

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**17B-ÖSTRADİOL VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN D3
UYGULANAN DÜZ KAS HÜCRELERİNDE ÇOĞALMA VE
APOPTOZ DİNAMİKLERİNİN EPİGENETİK ANALİZİ**

Kezban KİBAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ

T.C
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE
EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**17B-ÖSTRADİOL VE 1,25-DİHİDROKSİ VİTAMİN D3
UYGULANAN DÜZ KAS HÜCRELERİNDE ÇOĞALMA VE
APOPTOZ DİNAMİKLERİNİN EPİGENETİK ANALİZİ**

Kezban KİBAR
YÜKSEK LİSANSTEZİ

DANIŞMAN
Prof.Dr.Şakir Necat YILMAZ

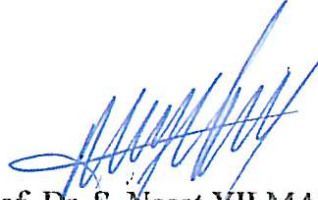
Tez No: 310

Butez Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından BAP-SBE
TTB(TK)2015-TP2-1363 nolu proje olarak desteklenmiştir.

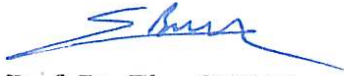
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tez programı çerçevesinde yürütülmüş olan “17 β -Östradiol ve 1,25-Dihidroksi Vitamin D3 Uygulanan Düz Kas Hücrelerinde Çoğalma ve Apoptoz Dinamiklerinin Epigenetik Analizi” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

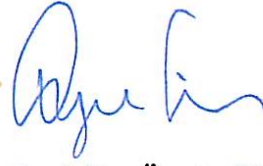
Tez Savunma Tarihi
26/07/2016



Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Ebru BALLI
Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi



Prof. Dr. Özgür ÇINAR
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim kurulunun ...08.08.2016... tarih ve 2016/299...sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Banu ÇOŞKUN YILMAZ



TEŞEKKÜR

Çok sevgili ve saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ'a bilimsel anlamdaki bütün tutkularımı desteklediği ve başaracağıma dair inancını her zaman dile getirdiği için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bana öğrettikleriniz sayesinde, akademik alandaki geleceğim adına tüm uğraşlarım artık daha anlamlı. Bana sunduğunuz, hayata dair ve kariyerimi etkileyen bütün fırsatlar için sonsuz teşekkürler.

Çok sevgili Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ' a, çok sevgili hocalarım Prof. Dr. Ebru BALLI ve Doç. Dr. Savaş AKTAŞ' a hiçbir sorumu yanıtız bırakmadıkları, her zaman ve her koşulda yanımda olup benden desteklerini esirgemedikleri için teşekkür ederim. Benim ikinci ailemsiniz ve bu yolda sizinle yürüyebildiğim için müteşekkirim.

Yüksek lisans hayatım boyunca yanımda olan, iyi ve kötü yanlarımı her zaman anlayan ve tolere eden çok sevgili çalışma arkadaşlarım Ayla BATU, Burcu DEMİRBAĞ ve İlkay KARAGÜL'e ve diğer çalışma arkadaşlarıma, tez dönemimde bana katlandıkları ve her konuda destek oldukları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, benim endişelenmeme izin vermeden pek çok şeyi düşünen ve gerçekleştiren, deneylerimin tüm aşamalarında ekstra zaman ayırarak bana yardımcı olan çok sevgili çalışma arkadaşım Derya YETKİN'e teşekkür ederim. Bu tezi bitirmem için paylaştığım deneyimlerin ve gösterdiğiniz ilgi için minnettarım.

Tezimde kullandığım hücrelerin temini için sayın hocam Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na ve tezimdaki bütün istatistiksel analizlerin yapılmasında emeği geçen çok sevgili ve güleryüzlü hocam sayın Doç. Dr. Gülhan OREKİCİ TEMEL'e teşekkür ederim.

Ve tabi ki sevgili anne ve babama bana sundukları tüm güzel şeyler için teşekkür ederim. Sizi düşünmeye vakit ayıramadığım anlarda bile bana koşulsuz destek oldunuz. Tüm başarılarımın kaynağı ve sebebi sizsiniz.

Son olarak canım arkadaşım Aytuğ MERİÇ'e, en kötü zamanlarımda bile beni gülümsetebildiği için teşekkür ederim. Tez sürecimde burada değildin ancak güzel dostluğunu, desteğini ve varlığını her zaman hissettirdin. Beraber yaşadığımız tüm güzel anılarımız için sonsuz teşekkürler.



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Düz Kaslar	4
2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücreleri.....	4
2.2. Ateroskleroz.....	5
2.2.1. Düz Kas Hücre Migrasyonu ve Proliferasyonunun Aterosklerozla İlişkisi	6
2.2.2. Düz Kas Hücre Ölümü	8
2.3. Epigenetik	9
2.3.1. Aterosklerozda Epigenetik Değişiklikler.....	10
2.3.1.1. DNA Metilasyonu ve Ateroskleroz.....	10
2.3.1.2. Hipermetilasyon ve Ateroskleroz	12
2.3.1.3. Hipometilasyon ve Ateroskleroz	12
2.4. Östradiol.....	13
2.4.1. Sentezi ve Metabolizması	14
2.4.2. Biyolojik Etkileri	14
2.4.3. Reseptörleri-Yapı ve Fonksiyonları.....	15
2.4.3.1. Reseptör-Ligand Etki Mekanizmaları.....	15
2.4.4. Östradiol ve Kardiyovasküler Hastalıklar	16
2.4.4.1. Aterosklerotik Hastalıklarda Östradiolün Rolü.....	17
2.5. Vitamin D.....	20
2.5.1. Sentezi ve Görevleri.....	20

2.5.2. Vitamin D ve Kardiyovasküler Hastalıklar	20
2.5.2.1. Vitamin D ve KVH Patogenezindeki Rolü	21
2.5.2.2. Vitamin D ve Ateroskleroz	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1. Hücre Kültürü	25
3.2. Hormonlar	27
3.3. Grupların Oluşturulması.....	28
3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi	29
3.5. İmmünofloresan İşaretleme	31
3.6. ImageJ Programı ile İşaretleme Yoğunluğu Analizi	32
3.7. Apoptotik İndeks Hesaplaması	35
3.8. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR.....	36
4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları.....	36
4.2. İmmünofloresan İşaretleme Yoğunluğu Analizi-H Skoru	37
4.2.1. DNMT1 Antikoru İşaretleme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması	37
4.2.2. DNMT3a İşaretleme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması	40
4.2.3. ER- α İşaretleme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması. 44	
4.2.4. ER- β İşaretleme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması. 48	
4.3. Apoptotik İndeks.....	51
5. TARTIŞMA.....	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
7. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	DNA Metilasyonunun şematik sunumu.....	10
Şekil 3.1.	Sıçan aortik düz kas hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüsü...	28
Şekil 3.2.	DNMT3a için örnek ImageJ alan belirleme görüntüsü.....	34
Şekil 3.3.	ER- α için örnek ImageJ alan belirleme görüntüsü.....	34
Şekil 4.1.	Gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri.....	36
Şekil 4.2.	24 saat hormon uygulamasına ait DNMT1 işaretlenmesi.....	38
Şekil 4.3.	72 saat hormon uygulamasına ait DNMT1 işaretlenmesi.....	39
Şekil 4.4.	24 saat hormon uygulamasına ait DNMT3a işaretlenmesi.....	41
Şekil 4.5.	72 saat hormon uygulamasına ait DNMT3a işaretlenmesi.....	42
Şekil 4.6.	DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 72 saat uygulanan etanol ve 1 nM vitamin D3 (D1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 100 nM vitamin D3 (D3) konsantrasyon grupları arasında karşılaştırılması	43
Şekil 4.7.	DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 72 saat uygulanan etanol ile 10 nM östradiol (E2), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 kombine grupları (E2D2) arasında karşılaştırılması	44
Şekil 4.8.	24 saat hormon uygulamasına ait ER- α işaretlenmesi.....	46
Şekil 4.9.	72 saat hormon uygulamasına ait ER- α işaretlenmesi.....	47
Şekil 4.10.	24 saat hormon uygulamasına ait ER- β işaretlenmesi.....	49
Şekil 4.11.	72 saat hormon uygulamasına ait ER- β işaretlenmesi.....	50
Şekil 4.12.	24 saat hormon uygulamasına ait kaspaz 3 işaretlenme yoğunlukları....	52
Şekil 4.13.	Etanol ile 1 nM vitamin D3 (D1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 100 nM vitamin D3 (D3) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması....	53
Şekil 4.14.	Etanol ile 1 nM östradiol (E1), 1 nM vitamin D3 (D1) ve 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3 (E1D1) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.....	54
Şekil 4.15.	Etanol ile 1 nM östradiol (E1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3 (E1D2) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.....	55

- Şekil 4.16.** Etanol ile 10 nM östradiol (E2), 1 nM vitamin D3 (D1) ve 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3 (E2D1) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.....56
- Şekil 4.17.** Etanol ile 10 nM östradiol (E2), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 10 nM östradiol östradiol+10 nM vitamin D3 (E2D2) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.....57



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Kullanılan primer ve sekonder antikörlerin özellikleri.....	32
--	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

1,25 (OH)₂D₃	1,25 α - Dihidroksi Vitamin D ₃
25 (OH) ₂D₃	25 α - Dihidroksi Vitamin D ₃
5mC	5-metil sitozin
5hmC	5-hidroksimetil sitozin
Apo-E	Apolipoprotein-E
BSA	Sığır serum albümini
⁴⁵Ca	Radyoaktif kalsiyum izotopu
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CpG	Sitozin guanin çiftleri
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle medyumunu
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT1	DNA metiltransferaz 1
DNMT3a	DNA metiltransferaz 3a
DPBS	Dulbecco'nun Fosfat Tampon Çözeltisi
ECM	Ekstraselüler Matris
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
eNOS	Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ER-α	Östrojen reseptör alfa
ER-β	Östrojen reseptör beta
FBS	Fötal sığır serumu
FGF-2	Fibroblastik büyüme faktörü
GIS	Gastrointestinal Sistem
ICAM-1	İnterselüler adezyon molekülü 1
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

IU	Enternasyonel Birim
KVH	Kardiyovasküler Hastalıklar
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
MBD1	Metil-CpG bağlayıcı protein domaini 1
MBD2	Metil-CpG bağlayıcı protein domaini 2
MBD4	Metil-CpG bağlayıcı protein domaini 4
MeCP2	Metil CpG bağlayıcı protein 2
MI	Miyokard infarktüsü
MMP9	Matriks metalloproteinaz 9
miRNA	Mikro ribonükleik asit
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NF- κ B	Nükleer faktör kappa B
nM	Nanomolar
NO	Nitrik oksit
PBS	Tuzlu fosfat tampon çözeltisi
PDGF-β	Platelet kökenli büyüme faktörü beta
RAS	Renin-anjiyotensin sistemi
RTCA	Gerçek-zamanlı hücre analizi
siRNA	Küçük interferaz ribonükleik asit
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
Th1	Yardımcı T hücresi 1
Th2	Yardımcı T hücresi 2
TNF-α	Tümör nekroz faktörü alfa
TNF-R	Tümör nekroz faktörü reseptörü
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon proteini 1
VDR	Vitamin D reseptörü
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktör

ÖZET

17 β -Östradiol ve 1,25-Dihidroksi Vitamin D3 Uygulanan Düz Kas Hücrelerinde Çoğalma ve Apoptoz Dinamiklerinin Epigenetik Analizi

Düz kas hücreleri kan damarlarının önemli bir bileşenidir. Damar duvarında kasılıp gevşeyerek kan akımını düzenlemek dışında matriks sentezi de yapabilme yeteneğine sahiptir. Günümüze kadar düz kas hücreleri ile aterosklerotik damar hastalıkları arasındaki ilişkiyi gösteren çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında aterosklerotik lezyonlarda düz kas hücrelerinin epigenetik değişiklikleri aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Östradiol ve D vitamininin de aterosklerotik damar hastalıklarında oldukça önemli olduğu, hastalığın oluşumunda ve klinik seyrinde belirleyici olabileceği çok sayıda çalışmayla gösterilmiştir. Bu hormonların damar düz kasları üzerinde koruyucu veya zararlı etkileri olduğunu bildiren çelişkili çalışmalar bulunmaktadır.

Sunulan çalışmada, kültüre edilmiş sıçan aortik düz kas hücreleri üzerine östradiol ve D vitamini farklı konsantrasyonlarda uygulandı. Çoğalma dinamiklerini göstermek için gerçek zamanlı hücre analizi yöntemi kullanıldı. Hücrelerin apoptoz oranlarını belirlemek için aktif kaspaz-3 antikoruyla immün işaretleme yapıldı ve apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. Ayrıca, epigenetik ve östrojen reseptörlerindeki değişiklikleri belirlemek için DNMT1, DNMT3a, östrojen reseptör alfa ve beta antikorları ile immün işaretleme yapıldı. İşaretleme yoğunlukları gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular incelendiğinde hormonların düz kas hücre çoğalması üzerine anlamlı etki göstermediği saptandı. Östradiol hormonu apoptoza yol açmazken D vitamini artan dozla korele bir şekilde apoptozu uyarmaktaydı. Hormonların birlikte verildiği gruplarda östradiolün apoptozdan koruyucu etki gösterdiği de anlaşıldı. İşaretleme yoğunluğu açısından sadece DNMT3a ile işaretlenen ve hormonlu medyumda 72 saat bekletilen bazı gruplarda anlamlı fark görüldü.

Bu bilgiler ışığında östradiol ve D vitamininin düz kas hücre apoptozunda önemli rol oynadığı, hücre proliferasyonunda etkisinin olmayabileceği, epigenetik olarak da daha çok DNMT3a üzerinden etki gösteriyor olabilecekleri sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: 1,25-Dihidroksi Vitamin D3, 17β-Östradiol, Apoptoz, Epigenetik, Sıçan Aortik Düz Kas Hücrele



ABSTRACT

The Epigenetic Analysis of the Effect of 17 β -Estradiol and 1,25-Dihydroxy vitamin D3 on the Proliferation and Apoptosis Dynamics of Smooth Muscle Cells

Vascular smooth muscle cells are important components of the vessel wall. As well as regulating blood flow via contraction and relaxation, vascular smooth muscle cells are also capable of synthesizing extracellular matrix and its components. There are number of studies pointing out their relationship with atherosclerotic vascular diseases. Some of those tried to shed light on the epigenetic changes of the vascular smooth muscle cells found in the atherosclerotic lesions.

To date, the importance of estradiol and vitamin D in atherosclerotic vascular pathology and disease progression has ben shown by several works. The results are controversial about whether those hormones have beneficial or detrimental effects on vascular smooth muscle cells.

In the present study, cultured rat aortic smooth muscle cells were treated either with estradiol or vitamin D in different concentrations. Real-time cell analyser was chosen as a method to report their proliferation dynamics. To determine the apoptotic rates of cells treated with different concentrations of these hormones, caspase 3 immunostaining method was performed and the apoptotic indices of the groups were compared. In addition, to determine the changes in estrogen receptors and epigenetic markers for DNA methylation, immunstaining for DNMT1, DNMT3a, ER- α and ER- β were carried out. Staining intensity between the groups was then evaluated.

Assessment of our findings revealed that the effect of the hormones on the smooth muscle cell proliferation was not statistically significant. The hormone estradiol did not induce apoptosis on the cells while vitamin D3 did in a dose-

dependent manner. The staining intensity was found to be different only for DNMT3a in some of the 72 hour hormone-treated groups.

In the light of these findings, it is suggested that both estradiol and vitamin D play an important role in smooth muscle cell apoptosis and their effects are opposite to each other. It is also inevitable to conclude that these hormones may not be effective on the smooth muscle cell proliferation and they may exert their epigenetic effects on vascular smooth muscle cells over DNMT3a.

Keywords: 1,25-Dihydroxy vitamin D₃, 17 β -Estradiol, Epigenetics, Apoptosis, Rat Aortic Smooth Muscle Cells.



1. GİRİŞ

Düz kas hücreleri kan damarlarındaki temel hücre tipidir ve esas görevleri kontraksiyon ve relaksasyon yoluyla lüminal çapı değiştirerek kan akışı ve basıncını düzenlemektir. Düz kas hücreleri gebelik ya da egzersiz gibi bazı fizyolojik olaylarda ve çeşitli vasküler hasar durumlarında damarın yeniden şekillenmesinden sorumludurlar. Bu işlevlerini “kontraktıl” durumlarından çeşitli çevresel stres faktörlerinden etkilenecek yüksek seviye proliferatif ve migratör “sentetik” fenotipe geçebilmeleri sayesinde gerçekleştirirler. Bu yüksek plastisite özellikleri sayesinde kan akışındaki değişimlere ya da vasküler hasara yanıt vermelerini gerektiren durumlarda düz kas hücreleri kontraktıl fenotipten sıyrılıp sentetik fenotipe bürünürler (1). Bu dengenin düzgün bir şekilde sürdürülememesi ise ateroskleroz gibi ciddi vasküler bozukluklara yol açabilir. Bu sebeple düz kas hücrelerinin çevresel faktörlerle etkileşiminin detaylı bir şekilde anlaşılabilmesi çeşitli klinik durumlar açısından büyük önem taşımaktadır.

Ateroskleroz kan damarlarının duvarında yağ, kolesterol, kalsiyum ve kanda bulunan diğer materyallerin birikmesiyle damar çapının daralması ve kan akış hızının düşmesi şeklinde seyreden bir durumdur (2). Bu tıkanıklık kalbe oksijen yönünden zengin kan taşıyan bir arterde meydana gelirse miyokard infarktüsü, felç, kalp yetmezliği ve hatta ölüm meydana gelebilir. Bazı durumlarda tıkanık damarda kan akışını düzenlemek için anjiyoplasti, stent takma veya bypass grefti gibi yeniden damarlanma protokolleri uygulanması gerekebilir (2). Bu gibi uygulamaların geliştirilebilmesi düz kas hücrelerinin damar hasarlanmalarında meydana gelen değişimlere verdiği yanıtların anlaşılması ile mümkündür. Damar hasarlarında damar mikroçevresi ciddi bir değişime uğrar. Öncelikle plateletler ve infiltre olan enflamatuar hücreleri ile makrofaj aracılı büyüme faktörleri ve mediatörler damar duvarındaki düz kas hücrelerinin kasılan/kontraktıl fazdan sentetik faza dediferansiye olmalarına yol açar. Bu sentetik fazdaki düz kas hücreleri hasarlı bölgede bol miktarda ekstraselüler matriks salgırlar ve luminal çapın daha fazla daralmasına sebep olurlar. Bu durumda ilerleyen aşamalarda düz kas hücre apoptozu

gözlenebilir (2). Tüm bu çıktıların önlenmesi ve/veya iyileştirebilmesi için kullanılan tedavi yöntemleri son derece kısıtlıdır.

Östrojen, dişilerde temel cinsiyet hormonu olarak üreme sisteminin gelişiminde ve sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkmasında rol oynamasının yanı sıra, pek çok işlevi olan bir hormondur ve farklı dokularda, damarlanma gibi çeşitli fizyolojik süreçlere dahil olur (3). Erkeklerde ve post-menopozal kadınlarda yapılan çalışmalar sonucunda ateroskleroz kaynaklı kardiyovasküler hastalıkların ve koroner ve miyokard infarktüsü riskinin pre-menopozal dönemdeki kadınlara kıyasla artması, östrojenin kardiyoprotektif rolünü gözler önüne sermektedir (4).

Kalsiyum homeostazı ve kemik metabolizmasındaki bilinen rolünün ötesinde güncel çalışmalar vitamin D'nin hücre proliferasyonu indüklemeye ve immünmodülasyon gibi biyolojik etkilerine dikkat çekmektedir (5). Metabolik olarak aktif olan 1,25-Dihidroksi vitamin D3' ün serumda düşük seviyelerde bulunması koroner arter hastalıklarının ciddiyetinin artmasına yol açmaktadır. 1,25 Dihidroksi vitamin D3 reseptörleri (VDR) kardiyovasküler sistemin pek çok hücresinde eksprese edilmektedir ve bu reseptör-ligand etkileşimi hücre spesifik fonksiyonlara ve gen regülasyonuna yol açmaktadır (6). Özellikle vasküler endotel hücreleri, kardiyomyositler ve düz kas hücrelerinde bulunan D vitamini reseptörlerini D vitamini yoksunluğu çeken bireylerde aktive etmek amacıyla kalsitriol ve parikalsitol gibi aktivatörler kullanılır (7). Erken yaşlarda gözlenen D vitamini yoksunluğunun vasküler oksidatif stresi tetiklediği, arteriyel kan basıncını arttırdığı ve kardiyak gen ekspresyonunda değişimi indüklediği bilinmektedir (8). Dolayısıyla dışardan verilen bu VDR aktivatör takviyeleri kardiyovasküler fonksiyonun iyileştirilmesi açısından önemlidir. Bizim çalışmamızda aort düz kas hücrelerine kalsitriol (1,25-Dihidroksi vitamin D3) uygulamasının mitojenik ve antimitojenik etkileri ile apoptotik etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Östradiol ve D vitamininin *in vitro* ve *in vivo* ortamda düz kas hücrelerinin proliferasyon ve apoptoz dinamiklerini değiştirdiği bilinmektedir. Bu değişimlere katkı sağlayan muhtemel mekanizmalardan bir tanesi de epigenetik mekanizmalardır (9). Epigenetik DNA üzerindeki gen sekansında meydana gelen değişimler haricinde gen ekspresyonunu değiştiren mekanizmaları içerir (10). Kromatin materyalinin yeniden şekillendirilmesi, histonlarda çeşitli modifikasyonlar ve DNA metilasyon/demetilasyon

dinamiklerinin değişmesi, aktif ya da baskılanmış gen ekspresyonunu ifade ederek epigenetik mekanizmaları oluştururlar (10). Gen susturma ile ilişkili en fazla çalışılan epigenetik modifikasyon DNA metilasyonudur. Memeli hücrelerinde DNA metilasyonu DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B tipleri olan DNA metiltransferaz enzimleri aracılığıyla sitozin halkasının 5' pozisyonunda gerçekleşir (10). Pek çok hücrede sıklıkla çalışılmış olmasına karşın düz kas hücrelerindeki DNA metilasyonunun etkinliğini gösteren pek fazla çalışma bulunmamaktadır ve östradiol ve vitamin D3'n düz kas hücrelerindeki bu mekanizmalara etkisini göstermenin literatüre önemli bir katkısı olacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle, çalışmamızda düz kas hücrelerinde DNMT1 ve DNMT3 enzim aktivitelerinde östradiol ve vitamin D3 varlığında meydana gelen değişimleri östrojen reseptörleri üzerinden göstermeyi amaçladık.

Vasküler hasarda ayrı ayrı veya kombine bir östrojen vitamin D3 tedavisinin etki mekanizmalarının anlaşılması klinik açıdan ciddi bir öneme sahiptir. Fizyolojik koşullarda düz kas hücrelerinin proliferasyon veya apoptozunda etkin olan epigenetik mekanizmaların incelendiği *in vitro* bir çalışmaya rastlanmamaktadır. Çalışmamız, kardiyovasküler bozuklukların tedavisi veya önlenmesi açısından önemli olan östradiol ve vitamin D3'n bu mekanizmaları ne yönde değiştirdiğini ortaya çıkarmayı hedeflemektedir ve çalışmamızın sonucunda ateroskleroz gibi kardiyovasküler sistem ilişkili bozukluklar açısından terapötik alanda ilerleme kaydedilmesine yol açabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Düz Kaslar

Düz kaslar kan ve lenf damarlarının duvarlarında yer alan, solunum, üreme ve gastrointestinal yollarda bulunan içi boş pek çok organı dıştan saran, çizgilenme göstermeyen ve istemsiz kasılıp gevşeyen yapılardır. Bunun dışında derideki arrektör pilorim kası ya da gözdeki siliyer kaslar gibi farklı örnekleri de bulunmaktadır. Esas görevi sıvı ya da içeriğin ileri yönde taşınmasını sağlamaktır. Yapısal olarak mekik şekilli, küçük, uzamış ve tek nükleuslu olan düz kas hücreleri, aktin ve miyozin filamentleri taşınmasına rağmen enine çizgilenme göstermezler. T tübüllerine sahip değildirler ancak sayısız kaveolinleri ve kalsiyumun kontrol ettiği gelişmiş bir kontraktıl aparatları bulunur (1).

2.1.1. Vasküler Düz Kas Hücreleri

Kan damarları tüm vücuda oksijen, besin ve hormonların taşınmasında ve metabolik atıkların toplanmasında fonksiyon görürler. Kapillerler hariç kan damarlarının duvarı tunika intima, tunika media ve tunika adventisya olmak üzere üç tabakadan oluşur. Kapillerler kan-doku arasındaki gaz ve atık değişiminin kolaylaştırılması amacıyla yalnızca en iç intima tabakasından oluşur. Medya çoğunlukla, kolajen, elastin ve diğer yapısal proteinlerden oluşan matriks içine gömülmüş düz kas hücrelerinden oluşur. Adventisya ise çok, az ya da hiç düz kas hücresi bulundurmayan vazo vazorum ve nervi vaskularis içeren fibro-elastik dış tabakadır (1).

Düz kas hücreleri fenotipik ve fonksiyonel olarak heterojendirler. Gelişimsel çalışmalar vasküler sistemin bağımsız şekilde oluşan düz kas hücreleri sayesinde mozaik bir yapısı olduğunu öngörmektedir. Gelişim sırasında düz kas hücreleri mezodermden ve nöral krestten köken alırlar (1). Aynı zamanda endotelial hücrelerden ve kemik iliği kökenli multipotent kök hücrelerden de kaynaklanabilirler. Sonuç olarak kan

damarlarının yapısal ve fonksiyonel farklılıkları düz kas hücrelerinin multipl kökenlerinden kaynaklanıyor olabilir. Vasküler düz kas hücrelerinin primer görevi vasküler tonusu sürdürmektir. Vasküler kasılma derecesi, akım direncinin, sirkülasyon kapasitesinin ve arteriyel duvar rijiditesinin korunmasına yardım eder. Diğer düz kas hücre fonksiyonları çevresel stres faktörleri ve hasara karşı kan damarı duvarının tamiriyle alakalıdır. Vasküler hücreler *in vivo* ve *in vitro* ortamda kontraktıl veya sentetik fenotipe adapte olurlar. Kontraktıl fenotipe düz kas hücreleri iğ şekillidirler ve diferansiye olmuş arter ve venlerin tipik düz kas hücreleridir. Sentetik fenotipe ise düz kas hücreleri epiteloid şekil kazanırlar ve gelişmekte olan kan damarları ile patolojik arterlerde yani ateroskleroz, anjiyoplasti sonrası restenoz ve koroner arter bypass grefti sonrasında gözlenmektedir. Her iki fenotipe, sağlıklı arterlerin media tabakasında damar çapı ve yaşına bağlı olarak ya da dolaşımdaki ve mikroçevredeki faktörlere bağlı olarak değişen oranlarda bir arada bulunabilirler (10). Vasküler düz kas hücreleri tarafından sentezlenen temel protein elastindir ve düz kas hücreleriyle beraber elastik lameller damar duvarının yapısal ve fonksiyonel ünitesini oluştururlar. Mekanik hasar veya matriks metalloproteinazların aktivasyonu ile elastin fiberlerin bozulması ateroskleroz ve restenoz gibi proliferatif vasküler hastalıklarda son derece tipiktir (2, 8).

