

GİZEM ÇELEBİ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2019



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**DİYETE BAĞLI ENDOTEL HASARI OLUŞTURULAN
RATLARDA RANKL/OPG SİNYAL YOLAĞI
AKTİVİTELERİ**

GİZEM ÇELEBİ

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. AYŞE EVRİM BAYRAK**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI**YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Gizem ÇELEBİ tarafından Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK'ın danışmanlığında hazırlanan **“Diyete Bağlı Endotel Hasarı Oluşturulan Ratlarda RANKL/OPG Sinyal Yolu Aktiviteleri”** başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 22.08.2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Burçak VURAL
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK
İ.Ü. Aziz Sancar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Fatma KAYA DAĞISTANLI
İ.Ü. Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fak.
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda 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.

Gizem Çelebi



İTHAF

Tesla'ma ve aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansım boyunca tüm fikirlerimi paylaşabildiğim, güvenini her zaman hissettiğim, yardımlarını asla esirgemeyen, bana kongreleri, posterleri, deneyleri ve kendimi geliştirebilmem için daha pek çok fırsatı vermeye çalışan, bir lisans süresi kadar yanında zaman geçirdiğim ve beni bugünlere ulaştıran saygıdeğer ve sevgili danışmanım Doç. Dr. Ayşe Evrim Kömürcü-Bayrak'a sonsuz teşekkürler.

Öğrencisi olamasam da asistanı olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum, referanslarını benden esirgemeyen, yanında akademik yaşam hakkında pek çok şey öğrendiğim, kendime olan inancımı kazandıran ve her zaman desteğini hissettiğim sayın Prof. Dr. Nermin Gözükırmızı'ya çok teşekkür ediyorum.

Çalışma ortamının en stresli koşullarında kahrımı çeken, işin içinden çıkamadığımda yardıma koşan, destekleyici, anlayışlı ve neşeli tavırları ile kısa sürede hayatımın vazgeçilmez bir parçası olan Öğr. Gör. Dr. Elif Karlık'a,

Üşenmeyip motivasyon mektubu yazmayı öğreten, doğruyu söylemekten hiç korkmayan, bu yönü ile kendime örnek aldığım, desteğini, ilgisini ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Ü. Baran Erman'a,

Tez deneylerim sırasında yanlarında çok şey öğrendiğim, bana büyük tecrübe kazandıran ve iyi ki karşılaşmışım dediğim sayın Doç. Dr. Fatma Kaya Dağıstanlı ve Ar. Gör. Merve Anapalı'ya,

Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne gelmeme vesile olan, yardımını, desteğini, anlayışını, bilgisini hiç esirgemeyen, Öğr. Gör. Dr. Gamze Güven'e,

Arkamda olduklarını bildiğim, desteklerini ve güvenlerini esirgemeyen aileme,

En karamsar anlarımda yanımda olan, vazgeçtiğimde ipleri eline alan, bana olan inancını hiç kaybetmeyen, ihtiyaç duyduğum her an cesaretimi körükleyen, varlığına her zaman ihtiyaç duyduğum ve sevgisini kalbimde hissettiğim Ar. Gör. Özgür Bozan'a teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32715

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN	iii
İTHAF	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / kısaltmalar listesi	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT	xiv
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Osteoprotegerin (OPG):	3
2.2. OPG/RANK/RANKL Yolağı:	7
2.3. Kardiyometabolik Hastalıklarda OPG'nin Rolü	8
2.3.1. <i>Tip 2 Diabetes Mellitus ve OPG İlişkisi</i>	8
2.3.2. <i>Metabolik Sendrom ve OPG İlişkisi</i>	9
2.4. OPG'nin Vasküler Sistemdeki Patofizyolojik Rolü	10
2.5. Endotel Disfonksiyonu.....	13
2.5.1. <i>Tip 2 Diabetes Mellitusta Endotel Disfonksiyonu</i>	14
2.5.2. <i>Metabolik Sendromda Endotel Disfonksiyonu</i>	16
2.6. Vitamin D (Kolekalsiferol)	18
2.6.1. <i>Vitamin D ile Endotel Disfonksiyonu İlişkisi</i>	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal	20

3.1.1. Kullanılan deney hayvanları.....	20
3.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	20
3.1.3. Kullanılan Kitler.....	21
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	22
3.2. Yöntem.....	22
4. BULGULAR.....	36
4.1. Açlık Kan Glukozu Seviyesi.....	36
4.2. Vücut Ağırlığı Ölçümleri.....	38
4.3. Günlük Kalori Alımı Tespiti.....	39
4.4. Aort Dokusunda <i>Opg</i> ve <i>Rankl</i> mRNA İfade Düzeyleri	41
4.5. Aort Dokusunda <i>Il-1b</i> ve <i>Tnfα</i> mRNA İfade Düzeyleri.....	42
4.6. Aort Dokusunda <i>Nos3</i> ve <i>Icam-1</i> mRNA İfade Düzeyleri	44
4.7. Aort Dokusunda <i>Runx2</i> ve <i>Bmp2</i> mRNA ifade düzeyleri	45
4.8. Korelasyon Analizleri	47
5. TARTIŞMA.....	51
6. KAYNAKÇA.....	58
HAM VERİLER	71
FORMLAR.....	72
ETİK KURUL KARARI.....	73
PATENT HAKKI İZNİ.....	74
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	75
ÖZGEÇMİŞ	76

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: OPG gen ifadesinin düzenlenmesi	6
Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar	21
Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar	22
Tablo 3-3: cDNA sentezi için önerilen sıcaklık-zaman protokolü	26
Tablo 3-4: OPG/RANKL sinyal yolağı ilişkili genler ve endojen kontrol genin ileri ve geri primer dizileri	27
Tablo 3-5: Araştırılan genlerin PZR içerikleri.....	28
Tablo 3-6: Araştırılan genlerin PZR sıcaklık-zaman protokolü	29
Tablo 3-7: Araştırılan genlerin Gradyent PZR içerikleri.....	29
Tablo 3-8: Araştırılan genlerin Gradyent PZR sıcaklık-zaman protokolü	30
Tablo 3-9: Araştırılan genlerin Gerçek-Zamanlı PZR içerikleri.....	31
Tablo 3-10: Araştırılan genlerin Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR sıcaklık-zaman protokolü.....	34
Tablo 4-1: Deney gruplarına ait açlık kan glukozları (mg/dl) ortalaması	37
Tablo 4-2: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının (gr) ortalaması.....	38
Tablo 4-3: Günlük kalori alımları (kcal/kg) ortalaması.....	40
Tablo 4-4: 9 hafta sonunda deney gruplarından alınan aort dokusunda hedef genlerin ifade düzeyleri.....	47
Tablo 4-5: Tüm deney gruplarında <i>Opg</i> mRNA ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: OPG protein yapısının şematik gösterimi	3
Şekil 2-2: OPG'nin RANKL (yeşil renk) ve TRAIL (mavi renk) molekülleri ile etkileşimleri- Baud'huin ve ark. (2013)'den.....	4
Şekil 2-3: OPG ve Ligandlarının dahil olduğu biyolojik süreçler- Bernardi ve ark. (2016)'dan.....	5
Şekil 2-4: Osteoprotegerinin farklı patolojilerdeki rolü.....	8
Şekil 2-5: Endotel hasarının damar yüzeyinde ilerleyişi	12
Şekil 2-6: OPG'nin endotel hücreler üzerindeki patolojik rolü	13
Şekil 2-7: Homeostazda ve diyabet varlığında Nitrik Oksit (NO) sentezi-Hamilton ve Watts, (2013)'den	15
Şekil 2-8: Endotel hücre hasarının patogenezi ve sonuçları	16
Şekil 2-9: Uyarılar ile birlikte MetS, T2DM ve endotel disfonksiyonu arasındaki ilişki- Hivert ve ark. (2008)'den değiştirilerek.....	18
Şekil 3-1: Gradyent PZR %2'lik agaroz jel görüntüleri.....	30
Şekil 3-2: 58°C bağlanma sıcaklığında çalışılan genlerin amplifikasyon ve erime sıcaklığı eğrileri	32
Şekil 3-3: 60°C bağlanma sıcaklığında çalışılan genlerin amplifikasyon ve erime sıcaklığı eğrileri	33
Şekil 4-1: Açlık kan glukozu takibi (mg/ d1)	38
Şekil 4-2: Vücut ağırlığı takibi (gr)	39
Şekil 4-3: Günlük kalori alımı takibi (kcal).....	40
Şekil 4-5: Deney grupları arasında <i>Rankl</i> mRNA ifade düzeyi değişimi	42
Şekil 4-6: Deney grupları arasında <i>Il-1b</i> gen ekspresyonu değişimi	43
Şekil 4-7: Deney grupları arasında <i>Tnfα</i> mRNA düzeyi değişimi.....	43
Şekil 4-8: Deney grupları arasında <i>Icam-1</i> mRNA düzeyi değişimi	44
Şekil 4-9: Deney grupları arasında <i>Nos3</i> mRNA düzeyi değişimi	45
Şekil 4-10: Deney grupları arasında <i>Bmp2</i> mRNA düzeyi değişimi	46
Şekil 4-11: Deney grupları arasında <i>Runx2</i> ifade düzeyi değişimi.....	46
Şekil 4-12: Araştırılan hedef genlerin birbirleri ile etkileşimi.....	49
Şekil 4-13: Araştırılan moleküllerin işlev gördükleri yollara göre tanımlanması ve etkileşim haritası	50

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

25(OH)D3: Vitamin D3

BMP2: Bone Morphogenetic Protein 2

cGMP: siklik guanozin 3',5' - monofosfat

CRP: C- reaktif protein

dl: desilitre

EC: Endothelial Cell

ECM: Extracellular Matrix

EH: Endotel Hasarı

EKHF: Endotel kökenli hiperpolarize edici faktör

eNOS: *endotelial NO sentaz*

ET-1: *Endotelin-1*

F: Diyabet grubu

FD: Diyabet ve Vitamin D grubu

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GTC: Guanidin izotiyosiyanat

STZ: Streptozotosin

gr: gram

ICAM-1: *Adezyon molekülü-1*

IL-1b: *Interleukin 1 beta*

İMK: intima-media kalınlığı

i.p: İntraperitoneal

K: Kontrol Grubu

KD: Vitamin D Kontrol grubu

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

Kcal: kilokalori

MetS: Metabolik sendrom

mg: miligram

MMP: *Matris Metalloproteaz*

mL: Mililitre

NADPH: nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NF- κ B: *Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör κ B*

NO: Nitrik Oksit

NOS3: *Nitrik Oksit Sentaz 3*

OPG: *Osteoprotegerin*

RANK: *Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) Reseptörü*

RANKL: *Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) Ligandı*

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RT: Reverse transcription

TNF α : *Tümör Nekrozis Faktör alfa*

TRAIL: Tümör nekrozis faktör aracılı apoptoz uyarıcı ligand

vWF: *von-Willebrand faktör*

VCAM-1: *vasküler adezyon molekülü-1*

VSMC: Vascular smooth muscle cell

WPB: Weibel-Palade cisimciği

ÖZET

Çelebi, G. (2019). Diyetle Bağlı Endotel Hasarı Oluşturulan Ratlarda RANKL/OPG Sinyal Yolağı Aktiviteleri. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Endotel hasarı ateroskleroz ve diyabet gibi pek çok hastalığın başlangıç patolojilerinden biridir. Enflamatuvar bir süreç olan endotel hasarının gelişiminde, Nükleer Faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolağı ve bu yolaktaki moleküller önemli rol oynamaktadır. Reseptör Aktivatör NF- κ B Ligandı (RANKL) ve onun reseptörü (RANK) ile osteoprotegerin (OPG), endotelde tanımlanan hasar sonucu oluşan kalsifikasyonun belirleyici molekülleridir. Deneysel çalışmalarda OPG/RANK/RANKL yolağının inflamasyon, vasküler ve kemik sistemi yanısıra glikoz homeostazının düzenlenmesinde de rol oynadığı, OPG ve Tip 2 Diabetes Mellitus arasında güçlü bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Transgenik fare çalışmaları ile aterosklerozda plazma RANKL ve OPG düzeyleri gösterilse de vasküler hastalıklardaki rolleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Bu tez çalışmasında, ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı olan endotel hasarında, OPG/RANKL sinyal yolağının rolü ve Vitamin D tedavisi ile bu yolakta rol alan genlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin belirlenmesi amaçlandı. Bu nedenle, Sprague Dawley erkek ratlarda oluşturulan Tip 2 Diyabet Mellitus (T2DM) Modeli kullanılarak OPG/RANKL yolağındaki aktivitelerin endotel hasarı üzerine etkisi araştırıldı. Endotelial hasara bağımlı mikrovasküler etkileri belirlemek için, damardaki kalsifikasyon ve enflamatuvar süreçlerde rol alan *Opg*, *Rankl*, *Runx2*, *Bmp-2*, *Il-1 β* , *Tnfa*, *Nos3*, *Icam-1* gen ifade seviyeleri değerlendirildi. Buna göre diyabetli sıçanlarda diğer deney gruplarına kıyasla *Opg*, *Il-1 β* , *Bmp-2* mRNA ifade seviyeleri ile endotel hasarı belirteci olarak seçilen *Icam-1* gen ifade seviyesinin diyabetli sıçan grubunda arttığı belirlendi. Ayrıca çalışma kapsamında, OPG/RANKL yolağındaki düzenleyicilerden biri olan vitamin D3 uygulamasının diyabet varlığında yolakla ilişkili genler üzerine etkisi araştırıldı. Vitamin D3 uygulanan diyabetli sıçanlarda 4 hafta sonunda kan şekeri düzeylerinde anlamlı bir azalma olduğu ($p < 0,01$) deney sonunda ise diyabet grubunda diğer gruplara kıyasla çok anlamlı bir artış olduğu tespit edildi ($p < 0,001$). Diyabetli sıçanların aort dokusunda, vitamin D3 uygulaması sonucunda *Opg* ve *Il-1 β* mRNA ifade seviyelerinde anlamlı bir azalma gözlemlendi. Sonuç olarak çalışma bulguları, vitamin D3 takviyesinin diyabet varlığında endotel dokuyu olumlu yönde etkilediğini ve OPG'nin vasküler homeostaza aracılık eden sitokinlerin düzenlenmesinde rol oynadığını destekler niteliktedir.

Anahtar Kelimeler: Endotel Hasarı, OPG, RANKL, Vitamin D, diyabet

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 32715

ABSTRACT

Celebi, G. (2019). RANKL / OPG Signalling Activities at Rat Models Forming Diet-Induced Endothelial Dysfunction. İstanbul University, Institute of Health Science, Genetics Department. Master Thesis. İstanbul.

Endothelial injury is the one of the beginning pathology of several diseases such as atherosclerosis and diabetes. Nuclear factor κ B (NF- κ B) signalling pathway plays an important role in endothelial damage. Receptor Activator NF- κ B Ligand (RANKL) and its receptor RANK and Osteoprotegerin (OPG) are known as the determinants of calcification as a result of damage in endothelium. It is known that the OPG/RANK/RANKL pathway plays a role in the skeletal, inflammation, and vascular system. In the experimental studies, strong data have been obtained that OPG pathway regulates glucose homeostasis, therefore there is a strong relationship between OPG and Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). Although plasma RANKL/OPG levels have been shown in atherosclerosis by transgenic studies, their role in vascular diseases is not known yet.

In this thesis, it was aimed to obtain preliminary information that could contribute to both preventions of endothelial damage and determination of new treatment goals. For this purpose, male Sprague Dawley rats were used to make Type 2 Diabetes Mellitus Model and the role of RANKL/OPG pathway in endothelial damage is studied. Endothelial damage-dependent microvascular analysis is analysed by using gene expression of *Opg*, *Rankl*, *Runx2*, *Bmp-2*, *Il-1 β* , *Tnfa*, *Nos3*, *Icam-1*. In diabetic rats, *Opg*, *Il-1 β* , *Bmp2* expression levels increase significantly while mRNA level of *Icam-1* and *Nos3* as markers of endothelial damage show also a significant correlation with elevation of mRNA level of *Opg*. In addition, effect of vitamin D3 which is one of the regulators in the OPG/RANKL pathway on the gene expression were studied in the presence of diabetes. After 4 weeks, blood sugar levels significantly increased ($p < 0.001$) in diabetic rats compared to other experimental groups. In the aortic endothelial cells of diabetic rats, vitamin D3 administration it was observed significant difference in expression levels of the *Opg* and *Il-1 β* gene. This study shows that vitamin D supplementation effect on OPG/RANKL activity in the vessel wall. These study results provide the first evidence that Vitamin D3 supplementation results in ameliorated endothelial damage in type 2 diabetes mellitus, and that OPG plays a crucial role in the regulation of cytokines mediating vascular homeostasis.

Key Words: Endothelial Damage, OPG, RANKL, Vitamin D, Diabetes

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 32715

ZUSAMMENFASSUNG / RESUME



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endotel hasarı (endotel disfonksiyonu), vasküler hastalıkların başlangıç patogenezi ve aterosklerozun ana sebeplerinden biridir (Rochette ve ark. 2019). Damar duvarında gerçekleşen bu hasarın oluşumu sırasında Nükleer faktör κ B (NF- κ B) sinyal yolu da dahil olmak üzere, sitokin-sitokin etkileşiminde görev alan yolaklar uyarılır. Reseptör Aktivatörü NF- κ B Ligand (RANKL) ve onun reseptörü RANK ile Osteoprotegerin (OPG), endoteldeki hasarın bir sonucu olan kalsifikasyonun belirleyicileri olarak gösterilmektedir (de Castro ve ark. 2018). OPG/RANK/RANKL üçlü yapısının sadece iskelet sisteminde değil, immünolojik ve vasküler sistemde de düzenleyici bir rol oynamaktadır (Heymann ve ark. 2012). Endotel dokudaki fonksiyon bozukluğu ile yükselmiş OPG seviyeleri hem dokuda hem de kan dolaşımında dikkat çekici boyutlardadır. Bu açıdan OPG'nin kardiyovasküler patofizyolojideki önemini belirlemek patolojinin erken tespiti ve ilerleyişinin takibi açısından önem taşımaktadır (Kosmopoulos ve ark. 2019; Tai ve Inoue, 2019). Klinik ve deneysel çalışmalar OPG ve ligandlarının birbirleri ile olan etkileşimlerini açıklamak için yeterli olsa da, vasküler hastalıklardaki rolü belirsizliğini korumaktadır (Landmesser ve ark. 2004).

Diabetes Mellitus, kronik metabolik bir hastalık olup beraberinde kardiyovasküler hastalıkların görülme sıklığını artırmaktadır. Kardiyovasküler hastalıklar diyabet hastaları için en fazla karşılaşılan ölüm sebebidir (Leon ve Maddox, 2015). Tip 2 Diyabetes Mellitus ise gelişmiş ülkelerde ileri yaşlarda görülen çoğunlukla beslenme ve hareketsiz yaşam tarzı kaynaklı metabolik bir hastalıktır (Sami ve ark. 2017). Diyabet çalışmaları için hem transgenik hem de diyet oluşturulan deneysel hayvan modelleri kullanılmaktadır. Transgenik hayvan modellerinin üretimi, tahsisi ve kullanımı araştırmanın bütçesini artırmaktır (Radenković ve ark. 2016). Sadece diyet ile (yüksek yağlı ve/veya yüksek fruktozlu) oluşturulan modeller ise araştırma süresini uzatmaktadır. Buna karşın kimyasal ajanlar kullanılarak diyet ile desteklenen modeller hem bütçe hem de zaman açısından avantajlıdır. Yüksek konsantrasyonlu fruktoz diyeti (%10'luk) ve düşük streptozosin (STZ) (40 mg/kg) uygulaması ile ratlarda oluşturulan Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) modeli, genetik olmayan ancak hastalık patogenezinin en yakın sonucu veren bir deney hayvanı çalışmasıdır (Wilson ve Islam, 2012). Wilson ve Islam'ın oluşturduğu bu rat modeli çalışmasında kan glukozu, serum lipid düzeyleri,

karaciğer parametreleri, insülin direnci ve pankreas hücrelerinin fonksiyon kaybı gibi genel parametreler detaylandırılarak T2DM araştırmaları için uygun bir model olarak kabul edilmektedir (Salman ve ark. 2013; Radenković ve ark. 2016; Gheibi ve ark. 2017). Bu tez çalışmasında ise, Wilson ve Islam'ın oluşturduğu T2DM prosedürüne ek olarak STZ enjeksiyonundan sonra 3 hafta daha fruktozlu su uygulanarak modifiye edilmiş yüksek fruktoz hasarına dayalı model ratlardan (Anapalı, M. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi 2018) aort dokuları dissekte edildi. 9 haftalık deney modeli oluşturulmasının ardından deney gruplarındaki ratların aort dokularında gen ifade düzeyleri incelendi. Bu çalışmanın hipotezi, ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı olan endotel hasarında, ilerlemiş ateroskleroz plaklarında aktif role sahip OPG/RANKL yolağındaki genlerin ifade düzeylerinde değişim var mı ve vitamin D'nin düzenleyici etkisi ile bu hasarda iyileşme sağlanabilir mi sorularına dayanmaktadır. Buna göre tez çalışmasında, deneysel olarak oluşturulan diyabetik model ratların aortlarında meydana gelen endotel hasarında OPG/RANKL sinyal yolağı etkisinin araştırılması amaçlandı.

Enflamasyonu baskıladığı gösterilen (De Vita ve ark. 2014) anti-diyabetik ilaç alternatifi olarak önerilen Vitamin D3 (Kolekalsiferol formu)'ün, hücre içinde transkripsiyonel regülasyon görevi üstlenerek insülin metabolizmasından sorumlu genlerin ifadesini düzenleyerek insülin üretimini uyarmaktadır (Takiishi ve ark. 2010). Bu çalışmada oluşturulan diyabetik ve sağlıklı gruplardaki ratlara oral yoldan haftada bir kez olmak üzere 4 hafta boyunca 170 IU/hafta Vitamin D3 uygulandı. Böylece kontrol grupları ile karşılaştırılarak diyabet ile meydana gelen endotel hasarında Vitamin D3'ün OPG/RANKL sinyal yolağında rol alan gen ifadelerine etkileri ilk defa bu çalışma kapsamında araştırıldı.

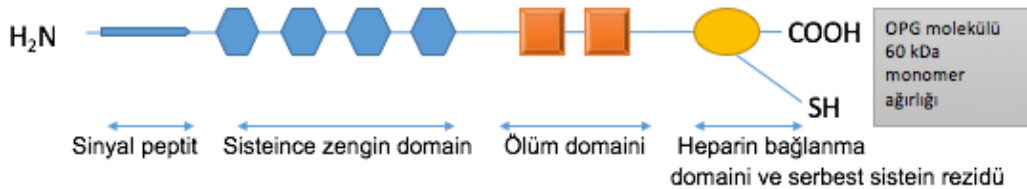
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Osteoprotegerin (OPG):

İlk olarak 1997 yılında iki farklı araştırma grubu tarafından tanımlanan osteoprotegerin (OPG), tümör nekrozis faktör (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesidir (Tsuda ve ark. 1997; Simonet ve ark. 1997). Osteoprotegerin ismi, Latince “os” kemik ve “protegere” korumak kelimelerinden türetilmiştir (Simonet ve ark. 1997).

OPG geni, 8. kromozomda (8q24) lokalize olup 1998 yılında tanımlanmış ve klonlanmıştır (Yamaguchi ve ark. 1998). 29 Kilo bazlık (Kb) gen, 5 ekzon içermektedir. Genin 2.4, 4.2, 6.5 Kb’lik 3 transkripti bulunmaktadır (Hilton ve ark. 2001). 2.4 Kb’lik transkript en çok eksprese olan transkripttir. Diğer 2 transkriptten biri ise 2. intronun bir kısmını içine alarak oluşan alternatif kırılma sonucu çözünebilir 145 aminoasitlik protein kodlayan transkript formu olup diğer transkript protein kodlamamaktadır (Theoleyre ve ark. 2004).

