



TÜRKİYE CUMHURİYETİ

ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POSTMENOPOZAL KADINLARDA GC RS2282679 'UN
VİTAMİN D SEVİYELERİ VE OSTEOPOROZLA İLİŞKİSİ**

ZÜMRE KARADAĞ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

DANIŞMAN
Dr. DENİZ AĞIRBAŞLI

İSTANBUL- 2014

TEZ ONAYI

Kurum : Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ()
Anabilim Dalı :Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Tez Sahibi :Zümre Karadağ
Tez Başlığı : Postmenopozal Kadınlarda GC rs2282679'un Vitamin D Seviyeleri ve Osteoporozla İlişkisi
Sınav Yeri : Acıbadem Üniversitesi, Kerem Aydınlar Kampüsü
Sınav Tarihi : 05.12.2014

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

| Danışman (Unvan, Adı, Soyadı) | Kurumu | İmza |
|--|-------------------------------|---|
| Yrd.Doç.Dr.Deniz Ağırbaşı | Acıbadem Üniversitesi |  |
| Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı) | | |
| Prof.Dr.Ergün Pınarbaşı | Sivas Cumhuriyet Üniversitesi |  |
| Yrd.Doç.Dr.Yavuz Oktay | Acıbadem üniversitesi |  |
| Yrd.Doç.Dr.Deniz Ağırbaşı | Acıbadem Üniversitesi |  |

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Mert ÜLGEN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

04.12.2014

Zümre KARADAĞ

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince danışmanım Acıbadem Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi, Yrd. Doç. Dr. Deniz Ağırbaşı'ya bilgisini, desteğini ve tecrübelerini benden esirgemediği için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Acıbadem Üniversitesi'ndeki yüksek lisans eğitimim boyunca benden bilgisini ve desteğini esirgemeyen çok değerli hocalarım Biyokimya Ana Bilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Aysel Özpınar' a ve Yrd. Doç. Dr. Özge Can'a, Tıbbi Biyoloji Ana bilim Dalı'nda öğretim üyeleri Yrd. Doç. Dr. Cemaliye Boylu ve Yrd. Doç. Dr. Yavuz Oktay'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Genetik çalışmalarım için maddi olanak sağlayan ve desteğini benden esirgemeyen değerli Fen Edebiyat Fakültesi Dekanımız Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer'e teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvar çalışmalarım için olanak sağlayan ve organize eden Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa Serteser 'e ve LABMED Laboratuvarları çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması için gerekli olan vakaların toplanmasında ve klinik konularda yardımda bulunan Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Ana Bilim Dalı'nda görev yapan Dr. Murat Sünbül'e ve Yetişkin Kan Alma Birimi'nde çalışan tüm hemşirelere teşekkürlerimi sunarım.

D vitamini ölçümlerinde benden yardımlarını esirgemeyen LABMED İleri Analiz Laboratuvarı Ekip Lideri Ümmet Melikoğlu' na teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak varlıklarıyla bana güç veren, beni her zaman destekleyen kıymetli aileme ve bana destek olan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|----------|
| TEZ ONAYI..... | ii |
| BEYAN..... | iii |
| TEŞEKKÜR..... | iv |
| İÇİNDEKİLER..... | v |
| KISALTMALAR VE SİMGELER..... | viii |
| ŞEKİLLER LİSTESİ..... | ix |
| TABLolar LİSTESİ..... | x |
| ÖZET..... | 1 |
| SUMMARY..... | 2 |
| | |
| 1. GİRİŞ ve AMAÇ..... | 3 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1. D Vitamini Yapısı ve Görevi | 4 |
| 2.2. D Vitamini Sentezi..... | 7 |
| 2.3. D Vitamini Seviyeleri ve Osteoporoz İlişkisi..... | 9 |
| 2.4. D Vitamini'nin Kanda Taşınması: Vitamin D Bağlayıcı Protein (VDBP)..... | 10 |
| 2.5. Gc Geni Yapısı (VDBP geni)..... | 11 |
| 2.5.1. Gen Yapısı..... | 12 |
| 2.5.2. Gen Fonksiyonu..... | 12 |
| 2.6. Gc Geni Polimorfizmi..... | 13 |
| 2.7. Gc Gen Polimorfizmi ve Osteoporozun İlişkilendirilmesi..... | 13 |

| | |
|--|----|
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 14 |
| 3.1. Gereçler..... | 14 |
| 3.1.1. Kullanılan Aletler..... | 14 |
| 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve ticari kitler..... | 15 |
| 3.1.3. Kullanılan Primerler ve Kesim Enzimi..... | 16 |
| 3.1.3.1 Primerler..... | 16 |
| 3.1.3.2 Enzimler..... | 16 |
| 3.1.4. Kullanılan Çözeltiler..... | 17 |
| 3.1.4.1. PZR..... | 17 |
| 3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi..... | 18 |
| 3.2. Yöntem..... | 19 |
| 3.2.1. Örnek Seçimi..... | 19 |
| 3.2.2. Kanın Saklanması ve Serum Elde Edilmesi..... | 20 |
| 3.2.3. Kandan DNA izolasyonu..... | 21 |
| 3.2.4. PZR Koşulları ve Bileşenleri..... | 21 |
| 3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi..... | 23 |
| 3.2.6. RFLP Tayini..... | 24 |
| 3.2.7. D vitamini ölçümü..... | 27 |
| 3.2.8. Kemik Yoğunluğu Ölçümü ve Yorumlanması..... | 28 |
| 3.2.9. İstatistiksel Analiz..... | 29 |
| 4. BULGULAR | 30 |
| 4.1. PZR Sonuçları..... | 30 |
| 4.2. PZR Ürününün PsiI enzimi ile kesilerek RFLP Tayini Sonuçları..... | 32 |
| 4.3. D Vitamini Ölçümü Sonuçları..... | 34 |
| 4.4. Kemik Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları..... | 35 |
| 4.5. LC- MS-MS Sonuçları..... | 39 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 4.6. | Çalışmanın İstatistiksel Değerlendirilmesi..... | 38 |
| 4.6.1. | Katılımcıların demografik bilgileri..... | 38 |
| 4.6.2. | Katılımcıların Genotipik Özellikleri..... | 38 |
| 4.6.3. | Vitamin D ve VKİ Değerlerinin Genotipe Göre Dağılımı..... | 39 |
| 4.6.4. | Kemik Yoğunluğu Ölçümleri Sonuçlarının Dağılımı..... | 39 |
| 4.6.5. | Vitamin D Değerlerinin Kemik Yoğunluğu Ölçümleriyle Korelasyonu..... | 39 |
| 4.1.6. | Kemik yoğunluğu, Vitamin D Değerleri ve Genotip İlişkisi..... | 40 |
| 5. | TARTIŞMA VE ÇALIŞMANIN GELECEK PLANI..... | 42 |
| 6. | KAYNAKLAR..... | 45 |
| Ek 1. | Özgeçmiş..... | 49 |
| Ek 2. | Etik Kurul Raporu..... | 50 |

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

| | |
|----------|--|
| Bç | Baz çifti |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| d NTP | Deoksinükleotid trifosfat |
| Gc | Grup Component |
| KMY | Kemik Mineral Yoğunluğu |
| Lc-Ms-Ms | Sıvı kromatografisi |
| PZR | Polimer Zincir Reaksiyonu |
| PTH | Parathormon |
| RFLP | Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizm |
| TAE | Tris Asetik asit EDTA |
| TE | Tris EDTA |
| Tm | Erime Sıcaklığı (melting temperature) |
| VDR | Vitamin D Reseptörü |
| VDBP | Vitamin D Bağlayıcı Protein |
| VKİ | Vücut Kitle İndeksi |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1 : D vitamini sentezi..... | 9 |
| Şekil 2 : Gc protein : Aminoasit sekansı ve ikincil yapısı..... | 11 |
| Şekil 3 : GC geninin 4. Kromozom üzerinde lokalizasyonu | 11 |
| Şekil4: Birinci döngü PZR sonuçlarının%3'lük agaroz jelde görünümü..... | 31 |
| Şekil 5 : PZR için kullanılan 100bç marker..... | 31 |
| Şekil 6 : İlk döngü PZR ürünlerinden yapılan ikinci döndü PZR ürünlerinin %3'lik agaroz jelde görüntülenmesi..... | 32 |
| Şekil 7 : GC geni rs2282679 polimorfik bölgesinin RFLP tayininde PsiI enzimi ile kesim sonuçları | 33 |
| Şekil 8 : 6 farklı konsantrasyon eğrisi ile hazırlanmış 25-OH Vitamin D3 kalibrasyon eğrisi..... | 34 |
| Şekil 9 : 401.3-383.3 geçişinde 4 numaralı örnek için kromatogram..... | 34 |
| Şekil 10 : Vitamin D seviyelerinin Genotipe göre dağılımı..... | 41 |

TABLolar LİSTESİ

| | |
|---|----|
| Tablo 1 : GC geninde rs2282679 polimorfik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerler..... | 16 |
| Tablo 2 : Restriksiyon enzimi ve kesim bölgesi | 16 |
| Tablo3 : PZR bileşenleri..... | 22 |
| Tablo 4 : PZR koşulları..... | 23 |
| Tablo 5 : Kesim Bileşenleri..... | 26 |
| Tablo 6 : Dünya Sağlık Örgütü T skoru değerlerine göre KMY sınıflaması..... | 29 |
| Tablo 7 : Kemik yoğunluğu ölçümü sonuçları..... | 35 |
| Tablo 8 : Katılımcıların Demografik Bilgileri..... | 38 |
| Tablo 9 : Katılımcıların Genotip ve Alel frekansları..... | 39 |
| Tablo 10 : Vitamin D ve VKİ değerlerinin genotipe göre dağılımı..... | 39 |
| Tablo 11 : Vitamin D değerlerinin kemik yoğunluğu ölçümleriyle korelasyonu..... | 40 |
| Tablo 12 : Kemik yoğunluğu, vitamin D Değerleri ve Genotip İlişkisi..... | 41 |

ÖZET

D vitamini bağırsaklardan ve böbreklerden kalsiyumun emilmesini sağlayarak iskeletin normal gelişimi için çok önemlidir. D vitamini eksikliği osteoporoz için önemli risk faktörüdür. D vitamini, dolaşımında D vitamini bağlayıcı protein (VDBP) ile taşınır. D vitamini bağlayıcı protein Gc geni tarafından kodlanır. Gc geni insanlarda 4. kromozomda 4q11-q13 bandında lokalizedir. Bu çalışma postmenopozal kadınlarda D Vitamini Bağlayıcı proteinini kodlayan GC geninde, vitamin D seviyelerini etkilemesi muhtemel bir varyant olan 12. intronda bulunan Gc rs2282679' un vitamin D seviyeleri ve kemik mineral yoğunluğu ile ilişkisini araştırmayı hedeflemektedir. Çalışma için sağlıklı 100 menopoz sonrası kadında sigara ve alkol gibi risk faktörleri ve demografik bilgileri sorgulandı. Periferik venden alınan kanın bir kısmı vitamin D ölçümleri için serumu ayrıştırıldı, diğer kısmından polimorfizm analizi için DNA'sı izole edildi. Vitamin D seviyesi ölçümleri LC-MS-MS metodu ile çalışıldı. DNA izolasyonu sonrası intron 12 bölgesi nested PZR ile çoğaltılarak restriksiyon uzunluk polimorfizmi ile polimorfik bölge tayin edildi. Kemik yoğunluğu ölçümleri için omurga ve femur bölgeleri T skorları kullanıldı. Çalışma grubunda Vitamin D ortanca değeri 9(13) ng/dl olarak normal değerlerin çok altındadır (35-50 ng/dl), Genotip frekansları AA, Ac ve CC için sırasıyla 0.14, 1.67 ve 0.19 bulunmuştur. Vitamin D değerleri yabanıl tip ve polimorfik homozigotlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermiştir ($p=0.025$).Yine yabanıl homozigotlarda vitamin D değerleri polimoerfik genotipler kıyaslandığında (AA vs AC+CC) anlamlı derecede yüksektir (0.042). Sonuç olarak literatüre uygun olarak Vitamin D seviyeleri yabanıl tip genotipe sahip kişilerde polimorfik tipe kıyasla daha yüksektir. Kemik yoğunluğu ölçümleri yabanıl ve polimorfik tiplerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.Sonuçlar daha geniş kohortlarda tekrarlanmalıdır.

