

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRESİNDE
KALSİTRİOL VE PARİKALSİTOLÜN OKSİDATİF
DNA HASARI VE ONARIMI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

MERVE AKIŞ

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970016

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN UMBİLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRESİNDE
KALSİTRİOL VE PARİKALSİTOLÜN OKSİDATİF
DNA HASARI VE ONARIMI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

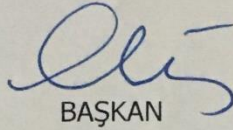
MERVE AKIŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2014.KB.SAG.041 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2012970016

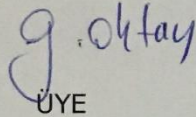
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tıbbi biyokimya Doktora programı öğrencisi Merve Akış '**İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücresinde Kalsitriol ve Parikalsitolün Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi**' konulu Doktora tezini 31.07.2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

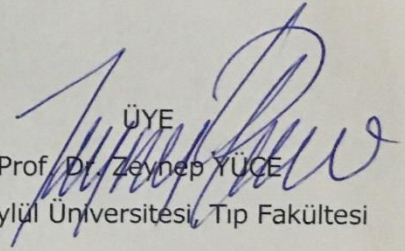
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi



ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

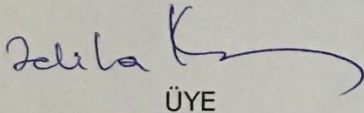
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi



ÜYE

Prof. Dr. Zeynep YÜCE

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi



ÜYE

Prof. Dr. Zeliha KERRY

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi



ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu

YEDEK ÜYE

Prof. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR

Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi

YEDEK ÜYE

Doç. Dr. Gönen ÖZŞARLAK SÖZER

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL DİZİNİ	iv
TABLO DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xii
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	8
2.1. D Vitamini	8
2.1.1. D Vitamini Tanımı ve Tarihçesi	8
2.1.2. D Vitamini Sentezi ve Metabolizması	8
2.1.3. Kalsitriolün Etki Mekanizması	10
2.1.3.1. D Vitamini Reseptörü (VDR)	10
2.1.4. Kalsitriolün Klasik (Kalsemik) Etkileri	13
2.1.5. Kalsitriolün Klasik Olmayan (Non-kalsemik) Etkileri	16
2.1.6. D Vitamini Analogları	20
2.1.6.1. VDR Agonisti: Parikalsitol	22
2.1.6.2. VDR Antagonisti: ZK159222	23
2.1.7. D Vitamini Eksikliği	24
2.2. Oksidatif DNA Hasarı ve DNA Onarımı	25
2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri	25
2.2.2. Oksidatif DNA Hasarı	30
2.2.2.1. DNA Nükleozid Hasarları	31
2.2.2.1.1. 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG)	32
2.2.2.1.2. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (<i>R</i> -cdA ve <i>S</i> -cdA)	34
2.2.2.1.3. DNA Nükleozid Hasarının Ölçüm Yöntemleri	36

2.2.3. DNA Onarımı	37
2.2.3.1. Baz Kesip Çıkarma Onarımı (BER)	37
2.2.3.2. Apürinik/apirimidinik Endonükleaz 1 (APE1)	40
2.3. İnsan Endotel Hücresi	42
2.4. D Vitamininin Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımındaki Rolü	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	46
3.1. Araştırmanın Tipi	46
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	46
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	46
3.4. Çalışma Materyali	46
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	46
3.6. Veri Toplama Araçları	47
3.6.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	47
3.6.2. Hücre Ortamlarının Hazırlanması	50
3.6.3. Hücrelerin Çözülmesi, Sayımı, Pasajlanması ve Dondurulması	50
3.6.3.1. Hücrelerin Çözülmesi	50
3.6.3.2. Hücrelerin Sayımı ve Tripan Mavisini ile Hücre Canlılığının Kontrolü	50
3.6.3.3. Hücrelerin Pasajlanması	51
3.6.3.4. Hücrelerin Dondurulması	51
3.6.4. Reaktiflerin Hazırlanması	52
3.6.4.1. Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)'in Hazırlanması	52
3.6.4.2. DCFH-DA Reaktifinin Hazırlanması	52
3.6.4.3. Kalsitriolün Hazırlanması	52
3.6.4.4. Parikalsitolün Hazırlanması	52
3.6.4.5. VDR Antagonisti ZK159222'nin Hazırlanması	53
3.6.5. Deneysel Çalışmalar	53
3.6.5.1. Hücre Canlılık Analizi	54
3.6.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümü	55
3.6.5.3. Hasarlı DNA Nükleozidlerinin Ölçümü	57
3.6.5.3.1. Hücrelerin Hazırlanması	59
3.6.5.3.2. Genomik DNA İzolasyonu	60