Düz kas hücreleri aynı zamanda arteriyel çapı koruyarak rezistansın ayarlanmasında görevlidirler. Lümen çapı yapısal, mekanik veya fonksiyonel olarak değişebilir. Bu süreçlerin üçünde de düz kas hücreleri görev alır. Hipertansiyonda, örneğin, vasküler duvarın yeniden şekillenmesine eşlik eden yapısal değişiklikler, düz kas hücre büyümesi ve apoptotik süreçler ile düz kas hücrelerinin boyut ve dansitesinde artışı (hiperplazi, hipertrofi) içermektedir. Bunun yanı sıra tüm yapısal ve mekanik değişimler düz kas hücreleri tarafından sentezlenen matriks protein kompozisyonundaki değişimlerle de alakalıdır (11, 12).

2.2. Ateroskleroz

Kardiyovasküler hastalıklar modern ülkelerde en sık görülen mortalite sebeplerinden bir tanesidir (13, 14). Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde giderek artan bir

ölüm sebebidir. Ana formu koroner kalp hastalığı ve inmedir. Koroner kalp hastalığının mortalite oranı erkeklerde kadınlara kıyasla daha fazladır ve yaşla beraber risk artışı gözlenmektedir (14). Koroner kalp hastalığının altında yatan esas patoloji aterosklerozdur.

Ateroskleroz multipl formlardaki endotelial hasara verilen fokal, inflamatuvar ve fibro-proliferatif bir yanıt olarak tanımlanmaktadır (15). Endotelial fonksiyon bozukluğu lipit ve inflamatuvar hücrelerin damar duvarını geçmesine yol açan risk faktörleriyle başlatılır. Artere girdikten sonra, monositler makrofajlara diferansiye olurlar ve lipitleri fagosite ederek köpük hücrelerine dönüşürler (16, 17). Bunun sonucunda aterosklerozun başlangıcında görülen “yağlı çizgilenme” lezyonları oluşmaktadır. Yağlı çizgilenmeler intimada köpük hücre makrofajlarının fokal birikiminden kaynaklanmaktadır. Lezyon süreci nekrotik kor ve fibröz kep oluşumuyla ilerler (16,18). Köpük hücre makrofajları ölmeye ve içeriklerini dış ortama salmaya başladıklarında nekrotik kor oluşumuna katkı sağlamaktadırlar. Bu yayılan sitoplazmik içerikler inflamasyona yol açan ekstraselüler lipit ve büyüme faktörlerinin akümülyasyonuna sebep olmaktadır. Vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyon ve migrasyonu ise fibröz kep oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Vasküler düz kas hücreleri bu süreçte intimaya göç ederek ekstraselüler matriks biriktirirler. Hücre sayısındaki ve matriks miktarındaki artış biriken plağın damar lümenini işgal etmesine yol açar ve sonuçta stabil gelişkin plak oluşumu gözlenir. Bu plaklarda küçük bir nekrotik kor ve kalın bir fibröz kep bulunmaktadır. Stabil olmayan plaklarda ise yüksek inflamatuvar hücre içeriğine sahip gelişmiş bir nekrotik kor ve ince bir fibröz kep bulunmaktadır (19). Stabil olmayan plaklar bozunmaya daha meyilli oldukları için trombus oluşumuna yol açmaları daha muhtemeldir. Trombus oluşumu ise lümeninde bir oklüzyona yol açabilir ve miyokard infarktüsü (MI) veya inme semptomlarına sebep olabilir.

2.2.1. Düz Kas Hücre Migrasyonu ve Proliferasyonunun Aterosklerozla İlişkisi

Kan damarlarında düz kas hücreleri sessiz profile sahiptirler ve lümen çapını kontrol edebilmek ve bu yolla nöral, hormonal veya lokal faktörlerde kan akışını

düzenleyebilmek için yüksek seviyede kontraktil hücre olarak özelleşmişlerdir. Bu hücreler kültüre edildiklerinde veya damar hasarı sonucunda aktive edildikleri zaman kontraktil/diferansiye fazdan proliferen olan/sentetik faza geçiş yaparlar ve sayısız büyüme düzenleyici molekül ekspresiyonuna başlarlar. Bu süreç fenotipik modülasyon olarak adlandırılır (20, 21).

Düz kas hücreleri aterosklerotik plak oluşumunun tüm evrelerine katılırlar. Erken dönem lezyonlarında, endotelial fonksiyon bozukluğu ve intimal lipit akümüasyonu inflamasyonu tetikleyerek lökositlerin bu bölgeye göçünü artırır (22, 23). Makrofajlar ve köpük hücrelerinden salgılanan sitokinler ve platelet kökenli büyüme faktörü beta (PDGF- β) gibi büyüme faktörleri, düz kas hücrelerinin dediferansiyasyonuna yani fenotipik modülasyonlarına sebep olarak bu hücrelerin mediadan intimaya göç etmesine yol açarlar. Bunun yanı sıra proteaz aracılı ekstraselüler matriks degradasyonu vasküler düz kas hücrelerinin göçüne olanak tanımaktadır (24). İntimada düz kas hücreleri çoğalarak, ekstraselüler matriks (ECM) sentezleyerek, lipitleri ve lipoproteinleri fagosite ederek ve inflamatuvar sitokinleri salgılayarak ateroskleroz yayılımı ve kompleksitesine katkı sağlarlar. Bu lezyon yayılımı stenozise sebep olabilir. Ayrıca, mediadan göç eden düz kas hücrelerinin yanı sıra insanlarda intimada halihazırda bulunan düz kas hücreleri tanımlanmıştır ve bu hücrelerin çevresel etmenlerle fenotipik modülasyona uğradıkları ve ateroskleroz oluşumuna katkı sağladıkları bilinmektedir (25).

Plak stabilitesi aterosklerotik süreçlerde en kritik problemdir. Stabil olmayan bir plak bozulursa trombozise başlayabilir ve bu da vasküler oklüzyona ve doku infarktüsüne yol açabilir. Düz kas hücreleri ECM salgılayarak plak üzerine fibröz bir kepek tabakası ve plak stabilitesini mekanik olarak destekler. Düz kas hücrelerini de içeren bu fibröz kepek lezyon ile damar lümeni arasında koruyucu bir tabaka olarak işlev görür. Fibröz kepek oluşumunun degranüle plateletler, endotelial hücreler, makrofajlar, köpük hücreleri ve vasküler düz kas hücrelerinden salgılanan, PDGF, fibroblastik büyüme faktörü (FGF-2) ve dönüştürücü büyüme faktörü β (TGF- β) gibi büyüme faktörleri ve sitokinlerle stimüle edildiği düşünülmektedir. İntimada vasküler düz kas hücreleri çoğalarak ve ekstraselüler matriks üreterek aterosklerotik plakların fibröz kepekini (skleroz) oluştururlar (26).

2.2.2. Düz Kas Hücre Ölümü

Düz kas hücre ölümü ve sağ kalımı arasındaki denge aterosklerotik plak oluşumu ve stabilitesinde önem taşır. Bazal seviyelerde otofaji, hasar görmüş hücresel komponentlerin geri dönüşümünü sağladığı için ateromların stabilizasyonunda fonksiyon görüyor olabilir. Aterosklerotik plaklarda düz kas hücre apoptozu ve nekrozu tanımlanmasına rağmen bu süreçlerin potansiyel yararlı veya zararlı rolleri tam olarak anlaşılammıştır. Erken lezyonlarda programlı hücre ölümü hücresel atıkların etkili bir şekilde temizlenmesini desteklemektedir. Öte yandan stabil olmayan plaklarda stabil plaklara ya da normal damarlara kıyasla yüksek hücre apoptozu plak oluşumunu indüklemektedir (26).

Güncel çalışmalar aterosklerotik lezyonlarda apoptotik düz kas hücrelerinin varlığını göstermiştir. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, DNA fragmantasyonu, nükleus morfolojisinde değişimler ve sitozolik makromolekül sızıntısı olmadan, hücrenin fragmente olmasıyla sonuçlanan intrinsik hücresel mekanizmalar tarafından kontrol edilmektedir. Bu açıdan hücresel şişme, plazma membranında hasar ve hücre lizisi yoluyla hücresel komponentlerin sızması ile karakterize nekrozdaki farklı bir hücre ölümü yolağıdır (27). Diğer hücreler gibi düz kas hücreleri de ekzojen veya endojen yollara bağımlı, ölüm reseptörleri içeren (Fas, TNF-R) veya mitokondriyal (sitokrom c salınımı) stres durumuna apoptoz ile yanıt verir. Ayrıca düz kas hücrelerinde mekanik strese bağılı apoptozun p38 yolağıyla gerçekleştiği ve bunun sonucunda kan akışında değişikliklerin gözlemlendiği gösterilmiştir. Dahası, apoptotik düz kas hücreleri plazma membranlarının dış katmanında bulunan ve trombin oluşumunu destekleyen fosfatidilserinlerin translokasyonu yoluyla plak trombojenitesini artırırlar (28). Dediferansiye olmuş düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel analizleri bu hücrelerde bol miktarda endoplazma retikulumu ve Golgi varlığını göstermektedir. Endoplazma retikulumu, normalde salgılanan proteinlerin düzgün katlanmasından sorumlu olduğu için bu hücrelerde artan protein ihtiyacı belki de daha fazla proteinin hatalı katlanması sonucu meydana gelebilecek endoplazma retikulumu stresini açıklayabilir. Özellikle gelişmiş aterosklerotik plaklarda yüksek miktarda gözlenen endoplazma retikulumu stresi son derece önemli bir düz kas hücre apoptozu nedenidir (29). Her ne kadar teorik olarak restenotik ve primer aterosklerotik plakların baskılanmasında ideal bir yol gibi görünsede

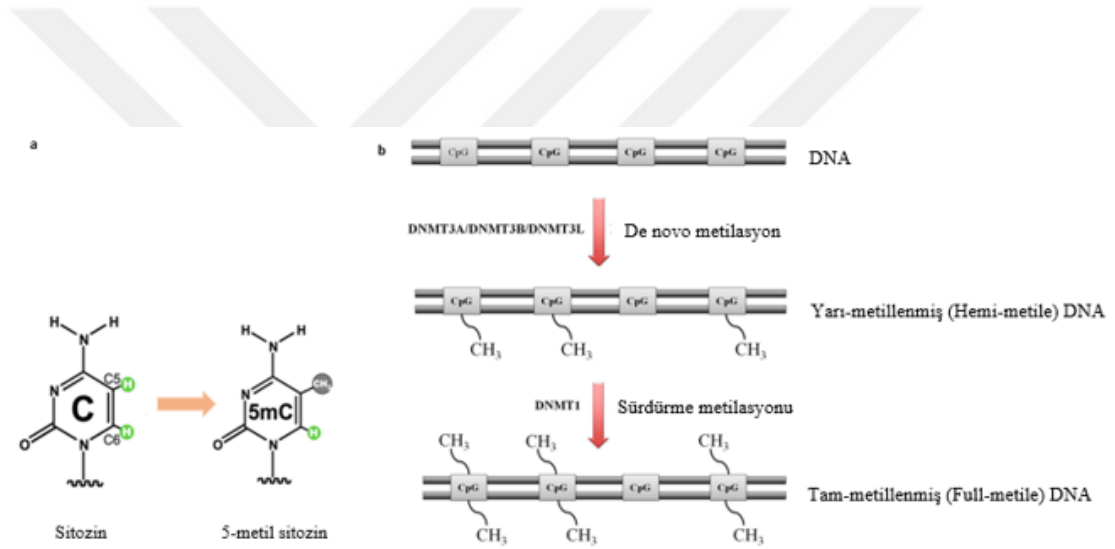
(30, 31), düz kas hücrelerinde apoptozun plak stabilitesi üzerindeki olası negatif etkileri sebebiyle yararlı ya da zararlı olup olmadığı halen tartışılmaktadır.

2.3. Epigenetik

Epigenetik, çeşitli genomik fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynayan DNA ve kromatin modifikasyonlarıdır. Multisellüler organizmaların farklı hücrel fenotipleri, housekeeping ve hücre-spesifik genlerin ekspresyonuyla ve uygun olmayan genlerin baskılanmasıyla gelişir. Hücre tipini tasarlayan gen ekspresyonu epigenotip olarak adlandırılır ve genetik koddan bağımsız olarak gen ekspresyonunu düzenleyebilen epigenetik mekanizmalar tarafından oluşturulur ve sürdürülür. Genomik imprintingde genler kalıtsal parental allelerin bir tanesinden kaynaklanır ve epigenetik gen düzenlenmesine tipik bir örnek teşkil etmektedir. Tek bir organizma baz alındığında hemen hemen tüm hücrelerdeki (gametler hariç) genotipler aynı olmasına rağmen hücrel fenotipler ve fonksiyonlar farklılık göstermektedir ve bu durum hücre diferansiyasyonu ve embriyonik morfogenez sırasında meydana gelen diferansiyel epigenetik düzenlemelerle açıklanabilir (31, 32).

DNA metilasyonu promotör bölgesindeki sitozin bazlarının 5' karbonuna bir metil grubu eklenmesiyle (5-metilsitozin) transkripsiyonun baskılanmasına yol açar (Şekil 2.1). *De novo* metilasyon yani değiştirilmemiş DNA'ya bir metil grubu eklenmesi epigenetik bir değişimdir çünkü DNA'da bir mutasyon olmadan gerçekleşen kimyasal bir modifikasyonu içerir (33, 34). Mutasyonlara kıyasla metilasyon değişimleri geri dönüştürülebilir. Epigenetik düzenlemeler ayrıca DNA-ilişkili moleküllerde de gözlenmektedir. Bunlar histon modifikasyonlarını, kromatinin yeniden şekillenmesini ve miRNA ve siRNA'ları içeren küçük kodlanmayan RNA'ları kapsamaktadır. Bu değişimler parental kökenli gen ekspresyonlarında (genomik imprinting), X-kromozom inaktivasyonunda ve heterokromatin oluşumunda kilit rol oynarlar (35). Gen susturmaya yönelik DNA metilasyonu, insan genomuna DNA ve RNA virüslerinden gelen ya da host genomundan bağımsız replike olabilen mRNA ve tRNA moleküllerinden kaynaklı tekrarlayan sekansların kontrolü açısından son derece önemlidir (36).

DNA da sitozinlere metil grubu eklenmesi reaksiyonunun enzimi DNA metiltransferazlardır (DNMTler). Memelilerde üç ana DNMT bulunur ve bunlar; var olan metilasyon motifinin DNA replikasyonundan sonra korunmasını sağlayan DNMT1 ile *de novo* metiltransferazları olarak işlev gören DNMT3a ve DNMT3b dir. DNA replikasyonundan sonra tamamen metillenmiş DNA hemi-metile hale gelir ve DNMT1 sitozinin 5' karbonuna metil grubu eklemek üzere hemi-metile DNA ya bağlanır (36). Sonuç olarak DNA metilasyon değişiklikleri tüm dokularda gözlenir ancak doku spesifik metilasyon değişikliklerinin küçük bir miktarı hücre farklanması, hastalık ve kanser gibi durumlarda hücrel aktivitelere öncü etkiye sahiptir.



Şekil 2.1. DNA Metilasyonunun şematik sunumu. (a) DNA (sitozin-5)-metiltransferazları DNA'daki 5' uçta bulunan sitozin halkasının 5. Karbonuna bir metil grubu eklerler ve 5-metilsitozin oluşumuna sebep olurlar. (b) DNA metilasyonunun klasik modeli: Sürdürme ve *de novo* metilasyon.(Şekil Cheng ve Blumenthal (2008)'den uyarlanmıştır (37)).

2.3.1. Aterosklerozda Epigenetik Değişiklikler

2.3.1.1. DNA Metilasyonu ve Ateroskleroz

DNA metilasyonu kromozomal DNA yapısını koruyan ve gen ekspresyonunu düzenleyen, X-kromozom inaktivasyonunda, imprinting işleminde, gelişimsel olarak düzenlenmiş genlerde transposable genetik elementlerin mobilitesini ve aktivitesini

kontrol eden epigenetik bir mekanizmadır. İnsanlarda sağlıklı somatik hücrelerin tüm sitozinlerinin yaklaşık %1'i kadarı metillenmiş görünmektedir ancak dokular arasında bu oran değişkenlik gösterir. DNA metilasyon düzeneğinin bazı komponentleri histon metilasyon kompleksindeki enzimle ortaklık gösterirler (32-39). DNA metilasyon motifi, embryonik gelişim sırasında replikasyona uğradığı kabul edilen bir olaydır ve rodentlerde erken dönemde indüklenen DNA metilasyon değişimlerinin yavrulara aktarıldığı bilinmektedir (38). Ayrıca erken dönemdeki epigenetik yeniden programlamanın yetişkin dönemde farmakolojik terapi yoluyla geri döndürülebileceğine dair kanıtlar mevcuttur (39-41). DNA metilasyonunun yaşa bağlı değişiminin genetik olarak kontrol edildiği düşünülmektedir. Bjornsson ve arkadaşları zaman boyunca bazı bireylerin sitozin metilasyonu kazandığını veya kaybettiğini ve bireye özgü değişimlerin kalıtsal olabileceğini öne sürmüşlerdir (42). Damar duvarının hücresel kütlelerinin çoğunluğuna karşılık gelen düz kas hücrelerinde de epigenetik değişimler tespit edilmiştir. Düz kas hücre diferansiyasyonunun en erken belirteci olan Transgelin DNA metilasyonu ile düzenlenmektedir ve endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) endoteliumda hipometile halden düz kas hücrelerinde aşırı metillenmiş haldedir (43, 44). Aterosklerotik plak neointimasında eksprese edilen iNOS diğer dokularda metilasyon yoluyla baskılanmaktadır (45, 46). Endotelial hücrelerde görülmeyen, ancak çoğalan düz kas hücrelerinde hipermetile bulunan östrojen reseptör alfa promotörü de epigenetik düzenlemeye tabi tutulur (47). Koroner arter by-pass ameliyatına girmiş hastalardan ve koroner atektomi geçirmiş hastaların aterosklerotik plaklarından toplanan örneklerde DNA izolasyonu yapılmış ve tamamında östrojen reseptör alfa genlerinin metillendiği gösterilmiştir. Ayrıca ateromlarda da, normal aorta göre östrojen reseptörleri metilasyonunun ciddi bir artış gösterdiği bulunmuştur (48). Bu bulgular, kardiyovasküler hastalıklarda CpG adalarındaki metillenmenin önemini vurgulamaktadır. Ying ve arkadaşları (2000) bu metilasyonun düz kas hücreleriyle alakalı olup olmadığını araştırmışlardır ve östrojen reseptör alfa (ER- α) metilasyonunun düz kaslarda fenotipik tranzisyon sırasında artış gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar kontraktil fazdaki düz kas hücrelerinde ER- α ekspresyonu varken, proliferatif fazdaki düz kas hücrelerinde ER- α 'nın metillenme yoluyla susturulduğunu da göstermişlerdir (47). Yani fizyolojik şartlarda östrojenle aktivasyonundan sonra östrojen reseptörleri, hücre proliferasyonunun engellenmesi gibi pek çok hücresel aktiviteyi düzenlemektedir. Bu etkisiyle östrojen

reseptör aktivasyonu, hasara karşı çoğalmaya başlayan düz kas hücrelerinde de anti-proliferatif yönüyle vaskülo-protektif özellik kazanmış olabilir.

2.3.1.2. Hipermetilasyon ve Ateroskleroz

CpG adalarında hipermetilasyon, transkripsiyonel susturmanın karakteristiğidir. DNA metilasyonu yoluyla gen baskılanması, transkripsiyon faktörlerinin tanıma bölgelerindeki sitozinleri metilleme ya da promotör bölgeyi metil-sitozin tanıyan proteinlerden (MBD1, MBD2, MBD4, MeCP2, Kaiso) bir tanesi aracılığıyla kapatılarak sağlanır (49). Kanser dışındaki hastalıklarda hipermetilasyon yoluyla transkripsiyonel susturma/baskılama üzerine pek fazla çalışmaya rastlanmamaktadır. Aterosklerozun bu kadar komplike bir durum olması spesifik genlerde meydana gelen epigenetik düzenlemelerden kaynaklanıyor olabilir. Ateromatöz bölgelerde çoğalan düz kas hücrelerinde östrojen reseptör alfa promotör bölgesinde metilasyon oranının arttığı saptanmıştır (47, 48). Aynı zamanda plak olmayan bölgelere kıyasla plak bölgesindeki hücrelerde yüksek seviyede östrojen reseptör beta promotör metilasyonu gözlenmektedir (49). Çoğalan düz kas hücrelerinde östrojen reseptörlerinin aktif rolü *in vivo* ortamda henüz tam anlamıyla netleşmemiştir. Arteriyel düz kas hücrelerinde yaşa bağlı artan bir östrojen reseptör promotör metilasyonu saptanmıştır ancak yaş-ilişkili hipermetilasyon yalnızca östrojen reseptörlerinde değil immün-modülatör ve tümör baskılayıcı genlerde de gözlenen bir durum olduğu için ateroskleroz patogenezinde önemli etkilere sahip olabilir.

2.3.1.3. Hipometilasyon ve Ateroskleroz

DNA metilasyonu kaybı, replikasyon-bağımlı (pasif) ya da replikasyon-bağımsız (aktif) olabilir. Aterosklerozda hangi sürecin dominant olduğu bilinmemekle beraber neointimada düz kas hücrelerinin aktif bir şekilde replikasyona uğruyor olmaları pasif hipometilasyon fikrini üstün kılıyor gibi gözükmektedir. Yaşlanma ve ateroskleroz

genellikle eş zamanlı gerçekleştiği için hangisinin global hipometilasyona sebep olduğu bilinmemektedir. Genomik DNA hipometilasyonu yaşlanmanın bir karakteristiği olmasına karşın güncel çalışmalar popülasyonun yalnızca %20-30'unun hipometilasyon karakteristiğinde olduğunu göstermiştir (42, 50). Ayrıca tümör büyümesi ve şizofreni gibi bazı patolojik durumlarda da global hipometilasyon gözlenirken, özellikle gelişmiş aterosklerotik plaklarda düz kas hücre çoğalmasının olduğu bölgelerde normal arterlere kıyasla %9 oranında sitozin metilasyonunda azalma saptanmıştır (51). Apolipoprotein-E knockout farelerdeki aterosklerozlarda ve tavşan aortlarının neointimal kalınlaşmalarında benzer hipometilasyon motifleri gösterilmiştir (52). DNA da tekrarlayan sekansların hipometilasyonu DNA rekombinasyon olaylarıyla kromozomal instabilite veya mutageneze yol açabilen transposable elementlerin aktivasyonuna yol açabilir ancak aterosklerotik lezyonlarda DNMT1 mRNA'sının upregüle olduğu bulgusu bu durumla çelişmektedir.

2.4. Östradiol

Kardiyovasküler gelişim ile kardiyak ve vasküler fonksiyonlarda, yaşa bağlı gelişen miyokard infarktüsü sebebiyle ölüm oranlarında, kalp yetmezliği ve aritminin klinik tablosunda cinsiyete bağlı majör farklılıklar bulunmuştur (53). Bu farklılıkların seks steroid hormon seviyeleri ve bu hormonların reseptörlerinin fonksiyonlarındaki farklılıklarla ilişkili olduğu öne sürülmüştür ve kadınlarda seks hormonlarındaki değişimlerle alakalı klinik sendromların kardiyovasküler komplikasyonların sayısındaki artışla bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Genç kadınlarda gözlenen polikistik over sendromu artan ateroskleroz riskiyle ilgilidir. Kadınlarda menopozla beraber kardiyovasküler olayların sayısında ciddi bir artış gözlenirken erkeklerde östrojen reseptör ekspresyonunda azalma ya da endojen östrojen oluşumundaki eksiklik miyokard infarktüsüyle ilişkilendirilmektedir (54). Östrojen ve androjenlerin hücre fonksiyonlarıyla çeşitli etkileşimleri, kardiyovasküler sistemde patofizyolojik uyarılara verdikleri yanıtı etkileyebilir.

2.4.1. Sentezi ve Metabolizması

17 β -östradiol steroid hormonlar sınıfına ait, doğal yollarla sentezlenen ve biyolojik olarak aktif östrojen formudur. Esas olarak gelişmekte olan ovaryan foliküllerinin granüloza hücreleri ve teka internadan sentezlendiği gibi korpus luteum ya da plasentadan da sentezlenmektedir. Östradiol androstenedion gibi androjenlerden köken alarak iki mekanizma ile sentezlenir. Androstenedion aromataz enzimiyle östrona ve östron 17- β -hidroksisteroid dehidrojenaz ile östradiole dönüştürülür. Bunun haricinde 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz direkt olarak androstenedionu testosterona ve testosteron aromataz enzimiyle östradiole dönüştürülür (55).

Klasik steroidojenik dokular haricinde aromataz ve 17 β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimleri vasküler hücreler de dahil pek çok farklı dokuda bulunmaktadır. Sentezlendikten sonra dolaşımda serbest ya da albümine bağlı veya seks hormon globülin-bağlı halde bulunur. Yetişkin kadınlarda serum östrojen seviyeleri foliküler fazda 40-60 pg/ml iken midsiklusta 200-400 pg/ml civarındadır. Gebelikte 7100 pg/ml' ye ulaşabilen östradiol seviyeleri menopoza beraber 5-20 pg/ml' ye düşer (56). Dolaşımdaki seviyeleri düşük olsa bile hedef hücrelerdeki etkili konsantrasyonları göz ardı etmemek gerekir. Vasküler dokuda örneğin, östradiol dokuya ait bazı hücreler tarafından sentezlenebildiği gibi ekzojen kaynaklardan da etkilenmektedir.

Östradiol esas olarak karaciğerde metabolize edilmesine rağmen, vasküler doku, gastrointestinal sistem (GİS), dalak, beyin ve pankreas gibi dokularda da östradiol metabolizmasında işlev gören enzimler bulunmaktadır.

2.4.2. Biyolojik Etkileri

Östrojenler overden köken alan endojen hormonlardır. Pek çok farklı östrojen olmasına rağmen (östriol, östron ve östradiol), fonksiyonel olarak en önemli formu 17 β -östradioldür.

Östrojenler dişi üreme sisteminin büyüme ve gelişmesinde önemli bir role sahiptirler. Sekonder cinsiyet karakteristiklerinin farklanmasında, fertilizasyon sürecinde, gebeliğin sürdürülmesinde ve menstrüel siklusun düzenlenmesinde görev alırlar. Bu

klasik fonksiyonlarının dışında östrojenlerin diğer pek çok dokunun biyolojisinin ve fizyolojisinin düzenlenmesinde önemli bir rolü olduğuna dair giderek artan deliller bulunmaktadır. Örneğin, karaciğerde kolesterol metabolizmasının düzenlenmesi, kemiklerde osteoporozisin engellenmesinde işlev görür ve beyinde çeşitli nöroprotektif etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Östrojenler cildin yaşlanmasını kısmen baskımlarken, kolon kanseri riskini azaltır. Ayrıca son birkaç yılda kardiyovasküler sistemin östrojenler için önemli bir hedef sistem olduğu anlaşılmıştır. Öte yandan zararlı etkileri arasında uterus ve meme dokusundaki karsinojenik etkileri indüklemesi bulunur (55). Her ne kadar dişi hormonları olarak bilirse de erkeklerde de üreme sistemini ve fertilitiyi etkilemektedirler (57).