Anahtar sözcükler: D vitamini, Gc geni, rs2282679, osteoporoz, kemik mineral yoğunluğu

The Association of GC rs2282679 Polymorphism with Vitamin D Levels and Osteoporosis in Postmenopausal Women

SUMMARY

Vitamin D deficiency is a risk factor for osteoporosis. Deficiency of Vitamin D-binding protein (VDBP) affects vitamin D binding and may impair bone mineralisation. VDBP is encoded by the Gc gene on chromosome 4q11-q13. This study aims to search the association of rs2282679 polymorphism in GC in intron 12, with vitamin D levels and bone mineral density in postmenopausal women. Healthy postmenopausal women (n=100) were enrolled in this study. Standard risk factors such as smoking, alcohol consumption and demographic data was taken from all participants. Peripheral blood is taken from participants, serum was kept for vitamin D measurements, and blood is used for DNA analysis. Intron 12 region of GC gene is amplified by nested PCR and rs2282679 variant is analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) method. Vitamin D levels are measured by LC MSMS method and bone mineral density results are taken as T-Scores of femur and AP spine. As a result Vitamin D levels are found to be very low in this cohort (median:9(13)). In rs2282679 polymorphism, genotype frequencies of AA, AC and CC are 0.14, 0.67 and 0.19 respectively. The only statistically significant result is the association between vitamin D levels and genotypes. Vitamin D levels are significantly higher ($p=0.042$) in wild type homozygotes vs polymorphic cases (AA vs AC+CC). Also, AA vs CC has a significant difference in vitamin D levels (0.025). These results are consistent with the previous articles about rs2282679 polymorphism. Bone mineral density results are not significantly associated with the polymorphism.

Key words: vitamin D, GC gene, rs 2282679, osteoporosis, bone mineral density

1. GİRİŞ VE AMAÇ

D vitamini bağırsaklardan ve böbreklerden kalsiyumun emilmesini sağlayarak kalsiyum metabolizmasında ve kemik gelişiminde görevli olan bir hormondur. Deride ilk olarak prohormon olarak sentezlenerek karaciğer ve böbrekte aktif haline dönüştürülür. D vitamininin dolaşımında taşınması için Gc geni tarafından kodlanan vitamin D bağlayıcı proteine (VDBP) ihtiyaç vardır. Kanda D vitamini düzeyleri VDBP'nin varlığına ve fonksiyonel olmasına bağlıdır. D vitamini hem vücutta sentezlenmesi hem de dışarıdan alınabilmesine rağmen ülkemizde eksikliği çok sık görülmektedir. Bu çalışmanın amacı, menopoz sonrası (postmenopozal) kadınlarda osteoporoz riskinin dolaşımında D vitaminini taşıyan vitamin D bağlayıcı proteini (VDBP) sentezleyen Gc geninde meydana gelen rs2282679 tek nükleotit polimorfizmi (SNP) ile ilişkisini göstermeyi hedeflemektedir.

Çalışma grubuna onay formunu imzalayarak katılan 100 postmenopozal kadından alınan periferik kan örneklerinin bir kısmından serum elde edilerek D vitamini seviyeleri ölçümleri yapıldı, bir kısmından da DNA izole edildi ve GC geni rs2282679 polimorfizmi tayini yapıldı. Aynı zamanda katılımcıların kemik mineral yoğunluğu ölçülerek osteoporoz riskleri belirlenmiştir.

D vitamini ölçümleri için D vitamininin dolaşımdaki aktif formu olan 1,25(OH)D₃ kullanılmamaktadır. Bunun nedeni 1,25(OH)D₃ 'ün dolaşımdaki yarı ömrü 4-6 saa olmasıdır. Bu yüzden çalışmaya katılan kişilerin serumlarındaki 25(OH)D₃ 'e bakılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda, D vitaminini taşıyan gendeki polimorfizmin postmenopozal kadınlarda D vitamini seviyeleri ve osteoporozla ilişkisinin bilinmesi, tanı ve tedavide kullanılacak yöntemlerin önceden belirlenmesinde önemli rol oynayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamininin Yapısı ve Görevi

D vitamini hormon gibi görev yapan steroldür. Yağda eriyen vitaminler grubundandır (1).

D vitamini deride güneş ışığı (ultraviyole) yardımıyla 7-dehidrokolestrolden üretilse de, bir miktarı besinler tarafından da sağlanmaktadır. D vitamininin, vitamin D2 (ergokalsiferol) ve vitamin D3 (kolekalsiferol) olmak üzere iki çeşidi vardır (2). Gıda takviyesi ile alınan D vitamininin biyolojik olarak aktivitesi düşüktür. D vitamininin vücutta etki göstermesi için güneşe maruz kalarak hidroksilasyon reaksiyonları geçirmesi gerekir.

D Vitaminin vücuttaki fonksiyonu kısaca şöyle özetlenebilir:

1- Kalsitriol, D vitaminin vücutta aktif bulunan şeklidir. Kalsitriol çeşitli organlar için önemli rol oynar. Böbrek ve bağırsaklardan kalsiyum ve fosfor emilimini sağlayarak dolaşıma kalsiyum geçişini sağlar, kemiğin normal mineralizasyonunu etkinleştirir. Ayrıca kemik büyümesini düzenler. D vitamini eksikliği veya bağırsaklardan emilimin bozulması (malnütrisyon, yaşlılık, bağırsak hastalıkları.vs) kemik mineralizasyonunda bozulmaya sebep olur, osteoporoza zemin hazırlar. Yeterli D vitamini alınmaması kemikleri ince, kırılabilir hale getirebilir. D vitamini eksikliği, besinlerden yeterli d vitamini almamaya birlikte yetersiz güneş ışığına maruz kalma ile birleştiğinde ortaya çıkar. Bununla birlikte D vitaminin vücutta aktif formuna çevrilememesi karaciğer ve böbreklerdeki kalıtsal bozukluklar sonucu da ortaya çıkabilir.

D vitamini eksikliği, çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde osteomalaziye neden olur. Ayrıca yetişkinlerde osteoporoza sebep olur. Serum 25(OH) D vitamini değeri 30-55 ng/ml ise normal, 21-29ng/ml ise eksiklik, 20ng/ml altında ise yetersizlik

vardır. Serum 25(OH) D vitamini değeri 200ng/ml den fazla ise hiper D vitaminozisi gösterir (3).

2- D vitamini kalsiyum ve fosforun emiliminden sorumludur. D vitamini kalsiyumun kanda seviyesini arttıran parathormon salınımını engeller. D vitamini ve paratiroid bezinden salgılanan parathormon sayesinde kalsiyum kanda sabit bir düzeyde tutulur. Kalsiyum seviyelerinin bozulması sinir iletiminde bozulmalarına, kalp durmasına sebep olabilir.

3- Çok yaygın olan hipertansiyon yani arter kan basıncı yüksekliği hastalığının düşük D vitamini düzeyleri ile ilgisi vardır. Normal düzeylerde D vitamininin koroner arter hastalık (Miyokard infarktüsü) ve periferik damar hastalığı riskini azalttığı bilinmektedir. Framingham Çalışmasında (2) D vitamini düşük seviyelerde olan kişilerde kalp hastalıklarının D vitamini düzeyleri normal olan kişilere kıyasla %62 arttığı tespit edilmiştir.

4- Multipl sklerozis, romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, Sjögren sendromu, sistemik sklerozis, gibi bazı otoimmün hastalıklarda da D vitamini eksikliğinin bu tip hastalıkları tetikleyici özellikleri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. D vitamini eksikliği CD8 T lenfositlerin sayıca azalmasında etkili olmaktadır. Ülseratif Kolit ve Crohn gibi enflamatuvar bağırsak hastalıkları ise D vitaminin barsaklardan emilimini bozarak hastalık tablosunu şiddetlendirmektedir.

5- Bağışıklık sisteminin temel yapılarından olan monosit, makrofaj ve lenfositlerin fonksiyonel olmaları aktif D vitaminine bağlıdır. Vücutta sentezlenen katelisin, defensin gibi antimikrobiyal peptidlerin üretiminin aktif D vitamini tarafından artırıldığı gösterilmiştir (4).

6- In vitro çalışmalarda kanser ile aktif D vitamini ilişkisi gösterilmesine rağmen in vivo çalışmalarda bu ilişki gösterilememiştir. Gözlemsel çalışmalarda kolorektal kanserler dışındaki kanserlerde D vitamini düzeyi ile güçlü bir ilişki gösterilememiştir. Ancak Aktif D vitamininin; hücre döngüsü inhibitörleri p21, p27 ifadesini ve hücre adezyon molekülü e-kaderin ifadesini uyardığı bilinmektedir. Aynı zamanda keratinositlerde aktif D vitamininin UVR'nin yol açtığı DNA hasarı

tamirini arttırdığı, p53'ü arttırdığı gösterilmiştir. Kanseri önleyici mekanizmalarda ve hücre bağışıklığı ile ilgili yollarda rol oynasa da klinikte D vitamini faydasının kesin olarak gösterilememesi, hem kanserin kompleks hastalıklar grubuna girmesi, etiyolojide rol alan genetik ve çevresel faktörlerin giriftliğine hem de randomize kontrollü çalışmalarının eksikliğine bağlanmaktadır.

7- D vitamini eksikliği diyabet ile ilişkilendirilmiştir. Tip 1 Diyabet'ten pankreasın beta hücresinin yıkımı ile ilgili bir çok mekanizma sorumlu tutulmaktadır: Bunlar; (a) CD8 T lenfositler ve makrofajlar üzerinden IL-12 bağımlı olarak Th1 (T-helper1) diferansiyasyonu ve böylece proenflamatuar sitokinlerin aktivasyonu, (b) Th1 hücre aktivasyonu ve spesifik hücre oto-antijenler yolu ile oto -reaktif T hücre klonlarının ortaya çıkması ve böylece periferik hücrelere karşı self tolerans kaybılması, (c) IL-12 sentezinin artması ve süpresör mekanizmaların yetersizliğidir (5). Yapılan çalışmalarda aktif D vitamini ve analoglarının in vivo olarak IL-12 ve Th-1 egemenliğini engellediği gösterilmiştir.

Tip 2 Diyabet ise insülin rezistansı ve glukoz intoleransı ile ilişkilendirilmiştir. Glukoz intoleransı ve tip 2 diyabet gelişirken; pankreatik beta hücre fonksiyonunda bozulma, insülin duyarlılığında azalma, bunu takiben sistemik enflamasyon ve insülin direnci görülür. D vitamini beta hücre fonksiyonunun iyileşmesi üzerine olan etkisi doğrudan veya kalsiyum üzerinden dolaylı olarak gerçekleşebilmektedir Çünkü D vitamini insülin sekresyonu üzerine olan dolaylı etkilerini; Ca'nın normalizasyonu ve takiben beta hücresinde Ca akışının sağlanması ile gerçekleştirmektedir.

8- Vücutta kalsiyum ve fosfor dengesinin sağlanması, kas gücü, yapısı için önemlidir. D vitamini seviyeleri düşük seyreden kişilerde kas gücü azalmış olarak bulunmaktadır. Hatta yaşlılarda kemik kırıklarının fazla olmasının bir nedeninin (Osteoporoz dışında) kas zaafiyeti nedeniyle artan düşmeler olduğu söylenmektedir.

9- İnfeksiyonlar: Monosit ve makrofajlar antijen sunumunun yanı sıra fagositik aktivitelerinden dolayı enfeksiyonlara karşı doğal immünitinin de hareketlenmesinden ve antimikrobisidal aktiviteden sorumludur. D vitamini ve

fagositoz arasındaki pozitif ilişki birçok enfeksiyona (İnfluenza, Tuberküloz vs.) neden olmaktadır.

D2 vitamininin 1932’de, D3 vitaminini ise 1936 ‘ da kimyasal yapısı karakterize olmuştur. D2 ve D3 arasındaki fark yan zincirlerinden kaynaklanır. D2 vitamini 22-23 karbonlar arasında bir çift bağ içerir ve 24. Karbona bağlı bir metil grubu vardır.

Yeterli miktarda D vitamini alınmasını temin etmeyi amaçlayan toplum sağlığı önerileri (besin değeri zenginleştirilmiş gıdalar da dâhil olmak üzere), özellikle yaşlı ve menopoz sonrası kadınlar gibi riskli gruplar için, gıdalardan alınabilecek temel takviyelerin yanı sıra doz sınırları iyi belirlenmiş takviyeleri önermektedir (6,7) .

2.1. D Vitamini Sentezi

Derideki pro-vitamin D3’den pre-vitamin D3’ün sentezi organizmanın ihtiyacına göre ayarlanır. 15 dakika gibi kısa bir sürede pro-vitamin D3 ten pre-vitamin D3 sentezi gerçekleşir ve en yüksek düzeye ulaşır. Pre-vitamin D3’ten vitamin D3’e dönüşüm ise oldukça yavaş, ısıya duyarlı olarak izomerizasyon ile gerçekleşir ve bu durum organizmanın ihtiyacına göre ayarlanır (8,9). Pro-vitamin D3, deride bulunun 7-dehidrokolesterolden UV ışığı ile katalizlenerek üretilir. D vitamini bağlayıcı protein (VDBP) ile bağlanarak dolaşım sistemine salınır. VDBP bağlı D3 (kolekalsiferol) karaciğere taşınır ve burada hidrosillenerek 25-hidroksivitamin D3 (25(OH)D3) formuna çevrilir. Karaciğerden dolaşıma geçen 25(OH)D3 böbreklerin proksimal tüplerinde vitaminin aktif metabolitine (1,25(OH)2D3) çevrilmektedir (Şekil1).

