0.5 mL; 1.5mg/kg dozunda verildi. Takiben, tüm fareler yüksek doz anestezi altında sakrifiye edilerek testis dokuları rutin histopatolojik inceleme için çıkarıldı.

İmmünohistokimyasal İnceleme

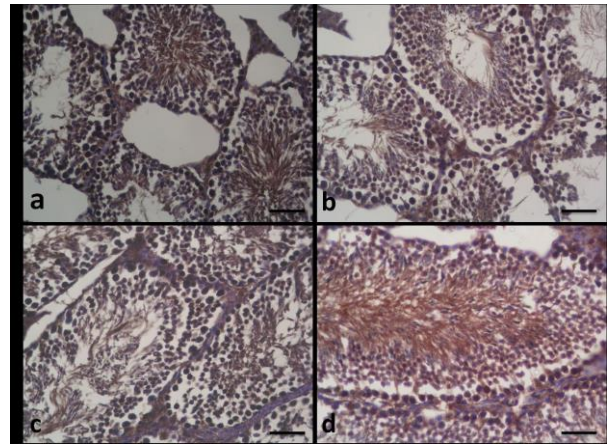
Çıkarılan testisler, %4'lük paraformaldehit içerisinde gece boyunca bekletilerek tespit edildi, sonra dehidrate edildi, parafine gömüldü ve mikrotom (Leica RM 2145) aracılığı ile kesildi. İmmünohistokimyasal analizler için 0.5 µm kalınlığındaki kesitler kullanıldı. Rehidratasyon her biri için 2 dakika süreyle, sıralı %100, %95, %80 ve %70'lik alkol serisi ile yapıldı. Kesitler 5 dakika boyunca distile suda bırakıldıktan sonra, endojen peroksidaz aktivitesi %3'lük H₂O₂ içerisinde 20 dakika boyunca inkübe edilerek engellendi. Lam üzerindeki bu doku örneklerinin etrafı işaretleyici bir kalem (Dakopen, Glostrup, Denmark) ile çizildi, fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde 10 dakika boyunca yıkandı, daha sonra 37°C'de 50mM Tris tamponu içindeki %2'lik tripsinde 15 dakika bırakıldı ve tekrar PBS ile yıkandı. Spesifik olmayan arka plan boyamaları azaltmak için, lamlar %3'lük bovine serum albümin/1X-Tris tamponlu salin içerisinde 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edildi. Primer antikorlar, *e-cadherin* ve SSEA-1 (Abcam), 1/200 oranında seyreltildi ve sonra nemli bir bölme içerisinde 57°C'deki inkübatörde bırakıldı. Kesitler her biri 5 dakikalık sürelerde üç kez PBS ile yıkandı bunu takiben biyotinlenmiş sekonder antikor (*histostain plus peroxidase kit*, Zymed Laboratories Inc., South San Francisco, CA, USA) ile inkübe edildi ve daha sonra streptavidin, PBS içerisindeki *horse radish* peroksidaz ve 3,3-

diaminobenzidin tetraklorid (DAB) ile 30 dakika konjuge edildi. Distile su ile yıkama sonrası, kesitler Mayer's Hematoksilen ile boyandı, dehidre edildi, ksilen ile temizlendi ve entellan ile kapatıldı. Kahverengi bir çökeltinin varlığı primer antikorlar için pozitif bulgu olarak gösterildi. Negatif kontrol örnekleri aynı işlemlere tabi tutuldu, primer antikorlar yerine benzer Ig G'ler kullanıldı. Bütün kesitler Olympus C-5050 dijital kamera ile incelendi ve fotoğrafları çekildi. Yazılım programını (Image-Pro Express, Media-Cybernetics, Inc. Bethesda, MD, USA) çalıştıran bir bilgisayar sistemine bağlı Olympos BX51 mikroskop analizler için kullanıldı. İmmünoreaktivite desenleri iki araştırmacı tarafından bağımsız olarak değerlendirildi. Nükleer immün boyama bütün primer antikorlar için puanlandırdı. Örneklerin grup ayırımından habersiz her iki araştırmacı her bir primer antikor için hayvan başına on farklı kesitten en az beş desen buldu. Preparatlar rastgele bir başlangıç ile sistematik olarak incelendi. 100'lük büyütmedeki örnekleme preparatın en üst sağ köşesinden başladı ve yoğun şekilde immün reaktif hücreler analiz edildi.

Bulgular

Testis dokusu histolojik olarak incelendiğinde deneysel diyabete bağlı olarak seminifer tübülde germ hücre serilerinde kayıp, hücre bütünlüklerinde bozulma saptandı.