2.4.3. Reseptörleri-Yapı ve Fonksiyonları

Steroid hormonların ve türevlerinin biyolojik etkileri intraselüler reseptörleriyle düzenlenir. Steroid hormon reseptörleri sınıf 1 nükleer reseptör süperailisine aittir. Bu ailede östradiol için ER- α ve β bulunur (58). Steroid reseptörleri hedef genlerdeki hormon response element adı verilen spesifik DNA sekanslarının homo veya heterodimerlerine bağlanarak transkripsiyonu düzenlerler (59).

2.4.3.1. Reseptör-Ligand Etki Mekanizmaları

Reseptör-ligand etki mekanizmalarında çeşitli yollar işlev görmektedir. Bunlardan birincisi klasik yolak olarak adlandırılırken diğeri reseptör bağımlı (non genomik) yollar olarak bilinir. Klasik yolda östradiol eylemleri transkripsiyon faktörleri olarak östrojen reseptörlerinin aktivasyonunu içerir. Hem nükleus hem de sitozolde bulunan östrojen reseptörleri, onları stabilize eden ve reseptör DNA bağlanma bölgelerini maskeleyen ısı şok proteinleriyle ilişki içerisindedirler. Serbest östrojen hücreye difüzyonla girerek reseptörlerine bağlanır ve konformasyonel değişikliğe uğrar. Bunun sonucunda östrojen reseptörleri ısı şok proteinlerinden ayrılır ve homo veya

heterodimerizasyona uğrarlar. Daha sonra östrojen-reseptör kompleksi difüzyonla nükleusa geçer ve burada hedef genlerin düzenleyici bölgelerindeki östrojen responsiv element adı verilen spesifik DNA sekanslarına bağlanır. DNA'ya ek olarak östrojen-reseptör kompleksi çeşitli ko-aktivatör veya ko-repressörlerle iletişime geçer. Bu yolla hedef gen ekspresyonunun arttırılması veya baskılanması düzenlenmektedir (60).

Non-genomik yolak ise, östrojen reseptör-bağımlı, gen transkripsiyonu içermeyen östradiol eylemleri olarak bilinmektedir. Bazı östrojen-kaynaklı yanıtlar, stimülasyondan sonraki birkaç saniye veya dakikada meydana geldiği için saatler ya da günler gerektiren transkripsiyonel mekanizmalarla açıklanması mümkün değildir. Östrojen reseptörleri endotel hücrelerinin kaveola adı verilen plazma membranı invajinasyonlarında tanımlanmıştır. Bu nedenle nükleer reseptör ailesine üye olmakla birlikte sitoplazmada da ekspresyonuna rastlanabilir. Östrojen reseptörleri muhtemelen kaveolanın intraselüler yüzeyini kaplayan sayısız proteinlerle ilişki halinde fonksiyon görürler (61).

Membran östrojen reseptörlerini intraselüler formlardan ayıran farklılıklar belirgin değildir. Razandi ve arkadaşları Chinese hamster over hücrelerini ER- α ve ER- β 'nın intraselüler formlarını kodlayan genleri taşıyan bir vektörle transfekte etmişlerdir ve bu reseptörleri membranda ortaya çıkarmışlardır (61).

2.4.4. Östradiol ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Kardiyovasküler hastalıklar (KVH) dünya üzerinde ölüme yol açan temel sebeplerden bir tanesidir (13,14). Vasküler patogeneze katkı yapan süreç esas olarak aterosklerozdur. Aterosklerozun temel tetikleyicisi vasküler endotelyum hasarıdır. Hasarlı endotel hücreler monositler için kemo-atraktan olarak rol oynayan sitokinlerin ekspresyonuna başlar. Ayrıca hasarlı hücreler monositlerin bağlanabileceği adezyon moleküllerini de eksprese ederler. Dolaşımdan sub-endotelial aralığa göç eden monositler burada makrofajlara diferansiye olarak düşük dansiteli lipoprotein (LDL) sindirimine başlarlar ve bu durum köpük hücreleri oluşumuyla sonuçlanır. Plateletler de lezyon bölgesine girerek PDGF- β ve TGF- β gibi büyüme faktörlerini salgırlar. Köpük ve endotel hücrelerinden salınan mitojenik faktörlerle birlikte bu büyüme faktörleri, düz

kas hücrelerini proliferere olma, göç etme ve kollajenden zengin bağ doku matriksi salgılamak üzere aktive ederler. Tüm bu süreçler neointima oluşumu ve damar duvarında kalınlaşma ile sonuçlanır. Vasküler hasara ek olarak düz kas hücreleri sebebiyle oluşan intimal kalınlaşma, ateroskleroz oluşumuna öncü olmasının yanı sıra normal damar yaşlanması sürecinde de gözlenmektedir (16-19).

Epidemiyolojik çalışmalar erkeklere kıyasla pre-menopozal dönemdeki kadınların koroner kalp hastalıkları insidansının daha düşük olduğunu göstermektedir. Menopoz başlangıcında overlerde fonksiyon bozukluğu ve dolayısıyla 17- β östradiol sentezindeki azalma KVH insidansında artışa eşlik etmektedir (62). Östrojen yoksunluğu ve vasküler patoloji arasındaki ilişki hormon replasman terapisi alan post-menopozal kadınlarda koroner hastalık riskindeki azalma ile desteklenmektedir. Dolayısıyla östradiolün vasküler koruyucu etkilerinin altında yatan mekanizmaların belirgin bir şekilde anlaşılması, hem erkeklerde hem de kadınlarda kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde yeni teröpatik ajanların geliştirilebilmesine olanak sağlayacaktır.

2.4.4.1. Aterosklerotik Hastalıklarda Östradiolün Rolü

Kardiyovasküler organlar da dahil pek çok dokuda farklı ekspresyon seviyelerinde östrojen reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Kalp ve damarlardaki lokalizasyonuna bakıldığında, insanlarda ve rodentlerde, vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde, kardiyak fibroblastlar ve miyositlerde östrojen reseptörleri tanımlanmıştır (63). Dişi ve erkek sıçanların kardiyak miyositlerinde östrojen reseptörleri nükleer bir yerleşim göstermektedir ve östradiol varlığında hem α hem de β reseptör ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir (64). Östradiol kalp yetmezliğinde protein kinaz B/Akt yolağını aktive ederek kardiyak miyositlerdeki apoptozu önlemeye ve iyileştirmeye yardım eder (65). Bu anti-apoptotik etkileri kültüre miyositlerde ve farelerde yapılan koroner oklüzyon modeli çalışmalarıyla da desteklenmektedir (66). Ayrıca, endotel hücrelerinde NO sentaz aktivasyonunu tetikleyerek vazodilatasyona yol açarken kardiyak fibroblastlarda TNF- α üretimini engelleyerek hasarlı miyokarda ICAM-1 aracılı lökosit bağlanmasını önler

(67). Östrojenler vasküler düz kas hücrelerinde guanozin monofosfat bağımlı mekanizma ile spesifik kalsiyum kanallarının açılmasına ve bu yolla kas tonüsünde azalmaya yol açar (68). Ayrıca düz kas hücre proliferasyonunu azaltıcı fonksiyonuyla bilinir. Tüm bunlar östrojenin kardiyovasküler koruyuculuğunu göstermektedir.

Spontan ateroskleroza yol açan Apo-E yoksunluğu çeken hayvan modeli çalışmasında, 17 β -östradiol uygulaması sonrasında vasküler inflamasyonun ciddi bir şekilde engellendiği, aortik anevrizma oluşumunun azaldığı gözlenmiştir (69). Benzer etkiler streptozotosin indüklenmiş hiperglisemi sonrası ateroskleroz oluşumu gözlenen hayvan modellerinde de gösterilmiştir (70). Dahası, östrojenin vasküler inflamasyon ve ateroskleroz ilişkili ICAM-1, VCAM-1 ve E-selektin gibi pro-inflamatuar genleri indükleyen NF- κ B aracılı yolağı inhibe ettiği bulunmuştur (69, 71). Aterosklerotik hastalıklarda hormon replasmanı hastalığın evresine bağlıdır. Erken dönemde östrojen vazodilatasyon ve anti-inflamatuar süreçlerde faydalı olmasına rağmen proliferen vasküler düz kas hücrelerinin bulunduğu geç evrede yani aterosklerotik plak zaten oluştuğunda östrojen vazodilatasyonu engelleyip pro-inflamatuar davranmaya başlar ve neovaskülarizasyon upregülasyonu yoluyla plak stabilitesini azaltır (72).

Östradiolün kalpteki doğrudan etkileri, renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) komponentleri, bradikinin ve endotelin gibi dolaşımdaki ya da lokal faktörlerin değişimiyle artırılabilir. Östradiol serumdaki ve damarlardaki anjiyotensin dönüştürücü enzim ekspresyonunu azaltarak renin ve aniyotensin 2 oluşumunu etkiler (73). Anjiyotensin 2 vasküler düz kas hücrelerinin mitojeni olarak fonksiyon görmesinin yanı sıra hipertansiyonda vasküler yeniden şekillenmeyi etkilediği için östradiol RAS inhibisyonu yoluyla vasküler büyümenin azalmasına yol açıyor olabilir (74).

Hormon replasman tedavisinin koruyucu etkinliğinin yanı sıra farklı yöntemler kullanılarak oluşturulan pek çok farklı hayvan modelinde 17 β -östradiolün patolojik vasküler yeniden şekillenme sürecini önlediği gösterilmiştir. Östradiol vazo-protektif etkilerini, farklı hücre tiplerinin, çeşitli büyüme faktörlerinin ve biyokimyasal/moleküler mekanizmaların dahil olduğu farklı yolaklarca düzenlenerek göstermektedir. Öncelikle östradiol, nitrik oksit (NO) sentezi ve salınımını stimüle ederek vazodilatasyonu uyarır. NO sentezini genomik düzeyde NO sentaz enzim ekspresyonunu indükleyerek artırır. Ayrıca non-genomik yolla membran reseptörleri aracılığıyla da NO salınımını stimüle

edebilmektedir. Östradiolün NO sentezi üzerindeki etkilerini ER α aracılığıyla gösterdiğine dair bulgular mevcuttur. 17 β -östradiolün vazodilatör etkilerini düzenleyen diğer mekanizmalar arasında K⁺ kanal proteinleri ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimi aktivasyonu da yer almaktadır. Aynı zamanda anjiyotensin 2, endotelin 1 gibi vazokonstriktörlerin sentezini de negatif yönde etkilediği bilinmektedir (75, 76).

Vasküler patolojiden sorumlu esas süreç anormal düz kas hücre aktivitesidir ve östradiol düz kas hücre büyümesini inhibe eder. Normal şartlarda, endotelium bu hücrelerin büyümesinde inhibitör etkiye sahiptir. Endotelin hasarlanması ve immün reaksiyonlar düz kas hücre proliferasyonu, göçü ve ekstraselüler matriks senteziyle sonuçlanırken, östradiolün bütün bu büyüme süreçlerini inhibe ettiği gösterilmiştir. Kardiyoprotektif rolünü hasar sonrası fonksiyonel endotelial iyileşmeyi, vasküler endotelial büyüme faktörü stimülasyonu sonucu endotelial hücre proliferasyonunu arttırarak ve aterosklerotik yüzey oluşumunu engelleyerek üstlenir. Diğer bir deyişle, östradiol anti-oksidan olarak görev yapmaktadır ve damarları hücre hasarı bölgesindeki serbest radikallerden ve salınan sitokinlerin yanıtından korumaktadır. Ortamda bulunan serbest radikaller apoptozu ve hücre hasarını indükler. Bunun sonucunda adezyon moleküllerinin ekspresyonu azalır ve hasarlı bölgeye lökosit, makrofaj ve monosit girişi hızlandırılır. Subendotelial alana makrofaj girişinin engellenmesi ve büyüme faktörlerinin oluşturulması ile vasküler yeniden şekillenmeye yol açar; arteriyoskleroziste kullanılan allograft transplantların indüklediği majör histokompatibilite kompleks sınıf 2 antijen ekspresyonunu engeller; düz kas hücreleri için mitojenik olan ve endotelial hücrelerde hasara yol açan faktörlerin (anjiyotensin 2, homosistein, vb.) sentezini düzenler. Ayrıca lösemi inhibitör faktörü ekspresyonunu arttırarak hasar-kaynaklı neointima oluşumunu engeller (77, 78).

Östrojen reseptörleri östradiolün damar koruyucu etkilerinin bir kısmının modülasyonunda rol oynar. Örneğin NO sentezi, cAMP üretimi ve adezyon moleküllerinin ifade ediliminin düzenlenmesi gibi birtakım östradiol etkileri reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir (79).

2.5. Vitamin D

2.5.1. Sentezi ve Görevleri

Vitamin D kalsiyum ve fosfor homeostazı ve sağlıklı bir iskeletin sürdürülebilmesi için önemli bir hormondur (80). Dışarıdan besin yoluyla ya da endojen yollarla sentezlenerek elde edilen vitamin D, adipöz dokuda saklanır ve dolaşımında alfa2-globülin D-bağlayıcı proteine bağlı olarak bulunur. Esas olarak iki formu vardır. Bunlardan bir tanesi ergokalsiferoldür (vitamin D2), diğeri ise kolekalsiferoldür (vitamin D3). Bu ikinci form deride güneş ışığı kaynaklı ultraviyole radyasyonu ile oluşur. Her iki form da biyolojik aktiviteye sahip değildir ve iki basamakta metabolize edilmelidir. İlk basamakta kolekalsiferol karaciğerde 25-hidroksikolekalsiferole hidroksillenir. İkinci aşamada böbrekte ileri hidroksillenme yoluyla 1,25-Dihidroksikolekalsiferol yani vitamin D nin biyolojik olarak aktif formu oluşturulur. 1,25-Dihidroksi vitamin D3 dolaşımında plazma vitamin D-bağlayıcı proteine bağlı olarak bulunur ve farklı dokularda vitamin D reseptörleri aracılığıyla endokrin fonksiyonlarını gerçekleştirir. Sayısız işlevlerinin arasında kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenleyerek ve bu iyonların kandaki seviyelerini arttırarak kemik mineralizasyonunu kolaylaştırmak primer sayılmaktadır. Bunun yanı sıra güncel araştırmalar vitamin D nin, reseptörleri aracılığıyla farklı hücre tiplerini etkilediğini göstermiştir. Vitamin D nin aktif formu intrasellüler reseptörlerine tutunarak gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir (81-83).

2.5.2. Vitamin D ve Kardiyovasküler Hastalıklar

Vitamin D eksikliği ya da yetersizliği kardiyovasküler hastalıkların (KVH) gelişmesinde risk faktörü olarak bilinmektedir ancak bu durumun moleküler temeli tam olarak anlaşılamamıştır (84). Aslında kardiyovasküler hastalıklarla osteoporoz yani kemik kalsiyumunda azalma ve kemik fragilitesinde artma arasında bir bağlantı olduğu görüşü giderek artmaktadır (85). Osteoporozlu kadınlar arter duvarlarında daha fazla kalsiyum biriktirirler ve genel olarak koroner arter kalsifikasyonu artışı aterosklerotik plak formasyonu riskini de arttırmaktadır (86, 87). Benzer şekilde Watson ve arkadaşları 173 denekte serum 1,25 Dihidroksi vitamin D3 seviyeleri ve koroner kalsifikasyon

arasında zıt korelasyon bulmuşlardır (88). Kısaca kemik kalsiyumunun azalması aterosklerotik plaklarda kalsiyum artışı ile ilişkilendirilir ve vitamin D veya metabolitleri bu süreçte önemli bir role sahiptirler.

2.5.2.1. Vitamin D ve KVH Patogenezindeki Rolü

Kardiyovasküler hastalıklarla vitamin D arasındaki olası ilişkiyi gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Epidemiyolojik çalışmalar yüksek vitamin D alımının KVH patogenezine ilişkili olduğunu göstermektedir. Linden ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, miyokard infarktüsü olan hastalarda vitamin D'nin fazla alımının miyokard infarktüsü olasılığını yükselttiği bildirilmiştir. Ayrıca doğal yollarla vitamin D alımındaki artışın hiperkolesterolemi riskini arttırdığını da göstermişlerdir. Bunun sonucunda, vitamin D ilişkili hiperkolesterolemik etkilerin koroner hastalıkların altında yatan mekanizma olabileceğini öne sürmüşlerdir (89). Davies, kalp transplantasyonlarında koroner arterlerde görülen ateroskleroz sürecini incelemiştir (90). Hasar sonrası koroner arteriyel intimada lipitlerin görülmesinden önce bazı değişiklikler meydana gelmektedir. İlk aşama intimal hiperplazi ve internal elastik laminanın bozulmasıdır. Sonra medial düz kas hücreleri intimaya doğru göç ederler. Lipid istilası daha sonra meydana gelir. Transplant arteriyopatideki lezyon morfolojik olarak normal ateroskleroza benzer. Erken intimal ve medial değişiklikler, immün aracılı gerçekleşiyor olabilir. Davies, aterosklerotik hastalıklarda lipit akınından önceki aşamaya odaklanmak gerektiğini düşünmüştür. Ayrıca vitamin D gibi mitojenlerin, hücrel proliferasyon mekanizmalarını bozucu reaksiyonları katalizliyor olabileceğini de ileri sürmüştür (90). Onun aksine Schmidt ve arkadaşları (1977) çalışmalarında miyokard infarktüsü geçirmiş hastaların serum 1,25-(OH)₂D₃ seviyelerinin kontrole göre farklı olmadığını göstermişlerdir (91). Scragg ve arkadaşları ise, plazma 25-(OH)₂D₃ ile miyokard infarktüsü arasında zıt bir korelasyon bulmuşlardır (92). Tüm bu bilgiler de göstermektedir ki, literatürdeki sonuçlar birbiriyle çelişmekte ve tartışmalı bir durum halen devam etmektedir. Bu konuda daha fazla çalışmaya gereksinim olduğu açıktır.

2.5.2.2. Vitamin D ve Ateroskleroz

Ateroskleroz inflamatuvar hücreler, sitokinler ve kemokinlerin rol oynadığı inflamatuvar vasküler bir bozukluktur. T hücreleri bu süreçte önemli rol oynarken vitamin D nin T hücre fonksiyonuna etkisi, bu vitaminin kalp hastalıklarıyla ilişkisine dair bir yolakta etkili olduğunu göstermektedir (93). 1,25-Dihidroksi vitamin D3, Th1 ve Th2 hücre diferansiyasyonunu engellediği gibi interlökin 2, interlökin1, interferon gamma ve tümör nekroz faktör-alfa üretiminin de önüne geçer. Bu sayede inflamatuvar sitokin seviyesi serum 1,25-Dihidroksi vitamin D3 seviyesindeki artışa bağlı olarak azalır ve aterosklerozdaki aterom oluşumunu iyileştirici etki sağlar (94, 95). Bir başka çalışmada ise iskemik kalp hastalığı olan Güney Hindistan'lı hastalarda serum 25-Dihidroksi vitamin D artışı saptanmış ve patojenik rolüne değinilmiştir (96). Bu zıt görüşler vitamin D nin aterosklerozda önleyici veya tetikleyici rolünün net olmadığını ve muhtemel etkilerinin doz-bağımlı veya yaş-ilişkili olduğunu düşündürmektedir.

Vitamin D nin en aktif formu olan 1,25-Dihidroksi vitamin D3, kemik kalsifikasyonu ve aterosklerotik kalsifikasyonun potansiyel düzenleyicilerinden bir tanesidir.

Vitamin D, 7-dehidrokolesterolün deride ultraviyole aktivasyonu ile oluşur ve bu sebeple okside kolesterolün vitamin D'nin moleküler hareketlerini taklit ediyor olabileceği düşünülmektedir. Diyetle alınan vitamin D'nin sirkülasyonda lipoproteinlere bağlı taşındığı da bilinmektedir. Bu yüzden arter duvarına lipoproteinlerin girişi mineralizasyon faktörü olan vitamin D'nin girişini ve akümüasyonunu kolaylaştırıyor olabilir. En aktif vitamin D metaboliti olan kalsitriol yağda çözünürlüğü ve düşük moleküler ağırlığı sayesinde hücre membranını rahatlıkla geçebilir ve hücre içerisindeki reseptörlerine bağlanabilir. Reseptör-sterol kompleksleri daha sonra nükleusa taşınarak DNA ile etkileşime geçer ve genin transkripsiyonel aktivitesini değiştirir (97). Klasik hedef dokularında 1,25-(OH)₂D₃'ün reseptörüne bağlanarak nükleer asosiyasyonu yeni mRNA ürünlerinin transkripsiyonuyla sonuçlanır (89-91). Oluşan proteinler genellikle bir ya da daha fazla kalsiyum bağlayan proteinlerdir (87, 88, 92). 1,25-(OH)₂D₃ reseptörleri arteriyel duvar dahil pek çok farklı dokuda tanımlanmıştır (94). Merke ve arkadaşları kültüre aortik endotel hücrelerinde vitamin D reseptörlerinin varlığını göstermişlerdir (99). Ateroskleroz patogenezinde kilit olay endotelial hasardır ve bu

yüzden 1,25-(OH)₂D₃ ün yeniden endotel oluşumuna negatif ya da pozitif etkilerinin anlaşılması aterosklerotik plak oluşum sürecinin çözümlenmesine fayda sağlar.

Vitamin D arteriyotoksitesisi yıllardır bilinen bir olaydır ve ateroskleroza yol açan sebeplerden biri olduğunu gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur. Hayvanlara oral yolla ya da intravenöz injeksiyon yoluyla vitamin D metabolitleri verilerek yapılan çok sayıda araştırmada kardiyovasküler sistemde gözle görülür patolojik değişimler rapor edilmiştir. Donath ve De Langen, tavşanlarda vitamin D uygulamasının aterom oluşumunu ciddi düzeyde etkilediğini göstermişlerdir (100). Yüksek dozlarda vitamin D kandaki kolesterol ve total lipidlerin konsantrasyonunu değiştirerek hiperfosfatemiye yol açmaktadır ve bu da aterom oluşumunu destekleyen bir faktördür. Tavşanlarda gözlenen benzer etkiler, ratlarla çalışan Eisenstein ve Groff tarafından da bulunmuştur (101). Yüksek dozlar serum kalsiyum seviyesini ve seromukoid seviyelerini arttırmaktadır. Aynı zamanda kalp, böbrek ve kan damarlarında polisakkarit akümülayonuyla beraber kalseröz depozitlerde artış görülmüştür (101). Bajwa, Morrison ve Ershoff (1971), vitamin D içeren diyet uygulanan ratlarda 6 hafta sonra aort ve koroner arterlerde aterosklerotik lezyonların varlığını rapor etmişlerdir (102). Lezyonlar çoğunlukla media tabakasında bulunmuştur ve elastik laminada lizis ve dejenerasyon gözlenirken kalsifikasyon ve plak oluşumu diğer bulgulardandır. Hayatta kalan hayvanların bazılarının damarlarında subintimal mezenkimal hücre proliferasyonuna rastlanmıştır. T. Toda, Leszczynski ve Kummerow, ateroskleroz ile vitamin D ilişkisini incelemek amacıyla domuzlarla ve ratlarla çalışmışlardır (103). Domuzlarda elektron mikroskopi ile aort incelenmiştir. Üç ay boyunca 62500 IU vit D₃/kg ile beslenen domuzlarda fibromüsküler intimal kalınlaşma gösterilmiştir ve 3 ay sonra aterosklerotik lezyonlara rastlanmıştır. Tavşanlar günlük 10000 IU ile beslenmeye zorlanmış ve ciddi düzeyde aortik düz kas hücre nekrozuna rastlanmıştır. Serum analizleri kalsiyum seviyelerinde bir farklılık göstermezken HPLC analizleri serum 25-OH-D₃ seviyelerinin kontrolden 30 kat fazla olduğunu bulmuştur ve bu sonuç arteriyel duvarın bütünlüğünü etkileyen etkenin kolekalsiferol yani vitamin D₃ ün oksitlenmiş formu olduğunu açığa çıkarmıştır. M.R. Hughes ve arkadaşları, vitamin D toksitesisinde plazmadaki yüksek 25-(OH)₂D₃ konsantrasyonunun hedef dokuları etkilediğini savunmuşlardır ve konsantrasyon yüksekken 25-(OH)₂D₃ reseptörlerine bağlanabilir ve 1,25(OH)₂D₃ gibi hareket edebilir sonucuna varmışlardır (104). E. Koh ve arkadaşları ise, ratlarda 1,25(OH)₂D₃ reseptörlerinin koroner arter düz kas

hücrelerinde varlığını göstermişlerdir ve doza bağımlı olarak bu hücrelerin proliferasyon dinamiklerinin değiştiğini kaydetmişlerdir (98). I. Tsutomu ve Hiroyuki, 1,25(OH)₂D₃'ün vasküler düz kas hücrelerinde kalsiyum alımını stimüle ettiğini öne sürmüşlerdir (105). Bu etki fizyolojik konsantrasyonlarda doz bağımlıdır ve sterole özgüdür. Tavşanlarla yaptıkları deneylerde Rajasree ve arkadaşları, aortlarda kalsifik lezyonlar görmüşlerdir ve bu lezyonların aortik medyadaki vitamin D₃ reseptörlerinin upregülasyonu ve medyal düz kas hücrelerindeki ⁴⁵Ca alımının artışıyla alakalı olduğunu gözlemlemişlerdir (106). Tüm bu bulgular, hipervitaminozis D toksisitesinin, aortik medyadaki VDR upregülasyonu ve düz kas hücreleri tarafından kalsiyum alım artışının bir sonucu olduğunu göstermektedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

Sıçan aortik düz kas hücreleri ticari olarak R-ASM-580 kodu ile LONZA firmasından satın alındı ve özel sıvı azot tankıyla elimize ulaştı. Bu hücreler adheran özellikte hücrelerdir ve epitelyal morfolojiye sahiptirler. Hücrelerin population doubling zamanı 28,8 saattir.

Medyum Hazırlanması: Çalışmamızda kullandığımız sıçan aortik düz kas hücreleri için yine hücre üreticisi firmanın önerdiği DMEM:F12 medyumunu (2,5 mM L-Glutamin+) bazal medyum olarak kullanıldı. Bazal medyum ısı ile inaktive edilmiş %20 fetal sığır serumu (FBS), %1 penisilin-streptomisin ve %1 amfoterisin ile desteklendi. Hazırlanan katkılı medyum 0,22 µm filtreden geçirilerek steril edilerek uygun hacimdeki kültür tüplerine bölündü ve kullanılacağı ana kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

Hücrelerin Çözülmesi: Hücreler henüz sıvı azottayken hücre kültüründe steril ortamda 2 adet 25 cm² yüzey alanlı kültür kaplarına (T25) önceden hazırlanıp filtrelenmiş katkılı medyum 1ml/5cm² olacak şekilde eklendi ve 37 °C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde 30 dakika boyunca ekülibrasyon sağlandı.

1. Sıvı azottan bir hücre kriyovialı çıkarıldı ve önceden 37 °C'ye getirilmiş su banyosuna çok hızlı bir şekilde alındı. Hücreler santrifüj edilmedi ya da vortekslenmedi. Su banyosunda döndürülen vial buz yok olur olmaz çıkarıldı (yaklaşık 1-1,5 dakika).
2. Çözünmüş hücre vialı %70 etil alkol yardımıyla temizlendi ve laminar kabine verildi.