OPG, monomer ağırlığı 60 kilodalton (kDa) olan 401 aminoasitten (aa) oluşan salgı glikoproteinidir. Ayrıca OPG’nin 7 yapısal domaini vardır (Şekil 2-1) (Yamaguchi ve ark. 1998).



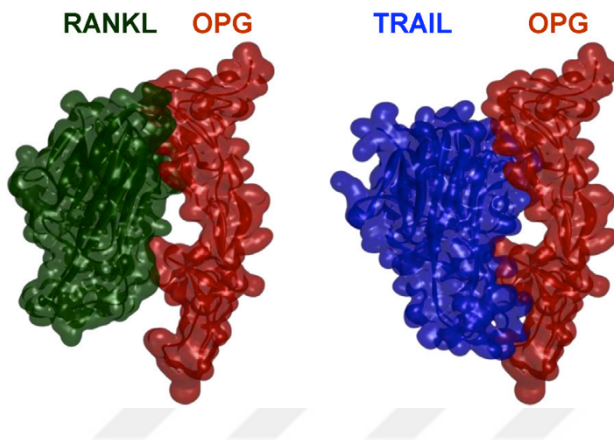
Şekil 2-1: OPG protein yapısının şematik gösterimi

I. Sisteince zengin domainler (1-2-3-4) ; sisteince zengin olup yapısal olarak TNF reseptör ailesi ile bağlantılıdır. Proteinin amino ucunda bulunan sisteince zengin bu yapılar, osteoklastojenezis inhibasyonunda önemlidir.

II. Ölüm domainleri (5-6) ; proteinin karboksil ucunda bulunan yapı, apoptoz aracılı ölüm domaini homolog bölgeleri içerir.

III. Heparin bağlanma bölgesi (7); proteinin karboksil ucuna konumlanmış olan yapı proteoglikanlarla etkileşir. Ayrıca bu bölgedeki serbest sisteinler (SH) bağ oluşumu ve protein dimerizasyonu için gereklidir.

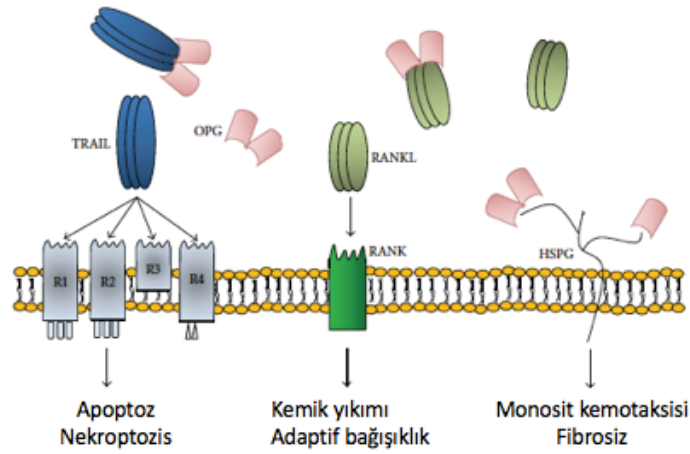
OPG'nin monomerik yapısının yanı sıra, heparin bağlanma bölgesi aracılığı ile disülfid bağlantılı dimerik yapısı da bulunur. Salgılanmasından önce 21 aa'lık sinyal peptidinin çıkarılması ile 380 aa'lık monomerik OPG proteini oluşur. OPG'nin homodimer yapısı, Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör $\kappa\beta$ Ligandı'na (RANKL) karşı daha yüksek afinite gösteren biyolojik aktiviteye sahip yapıyı oluşturmaktadır. Tümör nekrozis faktör aracılı apoptoz uyarıcı ligand (TRAIL) ve RANKL, OPG'ye bağlanarak sitokin-sitokin reseptör etkileşimi ile apoptoz, osteojenez gibi biyolojik süreçleri düzenlemektedir (Şekil 2-2) (Baud'huin ve ark. 2013).



Şekil 2-2: OPG'nin RANKL (yeşil renk) ve TRAIL (mavi renk) molekülleri ile etkileşimleri- Baud'huin ve ark. (2013)'den

Etkileşen proteinlerin üç boyutlu yüzeyleri şeffaf van der Waals bağları ile gösterilmiştir.

OPG'nin ligandları ile etkileşerek kanser, vasküler ve immün sistemle ilişkili patolojilerde rol aldıkları gösterilmiştir. Kardiyometabolik hastalığa sahip olanlarda ve kanser hastalarında yapılan klinik çalışmalarda, OPG ve ligandlarının (Şekil 2-3) aktif bir sitokin görevi gördüğü doğrulanmıştır (Baud'huin ve ark. 2013).



Şekil 2-3: OPG ve Ligandlarının dahil olduğu biyolojik süreçler- Bernardi ve ark. (2016)'dan

HSPG: Heparin Sülfat Proteoglikan

Yapılan çalışmalarda, OPG'nin aterom plakların gelişimi ve ilerleyişinde; arteriyel düz kas hücrelerinde, pulmoner arter düz kas hücrelerinde, endotel hücrelerin Weibel-Palade cisimlerinde von-Willebrand faktör (Zannettino ve ark. 2005) ve alfa granüllerin megakaryositlerinde ifade edildiği gösterilmiştir (Chollet ve ark. 2010).

OPG osteoblast, kemik iliği, dalak, böbrek, kalp, timus gibi pek çok farklı hücre ve dokuda ifade edilmektedir. Ancak beyin, plasenta ve çizgili kas dokularında daha az ifade edildiği saptanmıştır. OPG'nin gen ifadesi, bu dokularda Tablo 2-1'de belirtilen çeşitli sitokinler tarafından düzenlenmektedir (Pérez De Ciriza ve ark. 2015).

Tablo 2-1: OPG gen ifadesinin düzenlenmesi

Hücre tipi	OPG anlatımı	Sitokin	Kaynaklar
Osteoblastlar	Upregülasyon	IL-1 α , IL-6, IL-11, IL-18, TNF- α , BMP-2, Kalsiyum, vitamin D3, östrojen, anjiyotensin II ve PDGF, TNF- β , IL-1 β , TGF- β , 17-östradiyol ve Wnt sinyal yolağı	(Silva ve Branco, 2011)
	Down-regülasyon	Paratiroid hormone (PTH), glukokortikoidler, prostaglandin E2, kalsiyum, PPAR- γ , bFGF	
Endotel Hücreler	Upregülasyon	IL-1 α , IL-1 β ve TNF- α	(Zannettino ve ark. 2005)
Düz Kas Hücreleri	Upregülasyon	IL-1 β , TNF- α , östrojen ve PDGF	(Schoppet ve ark. 2011)
	Down-regülasyon	TGF- β ve BMP-2	
Kemik İliği Hücreleri	Upregülasyon	IL-18, TNF- α , BMP-4 ve TGF- β	(Silva ve Branco, 2011)
	Down-regülasyon	IGF-1, IL-6, IL-11, IL-17 ve IL-1 β	
Dentritik Hücreler	Upregülasyon	TNF- α , RANKL, IL-1 β ve CD40 ligandı	(Silva ve Branco, 2011)
Adipoz Doku	Upregülasyon	IL1- β ve TNF- α	(Pérez de Ciriza ve ark. 2014)
	Down-regülasyon	Kortizol veya troglitazon	
Diğer dokular; kalp, böbrek, karaciğer, dalak, akciğer, timüs, lenf, B-lenfositler, trake, testis. Az miktarda beyin, plasenta ve çizgili kas.			(Montagnana ve ark. 2013; Silva ve Branco, 2011)

2.2. OPG/RANK/RANKL Yolağı:

TNF reseptör süperaillesinin bir üyesi olan Reseptör Aktivatör Nükleer faktör $\kappa\beta$ (RANK), tip I homotrimerik transmembran proteinidir. 616 aa'den oluşan yapısında 28 aa'lık sinyal peptidi, 21 aa'lık transmembran domaini ve karboksil ucunda büyük bir sitoplazmik domaini bulunur (Khosla, 2001).

RANK osteoklast prekürsörleri, dentritik hücreler, B ve T lenfositleri, olgun osteoklastlar, fibroblastlar, meme ve prostat dokusundan kökenli kanser hücreleri, kemik metastası yapmış bazı tümörlerde ifade edildiği belirlenmiştir. Ligandı olan RANKL'a bağlanarak trimerik yapıyı oluşturur. RANK, OPG homodimeri ve RANKL'ın oluşturduğu trimerik yapı, Nükleer Faktör- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$) yolağını harekete geçiren çoklu hücre içi sinyallerini tetikleyerek hücre farklılaşmasını, fonksiyonunu ve hayatta kalmasını düzenler (Klejna ve ark. 2009).

Reseptör Aktivatör Nükleer Faktör $\kappa\beta$ Ligandı (RANKL) da TNF süper ailesinin bir üyesi olup 316 aa'den oluşan tip II homotrimerik glikoproteindir. 40-45 kDa ağırlığında transmembran protein olarak ya da 31 kDa ağırlığında çözünebilir protein yapısında bulunur. Osteoblastlardan sentezlenerek salgılanan RANKL, ayrıca aktif T lenfositlerde, lenf düğümlerinde, timusta, akciğerde, dalakta ve kemik iliğinde de ifade edilir. OPG'nin kemik koruyucu etkisinin varlığında RANKL osteoklastların farklılaşması ve olgun osteoklastların aktivasyonu başlatarak kemik yıkımında uyarıcı işlev görür (Klejna ve ark. 2009).

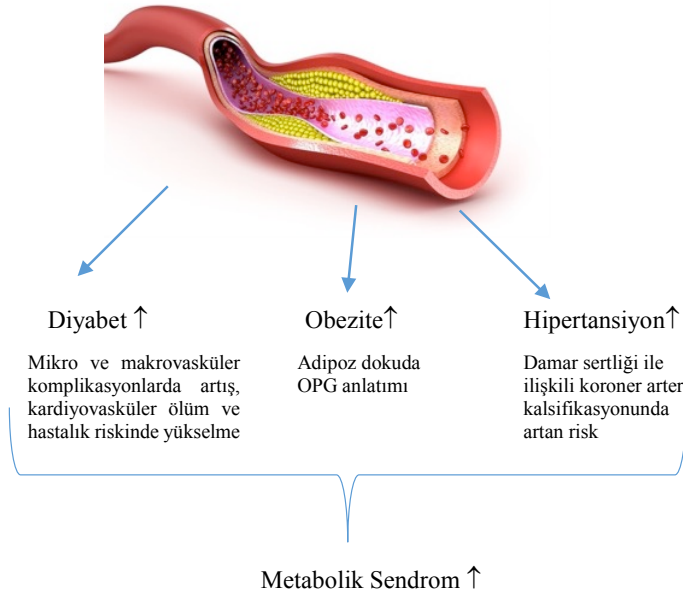
OPG/RANK/RANKL yolağı, esas olarak kemik yeniden modellenmesi, farklılaşmanın düzenlenmesi, osteoklast aktivasyonu ile kemik oluşumu ve kemik yıkımı arasındaki kritik dengenin sağlanmasında görevlidir. Osteoprojenitör hücrelerde RANKL, RANK'a bağlanır ve kemik yıkımı ile osteoklastojenezi kontrol eder. İlk olarak, RANK-RANKL etkileşimi I κ B kinazı tarafından I κ B'nin degradasyonuna sebep olarak NF- $\kappa\beta$ 'nin serbest kalmasına yol açar. Serbest kalan NF- $\kappa\beta$ kompleksi hücre nükleusuna girer ve bir dizi hücre içi sinyalleşme kaskadı başlatır. Nükleusta osteoklast oluşumu, farklılaşması, aktivasyonu ve kemik yıkımına özgü genlerin transkripsiyonunu sağlar. OPG tuzak reseptör görevi görerek bu etkileşime engel olmaya çalışır, RANK ile rekabet eder, böylece RANKL-RANK etkileşimini inhibe eder (Å ve Holen, 2009; Nahidi ve ark. 2013).

2.3. Kardiyometabolik Hastalıklarda OPG'nin Rolü

OPG'nin iskelet sistemindeki rolü ve osteoporoz açısından biyobelirteç niteliği ilk olarak araştırılmıştır (Bucay ve ark. 1998). Ardından OPG'nin diyabet, hipertansiyon, metabolik sendrom, obezite gibi kardiyometabolik patolojilerle de ilişkili olduğu belirlenmiştir (Van Campenhout ve Golledge, 2009; Pérez De Ciriza ve ark. 2015).

2.3.1. Tip 2 Diabetes Mellitus ve OPG İlişkisi

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)'nin OPG ifade düzeylerinde değişime sebep olduğu görülmüştür. Streptozotosin ile oluşturulmuş T2DM modelinde ratların diyabet oluşturulduktan hemen sonra alınan aort dokularında, mRNA ve protein OPG düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdiği belirlenmiştir. T2DM'de OPG ifade düzeylerindeki bu artışın, vasküler disfonksiyonda etkili bir rolünün olduğunu düşündürmüştür (Vaccarezza ve ark. 2007). OPG'nin başta diyabet olmak üzere obezite, hipertansiyon gibi patolojilerde rol oynayarak metabolik sendromun ortaya çıkışında görev aldığı gösterilmiştir (Şekil 2-3) (Secchiero ve ark. 2006).



Şekil 2-4: Osteoprotegerinin farklı patolojilerdeki rolü

Farklı çalışmalarda T2DM varlığının OPG düzeylerini kontrol gruplarına göre anlamlı şekilde yükselttiğini gösterilmiş olup mikrovasküler komplikasyonları olan T2DM'lu hastaların plazmalarında OPG düzeylerinin arttığı belirlenmiştir (Knudsen ve ark. 2003). Ayrıca plazma OPG düzeylerinin diyabetik nefropati ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Terekci ve ark. 2009).

T2DM'da ateroskleroz gelişimi ve bu hastalığın patolojisinde büyük bir komplikasyon olan progressif vasküler kalsifikasyonla ilişkilidir. Diyabetli hastaların karotis arterleri, ortalama olarak daha yüksek intima-media kalınlığına (İMK) sahiptir. Bu kalınlık aterosklerozda belirteç olarak kullanılmakta olup OPG düzeyleri ile anlamlı derecede ilişkilidir (Rozas Moreno ve ark. 2013). Çoklu varyasyon analizlerinde, ortalama İMK'nın bağımsız belirleyicileri yaş, hipertansiyon, osteopontin ve OPG olarak belirlenmiştir (Ishiyama ve ark. 2009).

Yüksek serum OPG düzeylerinin vasküler kalsifikasyon için yüksek prevalansa sahip olduğu gösterilmiştir. Serum OPG düzeyleri, vasküler kalsifikasyon ve kalsifikasyonun ilerleyişi için bağımsız bir göstergedir. Buna ek olarak OPG, ilerlemiş koroner arter kalsifikasyonu bulunan hastalarda anlamlı düzeyde artmaktadır (Rozas Moreno ve ark. 2013).

2.3.2. Metabolik Sendrom ve OPG İlişkisi

Metabolik Sendrom (MetS), arteriyel hipertansiyon, insülin direnci, dislipidemi, obezite gibi bir grup kardiyometabolik değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Diyabet, hipertansiyon, obezite gibi MetS gelişimine sebep olan kriterler serum OPG düzeylerinde değişikliklere neden olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda, OPG ve MetS arasında tartışmalı sonuçlar ortaya konulmuştur. Klinik değerlendirmesinde gestasyonel diyabet öyküsü bulunan MetS'li kadınların (n=46) sağlıklı kontrollere (n=30) göre daha yüksek serum OPG düzeylerine sahip oldukları tespit edilmiştir (Akinci ve ark. 2008). Bu sonuç, gestasyonel diyabeti olan 128 kadın ve 67 kontrol ile yapılan kohort çalışmasında doğrulanmıştır ve ayrıca serum OPG düzeylerinin obezite, insülin direnci ve artmış İMK ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Akinci ve ark. 2011). Ancak yapılan bir başka çalışmada, MetS'lu ve MetS olmayan İranlı kadınlarda (n=382) menopoz sonrası alınan serum OPG düzeyleri arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Nabipour ve ark. 2010). Bir başka kohort çalışmasında (n=2570) ise MetS ile CRP, IL-6, ICAM-1, TNF α , P-selektin gibi enflamasyon belirteçleri ile bulunan anlamlı ilişkiye rağmen MetS ve OPG düzeyleri arasında ilişki bulunamamıştır (Dallmeier ve ark. 2012). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise OPG ve MetS arasında kardiyovasküler risk faktörleri açısından pozitif yönlü bir ilişki tespit edilmiştir (Bernardi ve ark. 2014; Pérez de Ciriza ve ark. 2014; Tavintharan ve ark. 2014). Buna göre, MetS'lu bireylerdeki OPG düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun yanı sıra OPG'nin adipoz dokuda ifade edildiği ve MetS'da OPG'nin mRNA ifade düzeyinin hasta olmayanlara göre yükseldiği tespit edilmiştir (Pérez de Ciriza ve ark. 2014). Başka bir deneysel çalışmaya

göre de OPG serum düzeyi MetS'da artmaktadır (Bernardi ve ark. 2014). Buna göre, yüksek yağlı diyet ile beslenen C57BL6 soyu fareler kullanılarak oluşturulan MetS modeli çalışmasında, OPG serum düzeylerinin arttığı ve bu proteinin taşınmasının metabolik anormalliklerde sistemik ve adipoz dokudaki enflamatuvar yanıtı değiştirdiği kanda glukoz, lipid ve proenflamatuvar belirteçlerin ölçümü ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, yüksek yağlı diyet sonucu oluşan obezitede ve MetS'de adipoz dokuda OPG'nin enflamasyonu başlattığı düşünülmüştür (Bernardi ve ark. 2014). Buna ek olarak, yüksek serum OPG düzeyinin MetS gelişme riski ile ilişkili olduğunu ortaya çıkaran bir başka çalışmada ise yaş, cinsiyet, etnik köken, glukoz düzeyi ve mikrovasküler komplikasyonlardan bağımsız olarak OPG'nin, MetS için bir belirteç olduğunu göstermiştir (Tavintharan ve ark. 2014).

2.4. OPG'nin Vasküler Sistemdeki Patofizyolojik Rolü

Günümüzde, OPG'nin ateroskleroz, kalsifikasyon ve kardiyovasküler hastalıkların patolojisinde etkin bir role sahip olduğu kabul görmektedir. Vasküler fizyoloji ve patolojisindeki dengede, OPG'nin ifadesi ve regülasyonu, endotel hücrelerin hayatta kalması, anjiyogenez, monosit ve endotel hücre temini ile osteogenez ve kalsifikasyon gibi süreçlerde aktif rol üstlendiğine dair ilk veriler 2001 yılında elde edilmiştir (Collin-Osdoby ve ark. 2001).

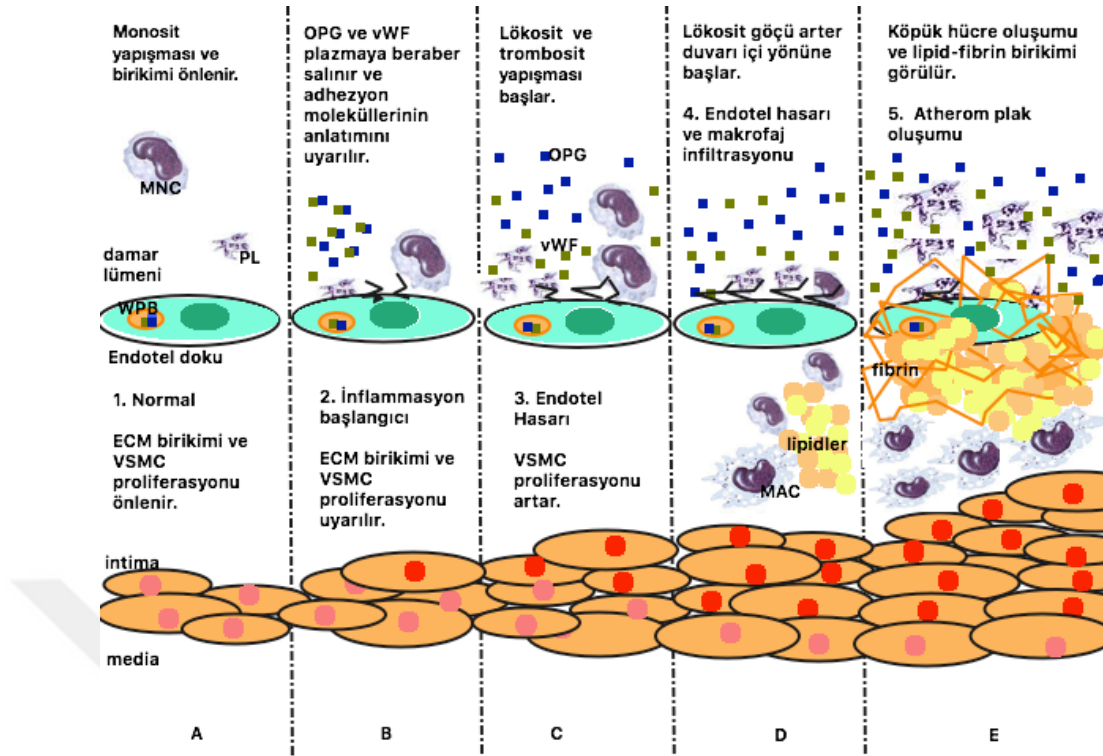
Endotel hücrelerinde OPG, hayatta kalma ve anti-apoptotik faktör görevi üstlenir. Endotel hücrelerini apoptozdan korur (*in vitro*) ve neovaskülerize olmasını sağlar (*in vivo*). Kapiller damarlarda ise endotel hücre proliferasyonunu arttırmaktadır. Bunun yanı sıra, TNF- α varlığında endotel hücrelerinde hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ve E-selektin ifadesini uyarır (Mangan ve ark. 2007).

Ayrıca OPG, adezyon moleküllerinin ifadesinde ve endotel hücrelerine monosit bağlanma oranında artışa neden olur. Ratlar üzerinde floresan işaretli lökositler ile yapılan bir *in vivo* çalışmada, lökosit/endotel hücre adezyonunun OPG tarafından desteklendiği görülmüştür (Zauli ve ark. 2007). Bunun yanı sıra, aterom plak içerisinde farklı lokasyonlarda immunohistolojik olarak tespit edilen OPG proteinlerinin esas olarak plak lezyonu içindeki makrofajların yoğunluğu ile korele olduğu gösterilmiştir (Heymann ve ark. 2012).

Mevcut çalışmalar OPG'nin ateroskleroz ile ilişkisini ve pro-aterojenik bir aracı olduğunu gösterse de asıl rolü üzerindeki tartışmalar sürmektedir. Bazı araştırmacılar, kardiyovasküler hastalıklarda görülen OPG ifadesindeki artışın, sekonder olarak gelişen bir denge mekanizmasının sonucu olduğunu düşünmektedir. Kan dolaşımındaki OPG düzeylerinin, aterom plak içinde devam eden enflamasyon sürecine yanıt olarak kompleks bir kompemzasyon mekanizmasının bir parçası niteliğinde arttığı düşünülmüştür (Venuraju ve ark. 2010). Transgenik hayvan modelinde yapılan bir çalışmada, endojen OPG'nin ateroskleroza aracı

olmaktan çok hastalık ile ilgili bir belirteç olabileceği gösterilmiştir (Morony ve ark. 2008). Diğer yandan Secchiero ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, diyabet hastalarında artmış OPG düzeyinin T2DM'in gelişiminin erken aşamalarına işaret edilmekte ve aslında bu durumun endotel disfonksiyonla ilişkili olabileceği belirtilmektedir (Secchiero ve ark. 2006). Hasarlı endotel hücrelerinin enflamasyona yanıt olarak Weibel-Palade cisimciklerinden OPG salgıladığı ve böylece OPG'nin dolaşımdaki miktarını arttırdığı gösterilmiştir. Weibel-Palade cisimcikleri, arteriyal endotel hücrelerde bulunur ve doku yenilenmesi, enflamasyon ve anjiyogenez süreçlerine katkıda bulunan pek çok proteini salgılamaktadır (Valentijn ve ark. 2011).