UV ışığa veya solar radyasyona uzun bir süre maruz kalınması durumunda pre-vitamin D3 biyolojik etkisi olmayan lumisterol ve takisterol gibi bir takım fotoliz inaktif yan ürünlerine dönüşür. Bir başka ifade ile bir kere deride pre-vitamin D3 olduğu zaman ya vitamin D3’e ya da inaktif metabolitlere dönüşmektedir. Diğer yandan deride sentezlenen vitamin D nin fazlası da yine UV etkisi altında inaktif

fotoliz yan ürünlerine dönüşmektedir. Bu durum gereksiz vitamin D sentezini önleyerek canlıyı vitamin D intoksikasyonundan koruyan fizyolojik bir kontrol mekanizmadır.

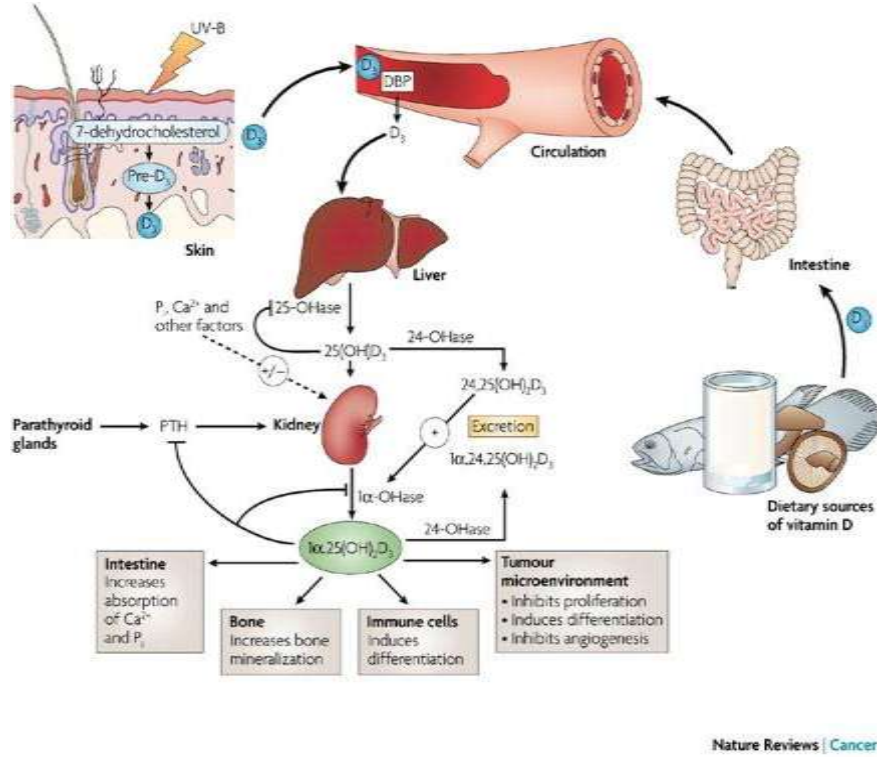
D vitamini organizmada değişikliklere uğrar. Kolekalsiferol (D3 vitamini) önce karaciğerde mikrozomlarda 25-hidroksikolekalsiferol'e dönüşür. Daha sonra böbreklerde 1,25 dihidroksikolekalsiferole oksitlenir (10). Bu şekilde dolaşımında taşınarak bağırsak mukozasına gelir. Burada Ca'un absorpsiyonunda bir tür taşıyıcı olarak görev yapan özel bir proteinin yapımını regüle eder.

İntestinal mukozada sentezlenen bu protein izole edilmiştir. 24.000 mol ağırlığında olup her molekülü bir atom kalsiyumu bağlamaktadır.

D vitamini bu etkisi ile tıpkı bir hormon gibi görev yapmaktadır. Ancak hormondan tek farklılığı ön maddesi olan D vitamininin dışardan da alınabilmesidir. Böbreklerde 1,25-kolekalsiferol sentezi parathormon tarafından uyarılmaktadır (11).

Kanda kalsiyum düzeyinin azalması parathormon salınımına neden olmakta, kana salınan parathormon bir taraftan idrarla daha çok fosfat atılımına yol açarken bir taraftan da 1,25-dihidroksikolekalsiferol sentezini çoğaltmaktadır.

1,25-dihidroksikolekalsiferol aynı zamanda kemiklerden kalsiyumun mobilizasyonunu da kolaylaştırmaktadır (12).



Şekil 1. D vitamini sentezi:

Kristin K. Deeb, Donald L. Trump & Candace S. Johnson Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. Nature Reviews Cancer 2007;7:684-700

2.2. D Vitamini Seviyeleri ve Osteoporoz İlişkisi

Osteoporoz postmenopozal kadınlarda yaşlanmaya bağlı olarak yaygınlaşmış bir rahatsızlıktır. Osteoporoz kemik mineral yoğunluğu azalması ve kemik kırılabilirliğinin artması ile karakterize olur (13).

Osteoporozun birincil klinik markeri vitamin D bağımlı kemik mineral yoğunluğudur (14).

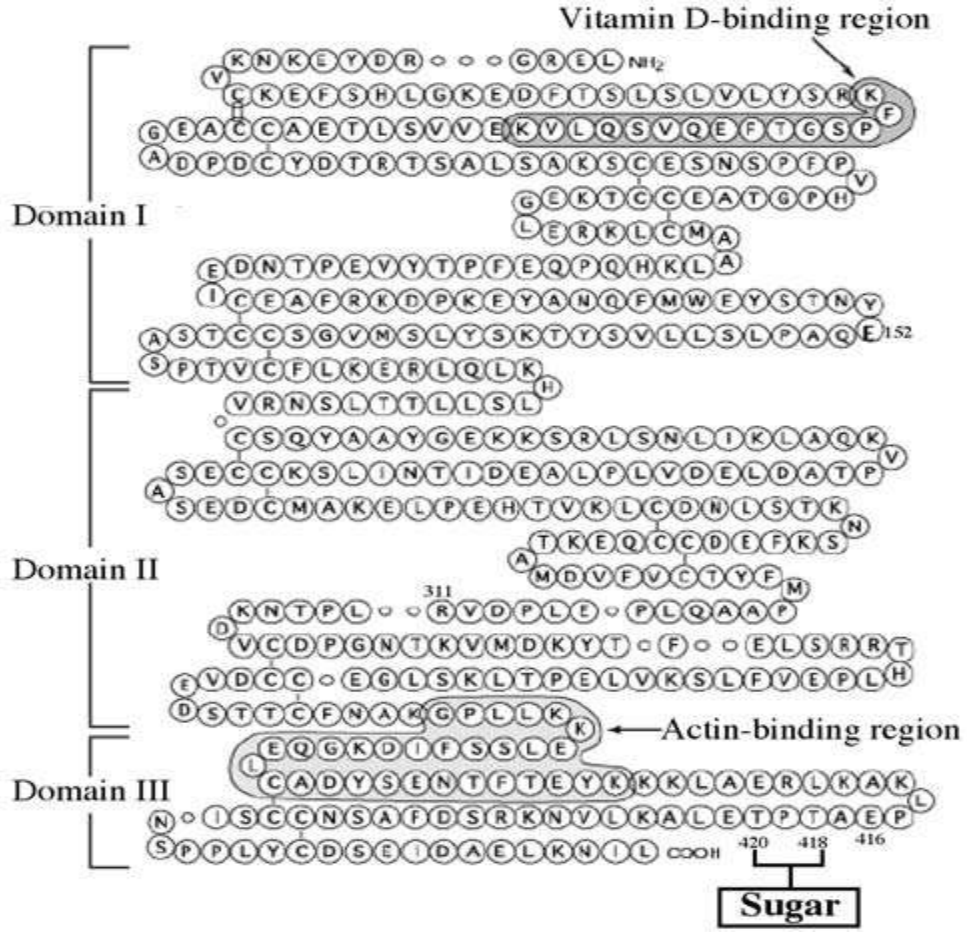
D vitamininin yeterli düzeyde alınması önemli bir etkiye sahiptir. D vitamini eksikliği kalsiyum metabolizmasını, osteoblastik aktiviteyi, matriks mineralizasyonunu, kemik modellenmesini ve kemik yoğunluğunu olumsuz etkiler (15).

Düşük 25-hidroksi D (25OHD) sekonder hiperparatiroidizm ve kemik yıkımı artışı ile ilişkilidir. D vitamini eksikliği osteoporoz için önemli bir risk faktörü olarak bilinmektedir(16).

Kemik mineral yoğunluğu (BMD) , kemik kalsiyum miktarını ölçen, osteopeni ve osteoporoz tanısı için kullanılan bir tekniktir.

2.3. D Vitamini'nin Kanda Taşınması; Vitamin D bağlayıcı protein (VDBP)

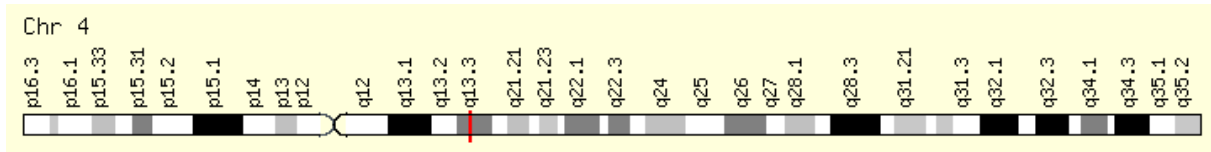
VDBP hepatik parankimal hücrelerden sentezlenir. Vitamin D bağlayıcı proteinin 3 grubu vardır. Bu yapı tamamen aminoasit sekanslarından oluşur. I. bölge vitamin D bağlayıcı bölge ve III. bölge 6 aminoasit sekansı içeren C terminalde bulunan aktin bağlayıcı bölgedir. VDBP, 51-58 kDa ağırlığındadır. 458 aminoasit içerir (17). 2 bağlayıcı bölgesi vardır. Birincisi 35-49 aminoasitleri arasındaki vitamin D ve yağ asidi bağlayıcı bölge, diğeri 350-403 aminoasitleri arasındaki aktin bağlayıcı bölgedir (18).



Şekil 2. Gc protein : Aminoasit sekansı ve ikincil yapısı (ANTICANCER RESEARCH 25: 3689-3696 (2005))

2.4. Gc geni yapısı (VDBP geni)

Gc geni, insanda 4. Kromozomunun 4q11-q13 bandında lokalize olmuştur(NCBI GENE ID2638). DBP geni albümin süper ailesi üyesidir (19).



Şekil 3. GC geninin 4. Kromozom üzerinde lokalizasyonu

2.4.1.Gen Yapısı

Witke ve arkadaşları 1993'de tüm GC genini; 5' bölgesine komşu 4228 bç'lik bölge ve 3' bölgesine komşu 8514 bç'lik kısmı dahil olmak üzere dizilemiştir. Bu dizi baş (cap) bölgesinden poliadenilasyon bölgesine 42,394 baz çifti içerir. Gen 13 exondan oluşmuştur. TAG sonlandırıcı kodonu içeren birinci exon ve 12. exon kısmen translasyona uğrarlar. 13. exon tamamen transle olmasa da poliadenilasyon sinyali AATAAA içerir (20). Albümin(ALB; 103600) ve alfa fetoprotein (AFP; 104150) genlerinde olduğu gibi, on intron kodlayan bölgeyi, değişen paternlerde ayırır. Diğer üyelerinden farklı olarak GC geninin albümin ve AFP'den 130 aminoasit daha kısa bir protein ifadesine neden olan 2 ve 4. exonların daha kısa olmasıdır. GC geninin ifadesi olan mRNA ve protein daha küçük olsa da, genin kendisi ailenin diğer genlerinden yaklaşık 2,5 kat daha büyüktür. Bu, GC geni içine dağılmış 13 DNA tekrar bölgesinin sonucudur.

2.4.2.Gen Fonksiyonu

DBP (D vitamini bağlayıcı protein)'nin en önemli görevi, D vitaminine bağlanma, D vitaminin çözünmesi, D vitamini ve metabolitlerinin kanda taşınmasıdır (Daiger ve ark. 1975).

Yamamoto ve Homma (1991), farelerle yaptıkları çalışmalarda D3 vitamini bağlayıcı proteinin makrofaj-aktive edici faktörün (MAF) öncüsü olduğunu, B ve T hücrelerinin membran glikosidazları tarafından makrofaj aktive edici faktöre dönüştürüldüğünü ve Gc geninin makrofaj aktive edici faktöre dönüşümünün invitro koşullarda gerçekleşebildiğini göstermiştir.

In vitro olarak fare periton makrofajlarının lizofosfotidil kolin veya diaçilgliserol ile muamele edilmesi makrofajların fagositik aktivitesini arttırmamış, ancak periton hücrelerinin bu ajanlarla serum içeren besiyerinde enkübasyonu fagositik aktiviteyi arttırmıştır. Gc bu olaydan sorumlu serum faktörü olarak rol oynamıştır. Gelsolin ile beraber Gc proteini, hücre nekrozu ile ortaya çıkan aktine bağlanarak dolaşıma salınmaktadır. Bu aktinin toksik etkilerini engelleyen ekstrasellüler aktin kurtarma sistemi olarak bilinmektedir.