3. Hücre süspansiyonunu içeren vial dikkatli bir şekilde iki kere tersyüz ederek karıştırıldı.
4. Vialin yarısı (250 µl) alınıp önceden ekülibre edilmiş 5 ml medyum içine konuldu. Kalan yarısı sıvı azota daldırılarak donduruldu.
5. Canlı hücre sayısını hesaplamak için tripan mavisini ile sayım yapıldı (ölü hücreler mavi, canlı hücreler renksiz). Tripan mavisinden 20 µl alındı ve 20 µl hücre süspansiyonu ile 1:1 oranında olacak şekilde karıştırıldı. Daha sonra hemositometreye yayılarak sayıldı.
6. 5000 hücre/cm² olacak şekilde uygun flaska ekim yapılarak 37 °C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatöre alındı.
7. Katkılı medyum kalan DMSO'yu ve tutunmamış hücreleri uzaklaştırmak amacıyla ekimden bir sonraki gün değiştirildi. Daha sonra hücrelerin medyumunu iki günde bir değiştirildi ve %80 konfluense ulaşıldığında hücreler pasajlandı.

Hücrelerin Pasajlanması: Hücreler ilk ekimden yaklaşık 5 gün sonra %80 konfluense ulaştı (Şekil 3.1). Pasajlama yapılacağı gün kullanılacak miktarda katkılı medyum ve tripsin-EDTA 37 °C ye getirildi. Her bir T25 flask için 5 mL katkılı medyum ve 2,5 mL tripsin-EDTA kullanıldı.

1. T25 flasklara 5'er mL katkılı medyum eklendi ve 37 °C ve %5 CO₂ ile nemlendirilmiş inkübatörde 30 dakika boyunca ekülibrasyon sağlandı.
2. Pasaj yapılacak hücre flaskı laminar kabine alındı ve medyum çekilerek 1X D-PBS ile hücreler 3 defa yıkandı.
3. Son D-PBS çekildikten sonra hücelere tripsin-EDTA eklendi ve 2 dakika inkübasyon sağlandı.
4. Hücreler kaldırıldıktan sonra flask tekrar laminar kabine alındı ve tripsin-EDTA inhibisyonu için aynı hacimde FBS katkılı medyum eklendi.
5. Hücre süspansiyonu 15 mL konik tüpe alındı ve 300g'de 5 dakika santrifüj yapıldı.

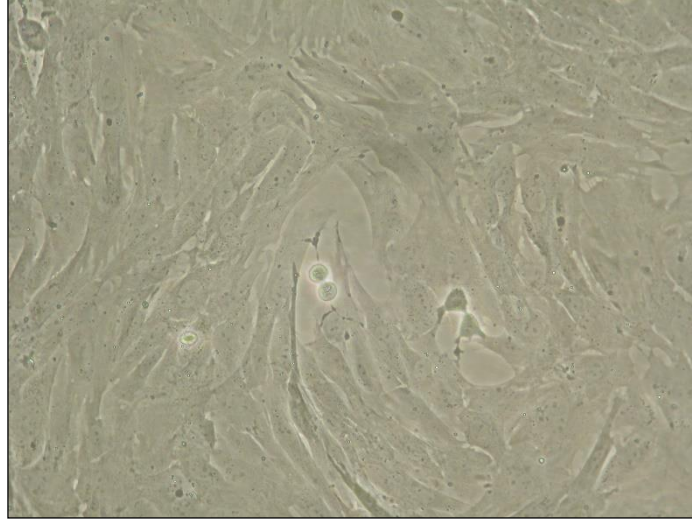
6. Santrifüj tamamlanınca supernatant atıldı ve pellet 1 mL katkılı medyum ile çözüldü.
7. Hemositometre ile sayım yapıldı ve deneye uygun flask, kuyucuklu plate veya petriye 3000 hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı.

3.2. Hormonlar

17-β Östradiol: 17-β östradiolün siklodekstrin kaplı suda çözünen formu (SIGMA Kat No: E4389), bidistile steril su ile çözümlenerek son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde alikotlandı ve -20⁰ C de muhafaza edildi.

Vitamin D3: 1,25-α-Dihidroksi vitamin D3 (CAYMAN CHEMICALS Kat No: 32222-06-3) saf etil alkol ile çözümlenerek son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde alikotlandı ve -20⁰C de muhafaza edildi.

Deney tasarımımıza göre her iki hormondan da son konsantrasyonları 1 nM, 10 nM ve 100 nM elde edebilmek amacıyla çalıştığımız hücre hattına uygun katkılı medyum kullanılarak hormon solüsyonları hazırlandı.



Şekil 3.1. Sıçan aortik düz kas hücrelerinin faz-kontrast mikroskopik görüntüsü. (X600).

3.3. Grupların Oluşturulması

Uygun koşullarda çoğaltılan hücreler, dört ana gruba ayrılarak hücre kültürü kaplarına ekildi. Çalışmamızda ana gruplarımız aşağıdaki gibi belirlendi:

- Kontrol: Herhangi bir hormon eklenmeyen hücre grubu
- Deney 1: Üç farklı konsantrasyonda 17β -östradiol içeren hücre grubu
- Deney 2: Üç farklı konsantrasyonda $1,25\alpha$ -Dihidroksi vitamin D3 içeren hücre grubu
- Deney 3: 17β -östradiol ile $1,25\alpha$ -Dihidroksi vitamin D3 ün farklı konsantrasyonlarının kombine verildiği hücre grubu

Deneylerimizde karşılaştırmak istediğimiz alt gruplar aşağıdaki gibi belirlenmiştir:

- Kontrol, 1 nM östradiol, 10 nM östradiol ve 100 nM östradiol grupları
- Etil alkol, 1 nM vitamin D3, 10 nM vitamin D3, 100 nM vitamin D3 grupları
- Etil alkol, 1 nM östradiol, 1 nM vitamin D3, 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3 grupları
- Etil alkol, 1 nM östradiol, 10 nM vitamin D3, 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3 grupları

- Etil alkol, 10 nM östradiol, 10 nM vitamin D3, 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 grupları
- Etil alkol, 10 nM östradiol, 1 nM vitamin D3, 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3 grupları

3.4. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Gerçek-zamanlı hücre ölçümleri sürekli bir şekilde impedans okuma yöntemiyle çalışan x-CELLigence cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Sürekli hücre proliferasyonu izleme, ilaç-aracılı sitotoksitenin zaman çözümlemesini yapmamıza yardımcı olur. Bu sayede istenen madde için selektif zaman noktaları seçilebilir veya hücre ölümü modunu anlayabilmek adına daha spesifik sonlandırma tahlilleri (apoptoz) yapılabilir.

Çalışmamızda gerçek zamanlı hücre analizi için n=4 tekrar yapıldı. Deney protokolümüz aşağıdaki gibidir.

1. Ekim günü medyum uzaklaştırılarak hücreler 3 mL 1X D-PBS ile 3 defa yıkandı.
2. Son yıkamada kullanılan DPBS çekildikten sonra hücrelere 2 mL %0,05 tripsin-EDTA eklenerek 10 dk boyunca 37 °C’de inkübe edildi.
3. Tripsin inaktivasyonunu sağlamak için flaska 2 mL FBS katkılı DMEM-F12 eklendi ve flastaki hücre süspansiyonu 15 mL konik kültür tüpüne aktarıldı.
4. 300 g’de 5 dakika santrifüj edilen tüpten süpernatant uzaklaştırılarak, pellet 1 mL katkılı medyum ile resüspande edildi.
5. Hemositometre ile hücre canlılık oranı sayıldı. Genelde T25 flasklardan 1,2-1,5X10⁵ hücre elde edildi.
6. 16 kuyulu e-plate lerin her bir kuyusuna yaklaşık 2000 hücre ekilmesi planlandığı için hücre süspansiyonu dilüsyon oranları hesaplandı.

x-CELLigence verilerinin RTCA (realtime cell analyzer) programında işlenmesi ve hücre analiz grafiklerinin çıktısı aşağıdaki aşamalar takip edilerek yapıldı.

1. RTCA programı başlatıldı. Program otomatik olarak RTCA kontrol ünitesine bağlı RTCA cihazını tanıdı ve uygun kullanıcı arayüzünü başlattı.

2. Expnote, Layout ve Schedule öğelerini içeren deney tasarısı sayfaları dolduruldu. Schedule için izlenen aşamalar: kör okuma aşaması; hücre izleme aşaması ve bileşik aktivitesi izleme aşaması şeklindedir. İstatistiksel analizlerde kullanılacak olan her bir uygulamada, dört tekrar olacak şekilde kuyucukların kodlaması yapıldı. Totalde, kontrol, ethanol, östradiöl (1 nM, 10 nM, 100 nM), vitamin D (1 nM, 10 nM, 100 nM) ve dört adet kombine gruptan oluşan 12 adet deney grubu ve her grup için dört tekrar yapıldığından 48 adet kuyu kullanılmıştır.
3. Tüm ayarlamalar yapıldıktan sonra e-platelerin herbir kuyusuna 50 µl katkılı medyum eklenerek plateler inkübatör içerisindeki enstrümanına yerleştirildi. Bu şekilde deney başlatılarak ilk okuma (kör okuma) alındı.
4. Kör okuma tamamlandıktan sonra plate ler inkübatörden çıkarılarak laminer kabine alındı. Kuyulara 50 µl hacimde 2000 hücre içeren hücre süspansiyonu tüm kuyucuklara son hacim 100 µl olacak şekilde eklendi.
5. İnkübatöre geri alınan e-plate ler için hücre izleme aşaması başlatıldı ve 24 saat beklendi.
6. İkinci aşamanın bekleme süresince, uygulanacak maddeler için gerekli konsantrasyonlar ependorf tüplerde hazırlanarak kodlarına uygun etiketlendi ve +4°C ye kaldırıldı. İlaç uygulanmayan gruptan bir tanesi kontrol grubu iken bir de hormonların çözücüsü olarak kullandığımız ethanol grubu oluşturuldu. Ethanol konsantrasyonu hormonlarla birlikte verildiğinde ulaşılan en yüksek konsantrasyon temel alınarak (son yoğunluk 1/20.000 olacak şekilde) hazırlandı. Hormon gruplarımızın konsantrasyonları ise katkılı medyum içerisinde 1 nM, 10 nM ve 100 nM olacak şekilde hazırlandı.
7. Hücre izleme aşaması bitmeden 1 saat önce, kullanılacak tüpler 37 °C ye getirildi. 24 saat sonunda bu aşama beklemeye alındı (pause). E-plateler inkübatörden alınarak laminer kabine aktarıldı. Plateler için önceden belirlenmiş kuyu kodlarına göre uygun konsantrasyonlarda hormon stoklarından 50 µl kullanılarak kuyulardaki son hacimler 100 µl'ye tamamlandı.
8. E-plateler tekrar inkübatöre alınarak bileşik aktivitesi izleme aşaması başlatıldı. Bu aşama uygulanan bileşik ve hücre hattına bağlı olarak 48-72 saat arası sürdürülmektedir. Bizim deney tasarımızda deney 93. saatte sonlandırıldı.

9. Elde edilen verilerden kontrole oranla, hem grupların kendi alt konsantrasyon grupları, hem de diğer grubun konsantrasyon grupları arasında kıyaslama yapabilmek için one-way ANOVA testi uygulandı.

3.5. İmmünofloresan İşaretleme

İmmünofloresan işaretleme metodu düz kas hücrelerinde bulunan ER α ve β 'nin farklı hormonlara veya bu hormonların kombine verildiği durumlara DNA metilasyonu yoluyla ekspresyon seviyesindeki değişimleri gösterebilmek amacıyla yapıldı. Ayrıca belirlenen gruplar arasındaki apoptoz dinamiklerinin incelenmesi amacıyla kaspaz 3 belirteci kullanılarak immünofloresan işaretleme de yapıldı. Kullanılan antikorlar ve dilüsyonları aşağıda belirtilmiştir (Çizelge 3.1.). Tüm deneyler için n=4 tekrar yapıldı ve herbir n için 10 hücre sayılarak analizler gerçekleştirildi.

İmmünofloresan işaretleme için takip edilen basamaklar aşağıdaki gibidir:

1. Süresi dolan kuyulardan medyum uzaklaştırılarak 0,1 M PBS (tuzlu fosfat tamponu) ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı.
2. 0,1 M PBS içerisinde taze olarak hazırlanmış %4 lük paraformaldehit solüsyonu ile oda sıcaklığında 10 dakika fiksasyon aşaması gerçekleştirildi.
3. Hücre membranlarının geçirgenliğini artırarak primer antikorların hücre tarafından alınmasını kolaylaştırmak amacıyla 0,1 M PBS içerisinde hazırlanmış %1 lik Triton-X karışımı ile 3 defa 5'er dakika permeabilizasyon yapıldı.
4. Primer antikorların spesifik olmayan bağlanmalarını önlemek amacıyla 0,1 M PBS içinde hazırlanmış %0,1 Triton-X ve %1,5 BSA karışımı ile 30 dakika bloklama yapıldı.
5. Hücrelerde işaretleme hedeflenen primer antiorlar 0,1 M PBS içinde %0,1 Triton-X ve %1,5 BSA karışımı kullanılarak uygun dilüsyonlarda hazırlandı ve kültür kaplarına eklendi. Primer antikor inkübasyonu DNA metilasyon belirteçleri ve kaspaz-3 için oda sıcaklığında 60 dakika boyunca gerçekleştirilirken, östrojen reseptörleri işaretleme için +4°C sıcaklıkta 18 saat olacak şekilde gerçekleştirildi.

6. Primer antikor aşaması bittikten sonra hücreler 0,1 M PBS ile oda sıcaklığında 3 defa 5'er dakika yıkandı.
7. Hücreler 0,1 M PBS içinde hazırlanmış %0,1 Triton-X100 ve %1 BSA karışımı içerisinde uygun dilüsyonlarda hazırlanan sekonder antikorlar ile 2 saat boyunca oda sıcaklığında ve karanlık ortamda inkübe edildi.
8. Sekonder antikor aşaması tamamlandıktan sonra karanlık ortamda +4 °C'de 0,1 M PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı.
9. Hücreler, çekirdekleri boyamak için PBS içinde son konsantrasyon 2 µg/mL olacak şekilde hazırlanmış Hoechst 33342 ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyon yapıldıktan sonra Nikon Ti inverted floresan mikroskop altında incelendi ve fotoğraflandı.

Antikor İsmi	Dilüsyon Oranı	Firma	Katalog Numarası
Estrogen Receptor β primer Rabbit antikor	1/50	Santa Cruz	sc-8974
Estrogen Receptor α primer Rabbit antikor	1/50	Upstate	06-629
Cleaved-caspase 3, primer Rabbit antikor	1/100	Cell Signalling	9664L
DNMT1 primer goat antikor	1/500	Santa Cruz	sc-10221
DNMT3a primer rabbit antikor	1/300	Santa Cruz	sc-20703
Donkey anti-Goat, FITC konjuge sekonder antikor	1/750	Life Sciences	A11055
Donkey anti-Rabbit, FITC konjuge sekonder antikor	1/750	Life Sciences	A21206

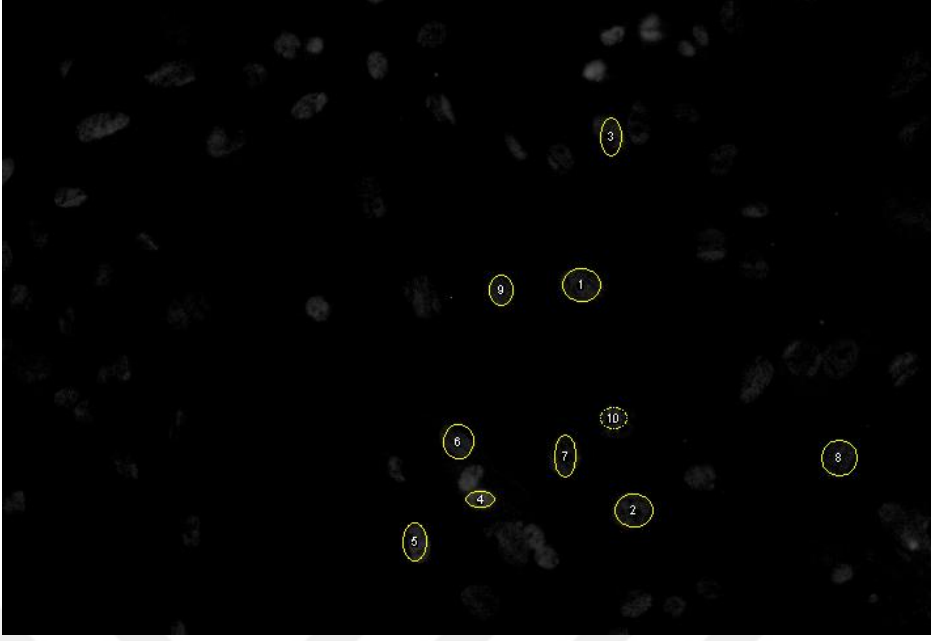
Çizelge 3.1. Kullanılan primer ve sekonder antikorların özellikleri.

3.6. ImageJ Programı ile İşaretlenme Yoğunluğu Analizi

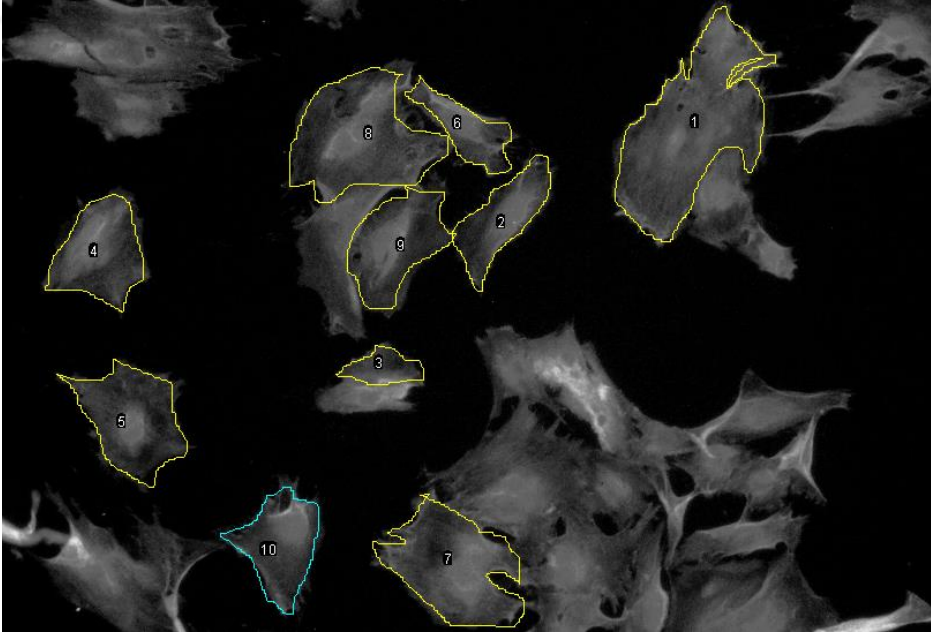
Floresan mikroskopla elde edilen resimlerdeki hücre işaretlenme yoğunlukları, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (National Institutes of Health-NIH) tarafından üretilmiş ve ücretsiz olarak dağıtılan ImageJ yazılımıyla analiz edildi. Bu işlem için, yazılım ile açılan resimler öncelikle analiz yapılabilmesi amacıyla 16-bit biçime

dönüştürülerek gri skala yapıldı. Daha sonra yazılımın “analyze” menüsünde bulunan “tools” içinden “ROI (region of interest) manager” penceresi açıldı. Sonra, analyze menüsü altında bulunan “set measurements” penceresi açılarak burada işaretlenme yoğunluğuyla ilgili tüm özellikler (min & max gray value, mean gray value, display label) seçildi. Yazılımın “seçim (selection)” araçlarından “freehand selection” seçildikten sonra resim üzerindeki hücrelerin sınırları dikkatlice çizildi. Her hücre seçiminden sonra ROI manager penceresinde “ekle (add)” butonuna basılarak yapılan seçimin listeye eklenmesi sağlandı. Amaçlanan sayıda hücre seçildikten sonra yine ROI manager penceresinde bulunan “measure” butonuna tıklandı ve seçilen tüm hücrelerin işaretlenme yoğunlukları ile ilgili veriler elde edildi. Bu veriler yazılım tarafından Microsoft Excell© tablosuna çevrildi. Bu tabloda ortalama işaretlenme yoğunlukları (mean gray value) küçükten büyüğe sıralandı ve her deneğin maksimum yoğunluk değerinden minimum olanı çıkarılarak işaretlenme aralıkları hesaplandı. Bu aralıklar sayısal 4 eşit parçaya bölündü ve ilk parçaya giren ortalama işaretlenme yoğunluğuna sahip hücreler işaretlenmemiş kabul edilerek 1 değeri verildi. İkinci parçaya girenler zayıf işaretlenme kabul edildi ve bunlara 2 skoru verildi. Üçüncü parçaya denk gelen hücreler orta düzeyde işaretlenmiş kabul edildi ve bunlara da 3 skoru verildi. Dördüncü parçaya giren hücreler ise yoğun işaretlenmiş olarak kabul edildi ve bunlara da 4 puan verildi. Her gruptaki deneklerde hücre skorları yüzde oran olarak hesaplandı. Bu yüzdelik oranlar, aşağıda gösterilen “H skoru” formülüne göre hesaplanarak her bir deneğin h skoru çıkarıldı (107). Her grubun h skor ortalaması için de grup içindeki deneklerin H skorları toplandı ve denek sayısına bölünerek ortalamaları alındı. İstatistiksel karşılaştırmalar bu ortalamalar üzerinden gerçekleştirildi. Her bir deneğin H skorunun hesaplanmasının formülü şu şekildeydi: $1 \times (1 \text{ puan alan hücre yüzdesi}) + 2 \times (2 \text{ puan alan hücre yüzdesi}) + 3 \times (3 \text{ puan alan hücre yüzdesi}) + 4 \times (4 \text{ puan alan hücre yüzdesi})$.

İmageJ analizlerine dair örnek şekiller aşağıda sunulmuştur (Şekil 3.2. ve Şekil 3.3.).



Şekil 3.2. DNMT3a için örnek ImageJ alan belirleme görüntüsü. Nükleus sınırları sarı ile belirtilmiştir (X200).



Şekil 3.3. ER- α için örnek ImageJ alan belirleme görüntüsü. Hücre sınırları sarı ile belirtilmiştir (X200).

3.7. Apoptotik İndeks Hesaplaması

Tüm gruptaki apoptoz oranını karşılaştırmak için apoptotik indeks hesaplamaları yapıldı. Bu amaçla aşağıda yazılı formül kullanıldı (108). Apoptotik hücreleri belirlemek için aktif kaspaz-3 işaretlenmesi yapıldı. İşaretlenme sonrası 4 farklı alandan 10 hücre olmak üzere her bir grupta tekrarlar ile beraber rastgele 40 hücre sayıldı.

$$\text{Apoptotik İndeks} = (\text{Apoptotik Hücre Sayısı} / \text{Toplam Hücre Sayısı}) \times 100$$

3.8. İstatistiksel Analiz

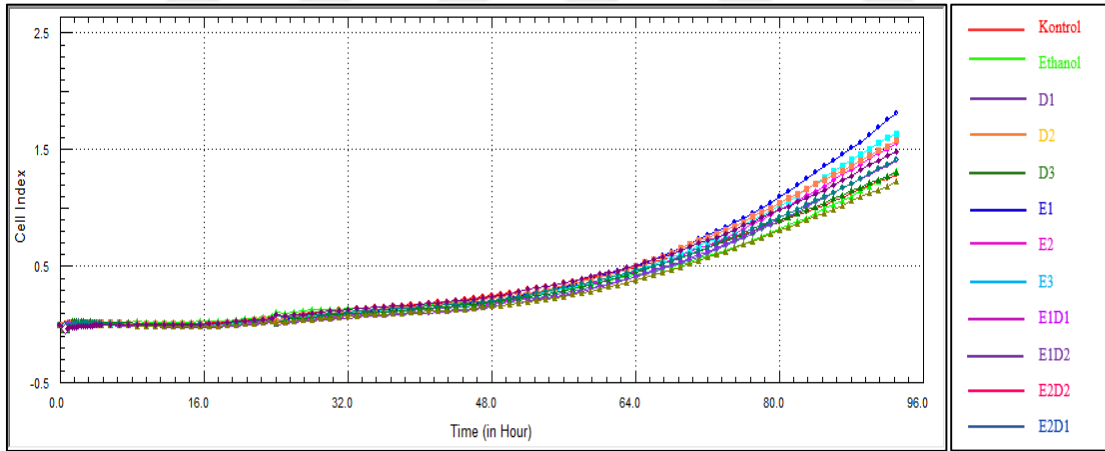
İstatistiksel analiz için SPSS 11,5 for Windows (Statistical Programme for Social Sciences) paket programı kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.005$ alındı.

Verilerin analizinde deskriptif analizler uygulandı. Verilerin her grupta normal dağılıma uygunluk kontrollerine Shapiro Wilk testi ile bakıldı. Dağılım normal dağılıma uygun bulundu. Veriler için tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart değerleri verildi. Gruplar arasında farklılık olup olmadığının testinde one-way ANOVA analizi kullanıldı. Posthoc testi için kontrol grubuna ilişkin ikişerli karşılaştırmalarda Duncan testi ve her grubun birbiri ile ikişerli karşılaştırmasında Bonferroni testi tercih edildi. Grup ortalamaları arasındaki farklılık grafiği için Error Bar kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi Bulguları

Aortik düz kas hücrelerinin farklı hormonlara ve bunların farklı konsantrasyonlarına verdiği proliferasyon yanıtını değerlendirebilmek için yapılan gerçek zamanlı hücre analiz çalışmasında elde edilen proliferasyon eğrilerinin zamana bağlı grafiği çıkarıldı (Şekil 4.1). Elde edilen veriler, cihazın yazılımı tarafından hücre indeksi cinsinden sayısallaştırıldı. Kullanılan hormon konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının, kontrol grubu, etil alkol grubu ve kendi aralarında düz kas hücre proliferasyonu üzerine anlamlı bir fark ortaya çıkarmadığı görüldü.



Şekil 4.1. Gerçek-zamanlı hücre analizi proliferasyon eğrileri. D1: 1 nM vitamin D3; D2: 10 nM vitamin D3; D3: 100 nM vitamin D3; E1: 1 nM östradiol; E2: 10 nM östradiol; E3: 100 nM östradiol; E1D1: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3; E1D2: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3; E2D2: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3; E2D1: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3.