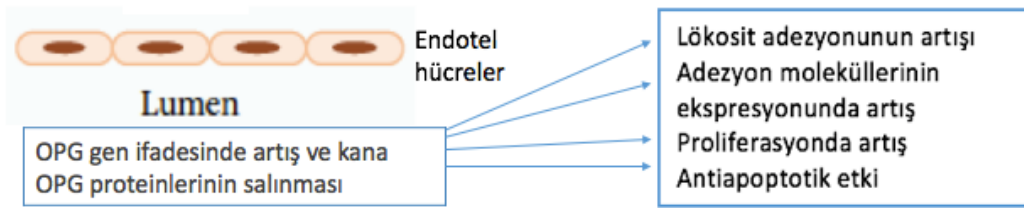
OPG'nin hastalık patogenezindeki belirleyici rolü, arteriyel duvardaki endotelde hücreler arası adezyon molekülü-1 (*Icam-1*), vasküler adezyon molekülü-1 (*Vcam-1*) ve E-selektin mRNA ekspresyonunun artması ile başlar. Yükselen adezyon molekülü seviyeleri, koroner arter tabakasını kaplayan endotele lökosit bağlanmasını artırır. Lökosit adezyonu, sürecin sonunda endotel disfonksiyonuna aracılık eder (Mangan ve ark. 2007). Başka bir deyişle, WPB'lerde immün cevapla birlikte OPG seviyesinin artması, endotel hücrelerine monosit bağlanmasıyla sonuçlanır. *In vivo* çalışmalarda lökosit adezyonunun OPG ile desteklendiği gösterilmiştir (Zauli ve ark. 2007). Ayrıca, aterom plaklarda OPG ekspresyonu ve lezyondaki makrofajların yoğunluğunun korele olduğu tespit edilmiştir (Heymann ve ark. 2012). İlerleyen aşamalarda OPG, lökosit göçünü başlatarak aterojenik faktör gibi hareket eder ve endotel hasarına ilerleyen süreçte önemli roller üstlenir (Şekil 2-5).



Şekil 2-5: Endotel hasarının damar yüzeyinde ilerleyişi

(A) Normal koşullarda, Ekstraselüler Matriks (ECM) birikimi ve intima-medyada VSMC'lerin proliferasyonu ve damar lümeninde trombosit birikimi ve monosit yapışmasını önlenir. (B) Endotelial homeostazın bozulması durumunda proenflamatuvar stimülasyon görülür. ECM'de birikim ve VSMC proliferasyonu uyarılır. OPG ve vWF, endotel hücrelerindeki WPB'lerden birlikte salgılanır, böylece yapışma molekülleri eksprese edilir. (C) Lökosit yuvarlanması ve trombosit yapışması başlar ve bunlar arter duvarında Endotel hasarına neden olurlar. Büyüme önleyici moleküllerin eksikliği, VSMC'lerin neointima'yı oluşturdukları bölgeye göçünü uyarır. OPG ve vWF plazmada birbirlerinden ayrılır. (D) Lökositler arter duvarı içine göç eder ve okside olmuş lipidler intimal boşluğa toplanır. Köpük hücre oluşumu başlar. (E) Son aşamada, atherom plak lipid molekülleri ve fibrin toplanması sonucu ilerler.

Sonuç olarak pek çok çalışma artan OPG düzeyinin pro-aterojenik rolünün altını çizmektedir. Bu çalışmalara göre OPG, aterosklerotik süreçlerin farklı aşamalarına katılmaktadır ve endotel hücre uyarılmasında ve disfonksiyonunda rol oynamaktadır (Zannettino ve ark. 2005; Mangan ve ark. 2007). Ayrıca makrofaj infiltrasyonu (Heymann ve ark. 2012), düz kas hücrelerinin proliferasyonu (Candido ve ark. 2010) ve lökosit adezyonunda (Zauli ve ark. 2007) da görev almaktadır (Şekil 2-6). Buna göre dolaşımdaki artmış OPG seviyesi, endotel hücre hasarı ile seyreden plak lezyonlarındaki düz kas hücrelerinin aktivasyonunu gösteren bir belirteç olabileceği ayrıca, aterosklerozun yayılmasından sorumlu proenflamatuvar sürecin göstergesi olabileceği ileri sürülmektedir (Venuraju ve ark. 2010).



Şekil 2-6: OPG'nin endotel hücreler üzerindeki patolojik rolü

Klinik araştırma sonuçlarına göre, OPG'nin vasküler sistemde çift role sahip olduğu söylenebilir. Sağlıklı bireylerde, pro-aterojenik ve anti-aterojenik etkiler denge halinde tutulurken pro-aterojenik yolağa ait çeşitli risk faktörleri varlığında, kalıcı ve pozitif yönlü uyarıda pro-aterojenik etkiler baskın hale gelmektedir (Venuraju ve ark. 2010). Diğer yandan, hayvan ve insan çalışmaları OPG'nin rolü hakkında farklılıklar göstermektedir. İnsanlar üzerinde yapılan gözlemsel çalışmalar, serum OPG düzeyleri ve klinik kardiyovasküler hastalıklar arasında pozitif bir ilişki gösterirken hayvan çalışmaları OPG'nin koruyucu rolünü desteklemektedir. Bu nedenlerden ötürü, OPG'nin inefektif bir belirteç mi yoksa patojenik bir faktör mü olduğunu tespit etmek için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Wajda ve ark. 2019).

Kemiklerde ve vasküler sistemde OPG ifade düzeyleri diğer dokulardan fazladır. Daha önce açıklandığı gibi elde edilen tüm bu veriler ışığında, OPG kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bulunsada, klinikte biyobelirteç olarak kullanılması ve patojenik öneminin anlaşılması için daha fazla kanıtın ortaya konulması beklenmektedir (Caidahl ve ark. 2018).

2.5. Endotel Disfonksiyonu

Endotel disfonksiyonu (hasarı), kardiyovasküler risk faktörlerine verilen cevabın ve ateroskleroz gelişiminin öncüsü olma niteliği taşımaktadır. Endotelde fonksiyon kaybı ile ortaya çıkmaya başlayan aterosklerotik lezyonlar, aterosklerozun erken ve geç mekanizmaları tarafından uyarılmaktadır. Bu uyarılar; adezyon moleküllerinin fazla regülasyonu, kemokinlerin artışı, lökosit adezyonu, hücre geçirgenliğinde artış, düşük yoğunluklu lipoprotein oksidasyonunda yayılma, trombosit aktivasyonu, sitokin çoğalması ve düz kasların proliferasyonu ile göçü olarak tanımlanmaktadır (Kinlay ve Ganz, 1997).

Endotel hücrelerinin normal homeostatik durumunda, enflamasyon öncüsü faktörler hiç üretilmez veya çok az miktarda üretilir. Ancak, sigara, yaşlanma, hiperkolesterolemi, hipertansiyon, hiperglisemi gibi kardiyovasküler risk faktörleri varlığında kronik enflamasyon süreci başlar. Bu süreç ile antitrombotik faktörlerin kaybı, damar daraltan ve protrombotik

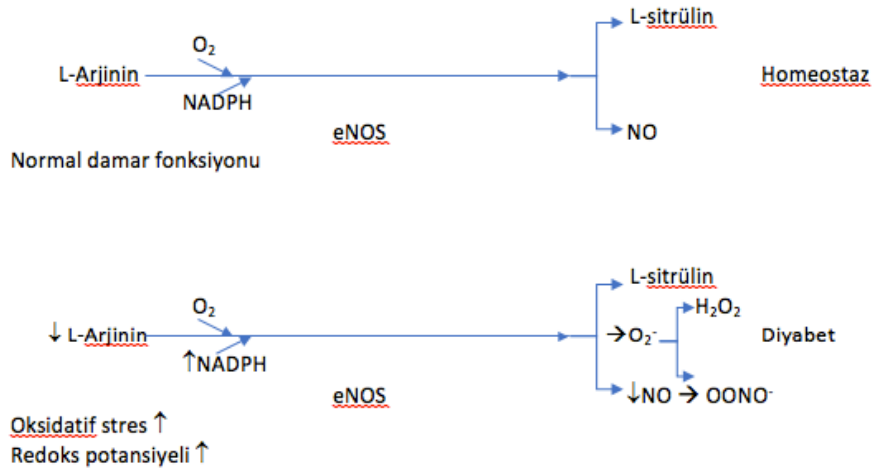
ürünlerin artışı ile seyreden anormal vazoreaksiyonlar gerçekleşir. Sonuçta kardiyovasküler olaylar için risk artışı meydana gelir. Son çalışmalarda obezite, C-reaktif protein (CRP) ve kronik enfeksiyonda, endotel hasarı ile ilişkilendirmiştir (Bahia ve ark. 2006; Rajendran ve ark. 2013).

Endotel doku vasküler homeostazda, vasküler tonu, kan akımını ve pıhtılaşmayı düzenleyen pek çok vazoaaktif faktörün salınmasında içinde olduğu çoklu ve kompleks fizyolojik fonksiyonları üstlenir. Endotel hücrelerinin kontrolünde olan en kritik molekül Nitrik Oksit (NO) olmasının yanı sıra endotel fonksiyonunu sağlayan önemli moleküller arasında endotelin-1 (ET-1), anjiyotensin II ve endotel kökenli hiperpolarize edici faktör (EKHF) bulunur. Damarda oluşan kontraksiyona veya muskarinik reseptörlerin aktivasyonuna cevap olarak G-protein sinyal iletim yolağı aktive edilir ve endotelyal NO sentezi (eNOS) uyarılır. L-arjininden üretilen NO ve sitrülin reaksiyonu için ayrıca oksijen ve nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH)'a ihtiyaç vardır. NO salınması ile ilerleyen bu süreç vazodilasyon, kemotaksis inhibisyonu ve trombosit agregasyonu gibi siklik guanozin 3',5'-monofosfat (cGMP) aracılıklı yolların fonksiyonunu sağlar (Hamilton ve Watts 2013).

Vasküler sistemin temel elemanı olan endotel dokusu, vasküler homeostazının zorunlu aktif parakrin, endokrin ve otokrin yapılarıdır (Bonetti ve ark. 2003). Endotel fizyolojide meydana gelen zararlı değişimler, aterosklerozun gelişiminde anahtar rol oynayan endotel hasarına sebep olur. Aterom plakların ilerleyişi ve aterosklerotik komplikasyonların oluşumu da endotel hasarına bağlı olarak gelişmektedir (Anderson ve ark. 1995)

2.5.1. Tip 2 Diabetes Mellitusta Endotel Disfonksiyonu

Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)'de meydana gelen hiperglisemi, endotel hücrelerinde NADPH seviyesinin değişmesi ile sonuçlanan hücre içi moleküllerin redoks potansiyelini etkileyerek fonksiyon bozukluğuna neden olabilir (Şekil 2-7). Diyabette büyüme faktörlerinin fazla üretilmesi hem endotel hücrelerde hem de düz kas hücrelerinde proliferasyona neden olarak neovaskülarizasyona yol açabilir (Hamilton ve Watts, 2013).



Şekil 2-7: Homeostazda ve diyabet varlığında Nitrik Oksit (NO) sentezi-Hamilton ve Watts, (2013)’den

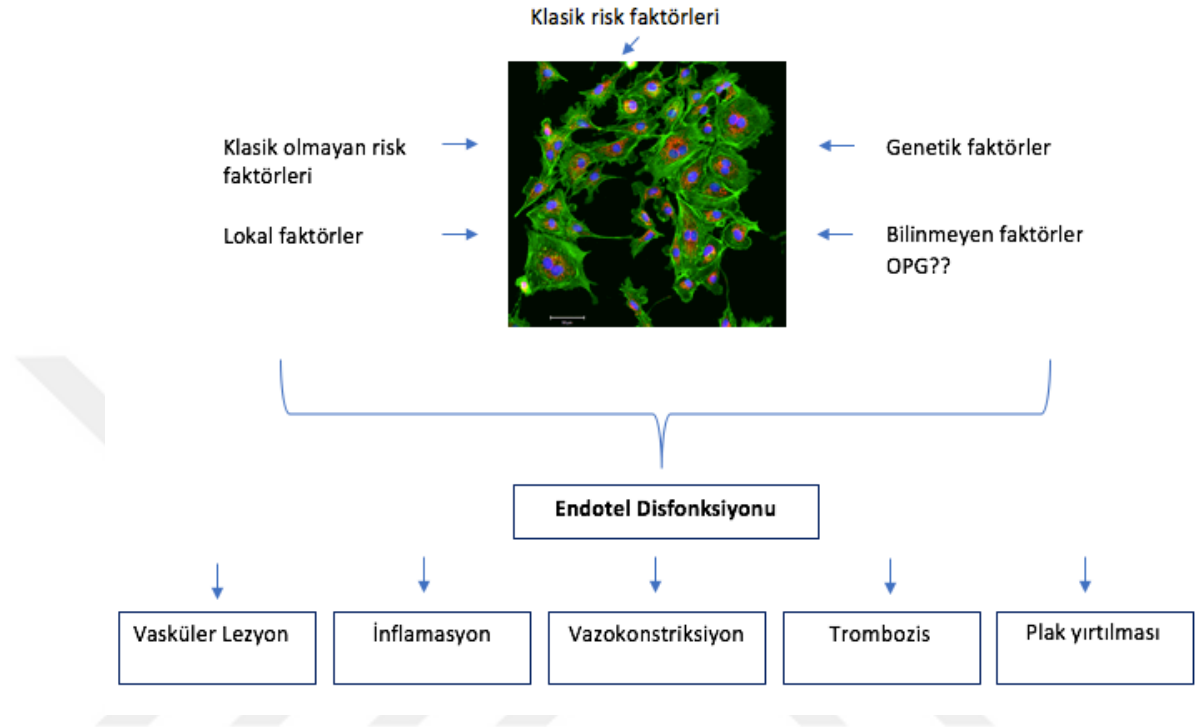
Diyabette oksidatif stres sonucu superoksit (O₂⁻) oluşturan oksijenin NO’ya bağlanarak peroksinitrit (OONO⁻) oluşturmaları

Endotel disfonksiyonu ile T2DM arasında kompleks bir ilişki mevcuttur. Yaş, hiperlipidemi, hipertansiyon ve diğer faktörlerin de eklenmesi sonucu iki patoloji arasındaki ilişki karmaşıklaşır (Hadi ve ark. 2005).

Endotel disfonksiyonunun hem periferel hem de koroner dolaşımda T2DM ile ilişkisi gösterilmiştir. Hastalarda, dolaşımdaki C-reaktif protein (CRP) ve hücre içi adezyon molekülü-1 (ICAM-1) gibi biyobelirteçlerin yükselmiş seviyeleri endotel hücre hasarı, aktivasyonuna ve enflamasyona işaret eder. Bunların yanı sıra von Willebrand faktörünün (vWF)’ın artmış seviyeleri, endotel hücre hasarı ve aktivasyonunun bir ölçütü olarak gösterilmiştir (Landmesser ve ark. 2004). Ayrıca mikroalbuminüremi endotel hasarının bağımsız bir belirleyicisidir ve yaygın vasküler disfonksiyonu işaret eder (Hamilton ve Watts, 2013).

Endotel hücreleri, damardaki kan ve kas hücreleri arasında mekanik ve biyolojik bir bariyer görevi görür. Bu bariyerde, klasik kardiyovasküler risk faktörleri (yaş, obezite, hipertansiyon, dislipidemi, vb.) klasik olmayan risk faktörleri (yüksek sensitiviteli-CRP; “hs-CRP”, karotid İMK, koroner arter kalsifikasyonu, vb.), lokal faktörlerden kan akış gerilimi (ing. “*shear stress*”), genetik faktörler ve halen araştırılmakta olan bilinmeyen faktörler (Şekil 2-8) hasara sebep olmaktadır. Endotel

disfonksiyonu sonucunda vasküler lezyon, enflamasyon, vazokonstriksiyon, trombozis, plak yırtılması meydana gelir (Rajendran ve ark. 2013).



Şekil 2-8: Endotel hücre hasarının patogenezi ve sonuçları

Görsel; Kandasamy, Biomedical Microscopy Core, Paul D. Coverdell Center'dan alınmıştır.

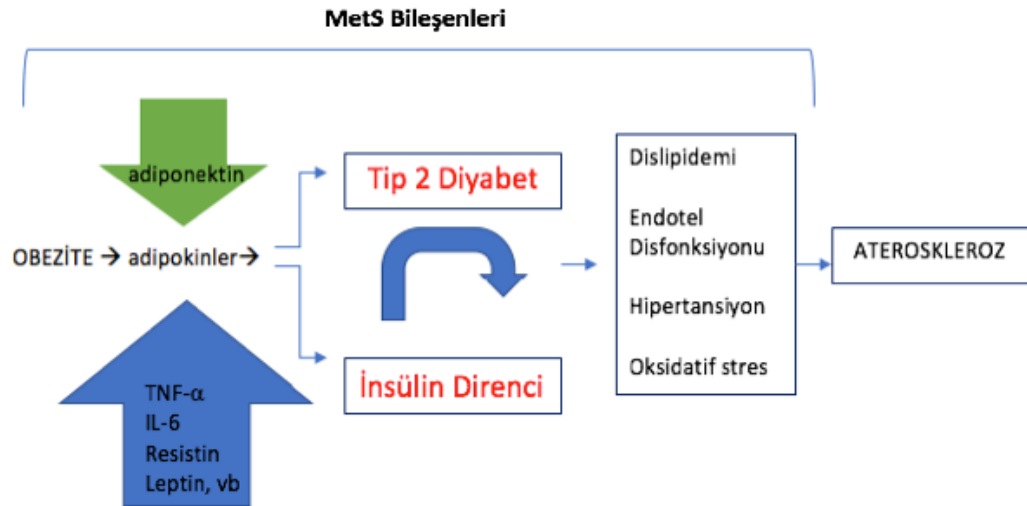
2.5.2. Metabolik Sendromda Endotel Disfonksiyonu

Metabolik sendromun (MetS) tüm birleşenlerinin endotel doku üzerinde negatif etkileri bulunduğu için, endotel disfonksiyonunun prevalansı metabolik sendromlu hastalarda daha yüksektir. Pek çok mekanizma endotel hasarının patogenezi dahil olmaktadır. NO'nun ortamdaki miktarının azlığı endotel hasarında önemli bir rol üstlenmektedir ve bunun nedeni reaktif oksijen türleri tarafından NO inaktivasyonunun artmasıdır. Ayrıca, prostasiklin, endotel kökenli hiperpolarize edici faktör (EKHF) gibi diğer vazodilatasyon faktörlerinin ortamdaki azlığı ve/veya endotelin-1 ve anjiyotensin II gibi vazokonstriktif moleküllerin aktivitesinde artış da endotel hasarını tetikler. MetS'nin bütün birleşenleri tek tek endotel fonksiyonları üzerinde etkilidir. Derleme makalede belirtilen pek çok çalışmada, hem hipertansiyonun hem de T2DM'in endotel

hasarı ile ilişkisi gösterilmiştir (Gustafson, 2010). Aynı zamanda, obezite ve hiperkolestorolemi de endotel disfonksiyonu ile ilişkilidir (Tziomalos ve ark. 2010).

MetS, pro-enflamatuvar bir durum olarak kabul edilir (Bahia ve ark. 2006). Bazı çalışmalar, MetS hastalarında hs-CRP düzeylerinin yükseldiğini ve bu yükselişin MetS bileşenlerinin sayısı arttıkça daha fazlalaştığını göstermiştir (Title ve ark. 2008; You ve ark. 2008). Bu pro-enflamatuvar durumun MetS'de, endotel disfonksiyondan kaynaklanabileceği, artmış hs-CRP seviyelerinin tüm çalışmalarda olmasa da çoğunda bozulmuş endotel bağımlı vazodilasyon ile ilişkili bulunmasından dolayı öne sürülmüştür (Tziomalos ve ark. 2010).

MetS hastalarında dolaşımdaki adiponektin seviyesi azalırken leptin ile resistin seviyeleri ise yükselmektedir (Şekil 2-9). Adipokinler, metabolik sendrom ve endotel disfonksiyonu için sinyal molekülleridir. Metabolik sendrom bileşenleri olarak dislipidemi, abdominal obezite, hiperglisemi ve hipertansiyon ile endotel hasarı ve oksidatif stresin sonucu olarak ilerlemiş ateroskleroza kadar varan bir süreç gelişir (Hivert ve ark. 2008). Adipokin düzeylerindeki bu değişimler endotel disfonksiyonu gelişimine yol açabilir. Adiponektin düzeyleri hipertansif hastalarda diğer risk faktörlerinden bağımsız olarak endotel bağımlı vazodilasyon ile korele olarak tespit edilmiştir. Leptin düzeyleri obez hastalarda direkt olarak korelasyon gösterirken resistin düzeyleri sadece endotel hasarı olan MetS hastalarında ilişkili görülmüştür (Bahia ve ark. 2006).



Şekil 2-9: Uyarılar ile birlikte MetS, T2DM ve endotel disfonksiyonu arasındaki ilişki-Hivert ve ark. (2008)’den değiştirilerek

2.6. Vitamin D (Kolekalsiferol)

Kolesterol kökenli olan Vitamin-D3, yağlı tuzlu su balıkları, karaciğer, yumurta gibi sınırlı sayıda gıdadan beslenme ile alınabilmektedir. Ticari olarak satılan Vitamin-D formu ise mantar kökenli bir sterol olan ergosterolden elde edilir (Feeney ve ark. 2014). Vitamin D3’ün biyolojik aktivitesi 1 ug’da 40 IU’dur. D3 karaciğerde hidroksile edilir ve dolaşıma 25(OH)D3 (25D) olarak salınır. Bu formda Vitamin D’nin yarı ömrü 15 gündür (Haussler ve ark. 2013).

İlk yapılan çalışmalar Vitamin D’nin iskelet sistemindeki önemini gösterse de günümüzde bu vitaminin en az beş fizyolojik sistem üzerinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. Bağışıklık sistemi, metabolik homeostaz, kardiyovasküler, kas ve sinir sistemleri, ayrıca hücre döngüsü kontrolü ve neoplastik süreçlerde etkili olduğu gösterilmiştir (Sogomonian ve ark. 2016; Wang ve ark. 2018).

2.6.1. Vitamin D ile Endotel Disfonksiyonu İlişkisi

Çok sayıda çalışma, Vitamin D eksikliğinin vasküler sertliği, oksidatif stresi, pro-enflamatuvar yanıtları, trombosit agregasyonunu ve nitrik oksit sentezlerini etkileyerek vasküler endotel fonksiyonlarını bozduğunu göstermiştir. Tüm bu faktörler ateroskleroz ve KVKH'lara yol açabilmektedir. Endotelial disfonksiyonun patogenezinde enflamasyonun rolünü destekleyen güçlü kanıtlar mevcuttur. Literatür taraması,

Vitamin D'nin, prostaglandin ve siklooksijenaz 2 yollarının inhibisyonu ve anti-enflamatuvar sitokinlerin artmış-regülasyonu dahil olmak üzere birkaç yoldan enflamasyonu baskıladığını ortaya koymuştur (Nedeljkovic ve ark. 2019).

Elektif koroner anjiyografi için başvuran 624 Koroner Arter Hastası'nda düşük Vitamin D düzeyleri ve yüksek enflamatuvar belirteçler saptanmıştır (Sogomonian ve ark. 2016). Ayrıca yeni tanı koroner arter hastalarında daha yüksek koroner arter kalsiyum skorları ve bozulmuş endotelial fonksiyonlar gözlemlenmiştir (Pérez-Hernández ve ark. 2016). Gerçekten de, D vitamini, oksidatif stres ve hücre yapışmasının yanı sıra, enflamasyonun yeniden düzenlenmesi yoluyla aktivasyon ve disfonksiyon ile bağlantılı endotel bütünlüğünün korunmasında önemli bir rol oynar (Dalan ve ark. 2014). Vitamin D takviyesi sadece bağışıklık fonksiyonunu iyileştirmekle kalmaz, aynı zamanda normal endotelial fonksiyonlar için trombositler tarafından salınan çeşitli adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltarak etki eder (Majeed, 2017).