2.5. Gc geni polimorfizmi (rs2282679)

rs2282679, 4p12 kromozomda lokalize olmuş GC geni (group-specific component - vitamin D bağlayıcı protein) Rs2282679 polimorfizmi 12. intronda lokalizedir (21,22).

25 (OH)D seviyeleri ile ilgili olduğu için fonksiyonel bir polimorfizm olarak bilinmektedir. GC proteininin (yani VDBP'nin), 25 (OH) vit D2'ye bağlanma bölgesini değiştirdiği için vit D seviyelerini etkilediği düşünülmektedir . Ayrıca 11. exonda bulunan rs 4588 ve 7041 polimorfizmi ile beraber kalıtıldığı için (linkage disequilibriumda olduğu için) bu polimorfizmler de vitamin D seviyelerini etkiler (23).

Rs2282679 polimorfizmi tek nükleotit değişikliği polimorfizmidir (SNP). Bu polimorfizmde Adenin yerine Sitozin bazı gelmiştir.. Nükleotit A;A olduğunda normal D vitamini seviyesi, A;C olduğunda D vitamini eksikliği C;C olduğunda D vitamini yetersizliği görülür (24).

2.6. Gc gen polimorfizmi ve osteoporozun ilişkilendirilmesi

Gc geninin 120 den fazla polimorfizmi vardır (22). Yapılan bir çalışmada yetişkinlerde yaz aylarındaki serumdaki D vitamini seviyeleri üzerinde Gc geni polimorfizmleri (SNPs rs4588, rs2282679, ve rs1155563) arasında güçlü bir ilişki olduğu gösterilmiştir (25).

Buna benzer sonuçlar Gozdzik ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada da bulunmuştur. Bu çalışma mayıs ve ekim ayları arasında serum vitamin d seviyeleri ile kasım ve nisan ayları arasındaki serum vitamin d seviyelerini karşılaştırdığında azalma olduğunu göstermiştir (26).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1. Kullanılan aletler

- ✓ Biyogüvenlik kabini 1(SAFE 2020)
- ✓ Buzdolabı (Kirsch)
- ✓ Derin Dondurucular -20 (Kirsch)
- ✓ Derin Dondurucu -80 (Kirsch)
- ✓ Etüv (Nüve dry heat – sterilizer)
- ✓ Hassas Terazı (KERN ABJ)
- ✓ Jel Elektroforez Sistemi ve Güç Kaynağı (BIO-RAD)
- ✓ Jel Görüntüleme Sistemi (Bio- RAD ChemiDoc MP)
- ✓ LC-MS –MS (SEM Agilent Technologies 6460 Triple Quad LC/MS)
- ✓ Masa üstü ısıtıcı (Bio TDB-100 BİOSAN)
- ✓ Masa üstü santrifüj (Thermo Scientific MİCROCL 17 Centrifuge
- ✓ Otoklav (Nüve – steamart)
- ✓ Otomatik Mikropipetler (Thermo Scientific)
- ✓ Spin (Combi-spin FVL -2400N BİOSAN)

- ✓ Termal Döngü Cihazları (PZR) (BIO-RAD ve BIO-ER)
- ✓ Vortex (VWR VV3)
- ✓ Soğutmalı santrifüj (Hettich UNIVERSAL 30RF)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Ticari Kitleler

- ✓ Agaroz , Invitrogen (ABD)
- ✓ Nusieve Agaroz, Prona (E.U)
- ✓ Asetik Asit
- ✓ Brom Fenol Mavisi, Sigma (ABD)
- ✓ dNTP set MBI, Fermentas (Litvanya)
- ✓ EDTA, Sigma (ABD)
- ✓ Etidiyum Bromid, Sigma (ABD)
- ✓ Etanol (%99), Merck (Almanya)
- ✓ Isopropanol
- ✓ 100 bç DNA belirteç, MBI Fermentas (Litvanya)
- ✓ Roche High Pure PCR Template Preparation Kit
- ✓ Steril distile su (Mustafa Nevzat, Türkiye)
- ✓ Tris-Base (Sigma – Aldrich, ABD)
- ✓ Taq DNA Polimeraz enzim ve Buffer seti, (Fermentas , Litvanya)

3.1.3. Kullanılan Primerler ve Kesim Enzimi

3.1.3.1. Primerler

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)'da kullanılacak primerler IONTEK (Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir. Primerlerin nükleotid dizileri Tablo 1'de gösterilmiştir. Liyofilize olarak bulunan primer tüpleri içine 100pmol'lük konsantrasyon elde etmek için gerekli miktarda Tris-EDTA ilave edilmiştir. 100 pmol'lük ana stoktan PZR'de kullanılmak üzere PZR grade H₂O ile dilüe edilerek 10pmol'lük ara stoklar hazırlanmış ve -20°C'de dondurulmuştur.

Tablo 1. GC geninde rs2282679 polimorfik bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primerler

| Primer | Bölge | Primer Dizisi | Tm(C°) | Ürün Boyu (bç) |
|----------|----------|---------------------------------|--------|----------------|
| Vit D F1 | İntron12 | AGCAAATCTCTGTCTCTTAATTATCTCATA | 59.70 | 169 |
| Vit D R1 | | TGTGCTGGGTGTGATTCTGG | 60.25 | |
| Vit D F2 | İntron12 | CAGCAAATCTCTGTCTCTTAATTATCTTATA | 58.09 | 169 |
| Vit D R2 | | TGTGCTGGGTGTGATTCTGG | 60.25 | |

3.1.3.2. Enzimler

GC geni rs2282679 polimorfik bölgesi PsiI enzimi ile kesilmiştir. PsiI enzimi ile ilgili bilgiler Tablo 2 'de verilmiştir.

Tablo 2. Restriksiyon enzimi ve kesim bölgesi

| Enzim | Dizi | Kesim Bölgesi | Kesim tipi | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|--------|--|------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|--------|
| PsiI | TTATAA | <table border="1"><tr><td>T</td><td>T</td><td>A</td><td>/</td><td>T</td><td>A</td><td>A</td></tr><tr><td>A</td><td>A</td><td>T</td><td>/</td><td>A</td><td>T</td><td>T</td></tr></table> | T | T | A | / | T | A | A | A | A | T | / | A | T | T | Küt uç |
| T | T | A | / | T | A | A | | | | | | | | | | | |
| A | A | T | / | A | T | T | | | | | | | | | | | |



Enzimin tanıdığı bölge: cagcaaatctctgtctcttaattatcttataaagcca PsiI ile kesim var
cagcaaatctctgtctcttaattatcttatacagcca PsiI ile kesim yok.

3.1.4. Kullanılan Çözeltiler

Deneylerde kullanılan çözeltiler aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanmıştır.

3.1.4.1.PZR

10X Reaksiyon Tamponu

500mM Tris HCl (pH:8.8), 160mM(NH₄)₂SO₄, 1.5mM KCl içeren reaksiyon tamponu Fermentas(Litvanya) firmasından Taq DNA Polimeraz seti ile temin edilmiştir.

10mM dNTP

Her biri 100mM olan dATP, dCTP, dTTP, dGTP solüsyonlarından 10mM'lık dNTP kokteyli hazırlandı. 100'er µl alınarak karıştırılmıştır ve üzerine 600µl PZR

grade H₂O eklenmiştir. Ana stoktan 100µl'lik ara stoklar hazırlanarak -20°C'de saklanmıştır.

PZR grade H₂O

Steril distile su 1000 µl olarak 1.5 mL ependorf tüplere konulmuştur. Kullanılmak üzere -20'de saklanmıştır.

3.1.4.2. Agaroz Jel Elektroforezi

10X TAE (1 Litre)

54 g Tris Baz

27 g Asetik Asit

20 ml 0.5 M EDTA(pH:8)

Bir miktar su ile çözüldükten sonra, 1 litre su ile tamamlanmıştır.

Yükleme Boyası 6X

%0.25 Bromfenol mavisi

%0.25 Ksilen siyanol FF

%30 (h/h) Gliserol

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek Seçimi

Çalışma bir kohort analizidir. Çalışmaya Şubat – Haziran 2014 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kardiyoloji Polikliniği'ne başvuran ve Acıbadem Üniversitesi etik kurulunca onaylanmış aydınlatılmış onam formunu imzalayarak çalışmaya gönüllü olarak katılan postmenopozal kadınlar katılmışlardır (n=100). Post-menopoz tanımı, en az bir senedir adet görmeme ve doktor tarafından menopoz teşhisi almış olmak olarak yapılmıştır.

Çalışma grubuna dahil olma kriterleri;

Aydınlatılmış onamı imzalayan ve çalışmaya katılmayı gönüllülük esasına göre kabul eden kişiler;

Menopoza girmiş olmak (en az 1 senedir adet görmeme)

D vitamini takviyesi almamak

Çalışma grubundan dışlanma kriterleri;

- Serum D vitamini seviyelerini düşüren herhangi bir hastalığı bulunan ve ilaç kullanan kişiler;
 1. Megaloblastik anemi
 2. Tiroid ve paratiroid hastalığı bulunan kişiler
 3. Kanser kemoterapi tedavisi görenler
 4. Karaciğer fonksiyon bozukluğuna sebep olan karaciğer hastalığı
 5. Böbrek hastalığı
 6. Yaygın deri hastalığı
 7. Aşırı stres/ depresyon
 8. Malabsorbsiyon/ malnutrisyon
 9. Akut/kronik enfeksiyon
 10. Kronik enflamasyon

11. Yüksek doz statin tedavisi alanlar

12. Sıkı vegan diyeti uygulayanlar

- D vitamini seviyelerini düşüren bilinen herhangi bir mutasyonu bulunan kişiler
- D vitamini takviyesi alan kişiler
- Deri hastalığı olan kişiler
- Bilinen kalıtsal hastalığı olan kişiler
- Aydınlatılmış onam formunu imzalamayarak çalışmaya katılmayı reddeden kişiler

Katılımcıların demografik bilgileri ve aile hikayeleri sorgulanmıştır. Kilo ve boy ölçümleri yapılmıştır. Katılımcıların ulaşabildiğimiz kısma kemik yoğunluk ölçümleri Radyoloji Anabilim Dalı tarafından yapılmıştır.

D vitamini ölçümleri için kırmızı kapaklı jelli tüpe 5cc kan alınmıştır. Gc rs2282679 ölçümleri için de 2 cc mor kapaklı EDTA'lı tüpe kan alınmıştır.

3.2.2. Kanın Saklanması ve Serum Elde Edilmesi

Çalışma grubu kriterlerine uyan kişilerden alınan kan örnekleri D vitamini düzeyi ölçümleri için ve genetik ölçümleri için farklı koşullarda saklanmıştır. Alınan kan örnekleri D vitamini ölçümleri için kırmızı kapaklı tüplere (5cc), genetik ölçümler için mor kapaklı EDTA'lı tüplere (2cc) alınmıştır.

D vitamini düzeyi biyokimyasal ölçümleri için öncelikle kan örneklerinden serum elde edilmiştir. Kan örnekleri bulunan kırmızı kapaklı tüpler periferik venden kan alınmasını takiben bir saat içinde 3000 rpm' de 6 dakika santrifüj yapılarak serum kısmı elde edilmiştir. Serum ependorf tüplere aktarılmış ve kalan pellet kısmı atılmıştır. Elde edilen serumlar -80°C' de saklanmıştır.

Genetik analizleri için alınan EDTA'lı mor kapaklı tüpteki kan örnekleri -20°C' de saklanmıştır.

3.2.3. Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanılmıştır. Burada amaç Proteinaz K varlığında ısıyla hücrenin parçalanması, nükleik asitlerin selektif olarak filtreli tüplerdeki fiberlere bağlanması, ardışık spin ve yıkamalardan sonra polimeraz zincir reaksiyonunu (PZR) inhibe edecek ürünleri uzaklaştırıp, en sonunda eklenen düşük miktarda tuz içeren çözeltiyle DNA'nın filtreden ayrılarak yüksek saflıkta elde edilmesidir.

DNA izolasyonu basamakları şöyle gerçekleştirilmiştir:

2ml EDTA'lı tüpteki periferik kan oda sıcaklığında çözdürülüp, 200µL'si 1.5ml'lik ependorf tüpe aktarılmıştır, 200µl binding buffer, 40µl Proteinaz K eklenmiştir. Vortekslenen örnekler 70°C'a ısıtılan ısı bloğunda 10 dakika bekletilmiştir. Bu süre sonunda ependorf tüpüne isopropanol ilave edilmiştir ve vortekslenmiştir. Ependorf tüpündeki tüm içerik iç içe geçen filtreli ve toplama tüplerine aktarılmıştır. Bu tüpler 8g'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonunda toplama tüpleri atılmıştır ve filtreli tüpler yeni toplama tüplerine aktarılmıştır. İnhibitör uzaklaştırıcı tampon ile bir kez ve yıkama solüsyonları ile iki kez yıkanarak santrifüjlenip yeni tüpe alınan filtreli tüpler en son 17g de santrifüjlenerek son olarak deneyin başında 70°C'ye ısıtılan, tuz konsantrasyonu içeren Elüsyon tamponu eklenerek santrifüjlenmiştir. Elde edilen DNA 1.5ml'lik ependorf tüplerine aktarılmıştır. İleriki çalışmalar için -20°C'de saklanmıştır.