4.2. İmmünofloresan İşaretlenme Yoğunluğu Analizi-H Skoru

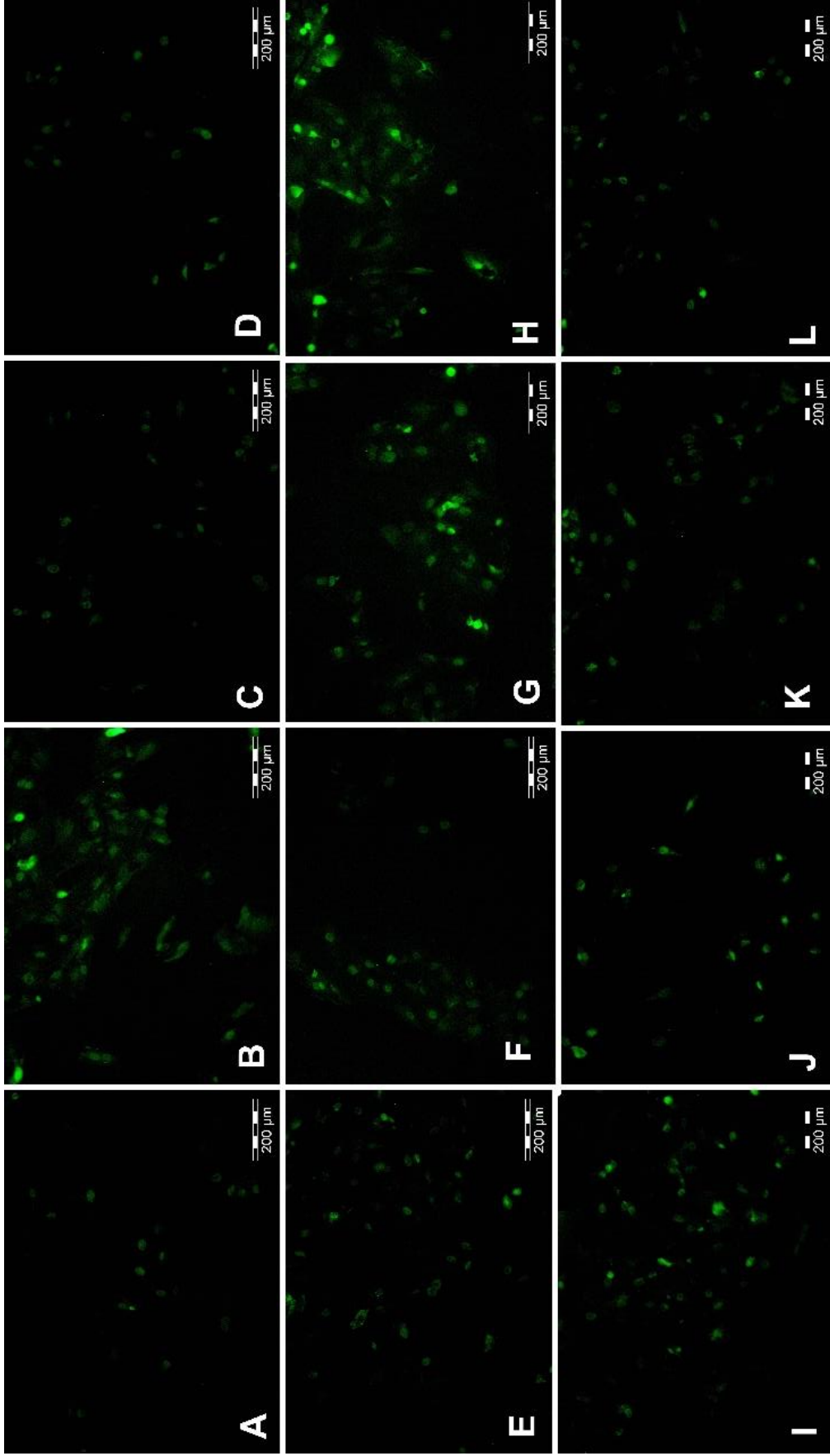
İmmünofloresan işaretleme yapılan hücrelerde boyanma özellikleri aşağıda belirtildiği şekildeydi.

DNMT1 enzimi hücre çekirdeklerinde lokalize olarak gözlendi (Şekil 4.2-4.3). Aynı şekilde DNMT3a da nükleer yerleşimliydi (Şekil 4.4-4.5). Östrojen reseptör alfa (Şekil 4.8-4.9) ve östrojen reseptör beta ise (Şekil 4.10-4.11) nükleer, sitoplazmik ve membranöz olarak izlendi. Farklı zamanlarda yapılan boyamalar arasında işaretlenme lokalizasyonu açısından fark görülmedi.

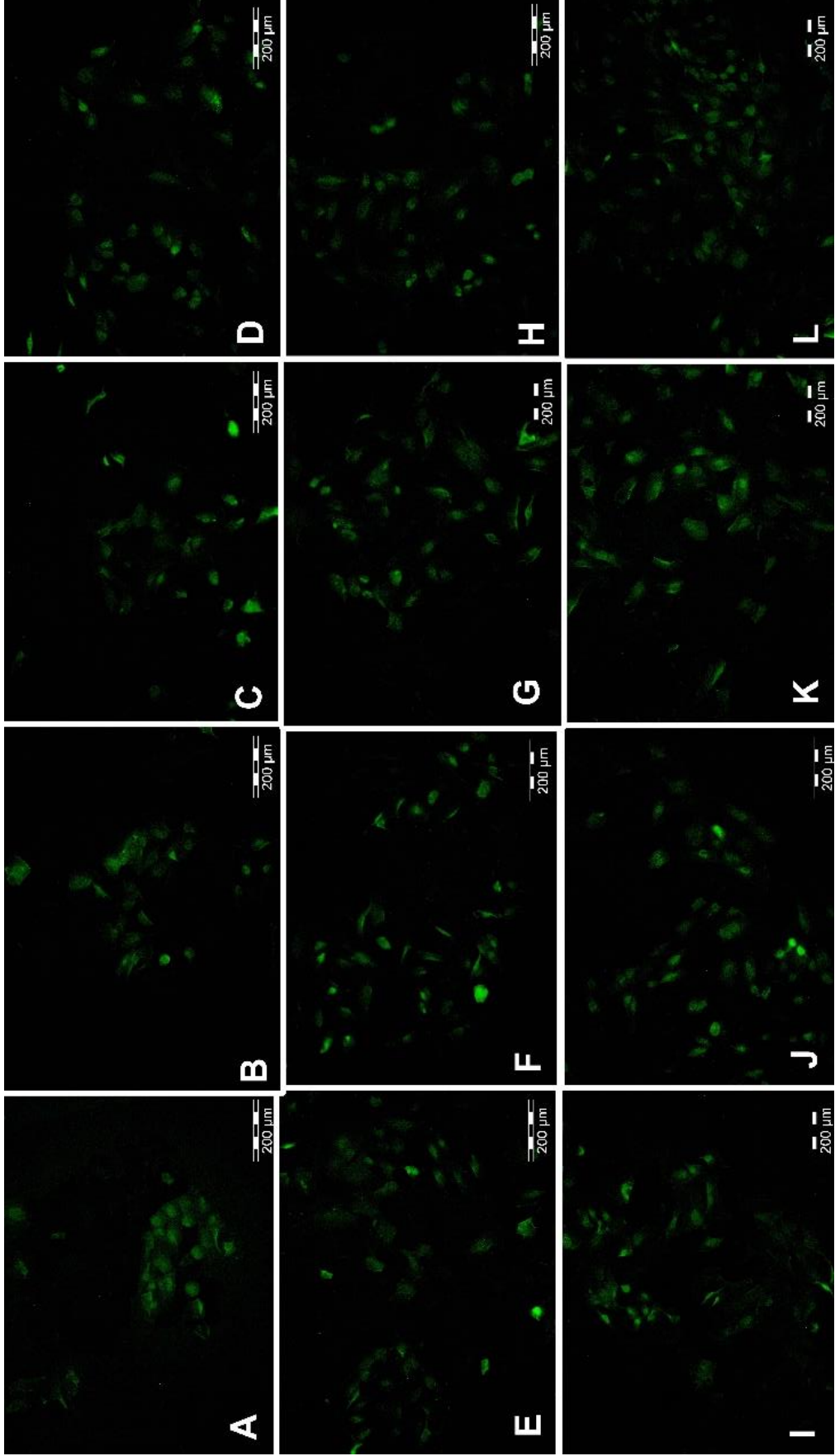
4.2.1. DNMT1 Antikoru İşaretlenme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Kontrol ve farklı östradiol konsantrasyon grupları arasında ve etanol ile farklı vitamin D3 konsantrasyon grupları arasında DNMT1 işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H skorları kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.2-Şekil 4.3). Ayrıca, etanol ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan vitamin D3, östradiol ve bunların kombine grupları arasında DNMT1 işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H-skorları kullanılarak yapılan analizlerde de anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.2-Şekil 4.3).

Her bir grubun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait DNMT1 işaretlenme yoğunluğunun H skorları kullanılarak kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırma analizlerinde de anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.2. 14 saat hormon uygulamasına ait DNMT1 işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).



Şekil 4.3. 72 saat hormon uygulamasına ait DNMT1 işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).

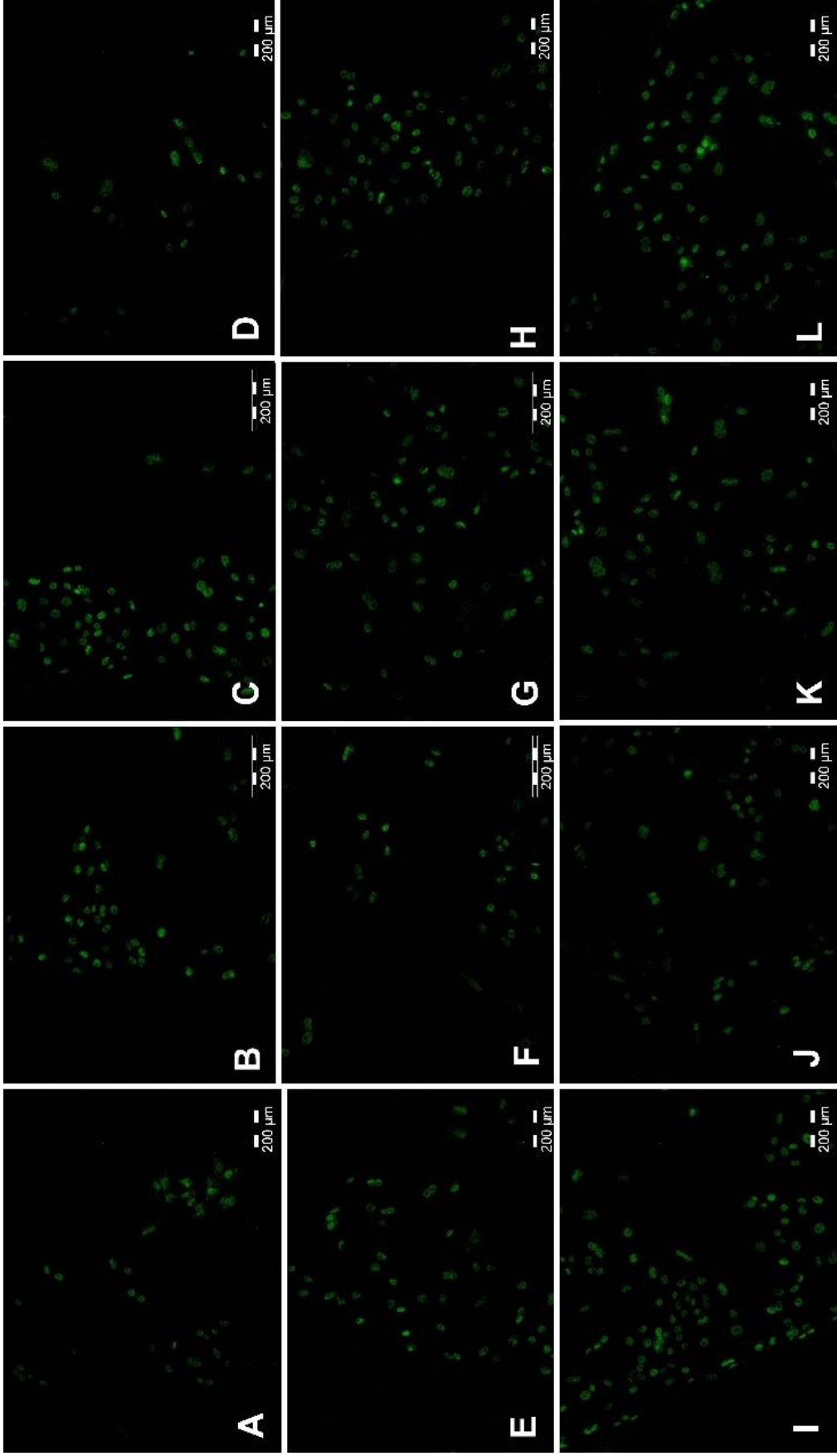
4.2.2. DNMT3a İşaretlenme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Kontrol ve farklı östradiol konsantrasyon grupları arasında ve etanol ile farklı vitamin D3 konsantrasyon grupları arasında DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 24 saat hormon uygulamasına ait H-skorları kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.4). Benzer şekilde, etanol ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan vitamin D3, östradiol ve bunların kombine grupları arasında DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 24 saat hormon uygulamasına ait H-skorları kullanılarak yapılan analizlerde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.4).

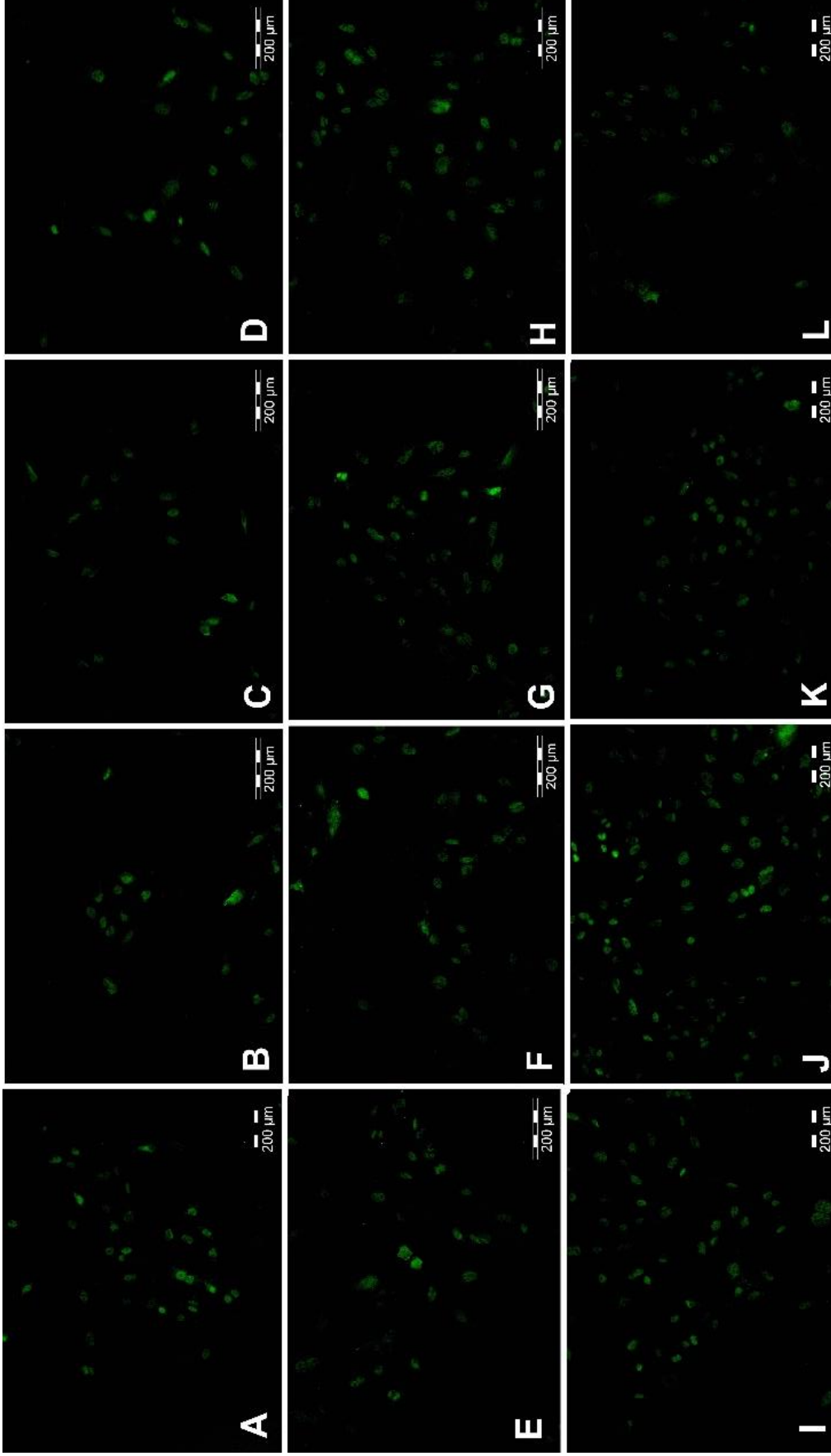
72 saat hormon uygulanan gruplarda DNMT3a enzimi için gerçekleştirilen H skorları karşılaştırıldığında, 1 nM vitamin D3 grubunun etil alkol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.6). Ayrıca, yine 72 saat hormon uygulanan gruplarda etil alkol ile 10 nM östradiol ve 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 grupları karşılaştırıldığında, 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 grubunda DNMT3a için H skorunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi (Şekil 4.7).

72 saat hormon uygulanan diğer gruplarda ise DNMT3a işaretlenme yoğunluğu için H-skorları analizlerinde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.5).

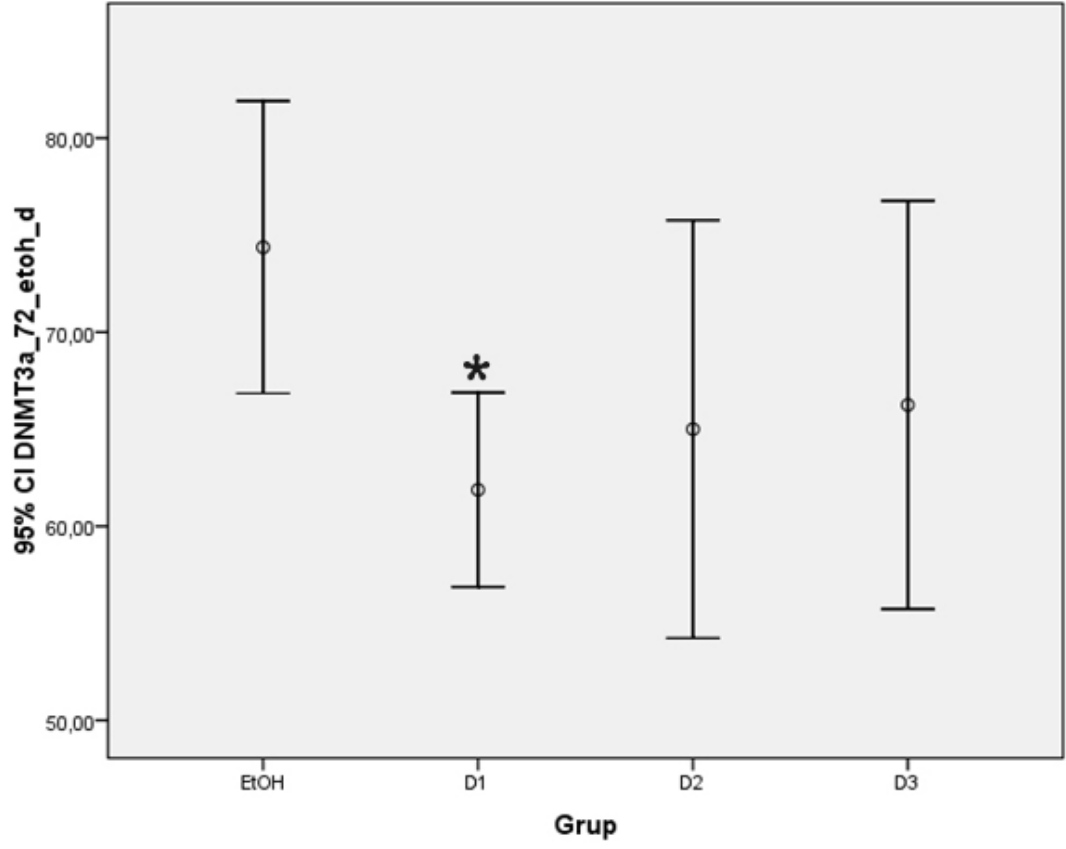
Her bir grubun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun H-skorları kullanılarak kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırma analizlerinde anlamlı bir fark yoktu.



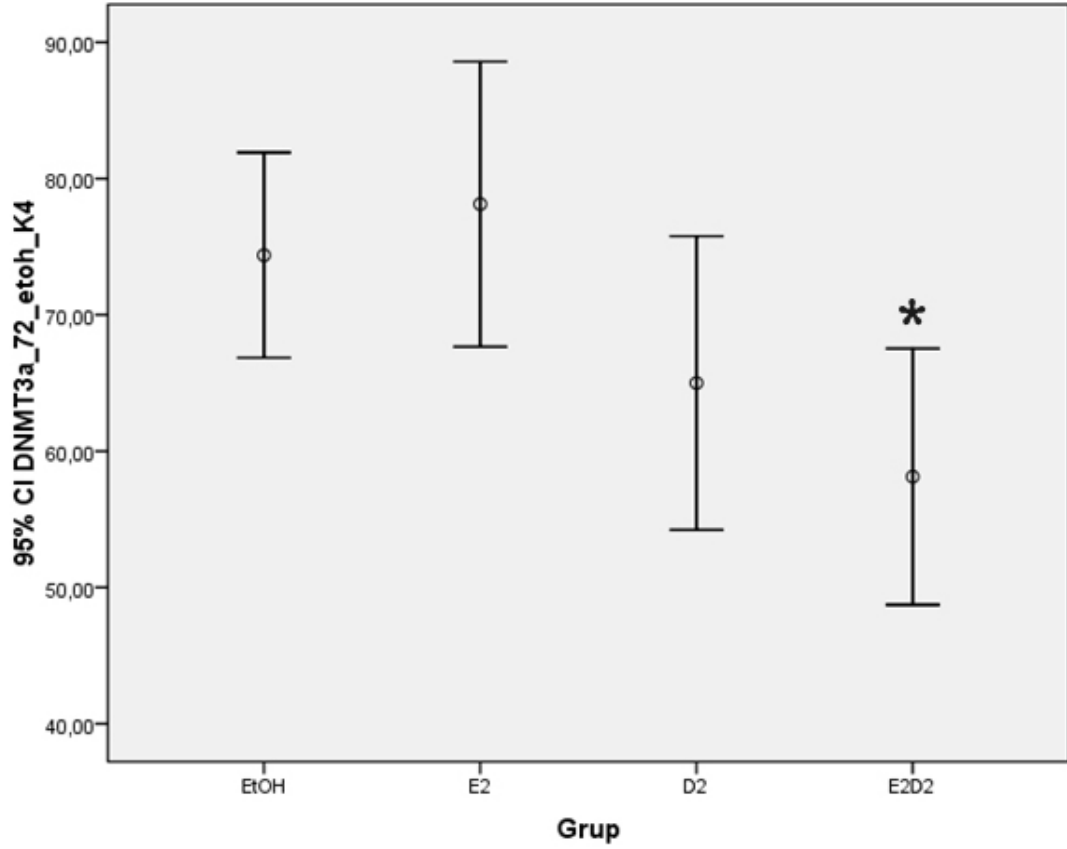
Şekil 4.4. 24 saat hormon uygulamasına ait DNMT3a işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).



Şekil 4.5. 72 saat hormon uygulamasına ait DNNMT3a işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).



Şekil 4.6. DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 72 saat uygulanan etanol ve 1 nM vitamin D3 (D1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 100 nM vitamin D3 (D3) konsantrasyon grupları arasında karşılaştırılması. Asterisk: Anlamli fark çıkan gruplar.



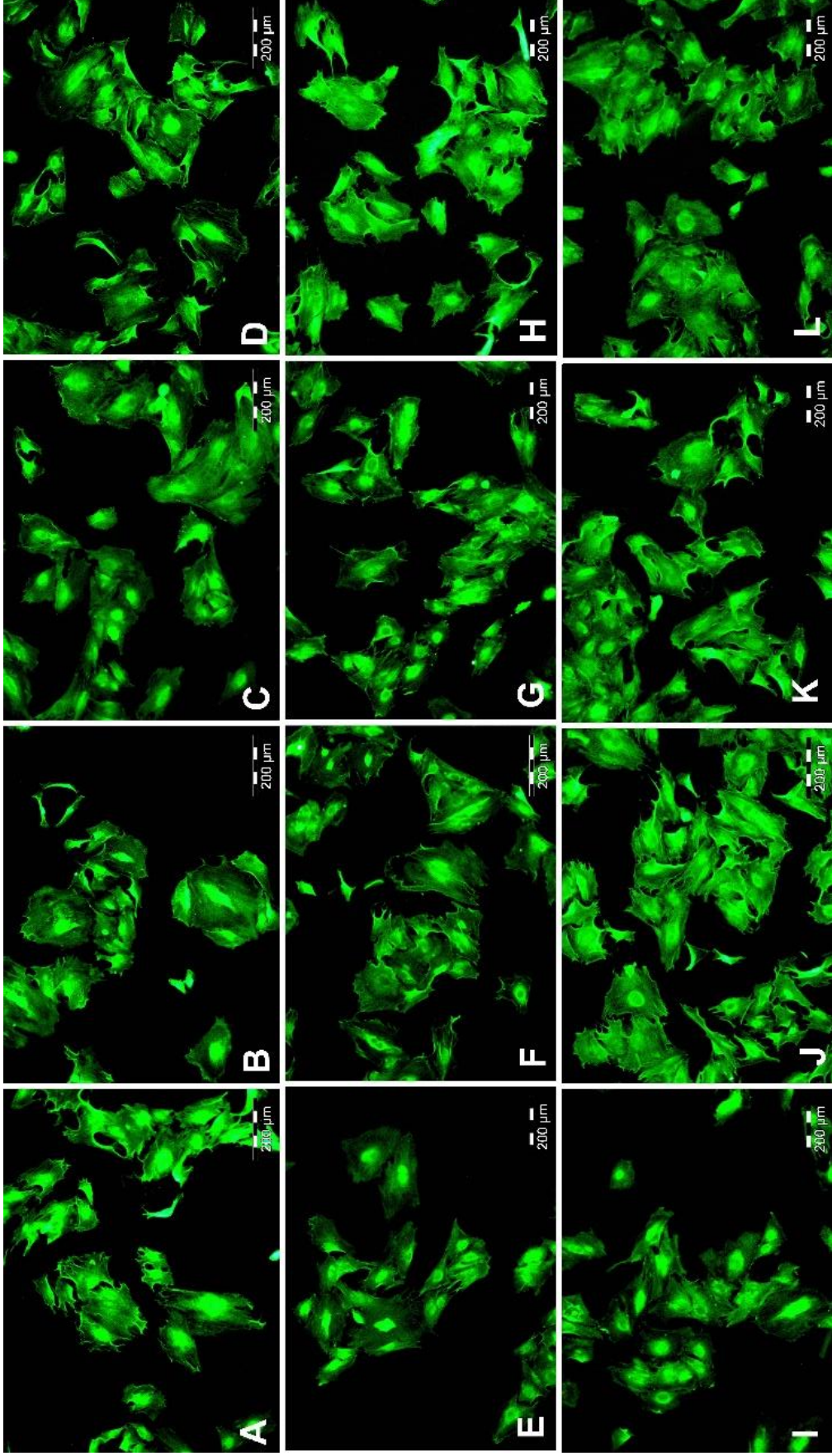
Şekil 4.7. DNMT3a işaretlenme yoğunluğunun 72 saat uygulanan etanol ile 10 nM östradiol (E2), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 kombine grupları (E2D2) arasında karşılaştırılması. Asterisk: Anlamlı fark çıkan gruplar.