Enflamasyon ve endotel disfonksiyonunun D vitamini eksikliği ile gerçekleştiğini kanıtlayan çalışmalara ek olarak D vitamininin RUNX2 yolağını direk olarak düzenleyebileceği ve vasküler düz kas hücrelerinin osteojenik farklılaşma sürecini doğrudan inhibe etme potansiyeli olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Tamagaki ve ark. 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan deney hayvanları

Çalışma İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Ana Bilim Dalı'nda 2018-2019 yılları arasında gerçekleştirildi. İstanbul Mehmet Akif Ersoy Deneysel Araştırma Geliştirme ve Eğitim Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (No: 20181001) çalışma için etik kurul onayı alındı. İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı'nda başka bir tez çalışması (Anapalı, M. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi 2018) kapsamında dizaynı yapılarak takip edilen 8-10 haftalık erkek Sprague-Dawley model ratlardan bu çalışma için aort dokularının disseksiyonları yapıldı. Tez çalışması kapsamında yedişer adet deney hayvanı olarak planmasına rağmen, diyabet grubunda 14 yerine 12 ratta başarılı diyabet oluşumu gözlemlendi ve Vitamin D tedavisi sadece 5 ratta uygulanabildi.

3.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Kullanılan kimyasallar Tablo 3-1'de verilmektedir.

Tablo 3-1: Kullanılan Kimyasallar

Streptozotosin (STZ)	Adipogen LifeScience AG-CN2-0046
DMSO	Santa Cruz
Vitamin D	DEVİT-3 300.000 IU/ml I.M/ORAL Ampul, Deva İlaç
D-(-)-Fruktoz	Glentham Life Sciences GC9966
Ksilazin	Rompun %2 Bayer
Ketamin	Ketalar Pfizer
Steril Apirojen İzotonik NaCl çözeltisi	Medifleks Eczacıbaşı
TRIZOL® Reagent (15596-018)	İnvitrogen
0.5 M EDTA	Multicell
1 M Tris	Multicell
Potasyum Bikarbonat	Merck
Amonyum Klorür	Merck
Absolü etanol	Merck
DEPC (Dietil Pirokarbonat)	Sigma
%100'lük izopropanol	Sigma
Kloroform	Merck
Agaroz	Prona

3.1.3. Kullanılan Kitler

Bio-Rad iScript cDNA Synthesis Kit (Katalog No. 1708890) kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Seçilen genlerin ifade düzeylerinin kantitatif RT-PZR yöntemi

ile belirlemek için iTaq Universal SYBR Green Supermix (Katalog No.172-5124) kullanıldı.

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3-2’de verilmektedir.

Tablo 3-2: Kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model
Nanodrop 2000	Thermo
Laminar Akış PCR Kabini	Özkaraçelik, KRB 96
Hassas Terazı	3.1.4.1. Shimadzu
Homojenizatör	İKA, T 10 Ultra-Turrax
Soğutmalı Santrifüj	Heraeus
PZR cihazı	Techne, Biorad
Gerçek Zamanlı PZR	Roche, LightCycler 480
Mikro pipetler	Eppendorf, Gilson
Elektroporez tankı	3.1.4.2. EC, Biorad
UV görüntüleme Sistemi	BioRad
Buzdolapları ve derin dondurucular (+4 °C, -20 °C, -80 °C)	Bosch, Uğur, Dairei
Güç Kaynağı	3.1.4.3. BioRad

3.2. Yöntem

8-10 haftalık olarak seçilen erkek Sprague-Dawley ratlar, deney başlamadan bir gece önce aç bırakılarak glukometre cihazı ile kuyruk veninden açlık kan glukozu ölçümü yapıldı ve ardından deney grupları başlatıldı. Tüm gruplarda 2., 5., 7. ve 9. haftaların sonunda açlık kan glukoz ölçümleri tekrarlandı. Deney hayvanlarının ağırlık

ölçümleri her hafta alındı. Deney gruplarına verilen günlük yem ve su miktarı ölçülerek sıçanların aldığı günlük kalori hesaplandı. Kalori ölçümü yapılırken 1 gram standart yem 2,6 kalori, 1 gram fruktoz 4 kalori olarak kabul edildi. Buna göre günlük kalori hesabı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Günlük kalori} = (\text{tüketilen yem miktarı} \times 2,6) + (\text{tüketilen fruktozlu su miktarı} \times 40)/100$$

Kontrol grupları 9 hafta boyunca çeşme suyu ve standart yem ile beslendi. Tip 2 Diabet Mellitus (T2DM) model uygulaması ile endotel hasarı incelemesi için oluşturulan diyabetik gruplara ise ilk 5 haftalık sürede her gün taze olarak hazırlanan %10'luk fruktozlu su çözeltisi ve standart yem verildi. 5. haftanın sonundan itibaren 9. haftaya kadar 4 hafta boyunca bu gruplara da çeşme suyu ve standart yem verildi.

Kontrol gruplarının her biri, 7 hayvan olacak şekilde iki grup olarak oluşturuldu. Kontrol grubuna seçilen deney hayvanlarına deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi. Deneyin 2. haftasının sonunda açlık kan glukozu ölçümünün ardından tek doz intraperitoneal (i.p) serum fizyolojik enjeksiyonu (%0,9 NaCl) yapılarak stres seviyesi eşitlendi. 5. haftanın sonunda açlık kan glukozuna bakıldıktan sonra 4 hafta süren Vitamin D veya Serum Fizyolojik (plasebo etkisi için) tedavi sürecine geçildi.

Grup I: Kontrol Grubu (K) (n=7)

5 hafta boyunca standart yem ve çeşme suyu ile beslenen deney hayvanları, tedaviye dayalı stresin her grupta aynı olması için 5. haftadan sonra her hafta 1 kez oral serum fizyolojik uygulandı.

Grup II: Vitamin D uygulanan Kontrol Grubu (KD) (n=7)

5 hafta boyunca standart yem ve çeşme suyu ile beslendi. 5. haftanın sonunda açlık kan glukozu ölçümü yapılan "D vitamini kontrol grubu"na 4 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere oral vitamin D (170 IU/hafta) uygulaması yapıldı.

Endotel hasarını incelemek için oluşturulan diyabetik iki deney grubunun her biri, 7 rat olacak şekilde oluşturuldu. Seçilen hayvanlara 2 hafta süre ile her gün taze olarak hazırlanan %10'luk fruktozlu su çözeltisi ve standart yem verildi. Ardından 2. haftanın

sonunda açlık kan glukozu ölçümü yapıldı ve gruplardaki her bir sıçanın ağırlığı ölçülerek ağırlık ortalaması hesaplandı. Serum fizyolojik içerisinde çözündürülmüş Streptozotosin (STZ) 40 mg/kg tek doz i.p. olarak uygulandı. 48 saat sonra 14 ratın 12'si açlık kan glukozları ölçülerek 160 mg/dl olanlar diyabetik kabul edildi. 5. haftanın sonuna kadar sıçanlara içme suyu olarak %10'luk fruktozlu su verildi.

Grup III: Diyabet Grubu (F) (n=7)

5 hafta boyunca fruktozlu su ve standart yem ile beslenen gruplar, 5. haftanın sonunda açlık kan glukozları ölçülerek 4 haftalık takip sürecine alındı. Tedaviye dayalı stresin her grupta aynı olması için 4 hafta boyunca haftada bir kez oral serum fizyolojik uygulandı.

Grup IV: Vitamin D Uygulanan Diyabet Grubu (FD) (n=5)

5 hafta boyunca fruktozlu su ve standart yem ile beslenen gruplar, 5. haftanın sonunda açlık kan glukozları ölçülerek 4 haftalık sürece alındı. 4 hafta boyunca haftada bir kez Vitamin D uygulaması (170 IU/hafta, oral) ile deney grubu oluşturuldu.

Deneylerin sonucunda tüm gruplarda açlık kan glukozu ölçüldü ve ketamine/ksilazin (60mg/kg-10mg/kg) anestezisi altında deney sonlandırıldı. Deney hayvanlarından aort dokuları dissekte edilerek sıvı azotta şok donduruldu ve ardından -80°C'de RNA izolasyonuna kadar saklandı.

3.2.1. Homojenizasyon ve Trizol ile RNA izolasyonu

-80°C dondurucuda saklanan örnekler buz üzerine alınarak çözünmeden hızlıca üzerine Trizol homojenizasyon solüsyonu eklendi (1000 mg doku için 1 ml olarak). Dokular buz üzerinde bıçaklı homojenizatör kullanılarak parçalandı. Homojenizatör bıçak uçları, her bir örnek homojenize edilmeden önce sırasıyla DEPC'li distile su, 4M Guanidin isotiyosiyanat (GTC), 0.1M Sodyum Hidroksit ve tekrar DEPC'li distile sudan geçirilerek temizlendi. Her solüsyon arasında homojenizatör ucu peçete ile kurulandı. Dokular trizol içerisinde homojenat haline getirildikten sonra tekrar -80°C'de saklandı. Total RNA izolasyonu için homojenatlar buz üzerinde çözüldü. Her bir homejenat üzerine +4°C'de soğutulmuş kloroform eklendi (1 ml trizol için 0,2 ml kloroform). 15 saniye vortekslenerek buz üzerinde 2-3 dakika inkübe edildi. Örnekler

soğutmalı santrifüjde, +4°C’de 12.000xg’de 15 dakika santrifüj edildi. Aköz faz dikkatlice yeni tüpe aktarıldı. Üzerine ilk aşamada eklenen Trizol miktarının yarısı kadar +4°C’de soğutulmuş isopropanol eklendi. Alt üst edilerek karıştırıldı. Örnekler gece boyu -20°C’de bekletildi. Daha sonra +4°C 12.000xg’de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüplerin dip kısmına çöken total RNA pelletine temas edilmeden mikropipet ile süpernant atıldı ve pellet üzerine başlangıç Trizol miktarı kadar +4°C’de soğutulmuş %75 Ethanol (DEPC’li su ile sulandırılmış) ile yıkandı. Ardından +4°C 7.500xg’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernant atıldıktan sonra pellet kurumaya bırakıldı. Pellet kuruduktan sonra 30 µl RNazsız steril suda çözüldü. Örnekler -80°C dondurucuya kutulanarak kaldırıldı.

3.2.2. RNA Kalite ve Miktar Tayini

Dokudan Trizol kullanılarak izolasyonu yapılan total RNA’ların kalite ve miktarları spektrofotometrik ölçümlere dayanarak hesaplandı. Total RNA’ların konsantrasyonları NanoDrop (nd-2000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) cihazı ile ölçüldü. A260 /A280 oranı 1.9-2.0 ve A260/A230 oranları ise 2.0-2.2 aralıklarında sonuç alınan RNA örnekleri kaliteli kabul edildi.

3.2.3. cDNA Sentezi

Dokudan elde edilen total RNA örnekleri -80°C’den buz üzerine alındı. Her bir örneğin konsantrasyonu cDNA sentez reaksiyonda 100 ng/µl olacak şekilde hesaplanarak RNazsız steril su ile sulandırıldı. cDNA sentezi, iScript cDNA sentez kiti (Biorad) kullanılarak gerçekleştirildi. Uygulanan protokol aşağıdaki gibidir.

RNA+dH₂O :15 µl

5X iScript Reaksiyon Miksi :4 µl

iScript Ters Transkriptaz :1 µl

Toplam :20 µl

Örneklerin cDNA sentezi, Biorad T100 Thermal Cycler cihazında Tablo 3-3’deki koşullarda yapıldı ve ardından kantitasyon için kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Tablo 3-3: cDNA sentezi için önerilen sıcaklık-zaman protokolü

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Zaman (dk)
Bağlanma	25	5
Ters transkripsiyon	42	30
Ters transkripsiyon inaktivasyonu	85	5
Soğutma	4	10

3.2.4. OPG/RANKL Sinyal Yolağında Araştırılan Genler İçin Primer Tasarımı

OPG/RANKL sinyal yolağına özgü olarak, transkripsiyon faktörleri olan Runt ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (*Runx2*) ve kemik morfojenik protein 2 (*Bmp-2*) ile *Opg* ve *Rankl* gen transkriptlerinin ifade düzeylerini belirlemek üzere tez çalışması kapsamında seçildi. Ayrıca, *Icam-1* ve *Nos3* genleri, endotel hasarını kontrol etmek amacı ile seçildi. Enflamasyon varlığını belirlemek için ise *Tnfa* ve *Il-1b* genleri seçildi. Kantitatif RT-PZR için “housekeeping” endojen kontrol olarak *Gapdh* geni kullanıldı. Bu genlere özgü primerler internet tabanlı Primer 3 (v. 0.4.0) programı aracılığı ile dizayn edildi. Primerlerin tasarımında, ileride yapılması planlanan çalışmalarda, insan gen transkript düzeylerinin de belirlenebilmesi için rat ve insan homolog diziler üzerinden primer çiftleri dizayn edilmeye çalışıldı. Bunun için genlerin transkriptleri kontrol edilerek rat ve insandaki ortak bölgeler seçildi. Bu ortak bölgeler Clustal W (CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments) çoklu sekans hizalaması programı ile tespit edildi ve ardından Primer 3 programında primer çiftleri belirlendi. Programda primerler çiftleri için, çoğaltılacak amplicon boyu 50-200 arası, erime sıcaklıkları 58-60-62 derece olarak belirlendi ve düşük ihtimal olsa da muhtemel genomik DNA kontaminasyonundan kaçınmak için farklı ekzonlara denk gelmesine dikkat edildi. Dizaynı yapılan oligonükleotidler ortalama 21 baz çifti uzunluğunda tasarlanmış olup yakın erime sıcaklığında (T_m), birbiri üzerlerine veya kendi üzerine dimerize olmamalarına dikkat edildi. Dimerizasyon kontrolü internet tabanlı OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., ABD) programı kullanılarak yapıldı.

Tablo 3-4: OPG/RANKL sinyal yolağı ilişkili genler ve endojen kontrol genin ileri ve geri primer dizileri

<i>Opg</i>	5'-AGTGTCTATACTGCAGCCC-3'	F
	5'-CACAGGGTAACATCTATTCCAC-3'	R
<i>Rankl</i>	5'-AGCGCAGATGGATCCTAA-3'	F
	5'-CAGACTCACTTTATGGGAACC-3'	R
<i>Bmp-2</i>	5'-CAAGCCAAACACAAACAGCG-3'	F
	5'-TATGGCATGGTTGGTGGAGT-3'	R
<i>Il-1b</i>	5'-GGAGAATGACCTGAGCACCT-3'	F
	5'-GGAGGTGGAGAGCTTTCAGT-3'	R
<i>Runx2</i>	5'-TTCCCAGGCATTTTCATCCCT-3'	F
	5'-GGGAACTGATAGGACGCTGA-3'	R
<i>Tnfα</i>	5'-CCCGAGTGACAAGCCTGTAG-3'	F
	5'-GATGGCAGAGAGGAGGTTGAC-3'	R
<i>Nos3</i>	5'-TGGCCAAAGTGACCATTGTG-3'	F
	5'-GGCAGGGGACAGGAAATAGT-3'	R
<i>Icam-1</i>	5'-AAGATCAAATGGGGCTGGGA-3'	F
	5'-AATGTATGTGGGTGGGGAGG-3'	R
<i>Gapdh</i>	5'-AAAGGGTCATCATCTCCGCC-3'	F
	5'-AGTGATGGCATGGACTGTGG-3'	R

3.2.5. Araştırılan genlerin Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Endotel hasarın oluşumunun test edilmesi ve OPG/RANKL sinyal yolağının aktivitelerinin araştırılması için öncelikle hedef genlere özgü tasarlanan primerler kullanılarak konvansiyonel PZR optimizasyonu yapıldı. Bunun için seçilen iki gruptan birer cDNA örneği kullanıldı.

PZR için seçilen genlerin reaksiyon içerikleri Tablo 3-5'deki miktarlarda hazırlandı. Kullanılan primerler Tablo 3-4'deki gibidir.

Tablo 3-5: Araştırılan genlerin PZR içerikleri

dH ₂ O	10,7 µL
10x Tampon	2,5 µL
2,5 µM dNTP	2,5 µL
25 mM MgCl ₂	2 µL
2 µM İleri Primer	2,5 µL
2 µM Geri Primer	2,5 µL
Taq Polimeraz	0,3 µL
cDNA	2 µL
Toplam	25 µL

0.2 ml'lik PZR tüplerinde hazırlanan reaksiyon karışımları, Biorad T100 Thermal Cycler cihazında ayarlanan Tablo 3-6'daki sıcaklık zaman protokolü ile çalışıldı ve %2'lik Agaroz jelde yürütüldü. UV ışık altında Etidyum Bromür ile boyanmış ampikon bantları BioRad görüntüleme cihazında (GelDoc-It 310 Imaging System, UVP, UK) analiz edildi.

Tablo 3-6: Araştırılan genlerin PZR sıcaklık-zaman protokolü

İnkübasyon	94 °C	2:00	1 siklus
Amplifikasyon	94 °C	0:30	30 siklus
	54 °C	0:30	
	72 °C	0:30	
Uzama	72 °C	7:00	1 siklus
Soğuma	10 °C	∞	1 siklus

3.2.6. Araştırılan Genlerin Gradyent Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Optimizasyonu

Primerlerin en uygun bağlanma sıcaklığını bulmak amacıyla primer konsantrasyonu sabit tutularak 5 farklı sıcaklıkta test edildi. Sıcaklıklar PZR cihazının Y eksenini boyunca ayarlandı. Her reaksiyonda 3 gen çalışıldı.

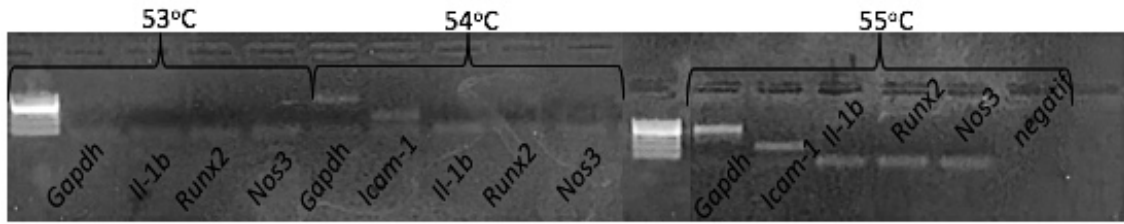
Gradyent PZR için seçilen genlerin reaksiyon içerikleri Tablo 3-7'deki miktarlarda hazırlanmıştır. Kullanılan primerler Tablo 3-3'deki gibidir.

Tablo 3-7: Araştırılan genlerin Gradyent PZR içerikleri

dH ₂ O	6,45 µL
10x Tampon	1,1 µL
2,5 µM dNTP	0,3 µL
25 mM MgCl ₂	0,25 µL
2 µM İleri Primer	0,4 µL
2 µM Geri Primer	0,4 µL

Taq Polimeraz	0,2 µL
cDNA	1 µL
Toplam	10 µL

0.2 ml'lik PZR tüplerinde hazırlanan reaksiyon karışımları, Biorad T100 Thermal Cycler cihazında ayarlanan Tablo 3-8'deki sıcaklık zaman protokolü ile çalışıldı ve PZR ürünleri %2'lik Agaroz jelde yürütüldü (Şekil 3-1). UV ışık altında Etidyum Bromür ile boyanmış ampikon bantları (*Opg* için 233 bç, *Rankl* için 246 bç, *Bmp2* için 186 bç, *Il-1b* için 105 bç, *Runx2* için 100 bç, *Tnfα* için 268 bç, *Nos3* için 81 bç, *Icam-1* için 133 bç, *Gapdh* için 197 bç), BioRad görüntüleme cihazında (GelDoc-It 310 Imaging System, UVP, UK) analiz edildi.



Şekil 3- 1: Gradiyent PZR %2'lik agaroz jel görüntüleri

Tablo 3-8: Araştırılan genlerin Gradiyent PZR sıcaklık-zaman protokolü

İnkübasyon	94 °C	2:00	1 siklus
Amplifikasyon	94 °C	0:30	30 siklus
	52-56 °C	0:30	
	72 °C	0:30	
Uzama	72 °C	7:00	1 siklus
Soğuma	10 °C	∞	1 siklus

3.2.7. Araştırılan Genlerin Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR ile İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR (RT-PZR) yöntemi, gen ifade düzeylerini belirlemeye yönelik kullanılmakta olup araştırma grupları arasında kıyaslama yapılabilmesini sağlamaktadır. Kullanılan floresan boya (SYBR-green), çift zincirli DNA'ya bağlanarak ürün miktarı hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. DNA'ya bağlandığında, boya yapısal olarak değişir ve daha az hareketli hale gelir ve enerjisinin flüoresan olarak salınmasına neden olur. Endotel hasarı ve OPG/RANKL yolağı ile ilişkili gen ürünlerini araştırmak amacı ile Gerçek-Zamanlı PZR cihazı (LightCycler, Roche Diagnostics GmbH, Germany) ve konvansiyonel PZR ve Gradient PZR ile optimize edilen primer çiftleri kullanıldı.

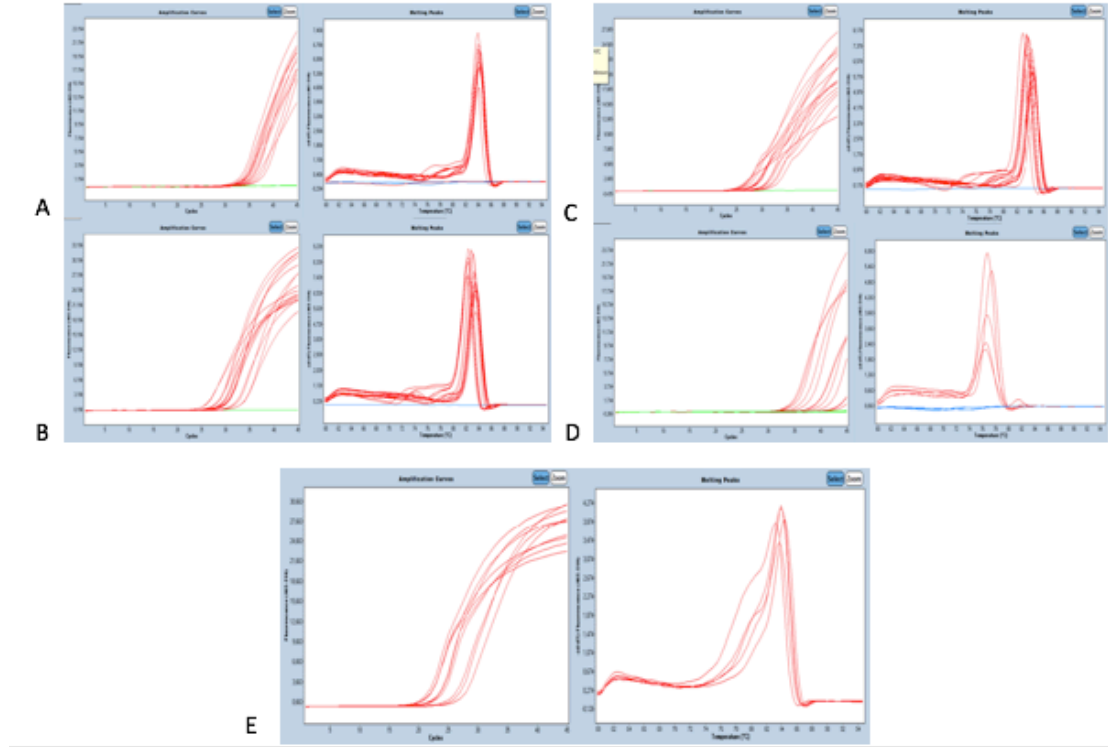
cDNA'lar 1:5 oranında dilüe edilerek 200 ng olacak şekilde hazırlandı. Bu dilüe cDNA örneklerinden 2'şer µl, Tablo 3-9'da gösterilen 8 µl'lik reaksiyon karışımı ile pipetleme yapılarak 96 kuyulu plaka içerisinde kantitatif RT-PZR'ları yapıldı.