3.2.4. PZR Koşulları ve Bileşenleri

PZR, DNA'nın belli bir bölgesinin laboratuvar koşullarında enzimatik olarak çoğaltılmasıdır. Denatürasyon, Primer bağlanması ve DNA sentezi olarak adlandırılan üç basamaktan oluşur. İlk olarak 94-96°C' yüksek ısı DNA çift zincirinin birbirinden ayrılmasını sağlar. İki zincir birbirinden ayrıldıktan sonra tasarlanan primerlerin DNA zincirinde kendilerine komplementer bölge ile eşleşmesi

sağlanır. Bu işlem sırasındaki ısı denatürasyon ısısından düşük ve primerlerin G/C oranına göre belirlenen Tm (erime) dereceleri ile uyumluluk göstermelidir. Genellikle son aşamada, 72 °C’de Taq polimeraz yardımı ile dNTP’ler yeni oluşan zincire eklenerek DNA zincirinde uzatma sağlanır. Uzatma aşamasının süresi kullanılan polimerazın cinsine ve çoğaltılacak DNA bölgesinin uzunluğuna göre değişiklik göstermektedir. Bu üç aşamanın tekrarlanarak DNA miktarı teorik olarak iki katına çıkmaktadır. Oluşan ürün miktarı, başlangıçtaki DNA konsantrasyonu ve döngü sayısına bağlı olarak artış gösterir.

Çalışmamızda VDBP (Gc) geninin 12. intronunda bulunan ve vitamin D seviyeleri ile ilişkilendirilen bölge çoğaltılmıştır. Rs2282679 polimorfik bölgesinin RFLP ile tayini için PZR ile amplifiye olması istenen bölge nested PZR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Bunun için hazırlanan primerde önce bir nükleotid değiştirilmiş, daha sonra bir önceki PZR ürünü kullanılarak yapılan PZR’de ikinci primerde tekrar bir nükleotid değiştirilerek enzim kesimine uygun hale getirilmiştir. Primer tasarımları yayınlardan alınmamış, primer- blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) programı kullanılarak tasarlanmıştır. Primer dizileri Tablo 1’de verilmiştir. PZR’de bağlanma sıcaklıkları primerlerin Tm derecelerine göre ayarlanmıştır. PZR bileşenleri Tablo 3’de ve PZR koşulları Tablo 4’de gösterilmiştir.

Tablo 3. PZR bileşenleri

| Bileşenler (µL) | İntron 12 GC 1. Döngü (1X) | İntron 12 GC 2. Döngü (1X) |
|--|-----------------------------------|-----------------------------------|
| dH ₂ O (hacmi 50 µl’ye tamamlamak için) | 31.6 | 35.6 |
| Taq Buffer (10X) | 5 | 5 |
| MgCl ₂ (25mM) | 5 | 5 |
| dNTP (10mM) | 1 | 1 |

| | | |
|-----------------------------|-----|-----|
| Primer F(10pmol) | 1 | 1 |
| Primer R (10pmol) | 1 | 1 |
| Taq Polimeraz (5U/ μ L) | 0.4 | 0.4 |
| Genomik DNA | 5 | - |
| 1.Döngü PZR ürünü | - | 1 |

Tablo 4. PZR koşulları

| İntron 12 GC 1. Döngü | | | İntron 12 GC 2. Döngü | | |
|-----------------------|----------|-----------|-----------------------|----------|-----------|
| 95 °C | 1dk | | 95 °C | 1dk | |
| 94 °C | 30sn | 35 siklus | 94 °C | 30sn | 35 siklus |
| 57.3°C | 1dk | | 57.3°C | 1dk | |
| 72 °C | 30sn | | 72 °C | 30sn | |
| 72 °C | 5dk | | 72 C | 5dk | |
| 4 °C | ∞ | | 4 °C | ∞ | |

3.2.5. Agoroz Jel Elektrofözezi

Jel elektrofözezinde elektrik akımı altında jele yüklenen moleküller yük, biçim ve büyüklüklerine göre ayrılırlar. Por çapları agoroz konsantrasyonu değıştirilerek

ayarlanabilir. Yürütölmek istenen DNA uzunluğu agaroz konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

Çalışmamızda PZR ile amplifiye edilen her ürün Agaroz jel elektroforezi ile gözlemlenmiştir. Amplifiye edilen ürünlerin uzunluklarını belirlemek için %2'lik, kesim sonuçlarını gözlemek için %3'lük jel hazırlanmıştır. Agaroz 1X TAE tamponunda tamamen çözülp homojen bir görüntü elde edilinceye kadar mikrodalga fırında kaynatılmış, çeker ocakta 60°C'ye soğutulurak DNA'nın jelde görünür hale geçmesini sağlayan Etidium Bromür (son konsantrasyon 30-50 ng/ml olacak şekilde) eklenerek karıştırılmış ve tarakları hazırlanmış jel tepsisine dökölerek 30 dakika soğuması beklenmiştir.

Soğuma işlemi bittikten sonra taraklar çıkarıldı, tepsi ile birlikte içinde 1X TAE bulunan jel tankına yüklenmiştir.

Örnekler agaroz jele ticari olarak temin edilen bromfenol mavi yükleme boyası (örneklerin 1/5 hacminde) kullanılarak yüklenmiş ve 120V'da 60 dakika yürütölmüştür. Ürün boylarının belirlenebilmesi için örneklerle birlikte 100bç DNA belirteci (ladder) ilk kuyuya eklenmiştir. Sonuçlar UV transilüminatörde (Chemi Doc MP BIO-RAD) gözlenmiştir. Parlak bantlar pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir. Bant oluşmayan örnekler için PZR işlemi tekrarlanmıştır.

3.2.6. Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizm (RFLP) Tayini

Restriksiyon enzimleri (RE) bakteri kökenli olup, çift iplikçikli DNA'da belli bölgeyi tanıyıp kesim yaparlar. Genom üzerinde belli bölgelerde DNA dizisi bireyler arası tek nükleotid düzeyinde farklılık gösterir (tek nükleotid polimorfizmi-SNP). Tek nükleotid polimorfizmleri restriksiyon enzimlerinin tanıma bölgelerini değiştirebilir ya da baştan tanıma bölgesi yaratabilir. Bu durumda restriksiyon fragman büyüklükleri bu bölge için farklılık gösterebilir. DNA'nın bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesime tabi tutulduktan sonra jel elektroforezine tabi tutularak

görüntülenmesi, oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısının kıyaslanması ile DNA'daki varyasyonun (polimorfizmin) saptanmasına restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm (restriction fragment length polymorphism- RFLP) adı verilmektedir.

Çalışmamızda GC geni üzerinde nested PZR sonrası yapılan PsiI kesimi tanıma bölgesi Tablo 2'de gösterilmiştir. Polimorfik bölgenin kesim enzimi ile tayini için NEB Cutter Programı (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>) kullanılmıştır.

↓

Enzimin tanıdığı bölge: cagcaaatctctgtctcttaattatcttataagcca PsiI ile kesim beklenmiş

cagcaaatctctgtctcttaattatcttatacagcca PsiI ile kesim beklenmemiştir.

DNA dizisinde polimorfik bölgede kesim beklenmemiş, yabancı tip aleli enzimin kesmesi beklenmiştir. DNA dizisinde eğer kesim olursa (wild tip homozigot) 29 ve 140 bç'lik iki parça görülmesi, kesim olmazsa, yani mutant alelin 169 bç'lik tek parça (ikinci döngü PZR ürününün) olarak görülmesi beklenmiştir. 169, 140 ve 29 parça olarak görünen üç bant heterozigot form olarak beklenmiştir.

Agaroz jel elektroforezinde

AA: Wild tip homozigot: 29 ve 140 bç'lik iki bant görülmesi beklenmiştir.

CC: Mutant homozigot: 169 bç'lik tek bant görülmesi beklenmiştir.

AC: Heterozigot: 169, 140, 29 üç bant görülmesi beklenmiştir.

Tablo 5. Kesim Bileşenleri

| Pcr ürünü kesim çözeltisi (1X) | (μL) |
|---|----------------------------|
| dH ₂ O (hacmi 30 μ l'ye tamamlamak için) | 11.9 |
| Tango Buffer (10X) | 3 |
| Psi I | 0.1 |

Kesim için 15 μ L'lik kesim çözeltisi üzerine 15 μ L 2. döngü PZR ürünü eklenmiştir. Kesim 37°C'de 16 saatte gerçekleşmiştir. Enzim kesimi sonuçları %3'lük agaroz jelde 120 V, 70 dakika yürütülerek gözlenmiştir.

3.2.7. D vitamini ölçümü

D vitamini seviyeleri biyokimyasal ölçümleri LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

LC-MS/MS D vitamini ölçümünde gold-standart olarak kabul edilmektedir. Sıvı Kromatografisi /Kütle/ Kütle (LC-MS/MS) tekniğinde; UPLC cihazı sayesinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan örnek moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Birinci quadropol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılan moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi tutulmaktadır. İkinci quadropol filtrede parçalanma sonucu oluşan

iyonların (daughter veya production) üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000 dür. Bu nedenle LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

HPLC ile kıyasla daha az miktar örnek kullanılması (0.25 ml) ve ölçümün daha hızlı olması bu yöntemi, tercih edilir kılmaktadır. Aynı zamanda 25(OH)D2 ve 25(OH)D3'ün ayrı ayrı ölçülmesi replasman tedavisi alanlarda ve fayda görmeyenlerde 25(OH)D2 seviyesi düşükse malabsorbsiyon, yüksekse vitamin D resistansını gösterebilmektedir. Yani dışarıdan alınan D vitamini ile vücutta sentezlenen D vitaminin ayrımını yapmaktadır.

D vitamini biyokimyasal ölçümleri aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır:

- -20 derecede bekleyen serumlar oda sıcaklığında 4 saat çözülmeye bırakıldı. Ependorf tüpteki serumlar sekonder tüplere aktarılmıştır.
- Tüplere alınan serumlar otomatik numune hazırlayıcı (Biomex NXP)'e yüklendi. Bu cihazda sırasıyla numunelerden 100 mikrolitre alınıp 1 mililitrelik kuyucuklara yerleştirilmiştir (deep well plate/ polipropilen). Bu kuyucuklarda çöktürme işlemi yapılmıştır.
- Örneklerin üzerine 50 mikrolitre su, 500 mikrolitre çöktürme reaktifi eklenmiştir. Çöktürme reaktifi proteinleri çöktürmek için kullanılmıştır. Böylece proteinler ve vitamin D3 ayrılmıştır. Bu cihazda çöktürme işlemi yapıldıktan sonra numuneler santrifüje alınmıştır.
- Numuneler 4000 rpm' de 3 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra süpernatant kısmı alınıp 350 mikrolitrelik well plate'e aktarılmıştır. (96 numunelik).
- Hazırlanan örnekler alüminyum folyo ile kapatıldı. LC-MS-MS de ölçüm gerçekleştirilmiştir.

3.2.8. Kemik Mineral Yoğunluğu (KMY) Ölçümü ve Yorumlanması

Dual X-Ray Absorbsiometry (DXA) ile KMY ölçümü yapılmıştır. KMY ölçümü yapılacak bölgeler :

Santral: Femur boynu, L1-L4 vertebrae (anteroposterior)

Periferik: Ön kol (ciddi obezite, hiperparatiroidizm, kalça-vertebradan ölçüm yapılamayan durumlar) olarak sınıflandırılmıştır.

Uluslararası osteoporoz tanımı yukarıdaki alanlardaki KMY'e ölçüm sonuçlarına göre yapılmıştır. Diğer alanlardan (topuk vb) yapılan ölçümlerin osteoporoz tanısında yeri yoktur.

Femur ölçümleri yorumlanırken femur total ve femur boynu dikkate alınmalı, vertebra ölçümleri yorumlanırken total (L1-L4) veya en az iki vertebra kullanılmalı, tek vertebraya göre tanı konulmamalıdır.

DXA ile taranan kemik alanına düşen mineral yoğunluğu (KMY) ölçülmektedir (g/cm²). Fakat DXA sonuçları osteoporoz açısından yorumlanırken KMY değil, T ve Z skorları kullanılır. T skoru, hastanın KMY ölçümlerinin aynı cinsiyetteki genç erişkinlerin KMY ölçümleri ile kıyaslanmasıdır. Bu değer KMY ortalamasının kaç standart sapma altında veya üstünde olduğunun göstergesidir.

Z skoru ise hastanın KMY ölçümlerinin aynı cinsiyetteki ve aynı yaşta KMY ölçümlerinin ortalamasının kaç standart sapma altında veya üstünde olduğunun ifadesidir. Postmenapozal kadınlarda ve 50 yaş üstü erkeklerde T skorları esas alınmaktadır. Z skoru ise genellikle premenapozal kadınlarda ve genç erişkinlerin ve çocukların kemik yoğunluğu ölçümlerinin yorumlanmasında kullanılır. Dünya Sağlık Örgütü'nün T skorlarına göre KMY sınıflaması Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Dünya Sağlık Örgütü T skoru değerlerine göre KMY sınıflaması

| T skoru | |
|--|---------------------------------------|
| Normal | -1.0 SD ve üstü |
| Osteopeni (düşük kemik kütlesi) | -1.0 SD ve -2.5 SD arasında |
| Osteoporoz | -2.5 SD ve altı |
| Ciddi osteoporoz varlığı | -2.5 SD ve altı + frajilite kırıklığı |

Çalışmamıza katılan postmenopozal kadınların KMY ölçümleri Marmara Üniversitesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda yapılmıştır.