4.2.3. ER- α İşaretlenme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması

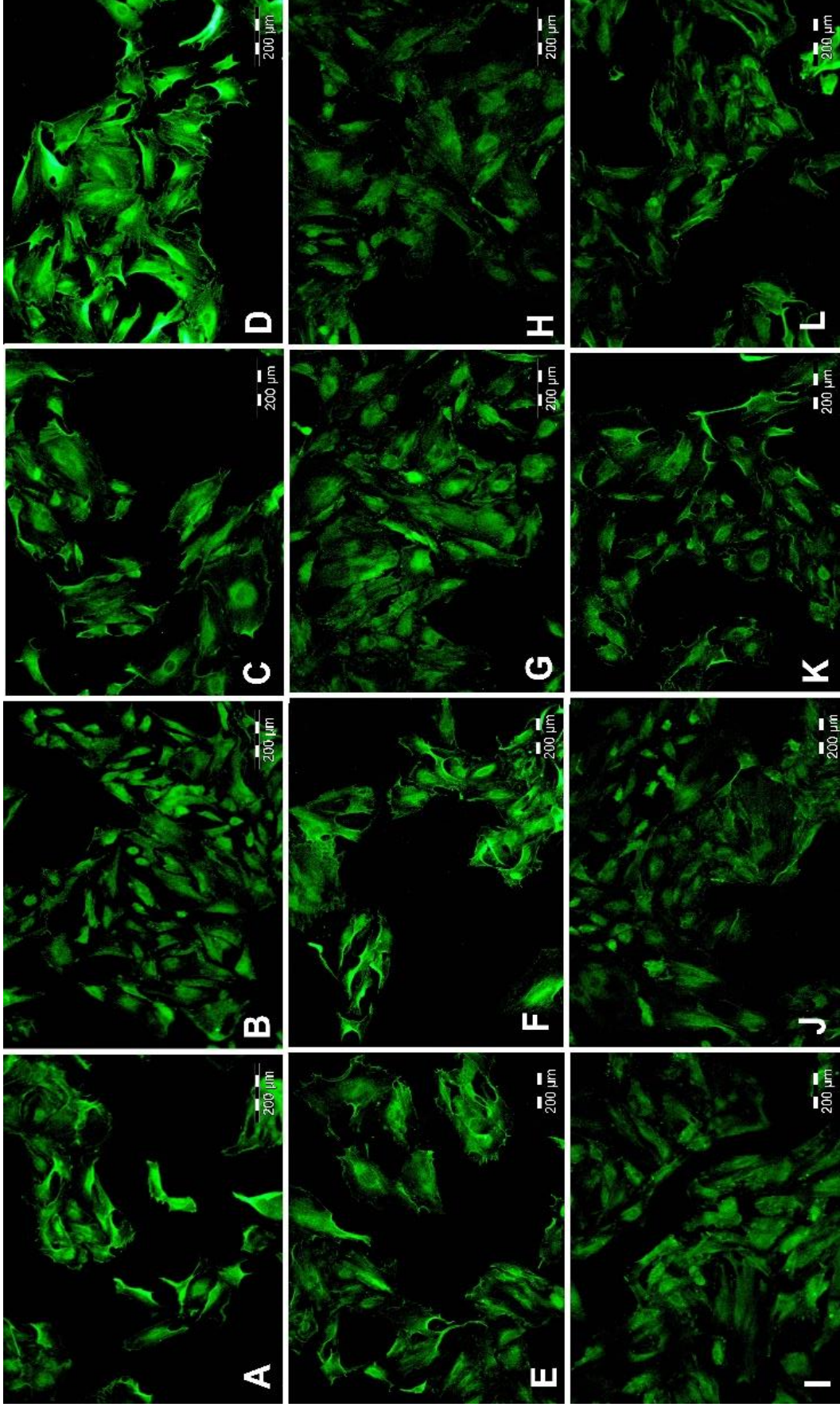
Kontrol ve farklı östradiol konsantrasyon grupları arasında ve etanol ile farklı vitamin D3 konsantrasyon grupları arasında ER- α işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H-skorları kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.8-Şekil 4.9). Ayrıca, etanol ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan vitamin D3, östradiol ve bunların kombine grupları arasında ER- α işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H-skorları kullanılarak yapılan analizlerde de anlamlı bir fark yoktu (Şekil 4.8-Şekil 4.9)

Her bir grubun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait ER- α işaretlenme yoğunluğunun H-skorları kullanılarak kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırma analizlerinde de anlamlı bir fark yoktu.





Şekil 4.8. 24 saat hormon uygulamasına ait ER- α işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).

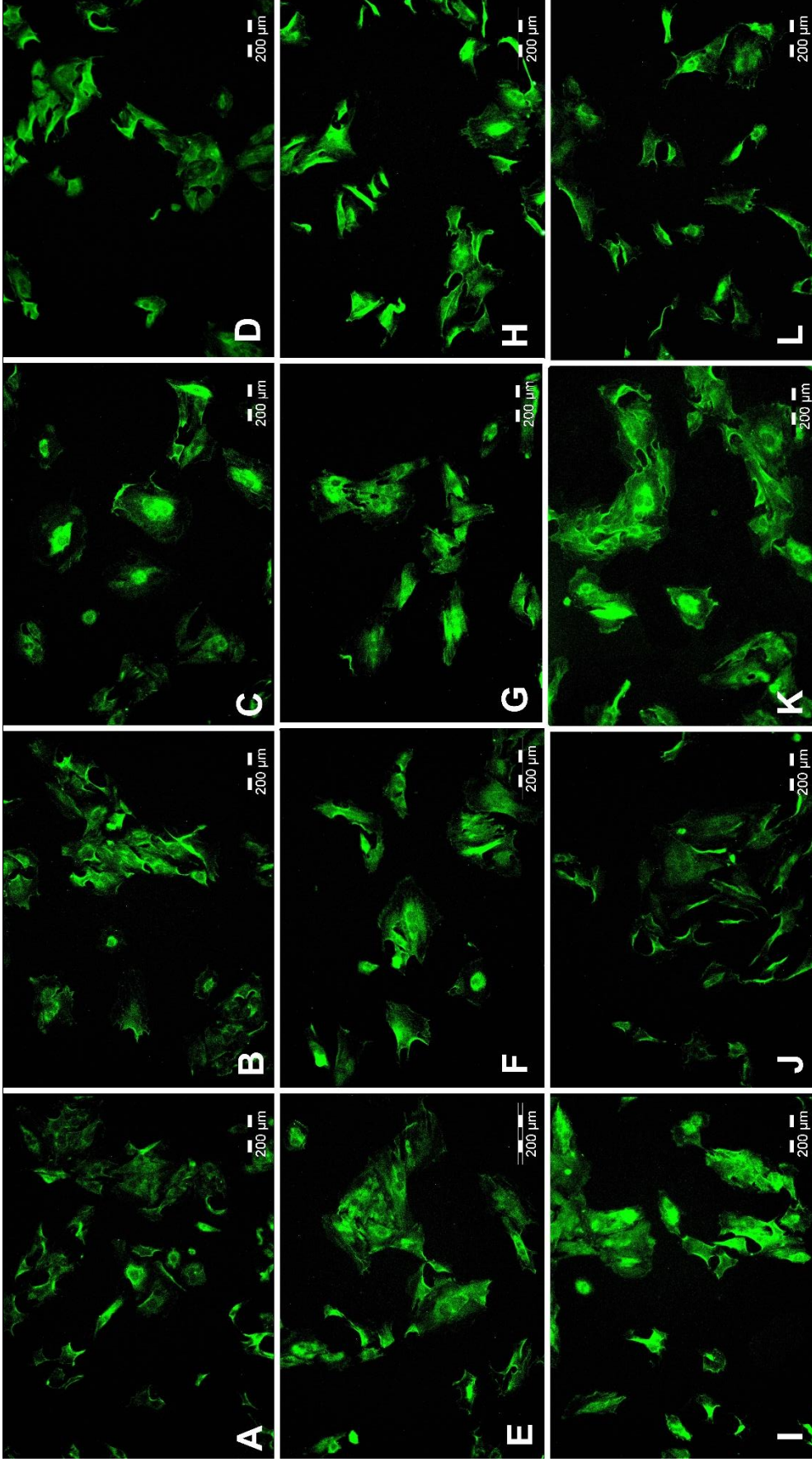


Şekil 4.9. 72 saat hormon uygulamasına ait ER- α işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).

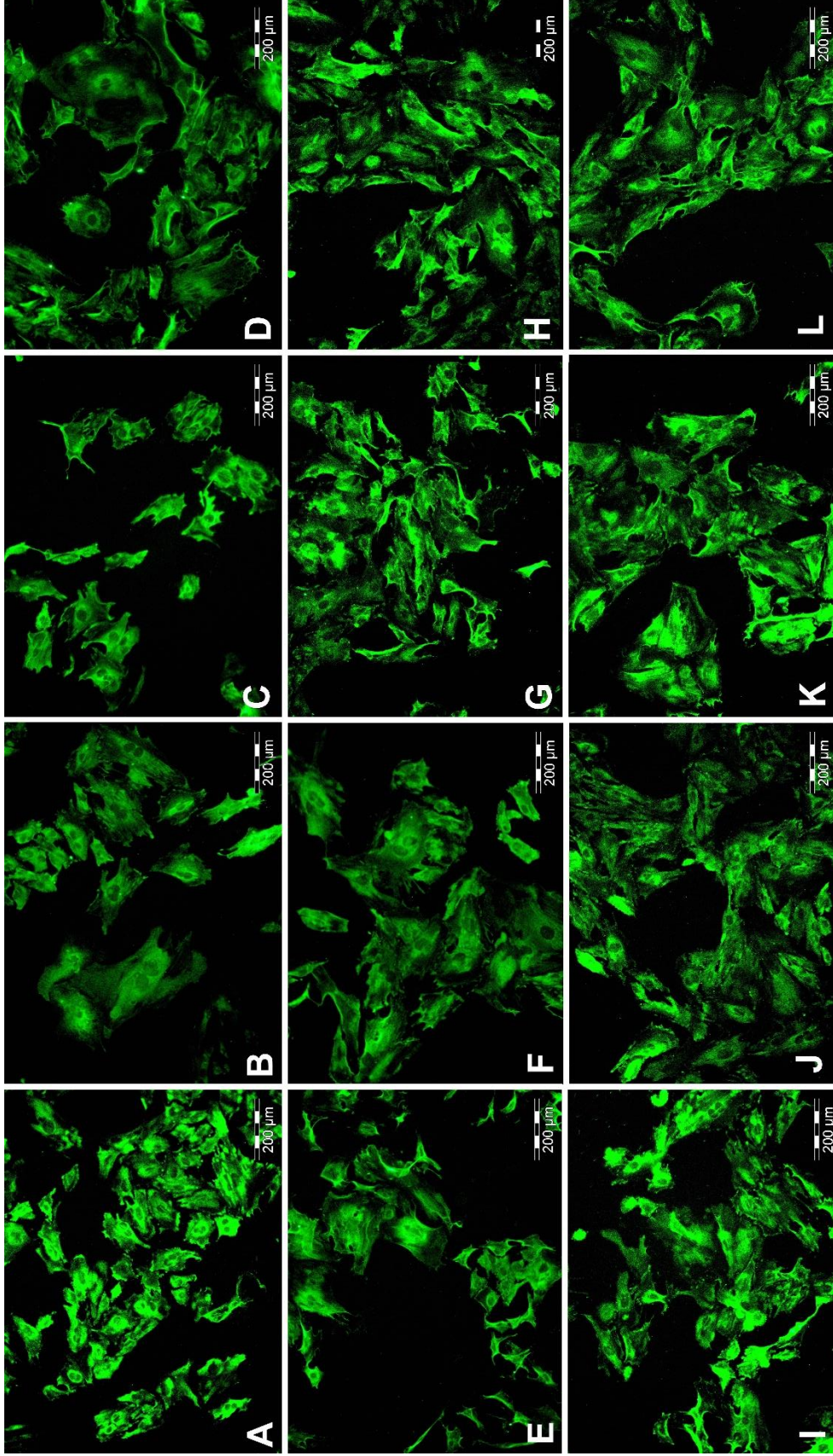
4.2.4. ER- β İşaretlenme Yoğunluğunun Gruplar Arasında Karşılaştırılması

Kontrol ve farklı östradiol konsantrasyon grupları arasında ve etanol ile farklı vitamin D3 konsantrasyon grupları arasında ER- β işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H skorları kullanılarak yapılan istatistiksel analizlerde anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 4.10-Şekil 4.11). Ayrıca, etanol ile farklı konsantrasyonlarda uygulanan vitamin D3, östradiol ve bunların kombine grupları arasında ER- β işaretlenme yoğunluğunun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait H skorları kullanılarak yapılan analizlerde de anlamlı bir fark görülmedi (Şekil 4.10-Şekil 4.11)

Her bir grubun 24 ve 72 saat hormon uygulamasına ait ER- β işaretlenme yoğunluğunun H skorları kullanılarak kendi aralarında yapılan ikili karşılaştırma analizlerinde de anlamlı bir fark yoktu.



Şekil 4.10. 24 saat hormon uygulamasına ait ER-β işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).



Şekil 4.11. 72 saat hormon uygulamasına ait ER-β işaretlenmesi. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).

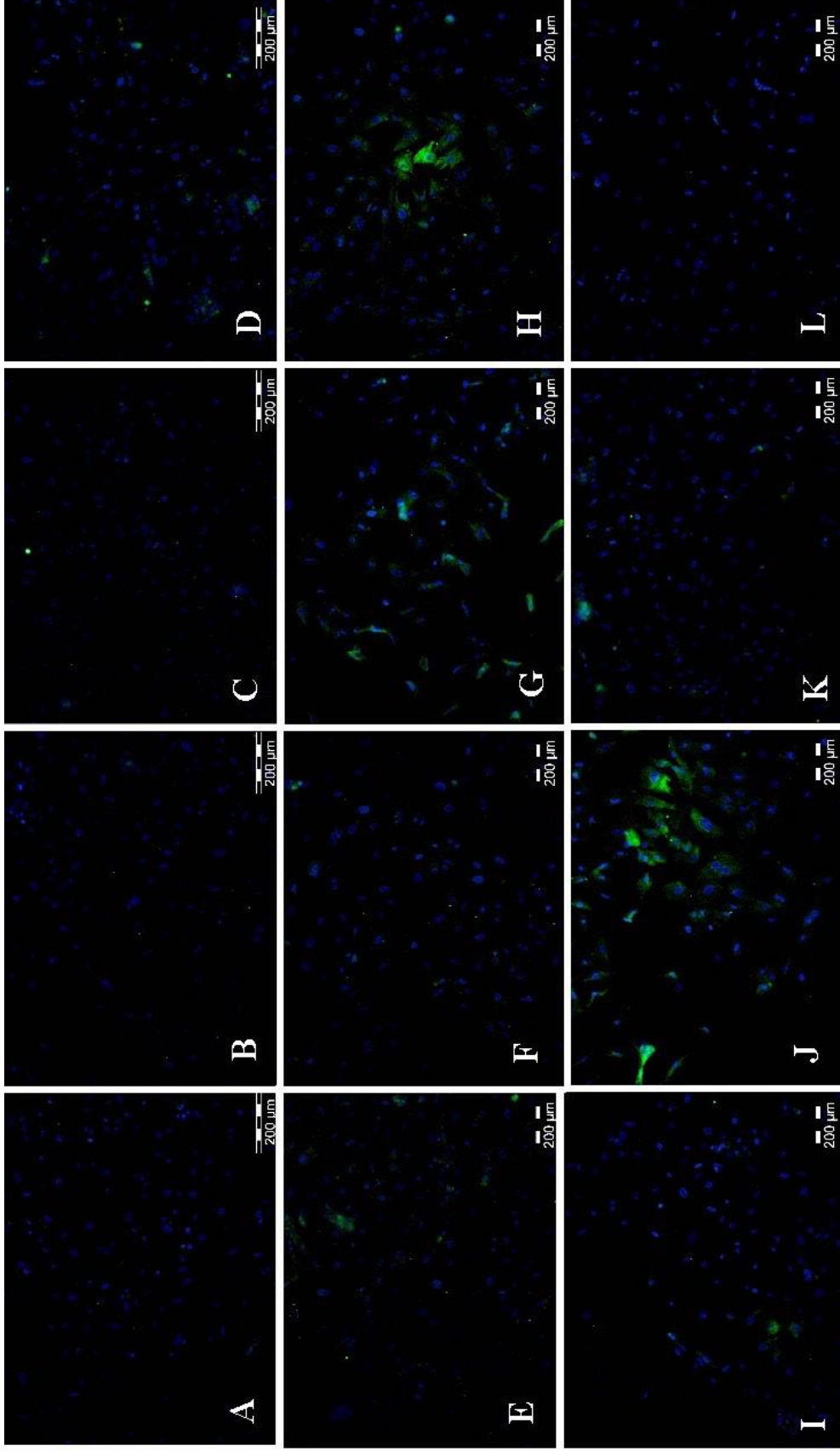
4.3. Apoptotik İndeks

Aktif Kaspaz 3 antikoru ile işaretlenen örneklerde (Şekil 4.12) pozitif boyanan apoptotik hücrelerin sağlıklı hücrelere oranı çıkartılarak apoptotik indeksler hesaplandı. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmaların sonuçları şu şekilde saptandı:

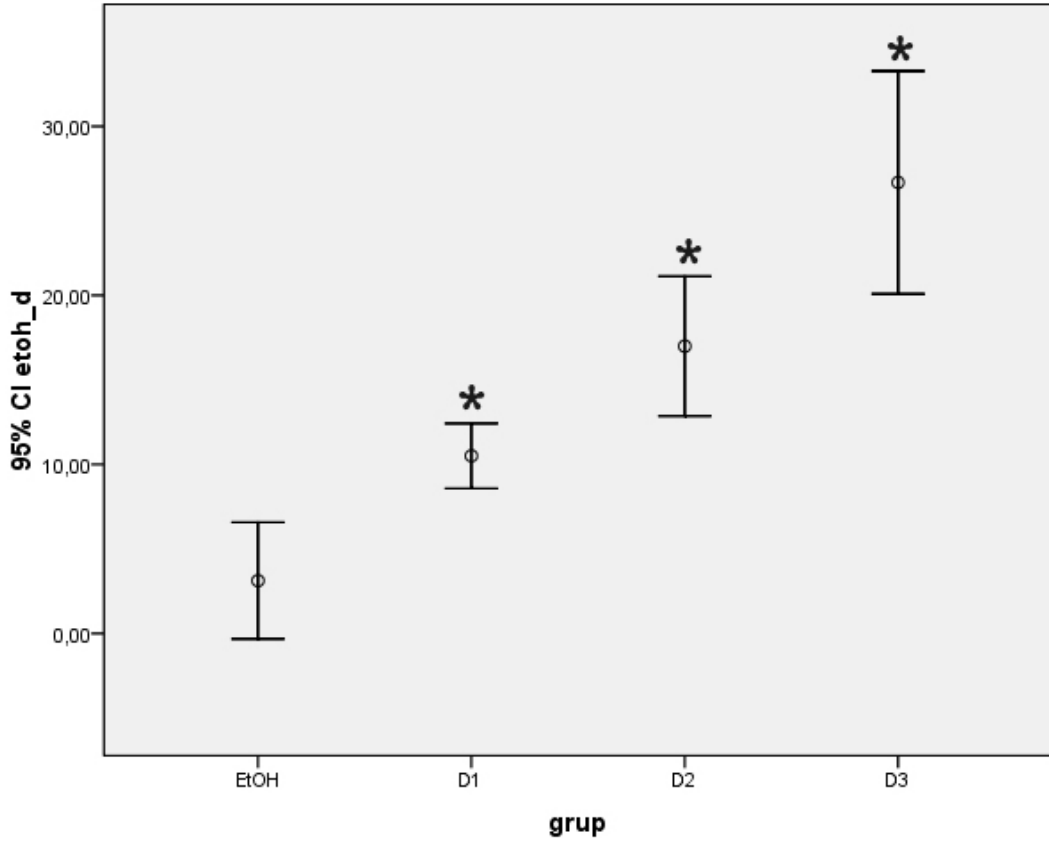
Kontrol grubu ile üç farklı östradiol konsantrasyonu grubu arasında apoptotik indeksler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Etil alkol ile üç farklı vitamin D3 konsantrasyonu grubu arasında yapılan karşılaştırmalarda, vitamin D3'ün apoptozu istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığı saptandı. Bu artış, vitamin D3'ün dozu ile doğru orantılıydı (Şekil 4.13).



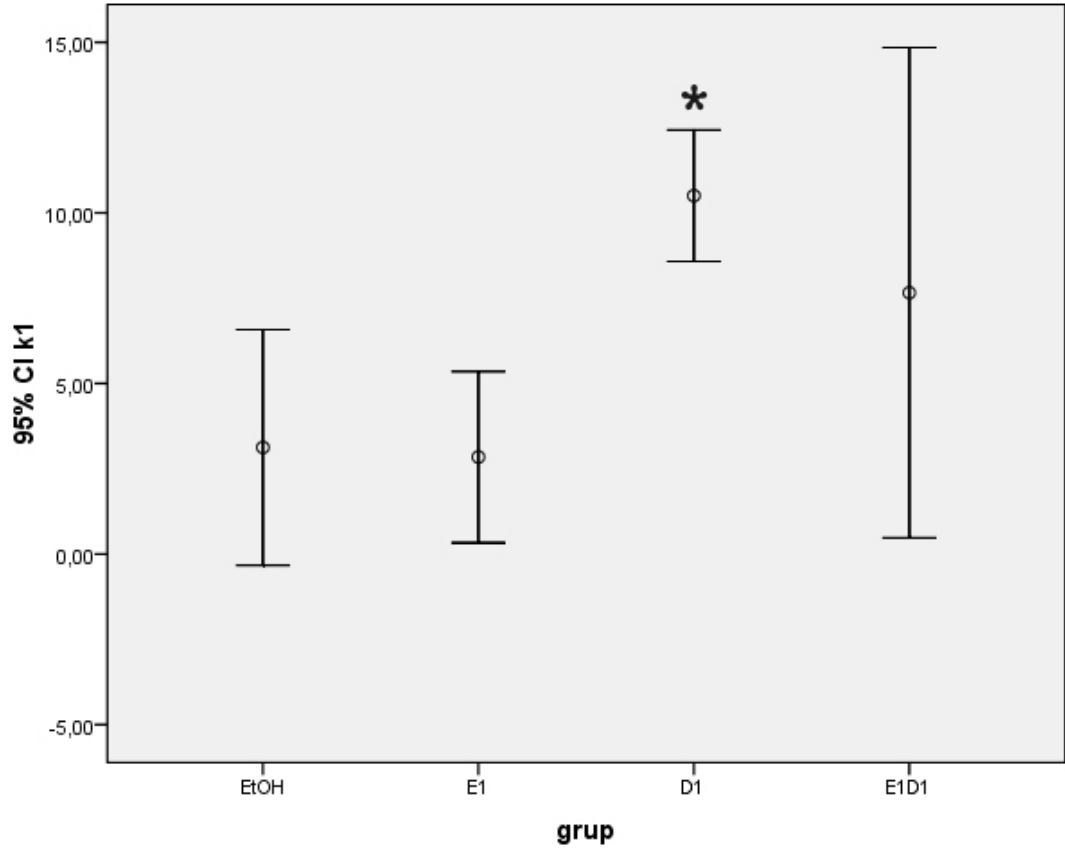


Şekil 4.12. 24 saat hormon uygulamasına ait kaspaz 3 işaretlenme yoğunlukları. A: kontrol, B: 1 nM östradiol, C: 10 nM östradiol, D: 100 nM östradiol, E: etil alkol, F: 1 nM vitamin D3, G: 10 nM vitamin D3, H: 100 nM vitamin D3, I: 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3, J: 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3, K: 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 ve L: 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3. (X200).



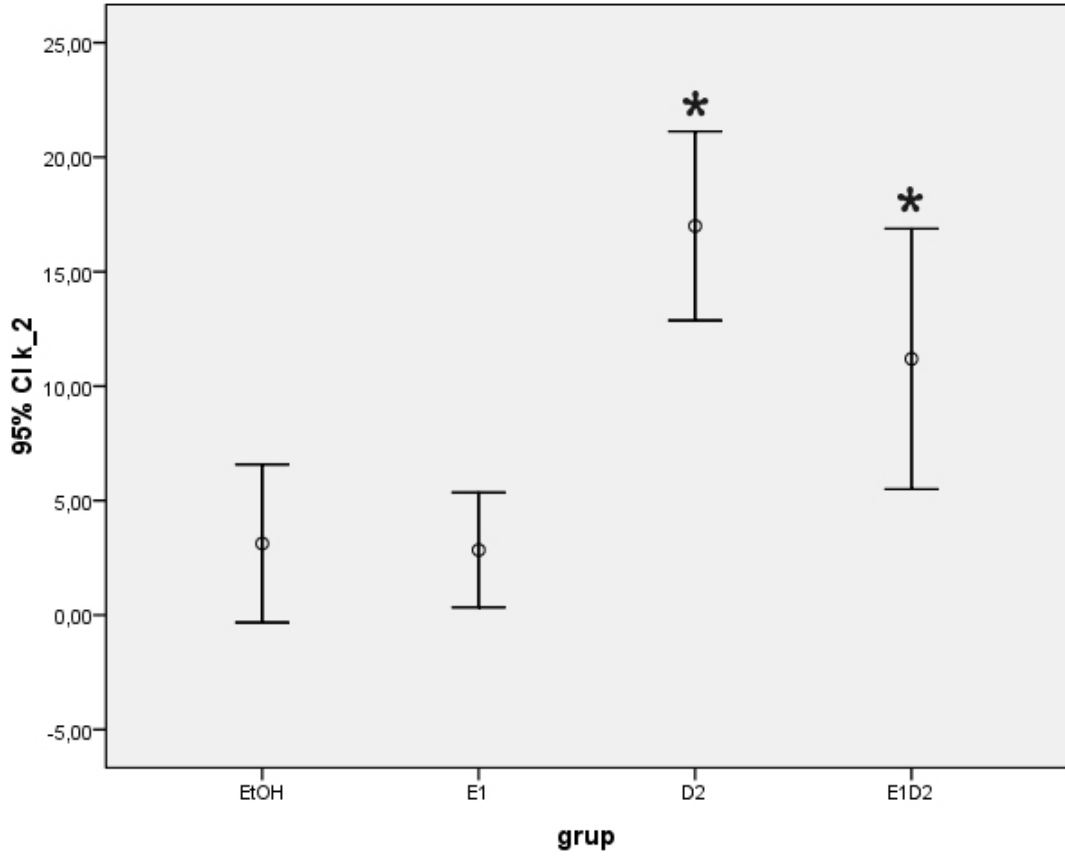
Şekil 4.13. Etanol ile 1 nM vitamin D3 (D1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 100 nM vitamin D3 (D3) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması. Asterisk: anlamlı fark çıkan gruplar.

Etil alkol grubu ile 1 nM östradiol, 1 nM vitamin D3 ve 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3 gruplarının apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. Yalnızca 1 nM vitamin D3 grubunda etanole göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı (Şekil 4.14) ($p < 0,05$).