Tablo 3-9: Araştırılan genlerin Gerçek-Zamanlı PZR içerikleri

iTaq SYBR Green Mix	5 µl
İleri Primer	1,5 µl
Geri Primer	1,5 µl
cDNA	2 µl
Toplam	10 µl

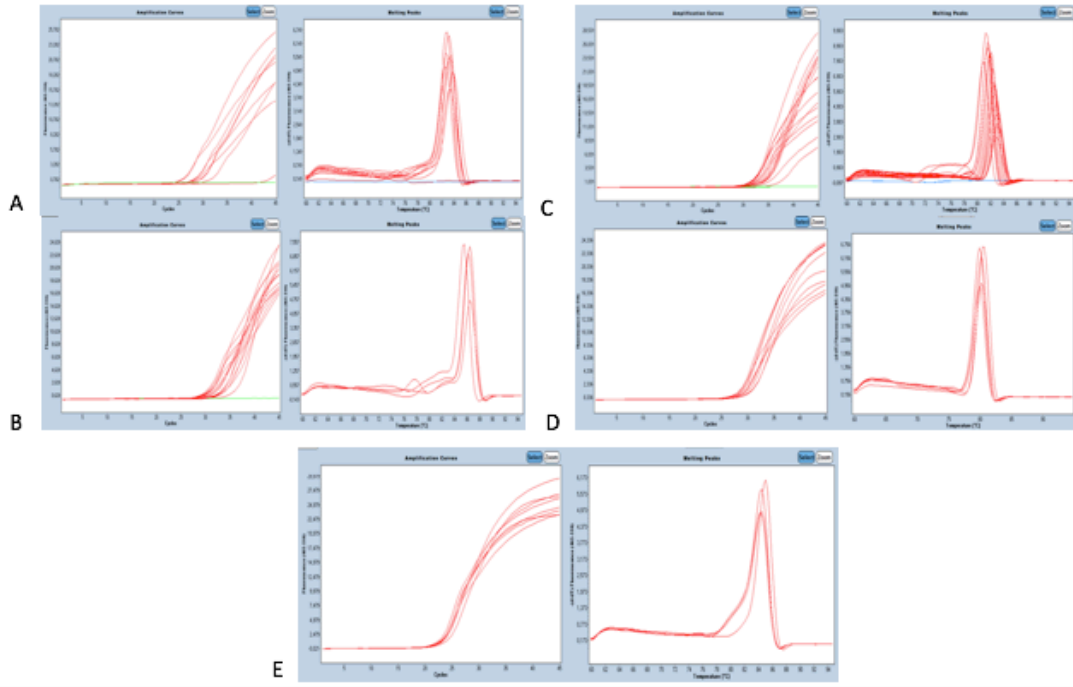
Kantitatif RT-PZR reaksiyonları, 96 kuyulu plakalarda kapatıcı filmler ile kapatılarak Gerçek-Zamanlı PZR cihazında (LightCycler480, Roche Diagnostics GmbH, Almanya) yapıldı. Tablo 3-10'daki sıcaklık-zaman protokolü uygulandı. Primer çiftlerinin optimizasyonu sonucunda araştırılan genler iki gruba ayrıldı ve gerçek zamanlı PZR'de iki farklı bağlanma sıcaklığında çalışıldı. *Icam-1*, *Runx2*, *Bmp2*, *Rankl*

genleri 58°C bağlanma sıcaklığında çalışılırken *Tnf*, *Il-1b*, *Nos3*, *Opg* genleri 60°C’de çalışıldı (Şekil 3-2, Şekil 3-3).



Şekil 3- 2: 58°C bağlanma sıcaklığında çalışılan genlerin amplifikasyon ve erime sıcaklığı eğrileri

A: *Icam-1*, B: *Runx2*, C: *Bmp2*, D: *Rankl*, E: *Gapdh* genleri 58°C bağlanma sıcaklığındaki gerçek zamanlı PZR’de amplifikasyon eğrileri ve erime sıcaklığı eğrilerini temsil etmektedir.



Şekil 3- 3: 60°C bağlanma sıcaklığında çalışılan genlerin amplifikasyon ve erime sıcaklığı eğrileri

A: *Opg*, B: *Tnfα*, C: *Il-1b* D: *Nos3*, E: *Gapdh* genleri 60°C bağlanma sıcaklığındaki gerçek zamanlı PZR’de amplifikasyon eğrileri ve erime sıcaklığı eğrilerini temsil etmektedir.

Tablo 3-10: Araştırılan genlerin Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR sıcaklık-zaman protokolü

Ön-inkübasyon	98 °C	5:00	1 siklus
Amplifikasyon	95 °C	0:10	45 siklus
	60/58 °C	0:30	
	60 °C	0:30	
Erime Eğrisi	95 °C	7:00	1 siklus
	60 °C	1:00	
	95 °C	∞	
Soğuma	40 °C	0:10	1 siklus

Kantitatif RT-PZR’de çift çalışılan cDNA örneklerinden LC480 sisteminin programında “Absolute Quantification w/2nd Derivative Maximum” metodu kullanılarak analiz edildi ve Ct değerleri elde edildi. Tüm örneklerin Ct verileri excel dosyasına aktarıldı. Araştırılan hedef genlerin Ct değerlerinden, Gapdh endojen kontrol geni Ct değerleri çıkarılarak öncelikle Delta-Ct değerleri ardından kontrol örneğinin (kalibratör olarak en düşük Gapdh Ct’sine sahip kontrol örneği seçildi) Delta-Ct değeri çıkartılarak Delta Delta Ct değeri hesaplandı. Tüm örneklerin rölatif kantitasyon (değişim katsayısı) değerleri, $2^{-\text{Ortalama Delta Delta Ct değeri}}$ hesabı ile belirlendi.

Araştırılan her genin rölatif kantitasyon değerleri yukarıdaki formüle göre hesaplandı ve gruplar arasında mRNA ifade düzey farklılıkları birbirleri ile kıyaslandı. Bunun için, 2’li gruplar arasında Mann-Whitney U testi (normal dağılıma uymadıkları için) ve 2’den fazla grup karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi ile istatistiksel olarak SPSS programında (21.0 versiyonu, Chicago, IL) analiz edildi. Deney hayvanlarının gruplar arasında açlık kan glukoz, ağırlık ve kalori hesaplarının karşılaştırılmasında ANOVA testi kullanıldı. Hedef gen ifade düzeyleri, hem kendi aralarında hem de açlık kan glukoz düzeyleri ve rat ağırlık takipleri gibi sürekli değişkenler ile Sperman’s testi

kullanılarak korelasyonları incelendi. Korelasyon Katsayısı (r), 0.00-0.25 (çok zayıf), 0.26-0.49 (zayıf), 0.50-0.69 (orta), 0.70-0.89 (yüksek), 0.90-1.00 (çok yüksek) değerlerine göre değerlendirildi. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Bu çalışmada, ateroskleroz gelişiminin ilk basamağı olan endotel hasarında, OPG/RANKL sinyal yolağında rol alan genlerin mRNA ifade düzeyleri ve Vitamin D tedavisi ile ifade düzeylerindeki değişimler araştırıldı. Bunun için, kontroller ile birlikte diyabetik ratlar ve bunların Vitamin D uygulaması yapılan gruplar olmak üzere toplam 4 grupta seçilmiş hedef genlerin ifade düzeyleri karşılaştırıldı. Daha önce modifiye edilerek T2DM modeli oluşturulan çalışmada deney gruplarının karaciğer dokularında (Anapalı, M. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi 2018) immunohistokimyasal olarak resveratrol, vitamin D ve kombine tedavisinin enflamasyon, endoplazmik retikulum (ER) stresi, apoptoz ve proliferasyon üzerine etkisi incelenmiş ve oluşturulan modelin diyabet oluşumunda etkin olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada ise deney hayvanlarının takiplerine ve tedavi uygulamasına aktif olarak katılındı ve dört deney hayvanı grubu, 9. Hafta sonunda sakrifiye edilerek aort dokuları dissekte edildi. Diyabet sebebi ile aort dokularında meydana gelen endotel hasarında OPG/RANKL sinyal yollağı aktiviteleri mRNA düzeyinde incelendi.

Bu çalışmada araştırılan 4 deney grubunda yer alan ratların deney başlamadan önce ve devam ederken açlık kan glukoz değerleri ile her gün verilen su ve yem miktarları not edilerek hesaplanmış günlük kalori alımları ve deney süresince değişen vücut ağırlıkları (Anapalı, M. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi 2018) daha önceki çalışmada detaylı olarak verilmiştir. Ancak bu çalışmaya dahil edilen gruplardaki ratların verileri aşağıda verilmektedir. Daha sonra aort dokusunda belirlenen gen ifade düzeyleri ile bu veriler karşılaştırmalı analizleri yapıldı.

4.1. Açlık Kan Glukozu Seviyesi

Deney modeli oluşturmada önce çalışmaya dahil edilen tüm ratların açlık kan glukoz değerleri ölçüldü. Bu değerler istatistiksel olarak analiz edildiğinde 4 grup arasında anlamlı fark olmadığı saptandı ($p>0,05$). Deneyin başlangıcından itibaren 2 hafta boyunca %10'luk fruktoz uygulanan test grupları ve çeşme suyu verilen kontrol grubunda açlık kan şekeri ölçümü tekrar yapıldı. Fruktoz uygulanan Diyabet-kontrol (F), vitamin D-endotel hasarı (FD), grupları ile fruktoz uygulanmayan sağlıklı kontrol (K), vitamin D-kontrol (KD) grupları arasında ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p<0.001$). Diyabet oluşturmak için uygulanan STZ'den (40 mg/kg, i.p) 48 saat sonra

yapılan açlık kan glukoz ölçümlerinde F, FD ile K, KD grupları arasında ileri derecede anlamlı fark saptandı ($p<0.001$). 5. Hafta (STZ uygulamasından 3 hafta sonra) olan tedavi başlangıcında yapılan açlık kan glukozu ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde F ve FD grupları ile K ve KD grupları arasında çok ileri derecede anlamlı farkın devam ettiği görüldü ($p<0.001$). 4 haftalık Vitamin D uygulamasının ardından yapılan ölçümde açlık kan glukozunun uygulama grubunda düştüğü gözlemlendi. F grubu ile tüm gruplar arasında çok ileri derecede anlamlı fark ($p<0.001$) devam ederken, tüm kontrol grupları ile FD grubu ($p<0,01$) arasında anlamlı fark bulundu (Tablo 4-1, Şekil 4-1).

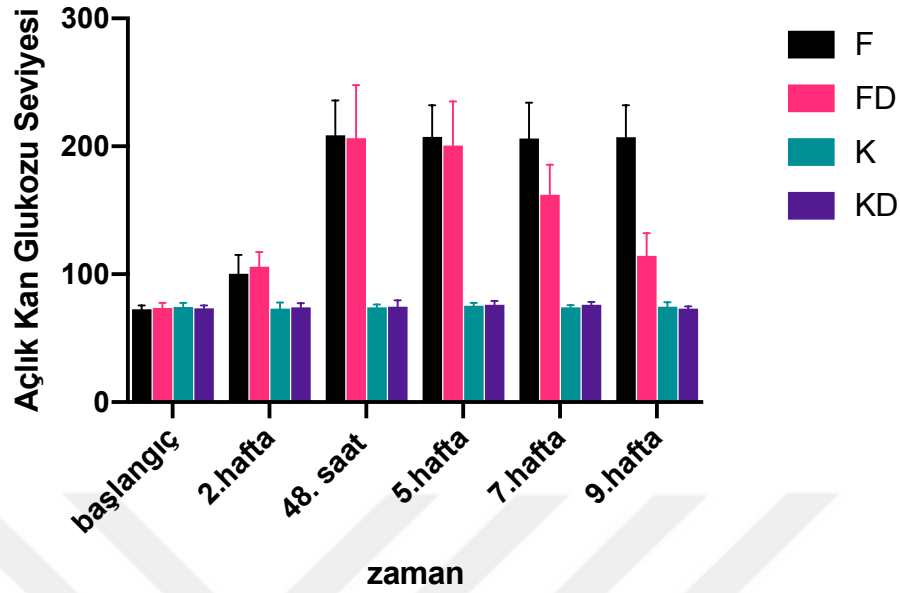
Tablo 4-1: Deney gruplarına ait açlık kan glukozları (mg/dl) ortalaması

Ölçüm zamanı/Gruplar	F (n=7)	FD (n=5)	K (n=7)	KD (n=7)	P değeri*
Başlangıç	72,57 $\pm$ 2,99	74,8 $\pm$ 2,94	74,43 $\pm$ 3,31	73,29 $\pm$ 2,43	0,524
2. hafta sonu, STZ öncesi	100,43 $\pm$ 14,61	106,2 $\pm$ 9,23	73,14 $\pm$ 4,74	74,14 $\pm$ 3,24	0,0001
STZ'den sonraki 48. saat	208,57 $\pm$ 27,34	225,0 $\pm$ 32,43	74,14 $\pm$ 2,27	74,71 $\pm$ 4,82	0,0001
5.hafta	207,29 $\pm$ 24,74	216,0 $\pm$ 27,24	75,43 $\pm$ 2,22	76,00 $\pm$ 3,05	0,0001
7.hafta	206,00 $\pm$ 28,05	173,00 $\pm$ 17,32	74,14 $\pm$ 1,68	76,14 $\pm$ 2,19	0,0001
9.hafta	207,14 $\pm$ 24,9	120,8 $\pm$ 16,69	74,71 $\pm$ 3,30	73,14 $\pm$ 1,77	0,0001

(K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD)

*ANOVA testi

Açlık Kan Glukozu Takibi



Şekil 4-1: Açlık kan glukozu takibi (mg/ d1)

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

4.2. Vücut Ağırlığı Ölçümleri

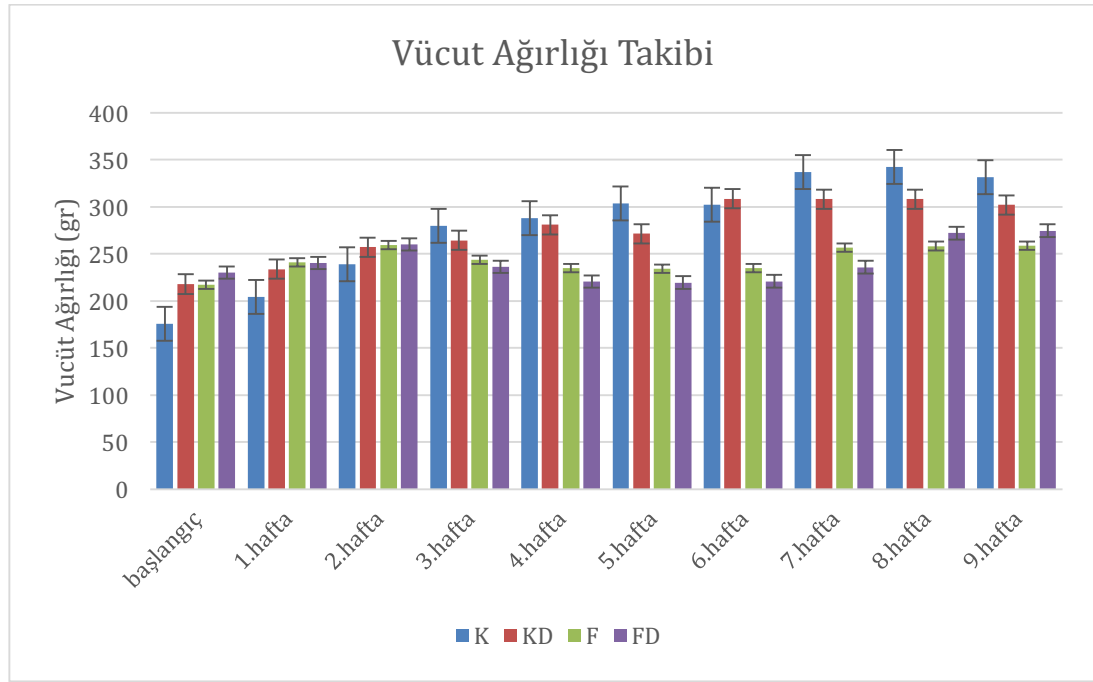
Tablo 4-2: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının (gr) ortalaması

Ölçüm zamanı/ Gruplar	F (n=7)	FD (n=5)	K (n=7)	KD (n=7)	P değeri
Başlangıç	216,93±43,92	229,90±58,09	175,57±10,47	217,78±9,68	0,049
2.hafta	259,1± 52,48	240,4±57,28	239,14±12,87	233,57±11,8	0,238
5.hafta	234,3±80,11	280,9±16,91	303,3±18,41	280,85±16,9	0,065
9.hafta	258,71±69,16	272,0±92,26	331,29±14,81	308,14±31,7	0,058

(K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD)

*ANOVA test

Çalışmaya dahil edilen ratların deney sürecindeki fiziksel değişimleri takip edildi. Tüm hayvanlarda belirli aralıklarla ağırlık ölçümleri yapıldı. Vitamin D uygulamasına başlanan 5. haftada ve deneyin sonunda ise tüm gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark gözlemlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 4-2, Şekil 4-2).



Şekil 4-2: Vücut ağırlığı takibi (gr)

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

4.3. Günlük Kalori Alımı Tespiti

Deney süresince deney hayvanlarının günlük tükettiği yem ve fruktozlu su miktarları kaydedilerek günlük kalori alımları hesaplandı. 2 haftalık fruktoz alımı, intraperitonel STZ uygulaması yapılarak üç haftalık fruktoz alımı ile tamamlanan 5. haftanın ve vitamin D takviyesinin sağlandığı dört haftalık periyodun kalori tüketimleri dikkate alındı (Tablo 4-3, Şekil 4-3).

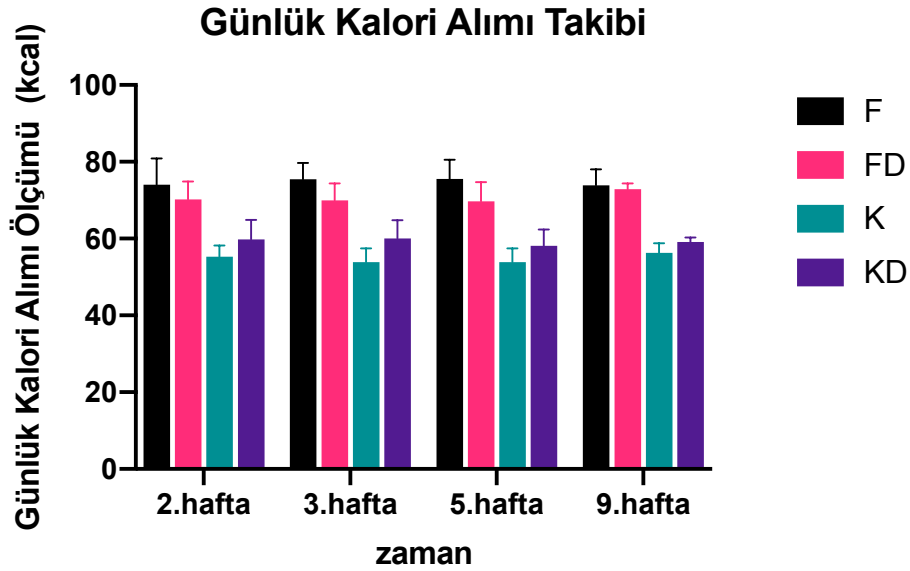
Deneyin ilerleyen süreçlerinde diyabet grubu (F) ve vitamin D tedavisi uygulanan diyabet grubu (FD) sıçanların günlük kalori alımları sağlıklı kontrol gruplarına (K, KD) kıyasla ileri derecede anlamlı bulundu ($p=0,001$).

Tablo 4-3: Günlük kalori alımları (kcal/kg) ortalaması

Zaman/ Deney Grupları	F (n=7)	FD (n=5)	K (n=7)	KD (n=7)	P değeri*
2.hafta	74,05±6,83	70,23±4,68	55,3±2,94	59,81± 5,06	0,001
3.hafta	75,43± 4,28	69,98±4,41	53,9± 3,53	60,08±4,7	0,001
5.hafta	75,51±5,04	69,68±5,0	53,9± 3,53	58,11± 4,28	0,001
9.hafta	73,85±4,17	72,86±1,52	56,31± 2,5	59,15± 1,18	0,001

(K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD)

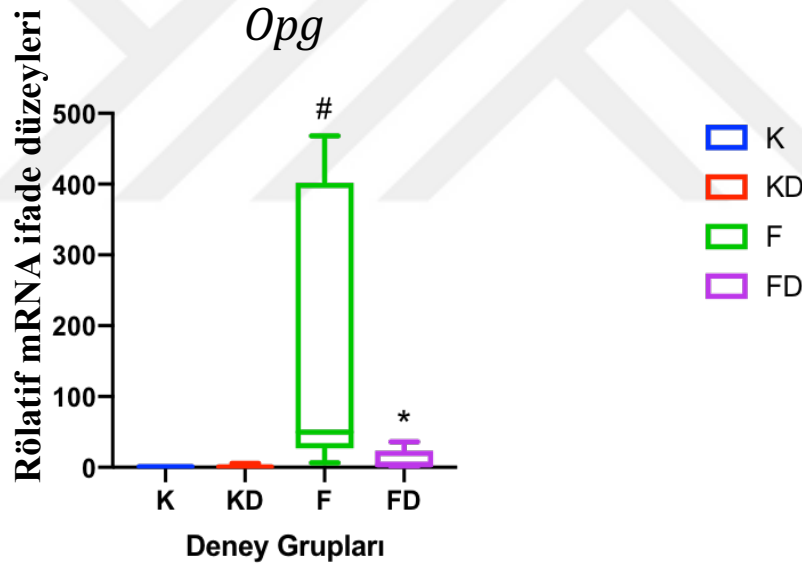
*ANOVA test

**Şekil 4-3: Günlük kalori alımı takibi (kcal)**

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

4.4. Aort Dokusunda *Opg* ve *Rankl* mRNA İfade Düzeyleri

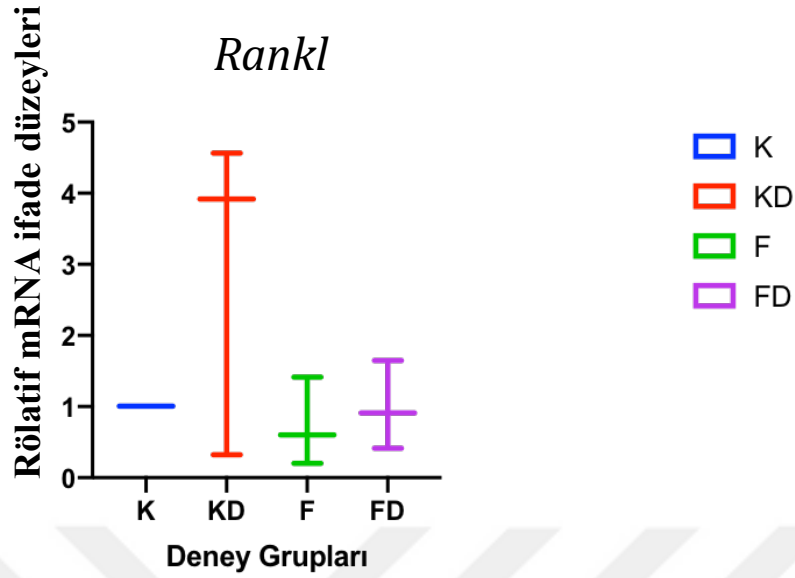
Rat aortlarında diyabet gelişimine bağlı endotel hasarında, deney grupları arasında Kruskal Wallis testine göre *Opg* mRNA ifade düzeyleri arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,013$) (Şekil 4-4). Man Whitney U testi ile ikili grup karşılaştırmalarında, diyabetik ratlardaki (F grubu) *Opg* mRNA ifade düzeyi, kontrole (K grubu) göre anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0,004$). Vitamin D uygulanmış diyabet grubunda (FD grubu) ise diyabetli ratlara (F grubu) göre anlamlı bir azalma tespit edildi ($p=0,03$). Deney grupları arasında yapılan *Rankl* mRNA ifade düzeyleri ise muhtemelen ifade düzeyi çok az olduğu için tüm aort doku örneklerde tespit edilememiş olup gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,597$) (Şekil 4-5).