3.2.9. İstatistiksel Analiz

Veriler çalışma formlarına kaydedilmiştir. Daha sonra bu formlardaki veriler kantitatif değerler (sayısal) ve kalitatif (kategorik) değerler olarak ikiye ayrılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. İstatistiksel değerler Windows XP işletim sistemi ile çalışan bilgisayarda SPSS for Windows 18.0 (Statistical Package for the Social Sciences Inc. , Chicago, USA) programı kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmadaki süresiz değişkenler frekans ve yüzde olarak, sürekli değişkenler ise ortalama \pm standart sapma olarak değerlendirilmiştir. Süreksiz değişkenler ki kare testi ile karşılaştırılırken, sürekli değişkenler için parametrik değerlerin karşılaştırılmasında independent saples t testi, parametrik olmayan dağılım gösteren değerlerin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanılmıştır.

Normal dağılım gösteren veriler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım göstermeyen veriler ortanca (medyan) (interqurtile range: çeyrek değer genişliği) değerler olarak ifade edilmiştir.

Genetik varyasyonların dağılımı için genotip ve alel frekansları hesaplanmıştır. Polimorfizmin Hardy Weinberg'e uyumluluğu test edilmiştir. Genotiplere göre değerlerin dağılımı yine medyanlar esas alınarak bakılmıştır. Mann-Whitney U testi ile gruplar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı hesaplanmıştır.

Kemik yoğunluğu sonuçlarının dağılımı için verilerin hem sayısal hem kategorik değişkenler olarak analizi yapılmıştır. Verileri kategorik değişkenler olarak tanımlandığında genotip grupları arası farklılıklar ki kare testi ile hesaplanmıştır.

Değişik kateogorideki veri gruplarının birbiriyle ilişkileri Korelasyon testleri ile ölçülmüştür.

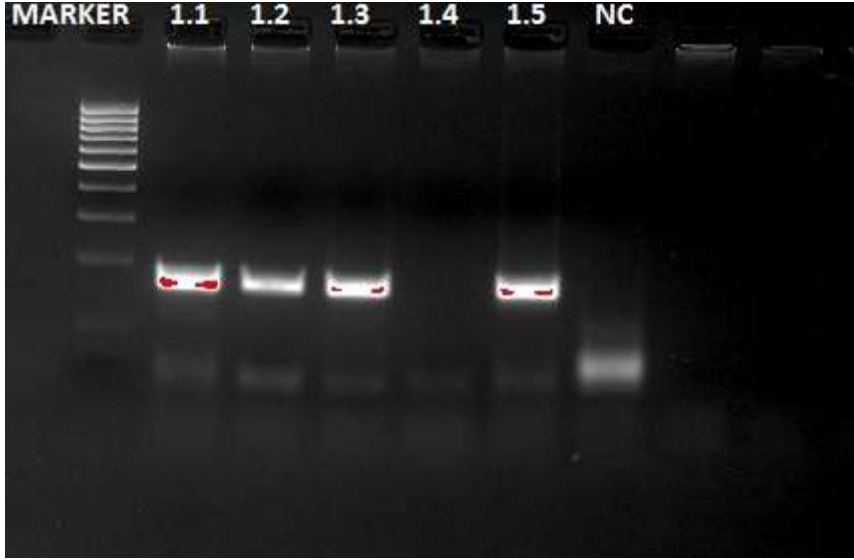
P değeri 0.05'den küçükse sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

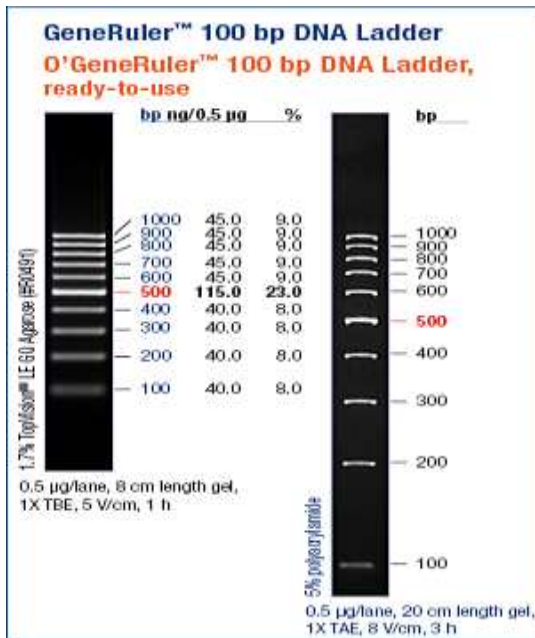
4.1. PZR Sonuçları

4.1.1. Birinci Döngü PZR:

Çalışmaya katılan 100 kişiden alınan periferik kan örneklerinden DNA izole edilmesini, takiben GC (VDBP) Geninin İntron 12 bölgesinde rs2282679 polimorfik bölgesi PZR ile amplifiye edilmiştir. PZR sonucu, %3 'lik Agaroz Jelde 120 V'da 70 dakika yürütülmesini takiben 169 bç 'lik ürün gözlenmiştir.



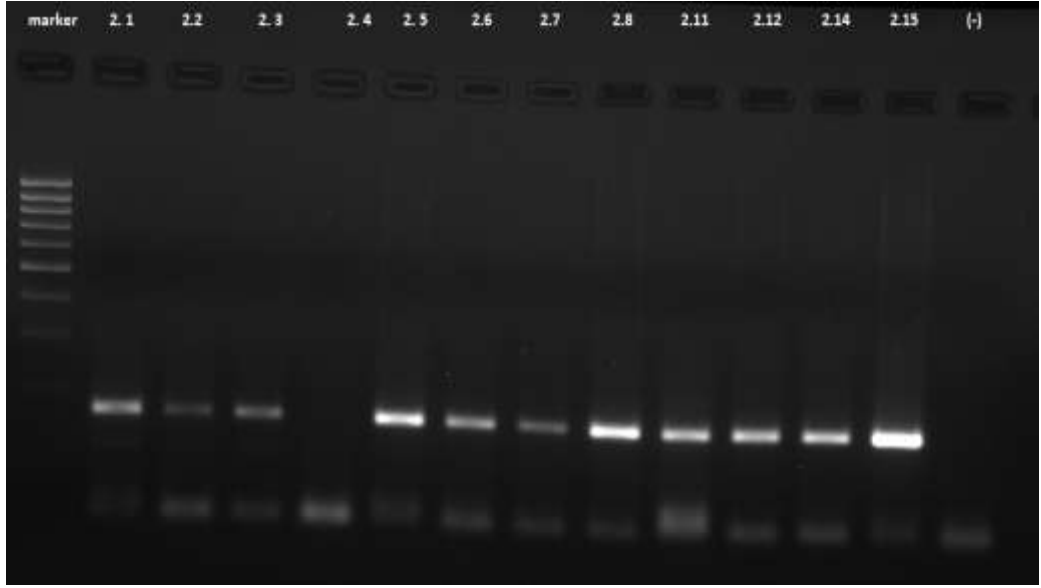
Şekil 4: Birinci döngü PZR sonuçlarının %3'lik agaroz jelde görünümü. 100bç belirteç (ladder) en solda görünmektedir, 1.1, 1.2, 1.3, 1.5 örneklerinde 169bç'lik ürün gözlenmiştir. 1.4'te sonuç çıkmamış sonraki deneylerde tekrarlanmıştır. NC: negatif kontrol



Şekil 5 : PZR için kullanılan 100 bç marker

4.1.2. İkinci Döngü PZR:

İlk döngünün PZR ürünlerinden 1 µl alınarak 49 µl PZR karışımı ile birlikte toplam 50 µl ikinci döngü PZR gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünlerinden 15 µl alınarak yükleme boyası ile birlikte toplam 18µl 2'lik Agaroz Jele yüklendi. 120 V'da 60 dakika sonucu 169 bç'lik ürün gözlemlendi (Şekil 7).



Şekil 6 : İlk döngü PZR ürünlerinden yapılan ikinci döngü PZR ürünlerinin %3'lik agaroz jelde görüntülenmesi. Marker olarak 100bp ladder kullanılmıştır. PZR'de 169 bç'lik ürün gözlenmiştir. En son kuyuda negatif kontrol (-) görülmektedir.

1. PZR Ürününün PstI enzimi ile kesilerek RFLP Tayini Sonuçları

Gc geni rs2282679 polimorfizmi tespiti için RFLP yöntemi kullanılarak İkinci döngü PZR örnekleri AatI (PstI) restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. 37°C'de 12 saat kesim sonucu %3'lük Agaroz'da 120 V'da 70 dakika sonucu DNA dizisinde polimorfik bölgede kesim beklenmemiş, yabancı tip aleli enzimin kesmesi beklenmiştir. DNA dizisinde yabancı homozigot 29 ve 140 bç'lik 2 bant olarak,

kesim olmazsa, yani mutant alelin 169 bç'lik tek parça (ikinci döngü PZR ürününün) olarak görülmüştür. 169, 140 ve 29 parça olarak görünen üç bant heterozigot genotiptir.

Agaroz jel elektroforezinde

AA: Wild tip homozigot: 29 ve 140 bç'lik iki bant.

CC: Mutant homozigot: 169 bç'lik tek bant

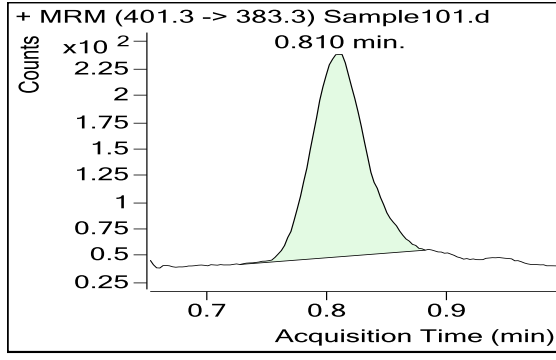
AC: Heterozigot: 169, 140, 29 üç bant



Şekil 7 : GC geni rs2282679 polimorfik bölgesinin RFLP tayininde PsiI enzimi ile kesim sonuçları. Enzim kesimi gerçekleştirilen olarak 100 bp'lik ladder kullanılmıştır. K11 yabani homozigot, K14 ve K49 heterozigot, K20 ve K50 homozigot mutant olarak gözlenmiştir.

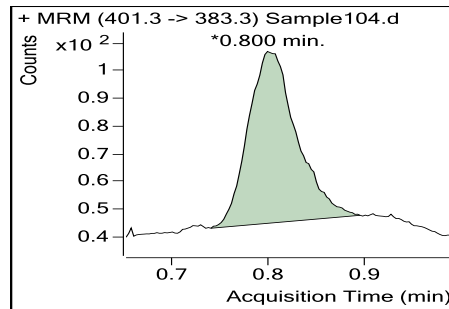
2. D Vitamini Ölçümü Sonuçları

D vitamini ölçümü için 6 farklı konsantrasyonda 25(OH)D3 kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Standart eğride korelasyon katsayısı (R²) 0.9972 olarak hesaplanmıştır. Standart eğri orijinden geçmeye zorlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken aynı zamanda iki tane farklı konsantrasyon seviyesinde kalite kontrol örnekleri ölçülmüştür (Şekil 9).



Şekil 8. 6 farklı konsantrasyon eğrisi ile hazırlanmış 25-OH Vitamin D3 kalibrasyon eğrisi

İlk kuadropolden geçtiğinde en yüksek tepe noktası alınmıştır (401.3), ikinci kuadropol, en büyük parçanın tepe noktasına göre ayarlanmış (383.3) ve ona göre üçgen oluşturulmuştur (Şekil 10). Her örnek için şekil 10'da görülen kromatogram üzerinden D vitamini seviyesi ölçümü üçgen ile belirtilen taralı alana göre hesaplanmıştır.