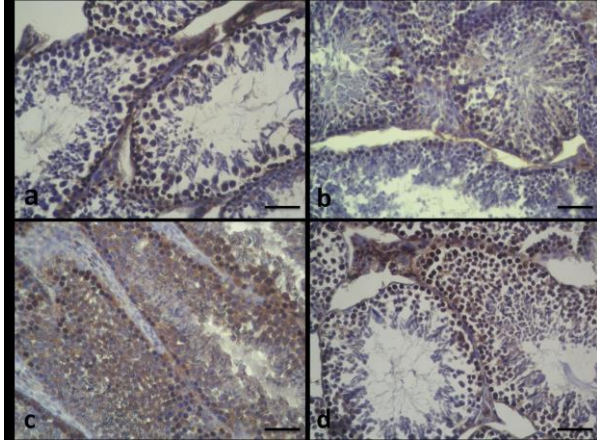
E-cadherin ekspresyonu incelendiğinde, deneysel diyabet grubunda (Şekil-1b) tüm hücre serilerinde *e-cadherin* ekspresyonunda azalma saptandı, diyabet grubuna uygulanan TK inhibitörü (Şekil-1c) tedavisi bu ekspresyonu arttırmayı başarmasına karşın ekspresyon düzeyleri kontrol grubu (Şekil-1a) ve kontrol+TK inhibitörü (Şekil-1d) grubu düzeylerine ulaşamamış olarak bulundu.



Şekil-1.e-cadherin a. Grup 1, kontrol grubu, b. Grup 3, diyabet+SF grubu, c. Grup 4, diyabet+TK inhibitörü grubu, d. Grup 2, TK inhibitörü grubu.

SSEA-1 ekspresyonu incelendiğinde, deneysel diyabet grubunda (Şekil-2b) SSEA-1 ekspresyonunda azalma

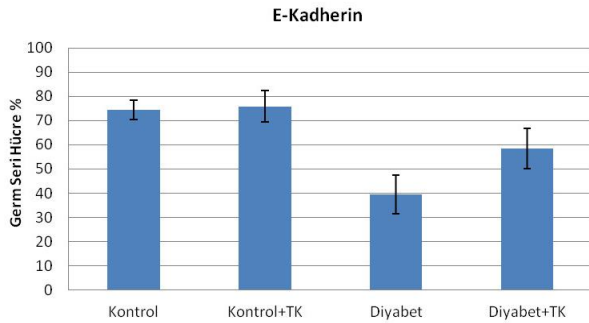
saptandı, diyabet grubuna uygulanan TK inhibitörü (Şekil-2c) tedavisinin bu ekspresyonu oldukça fazla düzeyde arttırdığı izlendi. Kontrol grubu (Şekil-2a) ve kontrol+TK inhibitörü (Şekil-2d) grubu SSEA-1 ekspresyonu düzeyleri diyabet grubundan fazla, diyabet+TK inhibitörü uygulanan gruptan daha az olarak bulundu.



Şekil-2. SSEA-1 a. Grup 1, kontrol grubu, b. Grup 3 diyabet+SF grubu, c. Grup 4, diyabet+TK inhibitörü grubu, d. Grup 2, TK inhibitörü grubu.

İstatistiksel Analiz

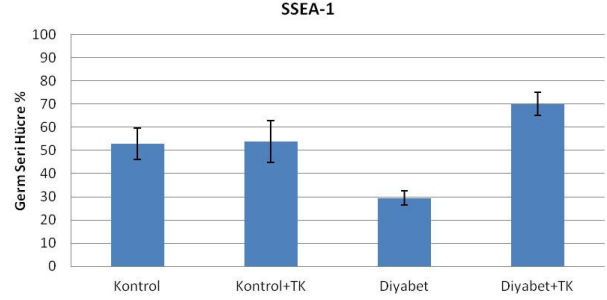
Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testi sonuçlarına göre *e-cadherin* ve SSEA-1 immünohistokimyasal boyaması yapılan her bir gruptan randomize seçilmiş 10 testis örneğinden, seminifer tübül içerisindeki pozitif boyanan germ hücreleri analiz edildi. *E-cadherin* için diyabet grubu ile diyabet+TK, kontrol ve TK grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.001$) (Şekil-3). SSEA-1 için de diyabet grubu ile diyabet+TK, kontrol ve kontrol+TK grupları arasındaki fark ile, kontrol ve TK grupları ile diyabet+TK grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu her ikisi için de $p<0.001$) (Şekil-4). Kontrol ve TK grupları arasında ise her iki boyama için istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$).



Şekil-3. E- cadherin istatistiksel analizi.

Tartışma

Çalışmamızda bir tirozin kinaz inhibitörü olan sunitinib kullanımına bağlı deneysel diyabet modelinde testis dokusu üzerine olan değişikliklerin, hücre adezyonu ve pluripotensi kapasitesi açısından incelenmesi amaç edinilmiştir.