Şekil 4-4: Deney grupları arasında *Opg* mRNA ifade düzeylerinin karşılaştırılması

$p < 0,005$ kontrol grubuna kıyasla, * $p < 0,05$ diyabet grubuna kıyasla

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

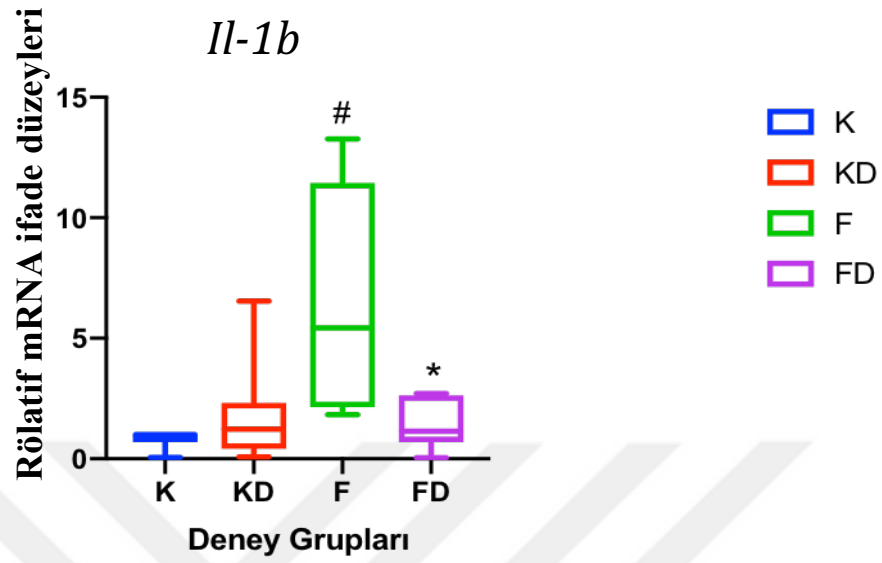


Şekil 4-5: Deney grupları arasında *Rankl* mRNA ifade düzeyi değişimi

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

4.5. Aort Dokusunda *Il-1b* ve *Tnfα* mRNA İfade Düzeyleri

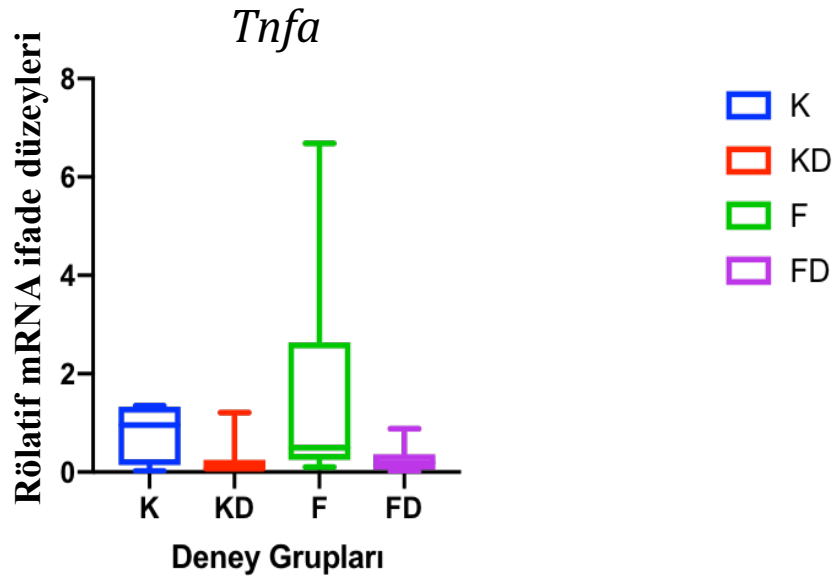
Diyabet modelinin uygulandığı 9 hafta boyunca seçilen enflamasyon belirteçleri olan *Tnfα* ve *Il-1b* mRNA ifade düzeylerindeki değişim Şekil 4-6 ve Şekil 4-7’de gösterildi. Deney grupları arasında Kruskal Wallis testine göre *Il-1b* aortik mRNA düzeyi anlamlı fark görülürken ($p=0,023$) *Tnfα* mRNA ifade düzeylerinde de değişim olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($p=0,172$). *Il-1b* gen ekspresyonu ikili karşılaştırmada kullanılan Mann Whitney U testi sonucunda diyabet grubunda kontrole göre anlamlı bir artış mevcuttur ($p=0,017$). Vitamin D uygulanan diyabet grubunda ise diyabet grubuna kıyasla anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0,030$).



Şekil 4-6: Deney grupları arasında *Il-1b* gen ekspresyonu değişimi

#p < 0,005 kontrol grubuna kıyasla, *p < 0,05 diyabet grubuna kıyasla

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

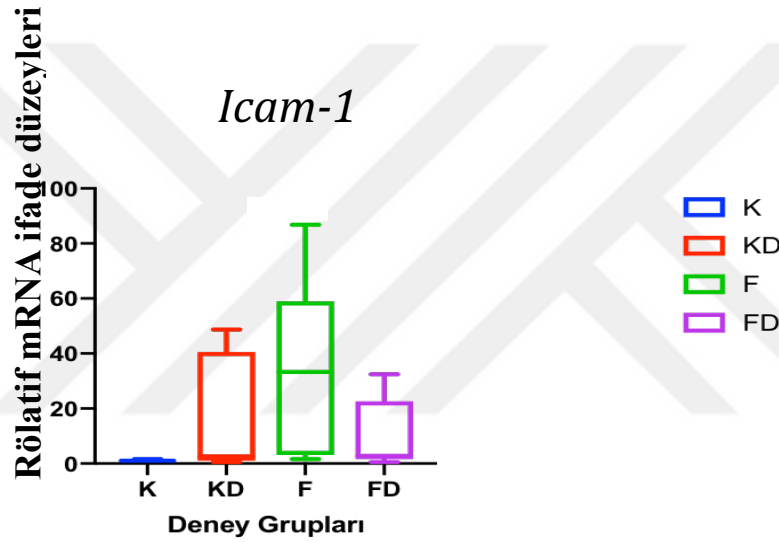


Şekil 4-7: Deney grupları arasında *Tnfa* mRNA düzeyi değişimi

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

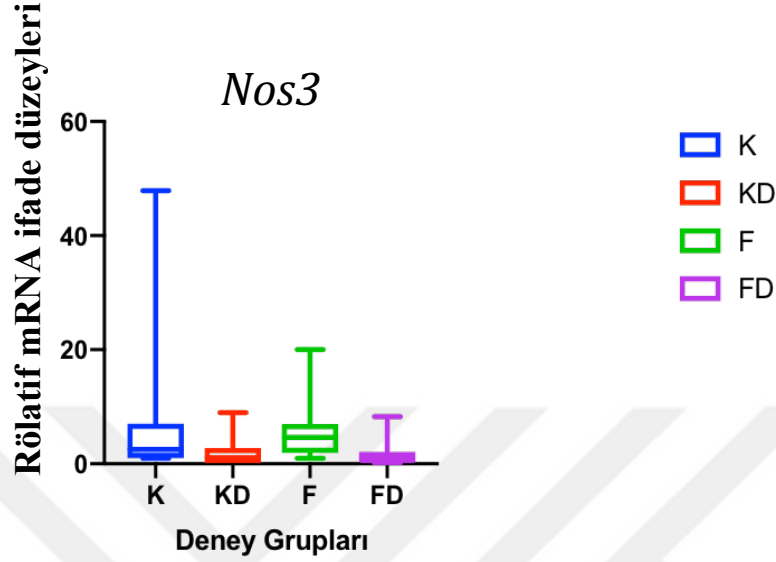
4.6. Aort Dokusunda *Nos3* ve *Icam-1* mRNA İfade Düzeyleri

Aort dokusunda yapılan analizlerde endotel hücre hasarı belirteci olarak seçilen *Nos3* ve *Icam-1* mRNA ifade düzeylerindeki değişim Şekil 4-8 ve Şekil 4-9'da verildi. Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Bununla birlikte Mann Whitney U testine göre diyabet grubundaki *Icam-1* mRNA ifade düzeyi kontrol grubuna göre sınırda anlamlı bir artış olduğu belirlendi ($p=0,067$). Vitamin D uygulanmış diyabet grubunda diyabet grubuna kıyasla *Icam-1* ve *Nos3* mRNA düzeylerinde azalma olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4-9).



Şekil 4-8: Deney grupları arasında *Icam-1* mRNA düzeyi değişimi

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

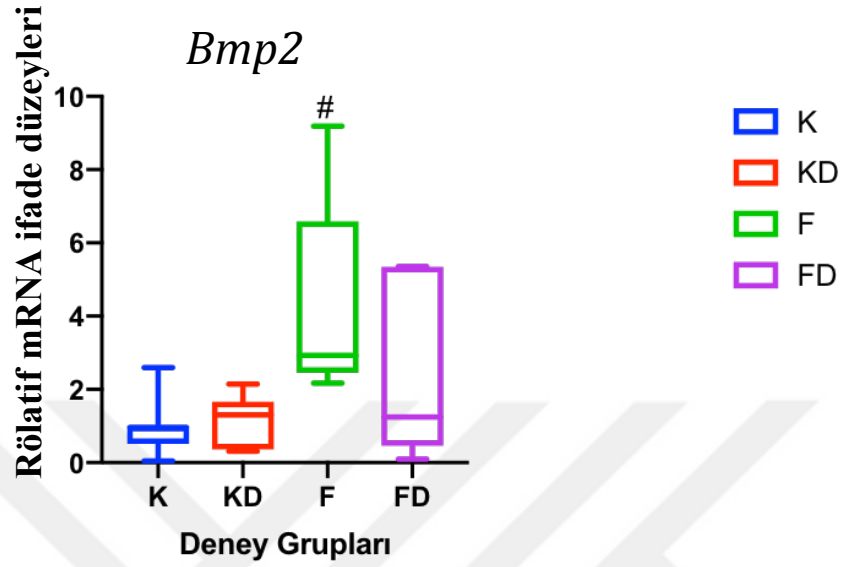


Şekil 4-9: Deney grupları arasında *Nos3* mRNA düzeyi değişimi

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diyabet, FD:Diyabet-vitaminD

4.7. Aort Dokusunda *Runx2* ve *Bmp2* mRNA ifade düzeyleri

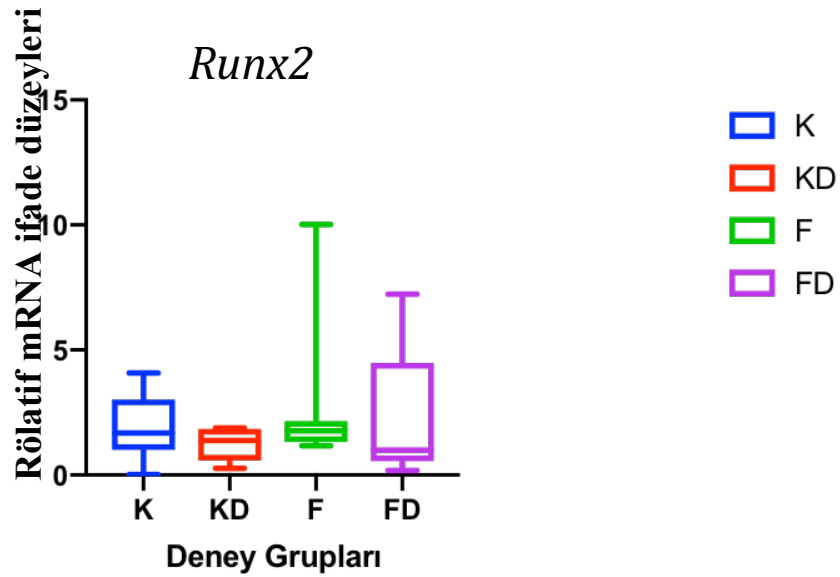
Aort dokusunda yapılan analizlerde OPG sinyal yolağında önemli transkripsiyon faktörleri olarak bilinen *Runx2* ve *Bmp2* mRNA ifade düzeylerindeki değişimler, Şekil 4-10 ve Şekil 4-11’de verildi. Kruskal Wallis testine göre dört grup arasında *Bmp2* mRNA ifade düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p=0,048$). Bununla birlikte Mann Whitney U testine göre diyabet grubundaki *Bmp2* mRNA ifade düzeyleri kontrol grubuna göre çok anlamlı bir artış gösterdiği belirlendi ($p=0,008$). Vitamin D uygulanmış diyabet grubunda ise diyabet grubuna kıyasla *Bmp2* mRNA düzeyinde anlamlı bir değişiklik tespit edilemedi ($p=0,232$) (Şekil 4-10). *Runx2* mRNA düzeyinde ise gruplar arasında anlamlı fark görülmemektedir (Şekil 4-11).



Şekil 4-5: Deney grupları arasında *Bmp2* mRNA düzeyi değişimi

[#]p< 0,005 kontrol grubuna kıyasla

K:Sağlıklı kontrol, KD:Kontrol-vitaminD, F:Diabet, FD:Diabet-vitaminD



Şekil 4-6: Deney grupları arasında *Runx2* ifade düzeyi değişimi

9 haftalık deney protokolünün sonunda dört gruptan toplanan aort dokularında yapılan analizlerde araştırılan genlerin mRNA ifade düzeyleri Tablo 4-4’de verilmektedir. Tablo 4-4’de *Rankl* mRNA ifadesi değerleri belirlenebilen örnek sayıları ayrıca belirtildi. *Rankl*, tüm araştırma grubunun yaklaşık yarısında (% 54’ünde) aort dokusunda ifade edilmediği tespit edildi.

Tablo 4-4: 9 hafta sonunda deney gruplarından alınan aort dokusunda hedef genlerin ifade düzeyleri

Gen transkriptleri	K (n=7)	KD (n=7)	F (n=7)	FD (n=5)
<i>Tnfa</i>	2,72 ± 4,06	0,33 ± 0,5	1,2 ± 1,4	0,16 ± 0,15
<i>Il-1b</i>	0,48 ± 0,48	2,87 ± 3,84	5,7 ± 3,4	1,27 ± 1,09
<i>Nos3</i>	9,34 ± 17,12	2,33 ± 3,09	6,84 ± 6,15	2,15 ± 3,45
<i>Opg</i>	1,23 ± 0,88	2,55 ± 4,43	145,18 ± 200,58	8,2 ± 15,59
<i>Icam-1</i>	1,44 ± 0,72	18,46 ± 21,2	21,91 ± 24,27	25,88 ± 36,18
<i>Runx2</i>	1,82 ± 1,35	1,21 ± 0,68	1,58 ± 0,4	3,3 ± 2,69
<i>Bmp-2</i>	0,94 ± 0,88	1,77 ± 1,99	3,6 ± 2,64	3,95 ± 4,46
<i>Rankl</i>	1,00 (n=1)	2,93 ± 2,28 (n=3)	0,74 ± 0,62 (n=3)	0,97 ± 1,11 (n=5)

*Kruskal Wallis ve **Mann-Whitney U testleri, p<0,05.

4.8. Korelasyon Analizleri

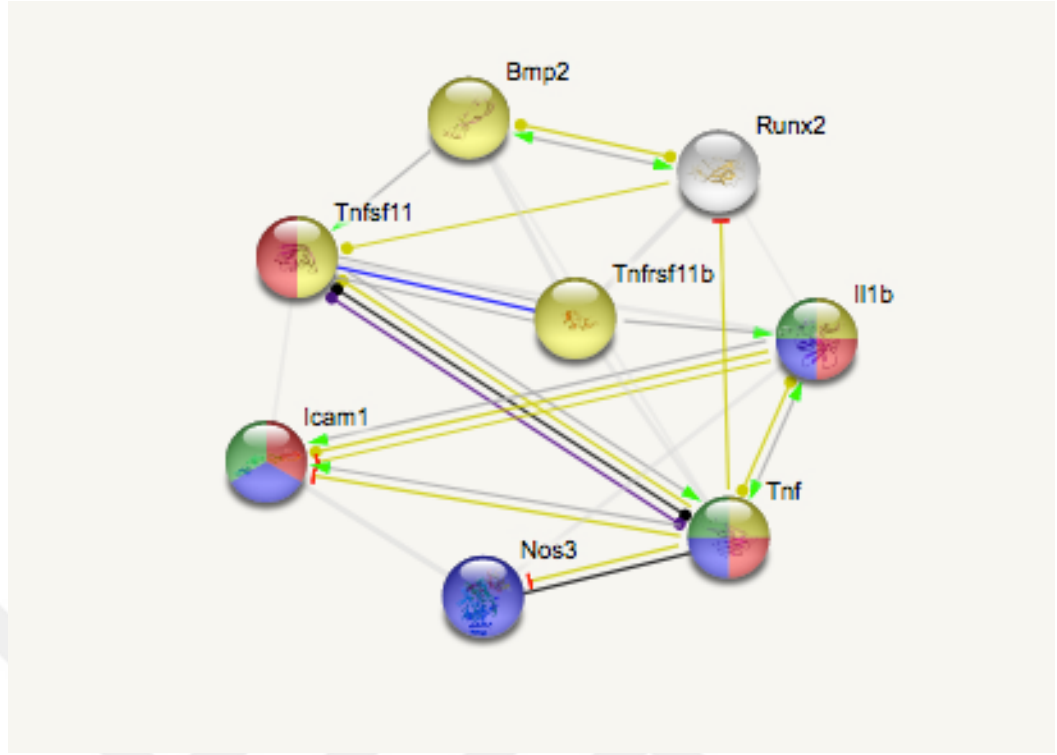
Çalışmamızda ayrıca hem tüm grupta hemde her bir grup ayrı ayrı OPG/RANKL yolağında rol alan hedef genlerin mRNA ifade düzeylerinin birbirleri ile olan korelasyonları ile açlık kan glukoz düzeyi ve ağırlık takip değerleri ile korelasyonları Sperman’s testi ile incelendi (Tablo 4-5). Buna göre *Il-1b*, *Nos3*, *Icam-1* mRNA ifade düzeyleri, STZ öncesi kan şekeri, 5., 7. ve 9. hafta kan şekeri değerleri ile *Opg* düzeyinin pozitif yönde korele olduğu saptandı. Korelasyon değerleri Tablo 4-5’de

verilmektedir. Ağırlık ölçümleri ile *Opg* mRNA düzeyleri arasında ise anlamlı bir korelasyon tespit edilemedi.

Tablo 4-5: Tüm deney gruplarında *Opg* mRNA ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar

	Korelasyon katsayısı (r)	P
<i>Tnfa</i>	0,24	0,258
<i>Il-1b</i>	0,847	0.000
<i>Nos3</i>	0,699	0,000
<i>Icam-1</i>	0,622	0,003
<i>Runx2</i>	0,103	0,617
<i>Bmp2</i>	0,255	0,218
<i>Rankl</i>	0,210	0,513
Başlangıç kan şekeri	0,048	0,817
2. hafta sonu, STZ öncesi kan şekeri	0,437	0.026
STZ'den sonraki 48. saat kan şekeri	0,372	0.061
5.hafta kan şekeri	0,423	0.031
7.hafta kan şekeri	0,442	0.024
9.hafta kan şekeri	0,613	0,001

Araştırma kapsamında mRNA ifade düzeyleri belirlenen hedef genlerin biyolojik süreçlerde birbirleri ile olan etkileşimleri biyoinformatik veritabanları aracılığı ile incelendi. Şekil 4-12 ve Şekil 4-13'te araştırılan moleküllerin birbirleri ile etkileşimleri verilmektedir.



Şekil 4-8: Araştırılan moleküllerin işlev gördükleri yollara göre tanımlanması ve etkileşim haritası

İşlevsel yollar renklendirilerek verilmektedir. Kırmızı; NF-kappaB Sinyal Yolağı, mavi; ateroskleroz ve vasküler gerilim, sarı; sitokin-sitokin reseptör etkileşimi, yeşil; TNF sinyal yolağını ifade etmektedir. Şekil, STRING database 11.0/ Analysis/ KEGG Pathways kullanılarak elde edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Asıl olarak kemik biyolojisini kontrol etmekten sorumlu olan RANKL ve OPG proteinleri, aynı zamanda pek çok metabolik süreçte önemli roller oynayan iki sitokindir (Voronkina ve ark. 2019). RANKL osteoklastogenezi başlatmak için hücrel reseptörü olan RANK'a bağlanır. Buna karşılık, RANKL'ın tuzak reseptör OPG'ye bağlanması osteoklastogenezin inhibisyonu ile sonuçlanır (Khosla, 2001; Rochette ve ark. 2019) OPG/RANKL sitokin sistemi yaygın olarak kemik metabolizması üzerinde çalışılmış olmasına karşın, hayvan modelleri üzerinde yapılan çalışmalarda vasküler kalsifikasyonu kontrol ettiği gözlemlenmiştir (Klejna ve ark. 2009; Loudon ve ark. 2018). Bu çalışmada, OPG/RANKL sisteminin metabolik hastalıkların vasküler sistemdeki ilk patolojisi olan endotel hasarına verdiği yanıt, Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM) hayvan modeli üzerinde araştırıldı. *Opg* mRNA düzeyinin diyabet grupta diğer gruplara göre ileri derecede arttığı (Şekil 4-4) ve *Rankl* mRNA ifade düzeyinin ise anlamlı ölçüde değişmediği (Şekil 4-5) tespit edildi. Bunun yanı sıra diyabetli hayvanlarda kontrol grubuna göre artan *Il-1b* mRNA ifade düzeyi endotel hücrelerdeki enflamasyonu işaret etmektedir.

BMP2 ise kemik formasyonu ve mineralizasyonunda rol alan önemli bir anabolik faktördür. Kemik gelişimi sırasında BMP2 uyarısı ile osteoblastik farklılaşma ve *Runx2* mRNA ifadesi gerçekleşir. Hem BMP2 hem RUNX2; RANKL'ın mRNA ifadesini düzenleyen iki transkripsiyon faktörüdür (Di Bartolo ve ark. 2013). Bu çalışmada *Bmp2* mRNA düzeyi kontrol grubuna kıyasla diyabet grubunda çok anlamlı bir artış gösterdiği ($p=0,008$) bulundu. Ancak *Runx2* mRNA düzeyinde anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bartolo ve ark. yayınladıkları çalışmaya göre yüksek yağlı diyet uygulanan TRAIL^{-/-} ApoE^{-/-} transgenik farelerin aort dokusunda da *Runx2* mRNA düzeylerinde benzer olarak anlamlı bir değişim tespit edilememiştir (Bartolo ve ark. 2013). Buna karşın, Enomoto ve ark.'larının gerçekleştirdiği başka bir çalışma ise *Runx2*^{-/-} farelerde osteoklast farklılaşması için *Runx2*'nin uyarısı ile *Rankl* seviyesindeki artışın gerekli olduğunu karaciğer dokusunda göstermiştir (Enomoto ve ark. 2003). *Bmp2*'deki anlamlı değişim ise endotel dokudaki kalsifikasyon başlangıcının göstergesi olabilir.

Çalışmamızda *Opg* mRNA ifade düzeyi *Il-1b*, *Nos3*, *Icam-1* mRNA ifade düzeyleri (sırası ile $r=0,847$, $p=0,0001$; $r=0,699$, $p=0,0001$; $r=0,622$, $p=0,003$) ve açlık kan şekeri ölçümleri ile korele bulundu. Bu korelasyon endotel hasarı ve enflamasyon belirteçlerinin *Opg* mRNA ifade düzeyindeki artışla güçlü bir şekilde korele olduğunu gösteren önceki deneysel çalışmaları destekler niteliktedir (Vaccarezza ve ark. 2007; Bernardi ve ark. 2014). Ancak metabolik sendromlu hastaların plazma düzeyleri kullanılarak yapılan önceki klinik çalışmada bu ilişki belirlenememiştir (Dallmeier ve ark. 2012). Deneysel hayvan modellerinde ulaşılan sonuçlar güçlü korelasyonu işaret etmesine karşın kohort çalışmalarının tam olarak aynı sonucu vermemesi genetik heterojenite ve hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlar ile ilgili olabileceğini düşündürmüştür. Buna ek olarak, belirli aralıklarla yapılan açlık kan şekeri ölçümleri; STZ uygulaması öncesi, 5., 7. ve 9. hafta kan şekeri değerleri *Opg* mRNA düzeyi ile anlamlı bulundu (sırası ile $r=0,437$, $p=0,026$; $r=0,423$, $p=0,031$; $r=0,442$, $p=0,024$ ve $r=0,613$, $p=0,001$). Açlık kan şekerindeki artışın *Opg* mRNA düzeyindeki artış ile anlamlı şekilde korelasyonu OPG'nin Tip 2 Diabetes Mellitus'un ilerleyişi ile olan güçlü ilişkisini desteklemektedir (Secchiero ve ark. 2006; Vaccarezza ve ark. 2007).