Şekil 9. 401.3-383.3 geçişinde 4 numaralı örnek için kromatogram

3. Kemik Yoğunluğu Ölçümü Sonuçları

Tablo 7 : Kemik yoğunluğu ölçümü sonuçları

| ÖRNEKLER | AP Spine T-SKOR (L1-L4) | Femur Boyun T- SKOR | Femur Toplam T-SKOR |
|----------|-------------------------|---------------------|---------------------|
| 001. | -1.3 OSTEOPENİK | -0.9 NORMAL | -0.3 NORMAL |
| 003. | -1.0 OSTEOPENİK | -2.2 OSTEOPENİK | -1.7 OSTEOPENİK |
| 004. | -3.3 OSTEOPOROTİK | -0.2 NORMAL | 0.5 NORMAL |
| 005. | -1.7 OSTEOPENİK | 0.2 NORMAL | 0.2 NORMAL |
| 006. | -1.3 OSTEOPENİK | -0.6 NORMAL | -0.1 NORMAL |
| 007. | -1.3 OSTEOPENİK | -0.7 NORMAL | -0.2 NORMAL |
| 009. | -1.9 OSTEOPENİK | -2.0 OSTEOPENİK | -1.8 OSTEOPENİK |
| 010. | 0.2 NORMAL | -0.2 NORMAL | 0.9 NORMAL |
| 011. | -1.5 OSTEOPENİK | -1.6 OSTEOPENİK | -0.9 NORMAL |
| 012. | 1.4 NORMAL | 1.8 NORMAL | 0.9 NORMAL |
| 013. | -1.7 OSTEOPENİK | -0.5 NORMAL | -0.5 NORMAL |
| 015. | -0.8 NORMAL | 0.3 NORMAL | 1.9 NORMAL |
| 016. | 2.5 NORMAL | 0.1 NORMAL | -0.4 NORMAL |

| | | | |
|-------------|-----------------|-----------------|--------------------|
| 017. | -1.1 OSTEOPENÍK | 0.0 NORMAL | -0.2 NORMAL |
| 018. | 0.2 NORMAL | 0.5 NORMAL | 1.4 NORMAL |
| 020. | -1.0 OSTEOPENÍK | -1.3 OSTEOPENÍK | -1.0 OSTEOPENÍK |
| 021. | -1.9 OSTEOPENÍK | -1.7 OSTEOPENÍK | -1.4 OSTEOPENÍK |
| 022. | -1.2 OSTEOPENÍK | -0.2 NORMAL | 0.7 NORMAL |
| 023. | 0.2 NORMAL | -0.3 NORMAL | -0.1 NORMAL |
| 025. | -1.0 OSTEOPENÍK | -0.5 NORMAL | -0.3 NORMAL |
| 026. | 3.5 NORMAL | 2.4 NORMAL | 3.0 NORMAL |
| 027. | -0.6 NORMAL | 0.7 NORMAL | 0.7 NORMAL |
| 029. | -0.9 NORMAL | -1.1 OSTEOPENÍK | -1.1 OSTEOPENÍK |
| 030. | -1.0 OSTEOPENÍK | 0.1 NORMAL | 1.4 NORMAL |
| 033. | 0.3 NORMAL | -0.9 NORMAL | 0.3 NORMAL |
| 034. | -1.5 OSTEOPENÍK | -1.5 OSTEOPENÍK | -0.9 NORMAL |
| 041. | -0.1 NORMAL | 0.2 NORMAL | 0.4 NORMAL |
| 043. | -1.9 OSTEOPENÍK | -1.3 OSTEOPENÍK | -1.8 OSTEOPENÍK |
| 045. | 1.4 NORMAL | 0.6 NORMAL | 0.7 NORMAL |

| | | | |
|-------------|-------------------|-------------------|----------------------|
| 047. | -2.3 OSTEOPENİK | -1.1 OSTEOPENİK | -0.9 NORMAL |
| 048. | -1.5 OSTEOPENİK | -1.0 OSTEOPENİK | -0.4 NORMAL |
| 050. | 1.7 NORMAL | 1.7 NORMAL | 1.4 NORMAL |
| 051. | -1.7 OSTEOPENİK | -0.6 NORMAL | -0.7 NORMAL |
| 052. | -1.9 OSTEOPENİK | -2.6 OSTEOPOROTİK | -2.0 OSTEOPENİK |
| 057. | -2.4 OSTEOPENİK | -0.8 NORMAL | -0.5 NORMAL |
| 058. | -1.2 OSTEOPENİK | -0.7 NORMAL | 0.8 NORMAL |
| 074. | -0.7 NORMAL | -1.2 OSTEOPENİK | -0.5 NORMAL |
| 079. | -0.9 NORMAL | -1.6 OSTEOPENİK | -1.2 OSTEOPENİK |
| 081. | 1.9 NORMAL | 0.2 NORMAL | 0.6 NORMAL |
| 082. | -1.0 OSTEOPENİK | -2.6 OSTEOPOROTİK | -1.6 OSTEOPENİK |
| 085. | 0.6 NORMAL | -0.3 NORMAL | 1.0 NORMAL |
| 086. | -0.9 NORMAL | -1.4 OSTEOPENİK | -1.0 OSTEOPENİK |
| 087. | -3.4 OSTEOPOROTİK | -3.0 OSTEOPOROTİK | -2.6 OSTEOPOROTİK |
| 089. | -2.0 OSTEOPENİK | -0.9 NORMAL | -0.9 NORMAL |
| 090. | 0.7 NORMAL | 1.6 NORMAL | 1.6 NORMAL |
| 091. | -2.4 OSTEOPENİK | -0.4 NORMAL | |

| | | | |
|-------------|-------------|-----------------|--------------------|
| 093. | 0.6 NORMAL | 0.6 NORMAL | 1.1 NORMAL |
| 095. | 0.9 NORMAL | 0.4 NORMAL | 1.9 NORMAL |
| 096. | -0.7 NORMAL | -0.4 NORMAL | -0.7 NORMAL |
| 097. | 2.4 NORMAL | 1.6 NORMAL | 1.5 NORMAL |
| 098. | -0.1 NORMAL | 0.6 NORMAL | 0.7 NORMAL |
| 100. | -0.1 NORMAL | -2.0 OSTEOPENİK | -1.6 OSTEOPENİK |

4.3. Çalışmanın İstatistiksel Değerlendirilmesi

4.3.1. Katılımcıların demografik bilgileri

Katılımcıların boy ve kilo sonuçları normal dağılmıştır. Bu yüzden sonuçlar ortalama (medyan) değerleri olarak verilmiştir. Ancak VKİ, D vitamin değerleri ve yaşları normal dağılım göstermediği için ortanca değer kullanılmıştır.

Tablo 8: Katılımcıların demografik bilgileri

| | Ortalama(± SD) veya Ortanca (IR) |
|-------------------------------|---|
| Boy (cm) | 157 (±7) |
| Kilo (kg) | 77 (±15) |
| VKİ (kg/m²) | 29.14 (10) |
| Yaş | 58 (12) |
| Vitamin D (mg/dl) | 9 (13) |

4.3.2. Katılımcıların Genotipik Özellikleri

100 katılımcıdan 88 tanesinin DNA'sı izole edilmiş, 74'ünün genotiplendirmesi yapılmıştır.

Tablo 9 : Katılımcıların Genotip ve alel frekansları

| | AA | AC | CC |
|-------------------------|-----------|-----------|-----------|
| Genotip Frekansı | 0.14(10) | 0.67 (50) | 0.19 (14) |

| | A | C |
|----------------------|----------|----------|
| Alel Frekansı | 0.47 | 0.53 |

4.3.3. Vitamin D ve VKİ Değerlerinin Genotipe Göre Dağılımı

Tablo 10: Vitamin D ve VKİ değerlerinin genotipe göre dağılımı

| | AA | AC | CC | P |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Vitamin D | 18.3 | 9.26 | 8.61 | 0.075 |
| VKİ | 29.00 | 28.27 | 28.44 | 0.630 |

Genotip gruplar arası Vitamin D düzeyleri farkı Mann Whitney U testi ile bakılmış ve anlamlı fark görülmemiştir. VKİ genotip grupları arasında anlamlı fark göstermemiştir.

4.3.4. Kemik Yoğunluğu Ölçümleri Sonuçlarının Dağılımı

Kemik Yoğunluğu Sonuçları değerlerine göre normal, osteopenik ve osteoporotik olarak kategorize edilmiş ve her üç bölge (AP spine, femur boyun ve femur toplam) ki kare testiyle korele edilmiş ancak gruplar arası fark bulunmamıştır ($p=0.383$). Kemik yoğunluğu sonuçları BMD (g/cm^2) olarak sayısal değerleri ile analizi yapılmıştır. Ölçüm sonuçları normal dağılım göstermiştir. Kemik yoğunluğunu gösteren değerlerin ortalamaları apspine (L1-L4 omurga) : 1.057 (± 0.19), femur boyun: 0.886(± 0.15), femur toplam: 0.970 (± 0.14) olarak bulunmuştur.

4.3.5. Vitamin D Değerlerinin Kemik Yoğunluğu Ölçümleriyle Korelasyonu

Vitamin D değerleri kemik yoğunluğu ölçümleriyle non parametrik Kruskal Wallis testiyle korelasyon analizi yapılmış ve anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

Tablo 11: Vitamin D değerlerinin kemik yoğunluğu ölçümleriyle korelasyonu

| Kemik Yoğunluğu ölçüm bölgesi | R | P |
|--------------------------------------|----------|----------|
| AP spine | -0.172 | 0.218 |
| Femur Boyun | -0.166 | 0.453 |
| Femur Toplam | -0.236 | 0.099 |

r: korelasyon katsayısı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı

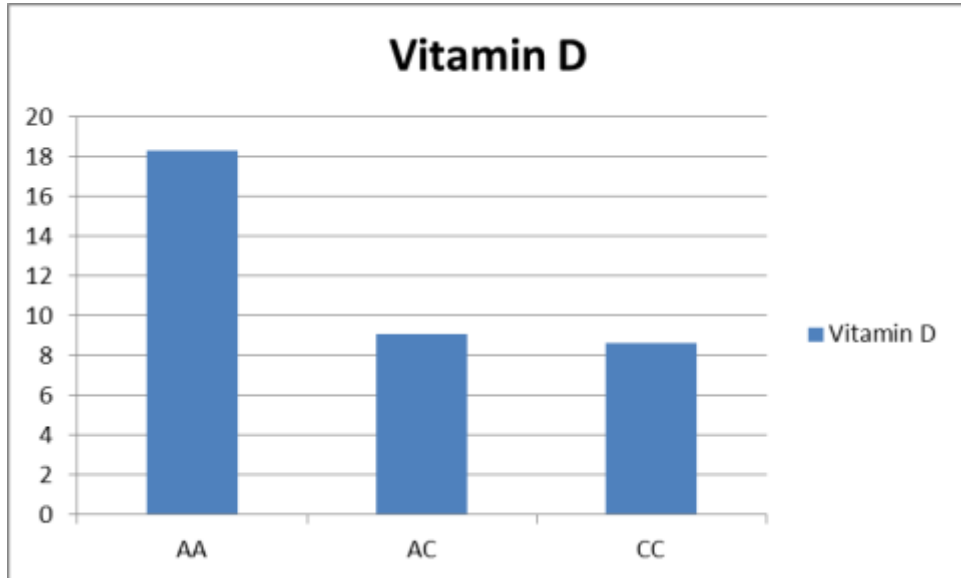
4.3.6. Kemik yoğunluğu, vitamin D Değerleri ve Genotip İlişkisi

Pearson korelasyon testiyle kemik yoğunluğu ölçümleri, vitamin D değerleri ve genotip ilişkisi araştırılmış ve yabancı homozygot tip genotipe sahip kişilerde (AA)

vitamin D düzeyleri, polimorfik bireylere göre (AC+CC) anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (22 ± 19 vs 13 ± 11 , $p=0.042$). Ancak kemik yoğunluğu ölçüm bölge değerleri ile rs2282679 polimorfizmi arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

Tablo 12 : Kemik yoğunluğu, vitamin D Değerleri ve Genotip İlişkisi

| | Yabancıl tip (AA) | Polimorfik tip (AC;CC) | p |
|---------------------|-------------------|------------------------|-------|
| APSpine | 1.1 ± 0.3 | 1.0 ± 0.2 | 0.082 |
| Femur boyun | 0.9 ± 0.2 | 0.9 ± 0.2 | 0.458 |
| Femur toplam | 1.0 ± 0.2 | 0.9 ± 0.1 | 0.697 |
| Vit D | 22 ± 19 | 13 ± 11 | 0.04 |



Şekil 10 : Vitamin D seviyelerinin Genotipe göre dağılımı. AA-CC arası fark $p=0.025$, AA-AC farkı $p=0.083$

5. TARTIŞMA VE GELECEK PLANI

5.1. Tartışma

Çalışmaya gönüllülük esasına dayanarak katılan 100 post menopozal kadının demografik bilgilerinin istatistiksel analizi sonucu ortalama boy 157 cm (± 7) ve ortalama vücut ağırlığı 77 kg (± 15) olarak bulunmuştur. Katılımcıların yaşları normal dağılım göstermediği için ortanca değer alınmıştır (58 (IR:12)). VKİ değerleri normal dağılım göstermediği için ortanca değerleri alınmıştır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kılavuzlarında VKİ: 25-29 kg/m² arası kişiler fazla kilolu, 30-34.9 kg/m² kişiler obez olarak tanımlanmaktadır (27). Çalışma popülasyonumuzun verileri göstermektedir ki VKİ değerleri WHO kılavuzlarına göre preobez-obez 29.14 (IR:10) sınıflandırmasına girmektedir. Bu da bize bu popülasyonunun metabolik sendrom için risk taşıdığını göstermektedir (27). Ancak çalışmamızda VKİ ve Vitamin D değerleri arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

Çalışmaya katılan kadınlarda vitamin seviyeleri normal değerlerin çok altında bulunmuştur. D vitamininin normal değerleri 30-55 ng/ml olarak bilinirken katılımcılarda D vitamininin ortanca değeri 9ng/ml (IR:13) olarak bulunmuştur. D vitamininin seviyelerinin bu kadar düşük seyretmesinin sebepleri bu popülasyonda menopoz sonrası hızlı kayıp, sosyoekonomik durum, beslenme alışkanlıkları, genetik yatkınlık sorularını akla getirmektedir. Yakın zamanlı yayınlarda obezitenin vitamin D seviyeleriyle ters orantılı olduğu ve VKİ arttıkça D vitamini seviyelerinin belirgin olarak düşüş gösterdiği rapor edilmiştir. Bu yayınlarda özellikle menopoz sonrası kadınlarda vitamin D seviyelerindeki bu düşüklüğün yüksek kilo ile ilişkili olduğu yönündedir (28,29). Vitamin D değerlerinin kemik yoğunluğu ölçümleriyle korelasyon analizi yapılmış ve omurga (apspine), femur boyun ve femur toplam sonuçlarının D vitamini değerleriyle arasında anlamlı bir ilişki gösterilememiştir.