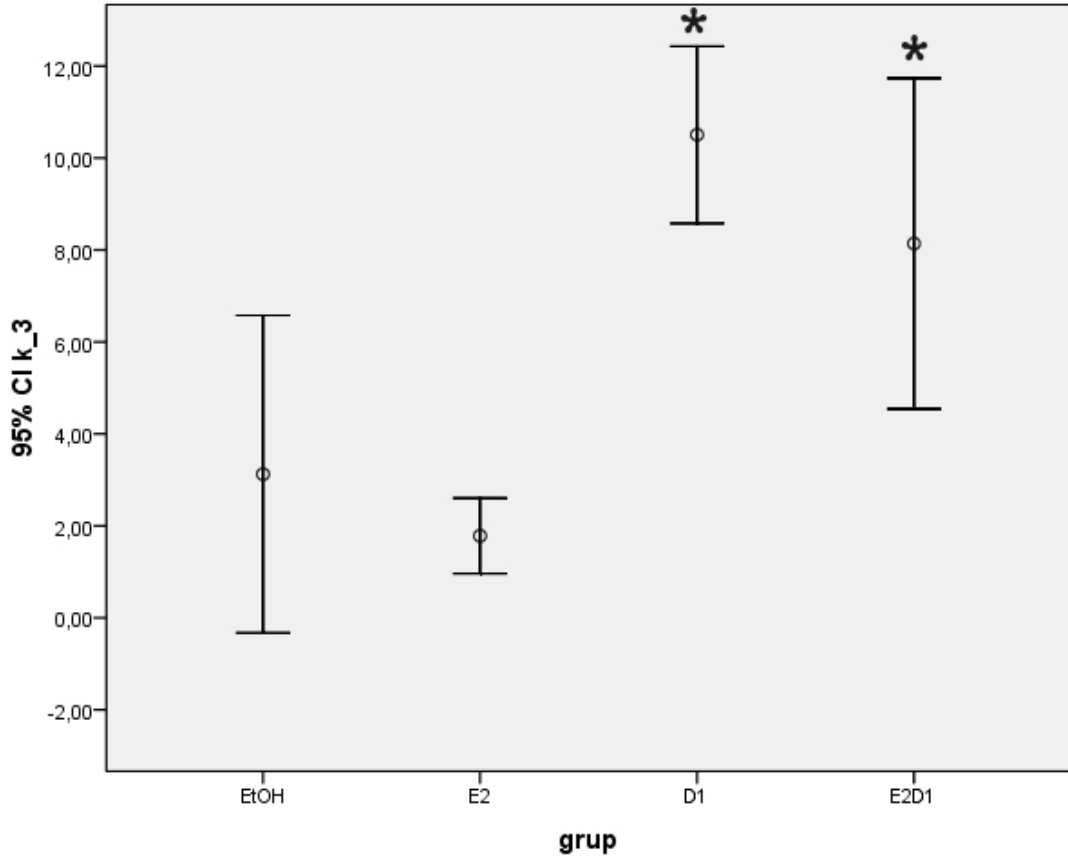
Şekil 4.14. Etanol ile 1 nM östradiol (E1), 1 nM vitamin D3 (D1) ve 1 nM östradiol+1 nM vitamin D3 (E1D1) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması.

Etil alkol grubu ile 1 nM östradiol, 10 nM vitamin D3 ve 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3 gruplarının apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. 10 nM vitamin D3 ve 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3 gruplarında etanole göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı (Şekil 4.15) ($p < 0,05$).



Şekil 4.15. Etanol ile 1 nM östradiol (E1), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 1 nM östradiol+10 nM vitamin D3 (E1D2) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması. Asterisk: Anlamli fark çıkan gruplar.

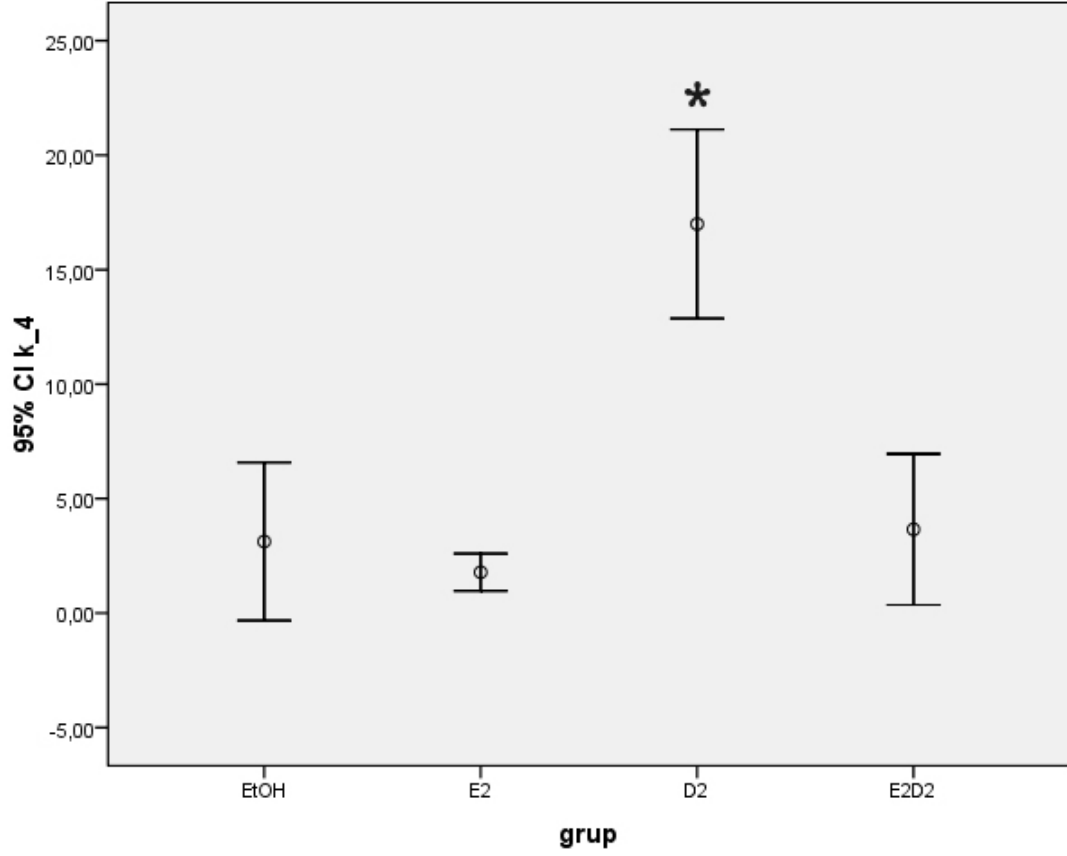
Etıl alkol grubu ile 10 nM östradiol, 1 nM vitamin D3 ve 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3 gruplarının apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. 1 nM vitamin D3 ve 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3 gruplarında etanole göre istatistiksel olarak anlamli artış vardı (Şekil 4.16) ($p < 0,05$).



Şekil 4.16. Etanol ile 10 nM östradiol (E2), 1 nM vitamin D3 (D1) ve 10 nM östradiol+1 nM vitamin D3 (E2D1) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması. Asterisk: Anlamli fark çıkan gruplar.

Etil alkol grubu ile 10 nM östradiol, 10 nM vitamin D3 ve 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 gruplarının apoptotik indeksleri karşılaştırıldı. Yalnızca 10 nM vitamin D3 grubunda etanole göre istatistiksel olarak anlamlı artış vardı (Şekil 4.17) ($p < 0,05$).

İstatistiksel veriler vitamin D3'ün dozundaki artışa bağlı olarak düz kas hücrelerindeki apoptotik indeksin arttığını ve kombine uygulanan östradiolün bu apoptotik indeks artışını yavaşlatabildiği veya durdurabildiğini göstermektedir.



Şekil 4.17. Etanol ile 10 nM östradiol (E2), 10 nM vitamin D3 (D2) ve 10 nM östradiol+10 nM vitamin D3 (E2D2) gruplarının apoptotik indekslerinin karşılaştırılması. Asterisk: Anlamlı fark çıkan gruplar.

5. TARTIŞMA

DNA metilasyonu gen ekspresyonunu düzenleyen majör mekanizmalardan bir tanesidir. Genlerin düzenleyici elementleri içinde yer alan metillenmemiş sitozinler sıklıkla aktif olarak transkripsiyona uğrayan genlere karşılık gelirken, sitozin metilasyonu gen aktivitesini baskılama ya da azaltma işlevi görmektedir (33, 34). Ateroskleroz, intimaya vasküler düz kas hücre göçü ve proliferasyonu ile genom ve gen ekspresyonunda çeşitli değişikliklerin gözlemlendiği bir bozukluktur (15). İntimada fenotipik modülasyona uğrayan vasküler düz kas hücrelerinin dediferansiyasyonlarını genomik seviyede açıklayan pek fazla çalışma bulunmamaktadır. Vasküler düz kas hücre proliferasyonunun önemli düzenleyicilerinden biri de östrojendir (46). ER- α ve β genleri promotör bölgelerinde klasik CpG adalarına sahip olmaları ve östrojenik kardiyovasküler protektif etkilerin potansiyel düzenleyicileri olmaları yönüyle aterosklerozda gözlenen epigenetik değişikliklerin çalışılmasında önem taşırlar (46-49). Önceki çalışmalar aterosklerotik dokularda öncelikli olarak ER- α nın epigenetik düzenlemelerine yönelmiştir (49). Kardiyovasküler aterosklerotik dokularda ve *in vitro* ortamda, vasküler fonksiyonda önemli olduğu bilinen östrojen reseptör β genindeki DNA metilasyon dinamiklerinin incelendiği bir çalışmada, araştırmacılar östrojen reseptör- β metilasyonunun aterosklerotik plak alanlarında daha yüksek oranda olduğunu rapor etmişlerdir (48). Ying ve arkadaşları *in vitro*, *in situ* ve eksplant kültür ortamlarında aortik düz kas hücrelerinde ER- α 'nın metilasyon paternini moleküler seviyede araştırmışlardır (47). Çalışmalarının sonucunda *in situ* ortamda yani kontraktıl fenotipteki vasküler düz kas hücrelerinde ER- α promotör bölgesinde metilasyon gözlenmezken, *in vitro* ortamda yani proliferatif fenotipte metilasyon seviyesinde artış rapor etmişlerdir. Sonuçta, ER- α metilasyonu proliferasyonla doğru orantılı olarak artıyorsa, östrojen konsantrasyonlarındaki artış sonucu östrojen reseptörlerindeki metile bölgelerin demetile olması yani aktif bir şekilde transkripsiyona uğraması beklenir. Bu da östrojenin vasküler düz kas hücrelerindeki anti-proliferatif etkisini destekler niteliktedir. Ayrıca östrojen reseptörlerindeki metilasyon oranının artışı, vasküler yaşlanma ile de ilişkilendirilmektedir. Post ve arkadaşları yaşla beraber aterogenez oluşumu ve ateroskleroz görülme oranlarındaki artışı, ER- α 'daki

metilasyonun artışıyla ilişkilendirmişlerdir (46). Bu çalışma gösteriyor ki, metilasyon artışıyla, östrojen reseptörlerindeki transkripsiyonel baskılanma, östradiolün reseptör aracılı kardiyoprotektif etkilerinin engellenmesinde rol oynuyor olabilir. Çalışmamızda, ER- α ve β ekspresyonlarında gruplar arasında fark saptayamadık. Post ve arkadaşlarının çalışmalarından farklı olarak elde ettiğimiz bu bulguların nedeni çalışmamızın *in vitro* koşullarda yapılmış olmasından kaynaklanıyor olabilir. Kullandığımız faktörlerin *in vivo* olarak da kurgulanmış benzer çalışmalarda sınanması ve daha kantitatif analiz yöntemleriyle değerlendirilmesinin yararlı olacağı kanaatine ulaştık.

DNA metiltransferaz enzimlerinin işlev gördükten sonraki son ürünleri 5-mC (5-metilsitozin) belirteciyle gösterilmektedir. 5-mC bir genin promotör bölgesindeki CpG adalarında sitozin bazının metillenmiş karbon atomuna karşılık gelir ve stabil ve uzun-sürelili transkripsiyonel susturmayı gösterir (33). Hiltunen ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmalarında insan arterlerindeki farklı aterosklerotik lezyonlar ile normal arterleri 5-mC düzeyi açısından incelemişlerdir. Araştırmalarının sonucunda *in vitro* ortamda 5-mC düzeyinde birkaç replikasyon sonrası bir azalma gözlemlenmesine rağmen, hastalığın erken dönemlerinde *in vivo* 5-mC seviyesinde herhangi bir azalma rapor etmemişlerdir ve bu sonucu erken döneme kıyasla geç dönem lezyonlarında düz kas hücre proliferasyonunun ciddi derecede artmasıyla yani hipometilasyonun geç dönemde görülme olasılığıyla ilişkilendirmişlerdir (51). Bizim çalışmamızda aterosklerozda görülen fenotipteki vasküler düz kas hücrelerinde DNA metilasyonu DNA metiltransferaz enzimlerinin ekspresyonu aracılığıyla incelenmiştir ve DNMT1 açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır. Düşük doz vitamin D3 ve orta doz kombine gruplarda DNMT3a ekspresyonlarında zamana bağlı olarak artış gözlenmiştir. Bu gruplarda DNMT3a açısından anlamlı fark bulunması, hücrelerdeki sürdürme metilasyonu stabil kalırken, *de novo* metilasyonun işlevinin devam ettiğini göstermektedir ve bu metilasyon paterninin hormonal olarak düzenleniyor olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanı sıra aortik düz kas hücrelerindeki ER- α ve β proteinlerinin sentezinden sorumlu genlerin promotör bölgelerinde 5-mC için herhangi bir inceleme yapmadık. Bu parametrenin yer almaması çalışmamızdaki eksikliklerden birisidir ve ilerideki çalışmalarımızda dahil edilmesi planlanmaktadır.

Literatürde *in vivo* östrojen uygulamasının, hasar ile indüklenmiş arteriyel intimal hiperplaziyi, vasküler düz kas hücre proliferasyonunu durdurma yoluyla baskıladığını gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Kolesterol ile beslenen ve aortlarında kateter hasarı oluşturulmuş tavşanlarda yaptıkları çalışmalarında Holm ve arkadaşları, östradiolün hasar görmemiş aort kısımlarında intimal kalınlaşma ve kolesterol akümülyasyonunu önemli derecede baskıladığını ancak hasarlı kısımlarda anti-aterojenik etkilerinin engellendiğini göstermişlerdir (109). Bu yönüyle östradiolün etkilerinin vaskülatürdeki lokal çevresel değişimlerden etkilendiğini söylemek mümkündür. Ayrıca, manşon ile uyarılmış rat femoral arterleriyle yaptıkları çalışmada Akishita ve arkadaşları dişilerde oluşan intimal kalınlaşmanın erkeklere oranla çok daha az olduğunu ve ovarektomize dişilerde ise, erkeklerdekine yakın oranda olduğunu göstermişlerdir (110). Ek olarak bu hayvanlardan elde edilen vasküler düz kas hücrelerini 17β -östradiolün değişen konsantrasyonlarıyla (1-100 nmol/l) kültüre ettiklerinde vasküler düz kas hücre göçü ve çoğalmasının kontrol gruplarına göre azaldığını rapor etmişlerdir (110). Buna rağmen *in vitro* çalışmaların bazıları östrojenin vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon ve migrasyonu arttırdığını öne sürerken bazıları bu hücrelerdeki apoptozu indüklediğini öne sürmektedir. Östrojen yoksunu hayvan modeli olarak kullanılan aromataz-knockout farelerle yapılan çalışmalarında Ling ve arkadaşları bu farelerden izole edilerek kültüre edilen vasküler düz kas hücrelerinin proliferatif kapasitelerinin çok daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma endojen östrojenlerin vasküler duvar homeostazında gerekli olan normal vasküler düz kas hücre proliferatif kapasitesinin korunmasındaki önemini açığa çıkarmaktadır (111). Song ve arkadaşları 17β -östradiolün *in vitro* ortamda, tavşan aortik düz kas hücrelerinin fenotipik modülasyonu ve proliferasyonuna olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, 17β -östradiol uygulanmış grupların kontrol gruplarına kıyasla kontraktıl fazdan sentetik/proliferatif faza geçişlerinin ciddi şekilde yavaşladığını, çünkü bu hücrelerde sessiz (G0) fazın çok daha uzun sürdüğünü gözlemlemişlerdir (78). Kültüre edilmiş düz kas hücreleri 2. ve 3. pasajlardan sonra kontraktıl özelliklerini tamamen kaybederek sentetik özellik kazanırlar. Bu durumda P2 ve P3 hücreleri kullanıldığı zaman 17β -östradiol antiproliferatif özelliğinden sıyrılarak replikasyonu tetikleyici özellik kazanır. Saito ve arkadaşları östradiolün allograftlarda insülin-benzeri büyüme faktörü ile indüklenmiş düz kas hücre proliferasyonunu tamamen durdurduğunu, ancak normal aortlarda böyle bir etkisi olmadığını göstermelerine rağmen bu çalışmada

fizyolojik koşulların çok üstünde olan 1 mM östradiol konsantrasyonu kullanmışlardır (77). Güncel çalışmalar östradiolün proliferatif veya anti-proliferatif etkilerinin konsantrasyon bağımlı olduğunu göstermektedir. Fizyolojik koşullarda 10^{-8} M en yüksek plazma östradiol konsantrasyonudur. Song ve arkadaşları 10^{-8} M'dan yüksek konsantrasyonlarda östradiolün büyüme indükleyici etkilerinin azaldığını rapor etmişlerdir (78). Ayrıca, Zhang ve arkadaşları bunun altındaki değerlerde östradiolün vasküler düz kas hücrelerinde büyüme indükleyici etkisi olduğunu ancak bu değerlerin üstündeki konsantrasyonlarda büyümeyi durdurucu etkisi olduğunu rapor etmişlerdir (112). Çalışmamızda 1 nM, 10 nM ve 100 nM konsantrasyonlardaki östradiolün vasküler düz kas hücrelerinde proliferasyon ve apoptoz dinamiklerine olan etkisi incelenmiştir. Önceki çalışmaların aksine bizim çalışmamızda bu üç farklı östradiol konsantrasyonu her iki hücresel olayda da anlamlı bir fark göstermemiştir. Elde ettiğimiz sonuçların literatürdeki bulgularla çelişiyor olmasının sebepleri, kullanılan östradiol konsantrasyonlarının farklılığı, bazı çalışmaların in vivo koşullarda yapılmış olması veya kullanılan hücre tipi veya pasaj sayısının değişkenliğinden kaynaklanıyor olabilir.

Vitamin D nin vasküler fonksiyonda ve ateroskleroz gelişim sürecinde etkili olduğuna dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Vitamin D reseptörleri vasküler düz kas hücreleri (113), makrofajlar (114) ve lenfositleri (115) içeren yaygın bir doku dağılımına sahiptir. Düz kas hücrelerinin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ için yüksek afiniteye sahip reseptörleri eksprese etmeleri arter duvarının vitamin D'nin hedefi olabileceğini düşündürmektedir (115). Vitamin D nin vasküler duvar büyümesinde önemli bir düzenleyici olduğunu savunan raporlar, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün düz kas hücrelerinde [^3H]-timidin alımını baskıladığını (113) veya stimüle ettiğini (94, 106) öngörmektedir. Vitamin D'nin insan vasküler hücrelerinin büyümesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarında Somjen ve arkadaşları vitamin D analoglarının düz kas hücrelerinde ve endotelial hücrelerde büyümeyi durdurucu etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir (116). Vasküler düz kas hücreleri ve endotelial hücreler $25(\text{OH})_2\text{D}$ 'yi $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye dönüştüren $1-\alpha$ hidroksilaz enzimine sahiptirler (117). Vasküler düz kas hücrelerinde trombus oluşumunu, hücre adezyonunu ve hücre proliferasyonunu önlemeye yardımcı olan prostasiklin vitamin D tarafından indüklenir (118). Vitamin D ayrıca, arter duvarındaki vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), matriks metalloproteinaz 9 (MMP9), myozin ve kollajen gibi pek çok farklı protein ekspresyonunun düzenlenmesinden de

sorumludur (119). Vitamin D *in vivo* ortamda yüksek dozlarda alındığında hiperkalsemi ve kalsiyum alımında artışa yol açarak vasküler duvarda zararlı etkilere sebep olabilir ancak, uygun konsantrasyonlarda, ateroskleroz gibi durumların açığa çıkmasını engelleyici ya da bu durumları iyileştirici vasküler protektif bir ajan olarak düşünülebilir (120). Farelerde vitamin D, renin-anjiyotensin sisteminin bir inhibitörüdür ve vitamin D reseptöründen yoksun fareler kardiyak hipertrofi geliştirirler. Vitamin D'nin aktif formunun yıkımından sorumlu vitamin-D-24-hidroksilaz enzim ekspresyonuna sahip transgenik sıçanlarla yaptıkları çalışmada Kasuga ve arkadaşları bu hayvanlarda aortik ateroskleroz gelişimi ve hiperlipidemi rapor etmişlerdir (121). Vitamin D aynı zamanda pro ve anti-fibrotik faktörlerin salınımını düzenleyici role sahiptir (123). Vasküler düz kas hücreleri inflamatuvar yanıt faktörü olarak bilinen plazminojen aktivatör inhibitör-1 faktörünü üretirler ve bu faktör tromboz ve ateroskleroz riskinin artmasıyla ilişkilendirilmektedir (123). İnsan koroner arterleri düz kas hücrelerinde aktif vitamin D analogları olan kalsitriol ve parikalsitol uygulamasının etkilerini *in vitro* inceleyen çalışmalarında Wu-Wong ve arkadaşları plazminojen-aktivatör inhibitör-1 in mRNA ekspresyonlarının doz-bağımlı olarak düzenlendiğini rapor etmişlerdir (124). İleride yapmayı planladığımız devam çalışmalarında, düz kas hücreleri üzerine vitamin D3'ün pro ve anti-fibrotik etkilerinin analiz edilmesi amacıyla plazminojen aktivatör inhibitör-1 faktörünün yanı sıra ateroskleroz ya da tromboza yol açabilen diğer faktörlerin de değerlendirilmesi ve ilişkili epigenetik süreçlerin tanımlanması klinik açıdan yararlı bilgiler üretecektir.

Normal dokularda vitamin D apoptozu arttırarak hücre proliferasyonunu düzenlemede görev alır. Örneğin meme dokusunda gebelik ve emzirme gibi farklı fizyolojik aşamalarda vücudun ihtiyacına göre apoptozu düzenlemektedir (125). Meme kanseri hücrelerinde Bcl2 ile Bax proteinleri arasındaki iletişim yoluyla apoptozu indükler (126). Ayrıca vitamin D analogu olan kalsitriolün renal-interstisyel fibroz sürecini inhibe etmek üzere renal-interstisyel miyofibroblastik büyümeyi engellediği gösterilmiştir (127). Kardiyak sistemde ise anjiyogenezi inhibe ederek tumor nekroz faktör ve interlökinler gibi inflamatuvar sitokinlerin sentezini kısıtladığı bilinmektedir (128). Vitamin D yoksunluğu hipertansiyon, miyokard infarktüsü ve ateroskleroz gibi pek çok kardiyovasküler hastalıkla ilişkilidir (129) ve antiapoptotik proteinleri baskılama yoluyla hücre matürasyonu, diferansiyasyonu ve apoptozunda majör rol oynamaktadır

(130). Bu bilgilerin aksine yenidoğan sıçanlardan izole ettikleri vasküler düz kas hücrelerine 1-100 nM aralığındaki değerlerde kalsitriol uygulayan Tukaj hiçbir dozda apoptoz gözlenmediğini, aksine ara dozlarda proliferasyon oranının daha fazla arttığını göstermiştir (131). Çalışmamızda sıçan aortik düz kas hücrelerinde sırasıyla 1nM, 10nM ve 100nM 1,25 α -Dihidroksi vitamin D3'ün proliferasyon ve apoptoz dinamiklerine etkisini inceledik ve vitamin D3'ün doza bağlı olarak apoptozu uyardığını belirledik. Literatürde bildirilen etkilerle çelişen bulgularımız, kullandığımız vitamin D3 dozu, *in vitro* kullanılmış olması, kullanılan hücrelerin pasaj sayısı ve alındığı canlı türü gibi faktörlere bağlı olabilir.

1,25 α -Dihidroksi vitamin D3 ün düz kas hücrelerindeki antiproliferatif etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur ancak moleküler temeli üzerine varolan bulgular son derece kısıtlıdır (113, 115). Carthy ve arkadaşları, 1,25 α -Dihidroksi vitamin D3 uygulanmış rat vasküler düz kas hücrelerinde, epidermal büyüme faktörü ve endotelin moleküllerinin, hücrelerdeki hücre siklusunu düzenleyen siklin-bağımlı kinaz 2 aktivitesini azaltarak proliferasyonu engellediğini rapor etmişlerdir (113). Bunun yanı sıra, kültüre edilen vasküler düz kas hücrelerinin çalışıldığı bir araştırmada endotel hücrelerine serum starvasyonu uygulanarak stres oluşturulmuş ve bu hücrelerin ürettikleri koşullandırılmış medyum vasküler düz kas hücrelerine verilmiştir. Bu medyuma ayrıca fizyolojik dozlarda, kalsitriol ve parikalsitol eklenmiştir. Sonuçta, ekstraselüler-sinyal-düzenleyici kinaz 1/2 fosforilasyonu aracılığıyla vitamin-D bağlayıcı protein aktivitesinin azalarak vasküler düz kas hücre proliferasyon ve migrasyonunu engellediği belirlenmiştir (132). Koh ve arkadaşları ise, ratlarda 1,25(OH)₂D₃ reseptörlerinin koroner arter düz kas hücrelerinde varlığını göstermişlerdir ve doza bağımlı olarak bu hücrelerin proliferasyon dinamiklerinin değiştiğini kaydetmişlerdir (98). Çalışmalarında ayrıca artan dozlarda vitamin D3'ün düz kas hücrelerindeki vitamin D reseptörlerini upregüle ederek proliferasyonu stimüle ettiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda östradiol ve vitamin D3'ün düz kas hücre proliferasyonu üzerine olası etkileri gerçek zamanlı hücre analiz sistemiyle değerlendirildi. Yapılan analizlerde bu maddelerin hücre proliferasyonunda anlamlı bir fark ortaya çıkarmadığı görüldü. Bu durumun olası nedenleri olarak bu maddelerin proliferasyonu etkileyebilmek için başka faktörlerin varlığına gerek duyuyor olabileceği düşünüldü. Hücrelerin *in vivo* şartlarda var olan parakrin faktörler, diğer

hücrelerle olan sinyal ilişkileri, başka hormon, vitamin, sitokin ve büyüme faktörü gibi çevresel etmenlerden yoksun olması da bu farklılığa neden olabilir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamıza ait sonuçlar aşağıdaki gibidir;

1. 17β -östradiolün farklı konsantrasyonlarının (1 nM, 10 nM ve 100 nM) *in vitro* ortamda sıçan aortik düz kas hücrelerinin proliferasyon dinamiklerine etkisi gerçek zamanlı hücre analizi yöntemiyle araştırılmış ancak bu hücrelerde proliferasyonu arttırıcı ya da azaltıcı etkileri saptanamamıştır.
2. Benzer şekilde $1,25\alpha$ -Dihidroksi vitamin D₃' ün farklı konsantrasyonlarının (1 nM, 10 nM ve 100 nM) *in vitro* ortamda sıçan aortik düz kas hücrelerinin proliferasyon dinamiklerine etkisi gerçek zamanlı hücre analizi yöntemiyle araştırılmış ancak bu hücrelerde proliferasyonu arttırıcı ya da azaltıcı etkileri saptanamamıştır.
3. Bu iki hormonun birbirlerini indükleyebileceğini ve etkilerini arttırabileceğini düşündüğümüz kombine gruplarda da gerçek zamanlı hücre analizi yöntemiyle anlamlı bir mitojenik veya anti-mitojenik etki bulunamamıştır. İlaç veya hormon uygulaması için *in vitro* ortamda hücrelerin bölünme siklusunu senkronize etmek amacıyla starvasyon medyumu uygulanması daha tutarlı ve güvenilir sonuçlar elde edilmesine yardımcı olabilir. Ayrıca bu çalışmanın *in vivo* olarak da tekrarlanması düşünülmektedir. Böylece bu hormonların hücre kültürü ortamında bulunmayan faktörlerin varlığında etkilerinin değerlendirilmesi de mümkün olacaktır.
4. Çalışmamızda ER- α ve β ekspresyonları immünofloresan işaretleme tekniğiyle gösterilmiştir ancak işaretlenme yoğunluklarının H-skorları anlamlı bir sonuç vermemiştir. Tüm gruplarda östrojen reseptörleri benzer işaretlenme yoğunluğuna sahiptir. Ayrıca gruplarımız metilasyon dinamiklerini karşılaştırabilmek için DNMT1 ve 3a enzimleri için immünofloresan yöntemle işaretlenmiş ve DNMT1 için östrojen reseptörleri işaretlemesine benzer şekilde anlamlı bir fark bulunamamıştır. DNMT3a işaretlemelerinin bazı gruplarda anlamlı bir şekilde azalmış olması bu hücrelerdeki *de novo* metilasyon paternlerinin çevresel etmenlerle değişiyor olduğunu düşündürmektedir.