Bu tez çalışmasında araştırılan genler birden çok sinyal yolağının ortak elemanları olup bu süreçlerde anahtar rol oynamaktadırlar. Nitekim araştırma kapsamında yapılan biyoinformatik analizlerde bu genlerin biyolojik süreçlerdeki rolü ve birbirleri ile olan etkileşimleri belirlendi. Buna göre, BMP-2, NOS3, OPG, RANKL, ICAM1, IL-1b ve TNF'in hücre içi moleküler fonksiyonları regüle ederken görev alırken IL-1b, ICAM1, TNF, OPG, RANKL aynı zamanda immün sistem süreçlerine dahil olmaktadır. RANKL, TNF, IL-1b ve ICAM1; NK-kB sinyal yolağı, NOS3, TNF, ICAM1, IL-1b; ateroskleroz ve vasküler gerilimi, ICAM1, TNF, IL-1b; TNF sinyal yolağı, OPG, BMP2, RANKL, TNF, IL-1b; sitokin-sitokin etkileşiminde yer alır (Baud'huin ve ark. 2013; Pérez De Ciriza ve ark. 2015). T2DM grubunda tespit edilen kontrole göre artmış *Il-1b*, *Bmp2* ve *Opg* mRNA ifade düzeyleri, NF-kB ve TNF sinyal yolağının aktive olduğunu, aterosklerotik süreçlerin başladığını ve sitokin-sitokin etkileşimin arttığını göstermektedir (Bartolo ve ark. 2013). *Nos3*, *Icam-1*, *Tnfa*, *Runx2* ve *Rankl* genlerinin mRNA düzeylerindeki anlamlı olmayan değişimlerin diyabetik uygulama süresi olan 5 haftanın yeterli olmamasından veya Vitamin D uygulama sürecindeki son 4 haftalık standart yem ve içme suyu ile beslenme sürecinden kaynaklanmış olabilir. Deney gruplarında *Rankl* mRNA ifade düzeyi oldukça düşük

bulunmuştur. Bunun temel sebebi normal koşullarda endotel hücrelerinde RANKL anlatımının olmamasıdır (O'Brien, 2010). Ancak Collin-Osdoby ve arkadaşları, enflamatuvar sitokinler olan IL-1 ve TNF α 'nın, insan mikrovasküler endotel hücrelerinde *Rankl* mRNA düzeyini, *in vitro* osteoklast oluşumunu teşvik etmek için yeterli seviyelerde uyardığını göstermişlerdir (Collin-Osdoby, 2004). Bu çalışmada gösterilen *Il-1b* mRNA düzeyindeki anlamlı artışa karşın *Rankl* mRNA düzeylerindeki düşük anlatım, 5 haftalık sürecin yeterli olmadığına işaret ediyor olabilir. Buna karşın *Opg* mRNA ifadesindeki *Rankl*'a kıyasla gözlemlenen hızlı yükseliş önceki *in vitro* çalışmalar ile uyumludur (Tai ve Inoue, 2019). RANKL'in, damar duvarında düz kas hücrelerinde (VSMC) üretilerek endotel hücreler için hayatta kalma faktörü görevi gördüğü Kim ve ark.'larının önceki çalışmalarında gösterilmiştir. Öyleki RANKL, endotel hücrelerdeki hayatta kalma uyarısını Fosfoinositid-3 Kinaz/Protein Kinaz B (PI 3'-kinase/Akt) yolağını aktive ederek yapmaktadır (Kim ve ark. 2003).

Enflamasyonda rol oynayan pek çok sitokin, kemik yıkımı uyarıcısı olabilir. IL-1b ve TNF α , kemik matris bileşenlerinin degradasyonu ile sonuçlanan düzenleyici genleri uyardığı gösterilmiştir (Toffoli ve ark. 2016). Bu çalışmada *Il-1b*'nin aort dokusunda mRNA düzeyleri diyabet grubunda anlamlı ölçüde arttığı bulundu. Önceki çalışmalar IL-1b tarafından yönetilen RANKL/RANK mekanizmasının osteoklast farklılaşmasını uyardığını göstermiştir (Kim ve ark. 2009). Ayrıca IL-1b, ateromplaklı damarlarda *Opg* mRNA ifadesindeki artışı uyaran en önemli sitokinlerden biri olarak gösterilmiştir (Venuraju ve ark. 2010a). Çalışmamızda, *Opg* mRNA seviyesindeki artışa korele olarak artan *Il-1b* mRNA seviyesi literatürle uyumludur. Diğer yandan vitamin D uygulanmış diyabet grubunda ise *Il-1b* ve *Tnf α* mRNA düzeyinin diyabet grubuna göre düştüğü tespit edildi. Bu sonuçlar enflamasyonun hastalık sürecindeki ilerleyişini göstermekle birlikte Vitamin D uygulamasının enflamasyonu baskıladığını destekleyici niteliktedir (Nedeljkovic ve ark. 2019). Aynı şekilde *Opg* mRNA düzeyinin enflamasyonla orantılı olarak Vitamin D uygulaması ile birlikte düştüğü gözlemlenmiştir. Hem TNF α hem de IL-1b, OPG'nin vasküler hücrelerden salınmasını uyabilir. Bu bulgu, vasküler hastalıkla ilişkili dolaşımdaki OPG'de artış olduğunu gösteren çeşitli klinik çalışmalarla uyumludur (Knudsen ve ark. 2003; Loudon ve ark. 2018; Nedeljkovic ve ark. 2019). Literatürde halen dolaşımdaki OPG seviyelerinin doğrudan vasküler kalsifikasyonun oluşumunda yer alıp almadığı ya da artan OPG

seviyelerinin kalsifik aterosklerotik dokudaki aşırı mineralizasyonu engelleme girişimlerini yansıtmayı yansıtmadığı açık değildir (Olesen ve ark. 2005; Morony ve ark. 2008; Oštrić ve ark. 2019).

Bu tez çalışması sonucu ulaşılan veriler diyabetin *Opg* mRNA düzeyi ve aorttaki OPG/RANKL oranını arttırdığını ve diyabetin başlangıcının OPG artışı ile ilişkili olduğunu gösteren önceki deneysel çalışmalarla uyumludur (Bucay ve ark. 1998; Bjerre, 2013; Tai ve Inoue, 2019). Bu gözlemlerle tutarlı olarak, çalışmamızda aortik OPG'nin sadece diyabetli ratların grubunda önemli ölçüde arttığı bulundu. Bu bulgular birlikte ele alındığında, diyabet ve/veya kardiyovasküler hastalıklarda endotel dokusunun artan OPG seviyelerinin kaynağı olabileceği hipotezini desteklemektedir (Anderson ve ark. 1995; Landmesser ve ark. 2004).

Dokudaki OPG seviyesinin artması, sadece bir risk belirteci değil, aynı zamanda ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık gelişimi için bir risk faktörü olabileceği belirtilmelidir (Pérez de Ciriza ve ark. 2014; Loudon ve ark. 2018). Hayvan modelleri üzerinde yapılan araştırmalar OPG'nin glukoz metabolizmasının düzenlemesinde rol oynadığına işaret etmektedir; öyleki OPG enjeksiyonları önemli risk faktörlerinden birini temsil eden glikoz seviyelerinin artması ile sonuçlandığı önceki çalışmalarda gözlemlenmiştir (Bernardi ve ark. 2014; Toffoli ve ark. 2016). İkinci olarak, çalışmalar OPG'nin damar sisteminde proenflamatuar ve profibrotik etkileri olduğunu göstermiştir (Zauli ve ark. 2007). Bu etkisi ile uyumlu olarak diyabet grubumuzda OPG'nin endotel hücrelerine lökosit adezyonu ile paralel olarak enflamasyonla birlikte artışı dikkat çekmektedir.

OPG, endotel hücreler, düz kas hücreleri ve epitel hücreler gibi çok çeşitli hücrelerde anlatım yapmaktadır, ayrıca endotel hücrelerde (EC) immüno-komponent hücre biyobelirteçlerinin uyarısı sonucunda ifade edilir (Voronkina ve ark. 2019). OPG aktivitesi, hem EC'lerin hayatta kalmasına izin verir hem de aterojenik moleküllerin arter duvarı içinde proliferasyonunu ve göçünü etkiler (Bahia ve ark. 2006). Endotel hücrede von Willebrand Factor (vWF) de OPG gibi endotel hasarına aracılık eder (Blann ve ark.1995; Shahbazı ve ark. 2007). Weibel-Palade cisimcikleri (WPB'ler) tarafından OPG ile birlikte üretilen vWF, tromboza yardımcı olmaktan ve trombosit yapışmasında kofaktör olarak görev yapmaktan sorumlu büyük bir glikoproteindir. Hem

WPB'lerde hem de plazmada OPG ile birlikte bulunur. OPG ve vWF kompleksinin salgılanması, vWF aracılı hemostazın *in vivo* rolünü düzenler (Zannettino ve ark. 2005).

OPG'nin düzenleyici rolü, EC'lerin hayatta kalması ve çoğalmasını sağlamaktır (McGonigle ve ark. 2009). OPG proteininin WPB'lerden salınmasını TNF α ve IL-1 β gibi pro-enflamatuar sitokinlerin uyardığı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir (Zannettino ve ark. 2005). Bu nedenle OPG'nin endotel hasarının ilk aşamasında potansiyel bir biyobelirteç olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca, hipertansiyonu olan hastalarda yapılan bir çalışmada asimetrik dimetil arginin (ADMA) ve arteriyel sertlik gibi endotel hasarı belirteçlerinin OPG ile pozitif ilişkili olduğunu gösterilmiştir (Tsioufis ve ark. 2011). Bu çalışmada rat serumlarında OPG düzeyleri ölçülemediği için diyabete bağlı olarak da gelişen aterosklerozun muhtemel riskini öngörülen bir belirteç olup olmadığı belirlenememiştir.

Önceki çalışmalar OPG'nin aterojenik bir faktör olarak çalıştığını göstermiş olsa da, gerçek rolü üzerine tartışmalar devam etmektedir. Pek çok araştırmacı, kardiyovasküler hastalıklarda OPG anlatımındaki artışın bir dengeleme sisteminin sonucu olduğu üzerine yoğunlaşmıştır. Benzer şekilde, endotel hasarına karşı immün yanıtın karmaşık bir kompanzasyon mekanizmasının bir parçası olarak dolaşımdaki OPG seviyelerinin arttığı öne sürülebilir (Venuraju ve ark. 2010b). Ek olarak, OPG'deki artış, aterosklerozun ilerlemesi ve ciddiyeti ile ilgili olmayıp süreci başlatan bir aracı olduğuna dair bulgular da elde edilmiştir (Morony ve ark. 2008). Bununla birlikte, birçok çalışma, artan OPG seviyelerinin aterojenik rolünün altını çizmektedir (Mangan ve ark. 2007). Artan OPG düzeyleri, damar üzerindeki proenflamatuvar ortamın bir göstergesi olduğu düşünülmektedir (Venuraju ve ark. 2010). Bu nedenle, OPG artışını endotel hasarı için erken bir belirteç olarak kabul etmek, kardiyovasküler hastalıklarda aterojenik bir faktör olarak nitelemekten daha doğru olabilir. Bu tez çalışmasından elde edilen deneysel sonuçlar, bu hipotezi doğrular niteliktedir. Hasarlı endotel hücrelerinin, enflamasyona yanıt olarak OPG salgıladığı ve böylece dolaşımdaki OPG seviyesini arttırdığını göstermektedir. Bununla birlikte diyabetik hastalarda yapılmış klinik çalışmalarda da destekleyici sonuçların elde edildiği görülmüştür. OPG'nin artmış ifadesi, hastalıkla ilişkili endotel disfonksiyonuna atfedilen doğal Diabetes Mellitus sürecinin erken aşamalarını gösterir niteliktedir (Secchiero ve ark. 2006).

Kemik metabolizması, vasküler sistem ve bağışıklık sisteminde OPG'nin yanı sıra RANKL'in de spesifik rolü vardır. EC'lerde ve immünokompetan hücrelerde RANKL'in ifadesi, vasküler homeostazın patojenitesi için kritiktir. RANKL'in Vasküler Düz Kas Hücreleri'nde (VSMC'ler) vasküler homeostazın üyeleri olan matris metaloproteazlar (MMP) için bir aktivatör olduğu bilinmektedir (Riegel ve ark. 2012). OPG, RANKL aktivitesi için bir kompensatör görevi görür ve RANK/RANKL etkileşimini etkisiz hale getirerek MMP işlevini inhibe eder (Quercioli ve ark. 2012; Venuraju ve ark. 2010a). Bu etkileşimleri nedeni ile vasküler sistemde, RANKL/RANK/OPG yolağının önemli düzenleyiciler olarak çalıştığı kabul edilir (Rochette ve ark. 2019). Bu çalışmada, *Rankl* mRNA ifadesi özellikle kontrol grubundaki ratlardan sadece birinde ifade edildiği, diyabetik grupta ifade düzeylerinin bu kontrol örneği ile benzer olduğu tespit edildi. Ancak vitamin D uygulaması olan kontrollerde nispeten ifade düzeyi artmıştır. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Vitamin D uygulamasının diyabetten bağımsız olarak Rankl ifadesini artırarak MMP aktivitesine katkı sağlayarak koruyucu bir etki gösteriyor olabilir. Ancak bu çalışma kapsamında MMP'ların ifade düzeylerine etkisi incelenememiştir.

Çalışmanın araştırma konularından biri olan Vitamin D3 uygulaması endotel hasarı ile aterosklerozun ilerleyişi ve araştırılan genler üzerine etkisi hakkında yeni bilgiler elde edilmiştir. Önceki bir çalışmada Vitamin D analogu olan parikalsitol uygulaması sonucu Tip 2 Diabetes Mellituslu ratların plazma glukoz ve insülin dirençlerinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir (Takiishi ve ark. 2010). Vitamin D bu etkiyi pankreatik oksidatif stres ve enflamasyon belirteçleri olan C-peptit, adiponektin, IL-2, katalaz ve TNF α gibi molekülleri düzenleyerek yapmaktadır. Başka bir çalışmada Diabetes Mellituslu hayvanlarda insülin yıkan enzimleri azalttığı ve insülin reseptörünü fosforilasyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Elseweidy ve ark. 2017). Klinik çalışmalar ve meta-analizler ise Vitamin D takviyesinin glisemik kontrolü önemli ölçüde artırdığı ve diyabet hastalarda metabolik parametreleri iyileştirdiği saptanmıştır. Benzer bir sonuç gestasyonel diyabet hastalarında da gözlemlenmiştir (Jamilian ve ark. 2016). Kardiyovasküler hastalıklarda ise Vitamin D'nin tromboz, ateroskleroz, endotel fonksiyonu, vasküler kalsifikasyon ve kardiyak hipertropi düzenleyici rolü kanıtlanmıştır. Vitamin D'nin endotel hücreler üzerindeki anti-enflamatuvar etkisi aterosklerozun başlangıcı ve ilerleyişini önlediği gösterilmiştir (Bozic ve ark. 2015). Bu çalışma ile elde edilen sonuçlarda Vitamin D'nin koruyucu

etkisini destekler niteliktedir (Tablo 4-4). *Il-1b* ve *Tnf α* mRNA ifadesinde diyabet grubuna göre meydana gelen 4,5 ve 7,5 katlık azalma Vitamin D'nin anti-enflamatuvar etkisini gösterir niteliktedir (Şekil 4-6, $p<0.05$). Endotel hasarı ile artmaya başlayan *Opg* mRNA ifade düzeyi de Diyabet grubuna (F) kıyasla Diyabet-Vitamin D (FD) grubunda ortalama 17,5 kat azalmıştır (Şekil 4.4). Bu sonuçlar hem OPG'nin endotel hücrelerdeki patogenezele değişimini hem de Vitamin D'nin baskılayıcı etkisini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada ilk defa diyetle bağlı oluşturulan rat diyabet modelinde OPG/RANKL sisteminin endotel hasara etkisi ve vitamin D uygulamasına verdiği yanıt araştırılmış oldu. T2DM modeli başarılı bir şekilde 8-10 haftalık erkek Sprague Dawley Ratlarda oluşturularak 4 hafta boyunca oral Vitamin D uygulandı. Bu çalışmanın limitasyonları arasında yüksek kalorili diyetin uygulanamaması ve bunun sonucunda diyabetik hayvanların kilo kaybetmesi ve damar dokusunda makroskopik olarak gözlenebilen ateroskleroz gelişmemesi olabilir. Ancak, rat modellerinde aterosklerozun tespit edilebileceği ileri tetkikler mevcut olsa da tez kapsamında bu incelemelerin yapılması mümkün olamamıştır. Bunun dışında 4 haftalık vitamin D uygulaması sırasında fruktoz alımının sona erdirilmesi de iyileşme sürecini olumlu yönde etkilemiş olabilir. Diğer yandan bu çalışma kapsamında mRNA düzeyinde incelenen hedef genlerin protein düzeyinde aort dokularında immünhistokimyasal olarak değerlendirilmeleri yapılamamıştır. Ancak daha sonra yapılması planlanan çalışmalar için aort dokularının bir kısmı immünhistokimyasal analizler için fikse edilerek parafine gömülerek saklanmıştır. İleride OPG/RANKL yolağındaki hedef proteinlerin de incelenmesi planlanmıştır. Ayrıca, ileride bu çalışmadan elde edilen sonuçlara dayanarak özellikle *OPG*, *ICAM-1*, *IL-1B* ve *BMP2* mRNA düzeylerinin (bu çalışmada hem rat hem de insana homolog bölgelerden dizayn edilen primer çiftleri kullanılarak) post-mortem insan aterosklerotik damarlarda araştırılması planlanmıştır.

6. KAYNAKÇA

- Ã, P. R., ve Holen, I. (2009). Pathophysiological roles of osteoprotegerin (OPG), 88, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2008.06.004>
- Akinci, B., Celtik, A., Yuksel, F., Genc, S., Yener, S., Secil, M., ve ark. (2011). Increased osteoprotegerin levels in women with previous gestational diabetes developing metabolic syndrome. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 91(1), 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2010.09.028>
- Akinci, B., Demir, T., Celtik, A., Baris, M., Yener, S., Ozcan, M. A., ve ark. (2008). Serum osteoprotegerin is associated with carotid intima media thickness in women with previous gestational diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 82(2), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.07.014>
- Anapalı, M. (2018) "Fruktoz ve Streptozotocin ile oluşturulan diyabet modelinde resveratrol ve vitamin d tedavisinin karaciğer ve endoplazmik retikulum stresine etkileri" (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi) İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa/Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul
- Anderson, T. J., Gerhard, M. D., Meredith, I. T., Charbonneau, F., Delagrang, D., Creager, M. A., ve ark. (1995). Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *The American Journal of Cardiology*, 75(6 SUPPL. 1). [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(95\)80017-M](https://doi.org/10.1016/0002-9149(95)80017-M)
- Bahia, L., Aguiar, L. G., Villela, N., Bottino, D., Godoy-Matos, A. F., Geloneze, B., ve ark. (2006). Relationship between adipokines, inflammation, and vascular reactivity in lean controls and obese subjects with metabolic syndrome. *Clinics.*, 61(5), 433–440. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322006000500010>
- Baud'huin, M., Duplomb, L., Teletchea, S., Lamoureux, F., Ruiz-Velasco, C., Maillason, M., ve ark. (2013). Osteoprotegerin: Multiple partners for multiple functions. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 24(5), 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2013.06.001>
- Bernardi, S., Bossi, F., Toffoli, B., ve Fabris, B. (2016). Roles and Clinical Applications of OPG and TRAIL as Biomarkers in Cardiovascular Disease. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/1752854>

- Bernardi, S., Fabris, B., Thomas, M., Toffoli, B., Tikellis, C., Candido, R., ve ark. (2014). Osteoprotegerin increases in metabolic syndrome and promotes adipose tissue proinflammatory changes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 394(1–2), 13–20. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.06.004>
- Bjerre, M. (2013). Osteoprotegerin (OPG) as a biomarker for diabetic cardiovascular complications. *SpringerPlus*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-658>
- Blann, A., Dobrotova, M., Kubisz, P., ve McCollum, C. (1995). von Willebrand Factor, Soluble P-Selectin, Tissue Plasminogen Activator and Plasminogen Activator Inhibitor in Atherosclerosis. *Thrombosis and Haemostasis*, 74(02), 626–630. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1649788>
- Bonetti, P. O., Lerman, L. O., ve Lerman, A. (2003). Endothelial dysfunction: A marker of atherosclerotic risk. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(2), 168–175. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000051384.43104.FC>
- Bozic, M., Álvarez, Á., de Pablo, C., Sanchez-Niño, M.-D., Ortiz, A., Dolcet, X., ve ark. (2015). Impaired Vitamin D Signaling in Endothelial Cell Leads to an Enhanced Leukocyte-Endothelium Interplay: Implications for Atherosclerosis Development. *PLOS ONE*, 10(8), e0136863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136863>
- Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., ve ark. (1998). osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes ve Development*, 12(9), 1260–1268. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9573043>
- Caidahl, K., Ueland, T., ve Aukrust, P. (2018). Osteoprotegerin : A Biomarker With Many Faces, 1684–1687. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.208843>
- Candido, R., Toffoli, B., Corallini, F., Bernardi, S., Zella, D., Voltan, R., ve ark. (2010). Human full-length osteoprotegerin induces the proliferation of rodent vascular smooth muscle cells both in vitro and in vivo. *Journal of Vascular Research*, 47(3), 252–261. <https://doi.org/10.1159/000257339>
- Chollet, M. E., Brouland, J. P., Bal Dit Sollier, C., Bauduer, F., Drouet, L., ve Bellucci, S. (2010). Evidence of a colocalisation of osteoprotegerin (OPG) with von Willebrand factor (VWF) in platelets and megakaryocytes alpha granules. *Studies*

- from normal and grey platelets. *British Journal of Haematology*, 148(5), 805–807.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2009.07989.x>
- Collin-Osdoby, P. (2004). Regulation of vascular calcification by osteoclast regulatory factors RANKL and osteoprotegerin. *Circulation Research*, 95(11), 1046–1057.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000149165.99974.12>
- Collin-Osdoby, P., Rothe, L., Anderson, F., Nelson, M., Maloney, W., ve Osdoby, P. (2001). Receptor Activator of NF- κ B and Osteoprotegerin Expression by Human Microvascular Endothelial Cells, Regulation by Inflammatory Cytokines, and Role in Human Osteoclastogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20659–20672. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010153200>
- Dalan, R., Liew, H., Kit, W., Tan, A., Chew, D. E. K., Khee, M., ve Leow, S. (2014). Vitamin D and the endothelium: basic, translational and clinical research updates. <https://doi.org/10.1016/j.ijcme.2014.06.003>
- Dallmeier, D., Larson, M. G., Vasan, R. S., Keaney, J. F., Fontes, J. D., Meigs, J. B., ve ark. (2012). Metabolic syndrome and inflammatory biomarkers: a community-based cross-sectional study at the Framingham Heart Study. *Diabetology ve Metabolic Syndrome*, 4(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-4-28>
- de Castro, L. F., Burke, A. B., Wang, H. D., Tsai, J., Florenzano, P., Pan, K. S., ve ark. (2018). Activation of RANK/RANKL/OPG Pathway Is Involved in the Pathophysiology of Fibrous Dysplasia and Associated With Disease Burden. *Journal of Bone and Mineral Research*, 34(2), 290–294. <https://doi.org/10.1002/jbmr.3602>
- De Vita, F., Lauretani, F., Bauer, J., Bautmans, I., Shardell, M., Cherubini, A., ve ark. (2014). Relationship between vitamin D and inflammatory markers in older individuals. *AGE*, 36(4), 9694. <https://doi.org/10.1007/s11357-014-9694-4>
- Di Bartolo, B. A., Cartland, S. P., Harith, H. H., Bobryshev, Y. V., Schoppet, M., ve Kavurma, M. M. (2013). TRAIL-Deficiency Accelerates Vascular Calcification in Atherosclerosis via Modulation of RANKL. *PLoS ONE*, 8(9), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074211>
- Elseweidy, M. M., Amin, R. S., Atteia, H. H., ve Ali, M. A. (2017). Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in