Şekil-4. SSEA-1 istatistiksel analizi

Bir TK inhibitörü olan sunitinib, hücreler sinyali, çoklu RTK yollarını hedefleyerek durdurur. Bunlar tümör anjiyogenez ve tümör proliferasyonunda rol alan tüm paletlerden türetilmiş büyüme faktörleri, *platelet-derived growth factor* (PDGF-Rs) ve vasküler endotel büyüme faktör reseptörlerini, *vascular endothelial growth factor receptors* (VEGFRs) kapsamaktadır. Sunitinib, ayrıca, RTK olan CD-117'yi (c-KIT) inhibe eder ki, CD-117 uygun olmayan mutasyon ile aktive edildiğinde gastrointestinal stromal hücre tümörlerini aktive eder (13). Öte taraftan sunitinib böbrek kanseri için ilk basamak tedavidir. Sunitinib'in, diğer TK inhibitörleriyle birlikte tip 2 diyabette ve yeni başlangıçlı tip 1 diyabette kan şekerini düşürdüğü bildirilmiştir (14). Sunitinib kullanımıyla insülin gereksinimlerinde azalma ile diyabet kontrolünde iyileşme saptanmıştır. Ancak, glikoz seviyelerini düşürme açısından sunitinib etki mekanizması üzerine fikir birliği yoktur (15).

Yaptığımız bu çalışmada, bir TK inhibitörü olan sunitinib'in diyabet hastalarında, hücre adezyon molekülleri özelinde, *e-cadherin* ve hücre pluripotensi ile farklılaşması özelinde SSEA-1 üzerinden nasıl bir etki mekanizması oluşturacağı araştırılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda diyabet gruplarında *e-cadherin* ekspresyonunun, kontrol gruplarına oranla daha az olduğu saptanmıştır. Diyabetin testiste, hem germ hücrelerinin kendi aralarında hem de destek hücreleri ile aralarında olan hücre adezyon davranışlarında hasarlanmaya yol açtığı düşünülmektedir. Diyabet grubuna tedavi amaçlı sunitinib uygulanması, istatistiksel anlamlı olmayan düzeyde *e-cadherin* ekspresyonunun artışına yol açmaktadır.

Öte yandan, SSEA-1 ekspresyonu diyabet grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı oranda düşük bulunmuş, bu gruba sunitinib uygulanması kontrol grubundan da daha yüksek bir SSEA-1 ekspresyonuna yol açmıştır. SSEA-1'in ekspresyonunun artışı, hücre farklılaşma sürecinde özellikle diyabetli grupta sunitinib uygulamasının, pluripotensi kapasitesini indüklediği ve diyabetli grupta tedavi sürecine katkı sağladığı düşünülmektedir.

Sonuç

Diyabetin testiste germ hücre serilerinde sayısal olarak azalmaya ve hücre adezyon mekanizmasında bozulmaya yol açtığı ve sunitinib uygulanmasının bu hasarlanmada tamir edici rol oynadığı düşünülmektedir. Oluşan hasarın tedavisinin başarısı, sunitinib dozu ve süresine bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir. Gelecekte bu konuda yapılacak moleküler çalışmalar, sonuna ışık tutabilecektir.

Kaynaklar

1. Lin Y, Sun Z. Current views on type 2 diabetes. *J Endocrin* 2010;204(1):1-11.
2. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* 2003;91(3A):7A-11A.
3. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2009;202(2):321-9.
4. La Vignera S, Calogero AE, Condorelli R, Lanzafame F, Giammusso B, Vicari E. Andrological characterization of the patient with diabetes mellitus. *Minerva Endocrinol* 2009;34(1):1-9.
5. Mallidis C, Agbaje I, McClure N, Kliesch S. The influence of diabetes mellitus on male reproductive function: A poorly investigated aspect of male infertility. *Urologe* 2011;50(1):33-7.
6. Petroianu A, Alberti LR, Antonio M, deMelo B, de Almeida LM. Relation between diabetes mellitus and male fertility. *Einstein* 2009;7(4):407-10.
7. Young B, Heath JW. *Wheater's Functional Histology*, 4th edition, Churchill Livingstone; London: 2000.
8. Doğan AL, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35(1):34-42.
9. Bhise SB, Nalawade AD, Wadhawa H. Role of protein tyrosine kinase inhibitors in cancer therapeutics. *Indian J Biochem Biophys* 2004;41(6):273-80.
10. Hulpiau P, vanRoy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41(2):349-69.
11. Nakayama F, Nishihara S, Iwasaki H, et al. CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *J Biol Chem* 2001;276(19):16100-6.
12. Gomez R, Barros HM. Ethopharmacology of the antidepressant effect of clonazepam in diabetic rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2000;66(2):329-35.
13. Hartmann JT, Kanz L. Sunitinib and periodic hair depigmentation due to temporary c-KIT inhibition. *Arch Dermatol* 2008;144(11):1525-6.
14. Quek R, George S. Gastrointestinal stromal tumor: A clinical overview. *Hematol Oncol Clin North Am* 2009;23(1):69-78.
15. Tyrrell HE, Pwint T. Sunitinib and improved diabetes control. *BMJ Case Rep* 2014;24:2014.