5. Çalışma gruplarımızda kaspaz-3 işaretlemesi sonucunda elde ettiğimiz apoptotik indeksler vitamin D3'ün doz-bağımlı apoptotik etkilerinin varlığını göstermektedir. Artan dozlarda vitamin D3'ün *in vitro* ortamda düz kas hücrelerinde gözlenen apoptotik etkisi *in vivo* ortamda aterosklerozdaki düz kas hücreleri üzerinde de gözleniyor olabilir. Aynı zamanda vitamin D3'ün bu apoptotik etkilerinin kombine gruplarda azaldığı bulgusu östradiolün vitamin D3'e zıt çalıştığını veya vitamin D3'ün zararlı etkilerini kompanse edebildiğini göstermektedir. Yine bu sonuçların da *in vivo* çalışmalarla doğrulanması yararlı olacaktır.
6. Yaptığımız çalışmanın devamında farklı konsantrasyonlar ve *in vivo* çalışmalarla daha ileri düzeyde analizler yapılması planlanmaktadır. Ayrıca çalışmamızda bir eksiklik olarak özellikle düz kas hücrelerinde fenotipik modülasyonla ilişkili östradiol ve/veya vitamin D3 tarafından düzenlenen gen bölgelerinin ve inflamatuvar yanıt ilişkili faktörlerdeki promotör bölgelerindeki epigenetik değişimlerin incelenmesi ve daha detaylı bir şekilde anlaşılabilmesi için moleküler genetik analizlerin de çalışmaya dahil edilmesi yararlı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. **Schwartz SM, Mecham RP.** Development of the Vessel Wall: Overview. Schwartz, SM, Mecham, RP. Eds. *The vascular smooth muscle cell: molecular and biological responses to the extracellular matrix*, 1st Ed. United Kingdom: Academic Press, **1995**: 1-10.
2. **Nofer JR.** Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems. *Journal of Molecular Endocrinology*, **2012**; 48: R13–R29.
3. **Gangula P, Dong YL, Al-Hendy A, Richard-Davis G, Valerie MR, Haddad G, Millis R, Nicholas SB, Moseberry D.** Protective cardiovascular and renal actions of vitamin D and estrogen. *Front Biosci (Schol Ed)*, **2013**; 5: 134–148.
4. **Baxter GS, Clayton JK, Coleman RA, Marshall K, Sangha R, Senior J.** Characterization of the prostanoid receptors mediating constriction and relaxation of human isolated uterine artery. *Br. J. Pharmacol.*, **1995**; 116: 1692–1696.
5. **Jones RL, Qian YM, Chan KM, Yim AP.** Characterization of a prostanoid EP3-receptor in guinea-pig aorta: partial agonist action of the non-prostanoid ONO-AP-324. *Br. J. Pharmacol.*, **1998**; 125: 1288–1296.
6. **Jackson SM, Parhami F, Xi XP, Berliner JA, Hsueh WA, Law RE, Demer LL.** Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial interaction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1999**; 19: 2094–2104.
7. **Wakino, S, Law, RE., Hsueh, WA.** Vascular protective effects by activation of nuclear receptor PPAR γ . *J. Diabetes Complications*, **2002**; 16: 46–49.
8. **Artaza JN, Mehrotra R, Norris KC.** Vitamin D and the Cardiovascular System. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, **2009**; 4: 1515-22.

9. **Jin B, Li Y, Robertson KD.** DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy? Esteller M, ed. *Genes & Cancer*. 2011;2(6):607-617.

10. **Alexander MR, Owens GK.** Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. *Annu. Rev. Physiol*, **2012**; 74: 13–40.

11. **Moncada S, Herman AG, Higgs EA, Vane JR.** Differential formation of prostacyclin (PGX or PGI₂) by layers of the arterial wall. An explanation for the anti-thrombotic properties of vascular endothelium. *Thromb Res*, **1977**; 11: 323–44.

12. **Peterson S, Peto V, Rayner M.** European Cardiovascular Disease Statistics, British Heart Foundation, London, **2005**.

13. **Allender S, Peto V, Scarborough P, Kaur A, Rayner M.** Coronary Heart Disease Statistics, British Heart Foundation, London, **2005**.

14. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **1993**; 362, 801–809.

15. **Ross R, Glomset J, Harker L.** Response to injury and atherogenesis. *Am. J. Pathol.*, **1977**; 86, 675–684.

16. **Shishehbor MH, Bhatt DL.** Inflammation and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, **2004**; 6(2):131-9.

17. **Doran AC, Meller N, McNamara CA.** Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, **2008**; 28(5): 812-819.

18. **Newby AC, Zaltsman AB.** Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation migration and matrix formation. *Cardiovasc Res*, **1999**; 41(2): 345-60.

19. **Libby P.** Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, 2002; 420: 868–874.
20. **Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR.** Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev*, 2004; 84(3): 767-801.
21. **Kawai-Kowase K.ve Owens GK.** Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007; 292(1): C59-C69.
22. **Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M.** Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves. *Am J Pathol.*, 1986;123(1):109-25.
23. **Weber C, Noels H.** Atherosclerosis: Current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med.*, 2011;17:1410–1422.
24. **Hansson GK, Hermansson A.** The immune system in atherosclerosis. *Nat. Immunol.*, 2011; 12: 204–212.
25. **Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.*, 2006;12:1075–1080.
26. **Van Vre EA, Ait-oufella H, Tedgui A, Mallat Z.** Apoptotic cell death and efferocytosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:887–893.
27. **Martinet W, Schrijvers DM, De Meyer GR.** Pharmacological modulation of cell death in atherosclerosis: A promising approach towards plaque stabilization? *Br J Pharmacol.*, 2011; 164:1–13.
28. **Scull CM, Tabas I.** Mechanisms of ER stress induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 2011;31:2792–2797.

29. **Pollman M.J, Hall J.L, Mann M.J, Zhang L Gibbons G.H.** Inhibition of neointimal cell Bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nat Med.* **1998**; 4:222–227.
30. **Wang BY, Ho HK, Lin PS, Schwarzacher SP, Pollman MJ, Gibbons GH, Tsao PS, Cooke JP.** Regression of atherosclerosis: Role of nitric oxide and apoptosis. *Circulation*, **1999**; 99:1236–1241.
31. **Monk, M, Boubelik M, Lehnert S.** Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development*, **1987**; 99, 371–382.
32. **Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter, J.** Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol.*, **2000**; 10: 475–478.
33. **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *GenesDev*, **2002**; 16, 6–21.
34. **Antequera,F.** Structure,functionand evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*, **2003**; 60: 1647–1658.
35. **Tost J.** *Epigenetics*, Norwich, UK: Horizon Scientific Press, **2008**.
36. **Klose RJ, Bird AP.** Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci*, **2006**; 31: 89–97.
37. **Cheng X, Blumenthal RM.** Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*, **2008**;16(3):341-50.
38. **Collas P, Noer A, Timoskainen S.** Programming the genome in embryonic and somatic stem cells. *J Cell Mol Med*, **2007**: 11b:602–620
39. **Napoli C, Glass CK, Witztum JL, Deutsch R, D’Armiento FP, Palinski W.** Influence of maternal hypercholesterolaemia during pregnancy on progression of early atherosclerotic lesions in childhood: fate of early lesions in children (FELIC) study. *Lancet*, **1999**; 354:1234–1241

40. **Weaver IC, Champagne FA, Brown SE, Dymov S, Sharma S, Meaney MJ, Szyf M.** Reversal of maternal programming of stress responses in adult offspring through methyl supplementation: altering epigenetic marking later in life. *J Neurosci*, **2005**; 25(47):11045–11054
41. **Weaver IC, Meaney MJ, Szyf M.** Maternal care effects on the hippocampal transcriptome and anxiety-mediated behaviors in the offspring that are reversible in adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2006**; 103(9):3480–3485
42. **Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, Yu W, Rongione MA, Ekström TJ, Harris TB, Launer LJ, Eiriksdottir G, Leppert MF, Sapienza C, Gudnason V, Feinberg AP.** Intraindividual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA*, **2008**; 299(24):2877–2883
43. **Yamamura H., Masuda H., Ikeda W., Tokuyama T., Takagi M., Shibata N., Tatsuta M., Takahashi K.** Structure and expression of the human SM22alpha gene, assignment of the gene to chromosome 11, and repression of the promoter activity by cytosine DNA methylation. *J Biochem*, **1997**; 122(1):157–167
44. **Chan GC, Fish JE, Mawji IA, Leung DD, Rachlis AC, Marsden PA.** Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J Immunol*, **2005**; 175(6):3846–3861
45. **Wilcox JN1, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA.** Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **1997**; 17(11):2479–2488
46. **Post WS1, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP.** Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*, **1999**; 43(4):985–991
47. **Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, Smiraglia DJ, Issa JJ., Michler RE, Caligiuri M, Plass C, Goldschmidt-Clermont PJ.** Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells, *Cardiovasc. Res.* **2000**; 46: 172-179.

48. **Matouk CC, Marsden PA.** Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression. *Circ Res*, **2008**; 102:873–887
49. **Kim J, Kim JY, Song KS, Lee YH, Seo JS, Jelinek J, Goldschmidt-Clermont PJ, Issa JP.** Epigenetic changes in estrogen receptor beta gene in atherosclerotic cardiovascular tissues and in-vitro vascular senescence. *Biochim Biophys Acta*, **2007**; 1772(1):72–80
50. **Wilson VL, Jones PA.** DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science*, **1983**; 220(4601):1055–1057
51. **Hiltunen MO1, Turunen MP, Häkkinen TP, Rutanen J, Hedman M, Mäkinen K, Turunen AM, Aalto-Setälä K, Ylä-Herttuala S.** DNA hypomethylation and methyltransferase expression in atherosclerotic lesions. *Vasc Med*, **2002**; 7(1):5–11
52. **Lund G, Andersson L, Lauria M, Lindholm M, Fraga MF, Villar-Garea A, Ballestar E, Esteller M, Zaina S.** DNA methylation polymorphisms precede any histological sign of atherosclerosis in mice lacking apolipoprotein E. *J Biol Chem*, **2004**; 279(28):29147–29154
53. **Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschöpe C.** Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Progress in Cardiovascular Diseases*, **2007**; 49: 241–51 .
54. **Regitz-Zagrosek V.** Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2006**; 5: 425 – 239 .
55. **Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC.** Production and actions of estrogens. *New England Journal of Medicine*, **2002**; 346: 340–52 .
56. **O’Connell MB.** Pharmacokinetic and Pharmacologic Variation Between Different Estrogen Products. *Journal of Clinical Pharmacology*, **1985**; 35:185-245.
57. **Yager JD.** Endogenous estrogens as carcinogens through metabolic activation. *J Natl Cancer Inst Monogr*, **2000**; 27: 67-73.

58. **Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA.** "International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors". *Pharmacological Reviews*, **2006**; 58 (4): 773–81.
59. **Schwabe JW, Fairall L, Chapman L, Finch JT, Dutnall RN, Rhodes D.** The cocrystal structures of two zinc-stabilized DNA-binding domains illustrate different ways of achieving sequence-specific DNA recognition . *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, **1993**; 58: 141–7.
60. **Beato M, Herrlich P, Schutz G.** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, **1995**; 83(6): 851-7.
61. **Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, Mendelsohn ME, Anderson RG, Shaul PW.** Estrogen receptor alpha and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res*, **2000**; 87(11): p. E44-52
62. **Razandi M1, Pedram A, Greene GL, Levin ER.** Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol Endocrinol*, **1999**; 13(2): 307-19.
63. **Sullivan JM ve Fowlkes LP.** The clinical aspects of estrogen and the cardiovascular system. *Obstet Gynecol*, **1996**; 87: 36S-43S.
64. **Grohé C, Kahlert S, Löbber K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L.** Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors .*FEBS Letters*, **1997**; 416: 07–12 .
65. **Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrugg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V.** Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation*, **2004**; 110: 3270 –5.
66. **Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER.** Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. *Journal of Biological Chemistry*, **2006**; 281: 6760–7.

67. **Pelzer T, Schumann M, Neumann M, deJager T, Stimpel M, Serfling E, Neyses L.** 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2000**; 268:192–200 .
68. **Florian M1, Lu Y, Angle M, Magder S.** Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Steroids*, **2004**; 69: 637–45 .
69. **White RE, Darkow DJ, Lang JL.** Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research*, **1995**; 77: 936–42 .
70. **Martin-McNulty B, Tham DM, Da Cunha V, Jerrick J Ho, Dennis W Wilson, Rutledge JC, Deng GG, Vergona R, Sullivan ME, Wang YX.** 17beta-estradiol attenuates development of angiotensin II-induced aortic abdominal aneurysm in apolipoprotein E- deficient mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, **2003**; 23: 1627–32 .
71. **Tse J, Martin-McNulty B, Halks-Miller M, Kauser K, DelVecchio V, Vergona R, Sullivan ME, Rubanyi GM.** Accelerated atherosclerosis and premature calcified cartilaginous metaplasia in the aorta of diabetic male Apo E knockout mice can be prevented by chronic treatment with 17 beta – estradiol. *Atherosclerosis*, **1999**; 144: 303–13.
72. **Evans MJ, Eckert A, Lai K, Adelman SJ, Harnish DC.** Reciprocal antagonism between estrogen receptor and NF- k appaB activity *in vivo*. *Circulation Research*, **2001**; 89: 823–30.
73. **Schunkert H, Danser AH, Hense HW, Derkx FH, Kürzinger S, Riegger GA.** Effects of estrogen replacement therapy on the renin-angiotensin system in postmenopausal women. *Circulation*, **1997**; 95: 39–45.
74. **Proudler AJ, Ahmed AI, Crook D, Fogelman I, Rymer JM, Stevenson JC.** Hormone replacement therapy and serum angiotensin converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet*, **1995**; 346: 89–90.
75. **Morey AK1, Razandi M, Pedram A, Hu RM, Prins BA, Levin ER.** Oestrogen and progesterone inhibit the stimulated production of endothelin-1. *Biochemical Journal*, **1998**; 330: 1097–105.

76. **Dubey RK1, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M.** Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor -independent mechanism. *Hypertension*, **2001**; 37: 640–4.
77. **Saito S, Foegh ML, Motomura N, Lou H, Kent K, Ramwell PW.** Estradiol inhibits allograft-inducible major histocompatibility complex class II antigen expression and transplant arteriosclerosis in the absence of immunosuppression. *Transplantation*, **1998**; 66(11):1424–31.
78. **Song J, Wan Y, Rolfe BE, Campbell JH, Campbell GR.** Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. *Atherosclerosis*, **1998**; 140(1):97–104.
79. **Coleman, KM ve Smith CL.** Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci*, **2001**; 6: D1379-91.
80. **Holick MF.** Vitamin D: A millenium perspective. *Journal of Cellular Biochemistry*, **2003**; 88: 296-307.
81. **Haussler MR, Haussler CA, Bartik L, Whitfield GK, Hsieh JC, Slater S, Jurutka PW.** Vitamin D receptor: Molecular signaling and actions of nutritional ligands in disease prevention. *Nutr. Rev.*, **2008**; 66: S98–112.
82. **Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW.** Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1alpha,25(OH)vitamin D: Genomic and nongenomic mechanisms. *Best Pract. Res. Clin. En*, **2011**; 25: 543–559.
83. **Haussler MR, Whitfield GK, Haussler CA, Hsieh JC, Thompson PD, Selznick SH, Dominguez CE, Jurutka PW.** The nuclear vitamin D receptor: Biological and molecular regulatory properties revealed. *J. Bone Miner. Res*, **1998**; 13: 325–349.
84. **Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ.** Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders?. *QJM*, **2002**; 95(12):787-96.

85. **Burnett JR, Vasikaran SD.** Cardiovascular disease and osteoporosis: is there a link between lipids and bone? *Annals of Clinical Biochemistry*, **2002**; 39: 203-10.
86. **Schmermund A, Baumgart D, Gorge G, Gronemeyer D, Seibel R, Bailey KR, Rumberger JA, Paar D, Erbel R.** Measuring The Effect Of Risk-Factors On Coronary Atherosclerosis- Coronary Calcium Score Versus Angiographic Disease Severity. *Journal of American College of Cardiology*, **1998**; 31: 1267-73.
87. **Arad Y, Spadaro LA, Roth M, Scordo J, Goodman K, Sherman S, Lerner G, Newstein D Guerci AD.** Serum concentration of calcium, 1,25 vitamin D and parathyroid hormone are not correlated with coronary calcifications. An electron beam computed tomography study. *Coronary Artery Disease*, **1998**; 9: 513-8.
88. **Watson KE, Abrolat M, Malone LL, Hoeg JM, Doherty T, Detrano R, Demer LL.** Active serum vitamin D levels are inversely correlated with coronary calcification. *Circulation*, **1997**; 96: 1755-60.
89. **Linden V.** Vitamin D and myocardial infarction. *Br Med J*, **1974**; 3(5932): 647-650.
90. **Davies H.** Coronary heart disease. The significance of coronary pathology in infancy and the role of mitogens such as vitamin D. *Med Hypothesis*, **1989**; 30:179-185.
91. **Schmidt GH, Goosen J, Lindle F, Seidal D.** Serum 25 hydroxy cholecalciferol in myocardial infarction. *Atherosclerosis*, **1977**; 26: 55-58.
92. **Scragg R, Jackson R, Holdaway IM, Lim T, Beaglehole R.** Myocardial infarction is inversely associated with 25-dihydroxy Vitamin D levels. A community based study. *Int J Epidemiol*, **1990**; 19: 59-63.
93. **Pichler J, Gerstmayr M, Szepefalusi Z, Urbanek R, Peterlik M, Willheim M.** $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ Inhibits Not Only Th1 But Also Th2 Differentiation in Human Cord Blood T Cells. *Pediatric Research*, **2002**; 52(1): 12-8.

94. **Smith JK, Dykes R, Douglas JE, Krishnaswamy G, Berk S.** Long-term exercise and atherogenic activity of blood mononuclear cells in persons at risk of developing ischemic heart disease. *Journal of the American Medical Association*, **1999**; 281: 1722-7.
95. **Krishnaswamy G, Dube D, Counts M, Chi D.** Cytokines and the pathogenesis of atherosclerosis. In Mechanism of Cardiovascular Aging. *Elsevier Science*, **2002**;11: 79-126.
96. **Rajasree S, Rajpal K, Kartha CC, Sarma PS, Kutty VR, Iyer CS, Girija G.** Serum 25-hydroxyvitamin D3 levels are elevated in South Indian patients with ischemic heart disease. *European Journal of Epidemiology*, **2001**; 17: 567-71.
97. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.** Steroids and the cell. In: *Molecular Biology of the Cell*. 729-30. Ed: New York, Garland Publishing Inc, **1994**.
98. **Koh E, Morimoto S, Fukuo K, Itoh K, Hironaka T, Shiraishi T, Onishi T, Kumara Y.** 1,25 dihydroxy vitamin D3 binds specifically to rat vascular smooth muscle cells and stimulates their proliferation *in vitro*. *Life Sciences*, **1988**; 42:215-223.
99. **Merke J, Milde P, Lewicka S, Hugel U, Klaus G, Mangelsdorf OJ, Haussler MR, Rauterberg EW, Ritz E.** Identification and regulation of 1,25 dihydroxy vitamin D3 receptor activity and biosynthesis of 1,25 dihydroxy vitamin D3. Studies in cultured bovine aortic endothelial cells and human dermal capillaries. *J Clin Invest*, **1989**; 83: 1903-1915.
100. **Donath W, De Langen C.** Vitamin D sclerosis of the arteries and the danger of different forms of arteriosclerosis. *Acta Med Scand*, **1956**; 156:317-325.
101. **Eisenstein R, Groff W.** Experimental hypervitaminosis D: Hypercalcemia, hypermucoproteinemia and metastatic calcification. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1957**; 94:441-444.
102. **Bajwa GS, Morrison LM, Ershoff BH.** Induction of aortic and coronary atheroarteriosclerosis in rats fed a hypervitaminosis D, cholesterol-containing diet. *Proc Soc Exp Biol Med*, **1971**; 138:975-982.

- 103. Toda T, Leszczynski DE, Kummerow FA.** The role of 25-OH-vitamin D₃ in the induction of atherosclerosis in swine and rabbit by hypervitaminosis D. *Acta Pathol jpn*, **1983**; 33:37-44.
- 104. Hughes MR, Baylink Dj, Jones PG, Haussler MR.** Radioligand receptor assay for 25 hydroxyvitamin D₃, and 1,25 dihydroxyvitamin D₃. Applications to hypervitaminosis D. *J Clin Invest*, **1976**; 58:61-70.
- 105. Tsutomu I, Hiroyuki K.** 1,25 dihydroxyvitamin D₃ stimulates ⁴⁵Ca²⁺ uptake by cultured vascular smooth muscle derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*, **1988**; 152:1388-1394.
- 106. Rajasree S, Umashankar PR, Lal AV, Sankara Sarma, Kartha Cc.** 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor is upregulated in aortic smooth muscle cells during hypervitaminosis D. *Life sciences*, **2002**; 70: 1777-1788.
- 107. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H.** Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*, **2003**; 88(5):2309-17.
- 108. Bressenot A, Marchal S, Bezdetnaya L, Garrier J, Guillemin F, Plénat F.** Assessment of Apoptosis by Immunohistochemistry to Active Caspase-3, Active Caspase-7, or Cleaved PARP in Monolayer Cells and Spheroid and Subcutaneous Xenografts of Human Carcinoma. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **2009**; 57(4):289-300.
- 109. Holm P, Stender S, Andersen HO, Hansen BF, Nordestgaard BG.** Antiatherogenic effect of estrogen abolished by balloon catheter injury in cholesterol-clamped rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **1997**; 17(8):1504-11.
- 110. Akishita M1, Ouchi Y, Miyoshi H, Kozaki K, Inoue S, Ishikawa M, Eto M, Toba K, Orimo H.** Estrogen inhibits cuff-induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **1997**; 130(1-2):1-10.
- 111. Ling S, Dai A, Dillej RJ, Jones M, Simpson E, Komesaroff PA, Sudhir K.** Endogenous estrogen deficiency reduces proliferation and enhances apoptosis-related death in vascular smooth muscle cells: insights from the aromatase-knockout mouse. *Circulation*, **2004**; 109 (4): 537-43.

- 112.Zhang L, Zhu C, Zhang X, Wan Y, Song J.** Dual effects of estrogen on vascular smooth muscle cells: receptor-mediated proliferative vs. metabolite-induced pro-senescent actions. *Steroids*, **2011**; 76 (3): 309-16.
- 113.Carthy EP, Yamashita W, Hsu A, Ooi BS.** 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and rat vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension*, **1989**;13:954–9.
- 114.Shioi A, Katagi M, Okuno Y.** Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res* **2002**;91:9–16.
- 115.Rigby WF, Denome S, Fanger MW.** Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA. *J Clin Invest*, **1987**;79:1659–64.
- 116.Somjen D, Kohen F, Jaffe A, Amir-Zaltsman Y, Knoll E, Stern N.** Vitamin D Analogs Modulate the Action of Gonadal Steroids in Human Vascular Cells In vitro. *AJH*, **2000**;13:396–403.
- 117.Mitsuhashi T, Morris RC Jr, Ives HE.** 1,25 dihydroxyvitamin D3 modulates growth of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, **1991**;87:1889–1895.
- 118.Wakasugi M, Noguchi T, Inoue M, Kazama Y, Tawata M, Kanemaru Y, Onaya T.** Vitamin D3 stimulates the production of prostacyclin by vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins*, **1991**;42:127–136.
- 119.Kawashima H.** Receptor for 1,25-dihydroxyvitamin D in a vascular smooth muscle cell line derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun*. **1987**;146:1–6.
- 120.Norman PE, Powell JT.** Vitamin D, shedding light on the development of disease in peripheral arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. **2005**;25:39–46.

- 121. Kasuga H, Hosogane N, Matsuoka K.** Characterization of transgenic rats constitutively expressing vitamin D-24-hydroxylase gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **2002**;297:1332–8.
- 122. Artaza JN, Norris KC.** Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol*. **2009**; 200:207–221.
- 123. Ha H, Oh EY, Lee HB.** The role of plasminogen activator inhibitor 1 in renal and cardiovascular diseases. *Nat Rev Nephrol*, **2009**; 5:203–211.
- 124. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J.** Effects of vitamin D analogs on the expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human vascular cells. *Thromb Res*. **2006**;118:709–714.
- 125. Zinser GM, Welsh J.** Accelerated mammary gland development during pregnancy and delayed postlactational involution in vitamin D3 receptor null mice. *Molecular Endocrinology*, **2004**; 18: 2208–2223.
- 126. Wagner N, Wagner K, Schley G, Badiali L, Theres H, Scholz H.** 1,25-DihydroxyVitamin D3-induced apoptosis of retinoblastoma cells is associated with reciprocal changes of Bcl-2 and bax. *Experimental Eye Research*, **2003**; 77 (1): 1–9.
- 127. Foltyn N, Bendikov I, De Miranda J.** Serine racemase modulates intracellular D-serine levels through an α,β -elimination activity. *The Journal of Biological Chemistry*, **2005**; 280 (3): 1754–63.
- 128. Müller P, Haahr M, Diamant M, Rieneck K, Kharazmi A, Bendtzen K.** 1,25-dihydroxy Vitamin D3 inhibits cytokine production by human blood monocytes at the post-transcriptional level. *Cytokine*, **1992**; 4 (6): 506–512.
- 129. McGreevy C, Williams D.** “New insights about Vitamin D and cardiovascular disease: a narrative review”. *Annals of Internal Medicine*, **2011**; 155(12): 820–826.

130.Zittermann A. “Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?”. *British Journal of Nutrition*, **2003**; 89(5): 552–572.

131.Tukaj C. Enhanced proliferation of aortal smooth muscle cells treated by 1,25(OH)2D3 in vitro coincides with impaired formation of elastic fibers. *Int. J. Exp. Pathol.* **2008**; 89:117–124.

132.Raymond MA, Désormeaux A, Labelle A, Soulez M, Soulez G, Langelier Y, Pshezhetsky AV, Hébert MJ. Endothelial stress induces the release of vitamin D-binding protein, a novel growth factor. *Biochem Biophys Res Commun.* **2005**;338:1374–1382.



ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Ankara'da doğdu. İlk ve ortaöğretimini Mecidiye İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise eğitimini Fatih Sultan Mehmet Lisesi'nde tamamladı.

2013 yılında Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyolojik Bilimler Bölümü'nden mezun oldu. 2014 yılı Şubat ayında Mersin üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda başladığı yüksek lisans eğitimine halen devam etmekte.