- diabetic rats. *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 85, 155–159. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.116>
- Enomoto, H., Shiojiri, S., Hoshi, K., Furuichi T., Fukuyama R. ve ark. (2003). Induction of osteoclast differentiation by Runx2 through receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL) and osteoprotegerin regulation and partial rescue of osteoclastogenesis in Runx2^{-/-} mice by RANKL transgene. *The Journal of biological chemistry*, 278(26), 23971-23977. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302457200>
- Feeney, M. J., Dwyer, J., Hasler-Lewis, C. M., Milner, J. A., Noakes, M., Rowe, S., ve ark. (2014). Mushrooms and Health Summit Proceedings. *The Journal of Nutrition*, 144(7), 1128S-1136S. <https://doi.org/10.3945/jn.114.190728>
- Gheibi, S., Kashfi, K., ve Ghasemi, A. (2017). A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: Incorporating a high-fat diet and streptozotocin. *Biomedicine ve Pharmacotherapy*, 95, 605–613. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPHA.2017.08.098>
- Gustafson, B. (2010). Adipose Tissue, Inflammation and Atherosclerosis. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17(4), 332–341. <https://doi.org/10.5551/jat.3939>
- Hadi, H. A. R., Carr, C. S., ve Al Suwaidi, J. (2005). Endothelial dysfunction: cardiovascular risk factors, therapy, and outcome. *Vascular Health and Risk Management*, 1(3), 183–198. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.12.013>
- Hamilton, S. J., ve Watts, G. F. (2013). Endothelial dysfunction in diabetes: Pathogenesis, significance, and treatment. *Review of Diabetic Studies*, 10(2–3), 133–156. <https://doi.org/10.1900/RDS.2013.10.133>
- Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Kaneko, I., Haussler, C. A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., ve Jurutka, P. W. (2013). Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcified Tissue International*, 92(2), 77–98. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>
- Heymann, M. F., Herisson, F., Davaine, J. M., Charrier, C., Battaglia, S., Passuti, N., ve ark. (2012). Role of the OPG/RANK/RANKL triad in calcifications of the atheromatous plaques: Comparison between carotid and femoral beds. *Cytokine*, 58(2), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.02.004>
- Hilton, M. J., Gutiérrez, L., Zhang, L., Moreno, P. A., Reddy, M., Brown, N., ve ark. (2001). An Integrated Physical Map of 8q22–q24: Use in Positional Cloning and

- Deletion Analysis of Langer–Giedion Syndrome. *Genomics*, 71(2), 192–199. <https://doi.org/10.1006/GENO.2000.6438>
- Hivert, M. F., Sullivan, L. M., Fox, C. S., Nathan, D. M., D’Agostino, R. B., Wilson, P. W. F., ve Meigs, J. B. (2008). Associations of adiponectin, resistin, and tumor necrosis factor- α with insulin resistance. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 93(8), 3165–3172. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-0425>
- Ishiyama, M., Suzuki, E., Katsuda, J., Murase, H., Tajima, Y., Horikawa, Y., ve ark. (2009). Associations of coronary artery calcification and carotid intima-media thickness with plasma concentrations of vascular calcification inhibitors in type 2 diabetic patients. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 85(2), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2009.04.023>
- Jamilian, M., Karamali, M., Taghizadeh, M., Sharifi, N., Jafari, Z., Memarzadeh, M. R., ve ark. (2016). Vitamin D and Evening Primrose Oil Administration Improve Glycemia and Lipid Profiles in Women with Gestational Diabetes. *Lipids*, 51(3), 349–356. <https://doi.org/10.1007/s11745-016-4123-3>
- Khosla, S. (2001). Minireview: The OPG/RANKL/RANK System, 142(12), 5050–5055. <https://doi.org/10.1210/endo.142.12.8536>
- Kim, H.-H., Shin, H. S., Kwak, H. J., Ahn, K. Y., Kim, J.-H., Lee, H. J., ve ark. (2003). RANKL regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *The FASEB Journal*, 17(14), 2163–2165. <https://doi.org/10.1096/fj.03-0215fje>
- Kinlay MB BS, P. S., ve Ganz MD, P. (1997). Role of Endothelial Dysfunction in Coronary Artery Disease and Implications for Therapy. *The American Journal of Cardiology*, 80(9, Supplement 1), 11I-16I. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(97\)00793-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(97)00793-5)
- Klejna, K., Naumnik, B., Gsowska, K., ve Myćeliwiec, M. (2009). OPG / RANK / RANKL signaling system and its significance in nephrology, 47(2), 199–206. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0035-x>
- Knudsen, S. T., Foss, C. H., Poulsen, P. L., Andersen, N. H., Mogensen, C. E., ve Rasmussen, L. M. (2003). Increased plasma concentrations of osteoprotegerin in type 2 diabetic patients with microvascular complications. *European Journal of*

- Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 149(1), 39–42.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12824864>
- Kosmopoulos, M., Paschou, S. A., Grapsa, J., Anagnostis, P., Vryonidou, A., Goulis, D. G., ve Siasos, G. (2019). The Emerging Role of Bone Markers in Diagnosis and Risk Stratification of Patients With Coronary Artery Disease. *Angiology*, 000331971882262. <https://doi.org/10.1177/0003319718822625>
- Landmesser, U., Hornig, B., ve Drexler, H. (2004). Endothelial Function: A Critical Determinant in Atherosclerosis? *Circulation*, 109(21_suppl_1), II-27-II-33. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000129501.88485.1f>
- Leon, B. M., ve Maddox, T. M. (2015). Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World Journal of Diabetes*, 6(13), 1246–1258. <https://doi.org/10.4239/wjd.v6.i13.1246>
- Loudon, B. L., Ntatsaki, E., Newsome, S., Halliday, B., Lota, A., Ali, A., ve ark. (2018). Osteoprotegerin and Myocardial Fibrosis in Patients with Aortic Stenosis. *Scientific Reports*, 8(1), 14550. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32738-y>
- Majeed, F. (2017). Low levels of Vitamin D an emerging risk for cardiovascular diseases: A review. *International Journal of Health Sciences*, 11(5), 71–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29114197>
- Mangan, S. H., Van Campenhout, A., Rush, C., ve Golledge, J. (2007). Osteoprotegerin upregulates endothelial cell adhesion molecule response to tumor necrosis factor- α associated with induction of angiopoietin-2. *Cardiovascular Research*, 76(3), 494–505. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.07.017>
- Mauro Vaccarezza, Roberta Bortul, Roberto Fadda, ve Marina Zweyer. (2007). Increased OPG Expression and Impaired OPG/TRAIL Ratio in the Aorta of Diabetic Rats. *Medicinal Chemistry*, 3(4), 387–391. <https://doi.org/10.2174/157340607781024456>
- McGonigle, J. S., Giachelli, C. M., ve Scatena, M. (2009). Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis*, 12(1), 35–46. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9127-z>

- Montagnana, M., Lippi, G., Danese, E., ve Guidi, G. C. (2013). The role of osteoprotegerin in cardiovascular disease. *Annals of Medicine*, 45(3), 254–264. <https://doi.org/10.3109/07853890.2012.727019>
- Morony, S., Tintut, Y., Zhang, Z., Cattley, R. C., Van, G., Dwyer, D., ve ark. (2008). Osteoprotegerin inhibits vascular calcification without affecting atherosclerosis in ldlr(-/-) mice. *Circulation*, 117(3), 411–420. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.707380>
- Nabipour, I., Kalantarhormozi, M., Larijani, B., Assadi, M., ve Sanjdideh, Z. (2010). Osteoprotegerin in relation to type 2 diabetes mellitus and the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(5), 742–747. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.09.019>
- Nahidi, L., Leach, S. T., Lemberg, D. A., ve Day, A. S. (2013). Osteoprotegerin Exerts Its Pro-inflammatory Effects Through Nuclear Factor- κ B Activation, 3144–3155. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2851-2>
- Nedeljkovic, B. B., Loncar, G., Vizin, T., Radojicic, Z., Brkic, V. P., ve Kos, J. (2019). Relationship of High Circulating Cystatin C to Biochemical Markers of Bone Turnover and Bone Mineral Density in Elderly Males with a Chronic Heart Failure. *Journal of Medical Biochemistry*, 38(1), 53–62. <https://doi.org/10.2478/jomb-2018-0011>
- O'Brien, C. A. (2010). Control of RANKL gene expression. *Bone*, 46(4), 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2009.08.050>
- Olesen, P., Ledet, T., ve Rasmussen, L. M. (2005). Arterial osteoprotegerin: increased amounts in diabetes and modifiable synthesis from vascular smooth muscle cells by insulin and TNF- α . *Diabetologia*, 48(3), 561–568. <https://doi.org/10.1007/s00125-004-1652-8>
- Oštrić, M., Kukuljan, M., Markić, D., Gršković, A., Ivančić, A., Bobinac, D., ve ark. (2019). Expression of bone-related proteins in vascular calcification and its serum correlations with coronary artery calcification score. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 33(1), 29–38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30734547>
- Pérez-Hernández, N., Aptilon-Duque, G., Nostroza-Hernández, M. C., Vargas-Alarcón,

- G., Rodríguez-Pérez, J. M., ve Blachman-Braun, R. (2016). Vitamin D and its effects on cardiovascular diseases: a comprehensive review. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(6), 1018–1029. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.224>
- Pérez De Ciriza, C., Lawrie, A., ve Varo, N. (2015). Osteoprotegerin in cardiometabolic disorders. *International Journal of Endocrinology*, 2015(iii). <https://doi.org/10.1155/2015/564934>
- Pérez de Ciriza, C., Moreno, M., Restituto, P., Bastarrika, G., Simón, I., Colina, I., ve Varo, N. (2014). Circulating osteoprotegerin is increased in the metabolic syndrome and associates with subclinical atherosclerosis and coronary arterial calcification. *Clinical Biochemistry*, 47(18), 272–278. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2014.09.004>
- Quercioli, A., Mach, F., Bertolotto, M., Lenglet, S., Vuilleumier, N., Galan, K., ve ark. (2012). Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) increases the release of neutrophil products associated with coronary vulnerability. *Thrombosis and Haemostasis*, 107(1), 124–139. <https://doi.org/10.1160/TH11-05-0324>
- Radenković, M., Stojanović, M., ve Prostran, M. (2016). Experimental diabetes induced by alloxan and streptozotocin: The current state of the art. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 78, 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2015.11.004>
- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., ve Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International Journal of Biological Sciences*, 9(10), 1057–1069. <https://doi.org/10.7150/ijbs.7502>
- Riegel, A., Maurer, T., Prior, B., Stegmaier, S., Heppert, V., Wagner, C., ve Hänsch, G. M. (2012). Human polymorphonuclear neutrophils express RANK and are activated by its ligand, RANKL. *European Journal of Immunology*, 42(4), 975–981. <https://doi.org/10.1002/eji.201141786>
- Rochette, L., Meloux, A., Rigal, E., Zeller, M., Cottin, Y., ve Vergely, C. (2019). The Role of Osteoprotegerin and Its Ligands in Vascular Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030705>
- Rozas Moreno, P., Reyes García, R., García-Martín, A., Varsavsky, M., García-Salcedo,

- J. A., ve Muñoz-Torres, M. (2013). Serum osteoprotegerin: Bone or cardiovascular marker in Type 2 diabetes males? *Journal of Endocrinological Investigation*, 36(1), 16–20. <https://doi.org/10.3275/8285>
- Salman, Z. K., Refaat, R., Selima, E., Sarha, A. El, ve Ismail, M. A. (2013). The combined effect of metformin and l-cysteine on inflammation, oxidative stress and insulin resistance in streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *European Journal of Pharmacology*, 714(1–3), 448–455. <https://doi.org/10.1016/J.EJPBAR.2013.07.002>
- Sami, W., Ansari, T., Butt, N. S., ve Hamid, M. R. A. (2017). Effect of diet on type 2 diabetes mellitus: A review. *International Journal of Health Sciences*, 11(2), 65–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28539866>
- Schoppet, M., Kavurma, M. M., Hofbauer, L. C., ve Shanahan, C. M. (2011). Crystallizing nanoparticles derived from vascular smooth muscle cells contain the calcification inhibitor osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407(1), 103–107. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.117>
- Secchiero, P., Corallini, F., Pandolfi, A., Consoli, A., Candido, R., Fabris, B., ve ark. (2006). An increased osteoprotegerin serum release characterizes the early onset of diabetes mellitus and may contribute to endothelial cell dysfunction. *American Journal of Pathology*, 169(6), 2236–2244. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060398>
- Shahbazi, S., Lenting, P. J., Fribourg, C., Terraube, V., Denis, C. V., Ve Christophe, O. D. (2007). Characterization of the interaction between von Willebrand factor and osteoprotegerin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(9), 1956–1962. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02681.x>
- Silva, I., ve Branco, J. C. (n.d.). Rank/Rankl/opg: literature review. *Acta Reumatologica Portuguesa*, 36(3), 209–218. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113597>
- Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., ve ark. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2), 309–319. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9108485>

- Sogomonian, R., Alkhawam, H., Jolly, J., Vyas, N., Ahmad, S., Moradoghli Haftevani, E., ve ark. (2016). Serum vitamin D levels correlate to coronary artery disease severity: a retrospective chart analysis. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, 14(8), 977–982. <https://doi.org/10.1080/14779072.2016.1190273>
- Tai, N., ve Inoue, D. (2019). Association between osteoporosis and atherosclerosis in dyslipidemia. *Clinical Calcium*, 29(2), 237–243. <https://doi.org/10.20837/4201902237>
- Takiishi, T., Gysemans, C., Bouillon, R., ve Mathieu, C. (2010). Vitamin D and Diabetes. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 39(2), 419–446. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2010.02.013>
- Tamagaki, K., Yuan, Q., Ohkawa, H., Imazeki, I., Moriguchi, Y., Imai, N., ve ark. (2006). Severe hyperparathyroidism with bone abnormalities and metastatic calcification in rats with adenine-induced uraemia. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 21(3), 651–659. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfi273>
- Tavintharan, S., Pek, L. T. S., Liu, J. J., Ng, X. W., Yeoh, L. Y., Su Chi, L., ve Chee Fang, S. (2014). Osteoprotegerin is independently associated with metabolic syndrome and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Disease Research*, 11(5), 359–362. <https://doi.org/10.1177/1479164114539712>
- Terekeci, H. M., Senol, M. G., Top, C., Sahan, B., Celik, S., Sayan, O., ve ark. (2009). Plasma osteoprotegerin concentrations in type 2 diabetic patients and its association with neuropathy. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 117(3), 119–123. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1085425>
- Theoleyre, S., Wittrant, Y., Tat, S. K., Fortun, Y., Redini, F., ve Heymann, D. (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 15(6), 457–475. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2004.06.004>
- Title, L. M., Lonn, E., Charbonneau, F., Fung, M., Mather, K. J., Verma, S., ve Anderson, T. J. (2008). Relationship between brachial artery flow-mediated dilatation, hyperemic shear stress, and the metabolic syndrome. *Vascular Medicine*, 13(4), 263–270. <https://doi.org/10.1177/1358863X08095154i>

- Toffoli, B., Fabris, B., Bartelloni, G., Bossi, F., ve Bernardi, S. (2016). Dyslipidemia and Diabetes Increase the OPG/TRAIL Ratio in the Cardiovascular System. *Mediators of Inflammation*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6529728>
- Tsioufis, C., Aggelis, A., Dimitriadis, K., Thomopoulos, C., Kasiakogias, A., Tzamour, V., ve ark. Stefanadis, C. (2011). Relationships of osteoprotegerin with albuminuria and asymmetric dimethylarginine in essential hypertension: integrating vascular dysfunction. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 15(12), 1347–1353. <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.642868>
- Tsuda, E., Goto, M., Mochizuki, S., Yano, K., Kobayashi, F., Morinaga, T., ve Higashio, K. (1997). Isolation of a Novel Cytokine from Human Fibroblasts That Specifically Inhibits Osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 234(1), 137–142. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.6603>
- Tziomalos, K., Athyros, V. G., Karagiannis, A., ve Mikhailidis, D. P. (2010). Endothelial dysfunction in metabolic syndrome: Prevalence, pathogenesis and management. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(2), 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.08.006>
- Valentijn, K. M., Sadler, J. E., Valentijn, J. A., Voorberg, J., ve Eikenboom, J. (2011). Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*, 117(19), 5033–5043. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-09-267492>
- Van Campenhout, A., ve Golledge, J. (2009). Osteoprotegerin, vascular calcification and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 204(2), 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2008.09.033>
- Venuraju, S. M., Yerramasu, A., Corder, R., ve Lahiri, A. (2010a). Osteoprotegerin as a Predictor of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Mortality and Morbidity. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(19), 2049 LP – 2061. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.013>
- Venuraju, S. M., Yerramasu, A., Corder, R., ve Lahiri, A. (2010b). Osteoprotegerin as a Predictor of Coronary Artery Disease and Cardiovascular Mortality and Morbidity. *Journal of the American College of Cardiology*, 55(19), 2049–2061. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.03.013>
- Voronkina, I. V., Irtyuga, O. B., Smagina, L. V., Adamova, P. E., Zhiduleva, E. V.,

- Malashicheva, A. B., ve ark. (2019). Expression of osteoprotegerin and soluble ligand of receptor of kappa-B transcription factor activator in the calcification of aortic valve. *Biomeditsinskaya Khimiya*, 65(1), 57–62. <https://doi.org/10.18097/pbmc20196501057>
- Wajda, J., Świat, M., Owczarek, A. J., Holecki, M., Duława, J., Brzozowska, A., ve ark. (2019). Osteoprotegerin Assessment Improves Prediction of Mortality in Stroke Patients. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. <https://doi.org/10.1016/J.JSTROKECEREBROVASDIS.2019.01.006>
- Wang, J., Zhou, J., Robertson, G., ve Lee, V. (2018). Vitamin D in Vascular Calcification: A Double-Edged Sword? *Nutrients*, 10(5), 652. <https://doi.org/10.3390/nu10050652>
- Wilson, R. D., ve Islam, M. S. (2012). Fructose-fed streptozotocin-injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacological Reports : PR*, 64(1), 129–139. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22580529>
- Yamaguchi, K., Kinoshita, M., Goto, M., Kobayashi, F., Tsuda, E., Morinaga, T., ve Higashio, K. (1998). Characterization of structural domains of human osteoclastogenesis inhibitory factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(9), 5117–5123. <https://doi.org/10.1074/JBC.273.9.5117>
- You, T., Nicklas, B. J., Ding, J., Penninx, B. W. J. H., Goodpaster, B. H., Bauer, D. C., ve ark. (2008). The Metabolic Syndrome Is Associated With Circulating Adipokines in Older Adults Across a Wide Range of Adiposity. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 63(4), 414–419. <https://doi.org/10.1093/gerona/63.4.414>
- Zannettino, A. C. W., Holding, C. A., Diamond, P., Atkins, G. J., Kostakis, P., Farrugia, A., ve ark. (2005). Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *Journal of Cellular Physiology*, 204(2), 714–723. <https://doi.org/10.1002/jcp.20354>
- Zauli, G., Corallini, F., Bossi, F., Fischetti, F., Durigutto, P., Celeghini, C., ve ark. (2007). Osteoprotegerin increases leukocyte adhesion to endothelial cells both in vitro and in vivo. *Hematology*, 110(2), 536–543. <https://doi.org/10.1182/blood->

2007-01-068395.The



HAM VERİLER



FORMLAR

ETİK KURUL KARARI



İSTANBUL MEHMET AKİF ERSOY
DENEYSEL ARAŞTIRMA GELİŞTİRME VE EĞİTİM MERKEZİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
KARAR METNİ

SAYI: 2018/10
KONU: Doç. Dr. Ayşe Evrim Bayrak Proje
Başvuru Kararı

30.05.2018

Sayın Doç Dr. Ayşe Evrim Bayrak;

“Diyete Bağlı Endotel Hasarı Oluşturulan Ratlarda RANKL/OPG Sinyal Yoluğu Aktiviteleri” başlıklı projeniz 30.05.2018 tarihinde yapılan Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul toplantısında değerlendirilmiş ve uygun bulunarak onanmıştır.

Hayvan Türü : Sıçan
Hayvan Sayısı : 40
Geçerlilik Süresi: 30.06.2018-30.06.2020

Prof. Dr. Abdurrahman EKSİK
Üye

Opr. Dr. Ersin KADİROĞULLARI
Üye

Uzm. Dr. İlknur ERKÖSEOĞLU
Üye

Uzm. Vet. Hek. Öznur İNAN
Üye

Gülşen TEMİZ
Üye

Yalçın Kaya KOBER
Üye

Doç. Dr. Burak QNAN
Etik Kurul Başkanı

Adres : İstasyon Mah. Turgut Özal Bulv. No:13/1
Kuşlukçekece /İstanbul
Telefon : 0212 472 80 00
e-posta : ideahadyek@gmail.com



PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

DİYETE BAĞLI ENDOTEL HASARI OLUŞTURULAN RATLARDA RANKL/OPG SİNYAL YOLAĞI AKTİVİTELERİ

ORIJİNALLIK RAPORU

%5	%3	%2	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Chester College of Higher Education Öğrenci Ödevi	<%1
4	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.yogunbakimderg.com İnternet Kaynağı	<%1
6	UZUN, Ahmet and PULUR, Atilla. "Genç basketbolcularda (14-15 yaş) serbest atış antrenmanlarının atış isabet oranı gelişimine etkisinin araştırılması", TUBITAK, 2011. Yayın	<%1
7	cardioweb.ru İnternet Kaynağı	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Soyadı	Çelebi
Doğ.Yeri	Giresun	Doğ.Tar.	27.08.1993
Email	gizem.celebi@yahoo.com.tr	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Teknik Üniversitesi	2017
Lise	Giresun Hamdi Bozbağ Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstinye Üniversitesi	2018-halen
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi		86,25

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	79,67613	83,71576	87,65638
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MC Office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özsait-Selçuk, B., Kömürcü-Bayrak, E., Kalkan, M.A., Çelebi, G., Erginel-Ünaltuna, N. (2017) Kalbe Özgü “Subtractive” Hibridizasyon CDNA Kütüphanesinden Elde Edilen MFN2, MT-ATP6, MIDN VE KPNB1 Genlerinin Yetişkin, Neonatal Ve Embriyonik Dokulardaki Ekspresyon Analizi, Deneysel Tıp Dergisi, 14;7,21-33.

“Myokard İnfarktüsü ile MiR-142-5p ifade düzeyinin ilişkisi” 13. Uluslararası Katılımlı Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 2018 (sözlü sunum) 7-11.11.2018 / Rixos Premium Belek Antalya

“The effect of the expression level of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 on the development of atherosclerosis in patients with myocardial infarction.” European Society of Human Genetics (ESHG) - The European Human Genetics Conference 2018 (Poster Presentation) 16-19.06.2018/ MiCo – Milano/Italy

“The effect of berberine on expression levels of selected genes involved in AMP activated protein kinase pathway” XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi 2017 (sözlü sunum) 26–29.10.2017 / Liberty Hotels Lykia World Resort Fethiye-Ölüdeniz

“The Transthyretin HIS110ASN Variant Cause the Early-Onset Severe Biventricular Hypertrophy Or Not?” Uluslararası Moleküler Biyoloji Kongresi 2017 (Poster Presentation) Bogazici University /İstanbul

Özel İlgi Alanları (Hobileri):