D vitamini seviyeleriyle ilişkilendirilen VDBP rs2282679 polimorfizmi seçilen popülasyonda bakılmış, genotip grupları arasında anlamlı fark gösterilememiştir

($p=0.075$). Ancak dominans analizinde homozigot yabancı tip polimorfik grupla karşılaştırıldığında bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0046$).

Ayrıca AA-CC arası fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (0.025). AA-AC genotipi arasındaki fark $p=0.083$ olarak bulunmuştur.

Leong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da rs2282679 ve DBP ve serum vitamin düzeyi arasında güçlü bir ilişki olduğu bulunmuştur. rs2282679 polimorfizminin DBP seviyelerinde düşüş ile ilişkili olduğu görülmüştür (30). Hartman çalışmasının sonuçları da bizim bulgularımızı doğrular niteliktedir. D vitamini seviyesinde rs2282679 polimorfizmine bağlı olarak düşüş görülmüştür (31).

Çalışma grubunda MAF (minor alel frekansı) 0.5 olarak ölçülmüştür. Ancak popülasyon çalışmalarında MAF:0.2 olarak belirtilmektedir. Avrupa toplumunda MAF:0.26, Asya toplumlarında 0.25 ve Asya toplumlarında 0.1 olarak belirtilmiştir (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2282679). Bu değerlere göre bizim çalışma grubumuzda riskli alel frekansı diğer toplumlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda genotip frekansları AA: 0.14, AC: =.67 ve CC: 0.19 olarak bulunmuştur, alel frekansları A:0.47 ve C: 0.43 olarak bulunmuştur.

Çalışmanın Eksik Yönleri: Çalışmamız bir kohort analizidir. Marmara Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran menopoiz sonrası kadınlar gönüllülük esasına göre katılmışlardır. Katılımcıların sosyoekonomik düzeyleri, beslenme alışkanlıkları vitamin D düzeylerine etki edebilir. Vitamin D düzeyleri topluma göre çok düşük olarak gözlenmiştir. Bu yüzden kohort çalışması olmasına rağmen homojen bir topluluk olmamıştır ve bu çalışmadaki sonuçlar toplumun genel özelliklerini yansıtmamaktadır. Aynı zamanda vaka sayısının çok düşük olması sonuçları etkilemiş olabilir. Ancak vitamin D takviyesi kullanmayan post menopoizal kadınların seçilmesi vaka sayısını sınırlamaktadır.

5.2. Çalışmanın Gelecek Planı

Çalışmamızın sonucunda serum D vitamini seviyeleri ve rs2282679 arasındaki ilişki anlamlı olduğu için çalışma grubu sayısının arttırılması daha doğru sonuçlar verebilir. Bu nedenle ileride yapılacak olan geniş bir kohort çalışması düşünülmüştür. Bu çalışma grubunda vitamin D değerlerinin düşüklüğüne yol açabilecek yeni genetik belirteçler araştırılabilir. Sonuçlarda serum vitamin D seviyelerinin çok düşük olmasına rağmen kemik dansitesinde beklenen anlamlı osteoporotik değişikliklerin görülmemesi bize vitamin D seviyeleri ve osteoporoz ilişkisini daha ayrıntılı araştırma ve etkileyen faktörleri araştırma gerekliliğini düşündürmüştür.

6. KAYNAKLAR

1. Biyokimya Lippincott's Illustrated Reviews 3. Baskı, 2007 Sayfa 384-387.
2. Diabetes. 2010 Jan;59(1):242-8. doi: 10.2337/db09-1011.
3. C. von Domarus, J. Brown, F. Barvencik, M. Amling, and P. Pogoda, "How much Vitamin D do we need for skeletal health" Clinical Orthopaedics and Related Research, vol. 469, no. 11, pp. 3127–3133, 2011
4. Bikle D. Nonclassic Actions of Vitamin D. J Clin Endocrinol Metab 2009; 94(1): 26-34.
5. Özkan B, Döneray H. D vitaminin iskelet sistemi dışı etkileri. Çocuk Sağ ve Has Derg 2011;54:99-119.
6. Buell et al. Vitamin D Is Associated With Cognitive Function in Elders Receiving Home Health Services. Journal of Gerontology 2009;664:888-895
7. Scientific Committee on Food. (2002). Opinion of the Scientific Committee on Food on the Tolerable Upper Intake Level of Vitamin D. Available at:http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out157_en.pdf
8. Hochberg Z. Rickets-past and present. In: Hochberg Z (ed). Vitamin D and Rickets Vol 6 Switzerland: S Karger AG 2003: 1-13.
9. Wharton B, Bishop N. Rickets. Lancet 2003; 362: 1389-1400.
10. Henry HL. Vitamin D hydroxylases. J Cell Biochem 1992;49:4–9

11. Henry HL Parathyroid hormone modulation of 25-hydroxyvitamin D3 metabolism by cultured chick kidney cells is mimicked and enhanced by forskolin. *Endocrinology* 1985;116:503–510
12. Takayuki Sakai, Yukio Okano, Yoshinori Nozawa, Nobumitsu Oka J Parathyroid hormone stimulates phosphoinositide metabolism and intracellular calcium mobilization in osteoblast-like clone MC3T3-E1 cells. *Bone Miner. Metab.* 1991;9, 19-25.
13. Lauridsen AL, Vestergaard P, Hermann AP, et al. Female premenopausal fracture risk is associated with gc phenotype. *J Bone Miner Res* 2004;19:875–881.
14. Tang BM, Eslick GD, Nowson C, et al. Use of calcium or calcium in combination with vitamin D supplementation to prevent fractures and bone loss in people aged 50 years and older: a meta-analysis. *Lancet* 2007;370:657–66
15. D. T. Villareal, R. Civitelli, A. Chines, and L. V. Avioli, “Subclinical vitamin D deficiency in postmenopausal women with low vertebral bone mass,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 72, no. 3, pp. 628–634, 1991
16. P. Lips, D. Hosking, K. Lippuner et al., “The prevalence of vitamin D inadequacy among women with osteoporosis: an international epidemiological investigation,” *Journal of Internal Medicine*, 2006;260: 245–254.
17. Verboven C, Rabijns A, De Maeyer M, Van Baelen H, Bouillon R and De Ranter C: A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nat Struct Biol* , 2002; 9: 131-136.
18. Zhang J, Habel DM, Ramadass M, Kew RR. Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:623–9.
19. Song YH, Naumova AK, Liebhaber SA, Cooke NE. Physical and meiotic mapping of the region of human chromosome 4q11- q13 encompassing the

- vitamin D binding protein DBP/Gcglobulin and albumin multigene cluster. *Genome Res* 1999;9:581–7
20. Witke WF1, Gibbs PE, Zielinski R, Yang F, Bowman BH, Dugaiczky A. Complete Structure of the Human Gc Gene: Differences and Similarities between Members of the Albumin Gene Family. *Genomics*. 1993 Jun;16(3):751-4.
 21. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Simon KC, McCullough ML, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. *Hum Mol Genet* 2010;19: 2739–2745.
 22. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet* 2010;376: 180–188.
 23. Abbas S, Linseisen J, Slinger T, et al. The Gc2 allele of the vitamin D binding protein is associated with a decreased postmenopausal breast cancer risk, independent of the vitamin D status. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008;17:1339–1343.
 24. Cleve H, Constans J. The mutants of the vitamin-D-binding protein: more than 120 variants of the GC/DBP system. *Vox Sang*. 1988;54:215–225.
 25. Perna L1, Felix JF, Breitling LP, Haug U, Raum E, Burwinkel B, Schöttker B, Brenner H. Genetic Variations in the Vitamin D Binding Protein and Season-Specific Levels of Vitamin D Among Older Adults. *Epidemiology*. 2013;24(1):104-9
 26. Gozdzik A, Zhu J, Wong BY, Fu L, Cole DE, Parra EJ. Association of vitamin D binding protein (VDBP) polymorphisms and serum 25(OH)D concentrations in a sample of young Canadian adults of different ancestry. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;127:405–412.

27. World Health Organization. Obesity. Preventing and managing the global epidemic. Report on a WHO consultation on Obesity. Technical Report Series Number 894. Geneva. World Health Organization; 2000.
28. Vanlint S. Vitamin D and obesity. *Nutrients* 2013;5:949-956.
29. Konradsen S1, Ag H, Lindberg F, Hexeberg S, Jorde R. Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index. *Eur J Nutr.* 2008;47:87-9.
30. Leong A, Rehman W, Dastani Z, Greenwood C, Timpson N, et al. (2014) The Causal Effect of Vitamin D Binding Protein (DBP) Levels on Calcemic and Cardiometabolic Diseases: A Mendelian Randomization Study. *PLoS Med* 2014;11(10): e1001751. doi:10.1371/journal.pmed.1001751
31. Hartman JL 4th, Garvik B, Hartwell L Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 2001;291: 1001–1004.

EKLER :

Ek 1. Özgeçmiş

ZÜMRE KARADAĞ

Sultançiftliği Mh.Atatürk Cd.Durak Sok.N:12\3 Taşdelen\Çekmeköy

E-mail: zumre.karadag@gmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Yeri : İstanbul –Kadıköy

Doğum Yılı : 1986

EĞİTİM DURUMU

2011-2014 : Acıbadem Üniversitesi (Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Yüksek Lisans)

2005-2009 : Uludağ Üniversitesi (Fen Edebiyat Fakültesi) Biyoloji Bölümü

2000-2004 : Ümraniye Lisesi (İngilizce Hazırlık + 3 yıl)

YABANCI DİL

İngilizce : İyi

BİLGİSAYAR

Windows NT, Microsoft Ofis 98; Excel, Word, PowerPoint, Access, Internet

AKTİVİTELER\ SEMİNERLER

1) Boğaziçi üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Haftasonu 3 Kongresi 10-11 Mayıs 2008

2) Uluslararası Katılımlı 6. İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi 6-8 Mart 2009

3) Uludağ üniversitesi Önemli Bitki Alanları Ağı Projesi 13-17 Mayıs 2008

4) Tübitak Destekli Doğa Eğitimi / ARTVİN 10-20 Temmuz 2008

5) Dış Ticaret Eğitimi - Uludağ Üniversitesi Dış Ticaret ve Lojistik Topluluğu 8-9-15-16 Kasım 2008

Ek 2. Etik Kurul Raporu



T.C.
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

SAYI:B.30.2.ACÜ.0.00.00.050-06/2360
KONU: ATADEK 2013-554

18 Aralık 2013

Sayın Prof. Dr. Cengiz YAKICIER,

ATADEK 2013-554 kodlu, Prof. Dr. Cengiz Yakıcıer, Yrd. Doç. Dr. Deniz Ağırbaşı, Zümre Karadağ, Prof. Dr. Zeynep Güven, Prof.Dr. Mustafa Serteser tarafından yürütülecek olan "Postmenopozal kadınlarda GC rs2282679 'un vitamin D seviyeleri ve osteoporozla ilişkisi" başlıklı araştırması Acıbadem Üniversitesi Etik Kurulu'nun 17 Aralık 2013 tarihli 90. toplantısında incelenmiş; etik açıdan uygun bulunmuştur.(Karar No. 2013-554)

Saygılarımızla,

Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS
Başkan

Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman
Başkan Yardımcısı



T.C.
ACIBADEM ÜNİVERSİTESİ

TIBBİ ARAŞTIRMALARI DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

Prof. Dr. İsmail Hakkı Ulus (Başkan)

Prof. Dr. Yeşim Işıl Ülman (Başkan Yardımcısı)

Prof. Dr. Güldal Süyen

Prof. Dr. Fevzi Toraman

Prof. Dr. Murat Saruç

Prof. Dr. Mert Ülgen

Prof. Dr. Nadi Bakırcı

Prof. Dr. Yasemin Alanay

Doç. Dr. Ükke Karabacak

Yrd. Doç. Dr. Emre Dorman

Dr. Sertaç Uzel

Dr. Nalan Karadağ

Av. Ferda Kaya Öztürk