3.6.5.3.3. Genomik DNA Miktarının Ölçümü	60
3.6.5.3.4. Üç Enzim Hidrolizi	61
3.6.5.3.5. Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre Koşulları	61
3.6.5.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Analizi	62
3.6.5.4.1. Total RNA İzolasyonu	63
3.6.5.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	64
3.6.5.4.3. Real-time qPCR	65
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	67
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	67
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	68
3.10. Etik Kurul Onayı	68
4. BULGULAR	69
4.1. Ön Çalışmalar İle İlgili Bulgular	69
4.1.1. WST-1 Testi için Hücre Sayısı ve Reaktif İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi	69
4.1.2. Hidrojen Peroksit Uygulama Süresinin Belirlenmesi	70
4.1.3. Hidrojen Peroksit IC ₅₀ Dozunun Belirlenmesi	71
4.2. Ana Çalışmalar İle İlgili Bulgular	73
4.2.1. Kalsitriol ve Parikalsitolün Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu Üzerine Etkisi	73
4.2.2. Kalsitriol ve Parikalsitolün Hasarlı DNA Nükleozidleri Üzerine Etkisi	78
4.2.3. Kalsitriol ve Parikalsitolün VDR ve APE1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi	86
5. TARTIŞMA	91
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	98
7. KAYNAKLAR	100
8. EKLER	118

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Vitamin D ₃ 'ün deride sentezi	8
Şekil 2. D vitamini metabolizması	9
Şekil 3. VDR a) gen lokalizasyonu ve b) protein yapısı	11
Şekil 4. Kalsitriolün gen regülasyonu mekanizması	12
Şekil 5. Kalsitriol ve paratiroid hormonun kan kalsiyum düzeylerine etkisi	14
Şekil 6. Kalsitriol ve endokrin sistemin kan kalsiyum düzeylerine etkisi	14
Şekil 7. Kalsitriolün periferel dokulardaki ana hedefleri ve etkileri	16
Şekil 8. Kalsitriol yapısındaki modifikasyonlar	20
Şekil 9. VDR antagonistlerinin yapısı	23
Şekil 10. Moleküler oksijenin temel hali, singlet oksijen ve bazı reaktif oksijen türleri için moleküler orbital diyagramı	26
Şekil 11. Elektron transfer reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu	27
Şekil 12. Haber-Weiss reaksiyonu	28
Şekil 13. Fenton reaksiyonu	28
Şekil 14. DNA yapısında meydana gelen oksidatif hasar tipleri	30
Şekil 15. Hidroksil radikalının DNA'da atak yaptığı bölgeler	31
Şekil 16. 8-OH-Gua oluşum mekanizması	33
Şekil 17. 8-OH-Gua'nin a) onarımı ve replikasyona etkisi, b) yanlış eşleme sonrası G→T transversiyonu	33
Şekil 18. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinlerin oluşum mekanizması	35
Şekil 19. Baz kesip çıkarma onarım mekanizması	39
Şekil 20. İnsan APE1 proteininin yapısı	40
Şekil 21. APE1'in ekspresyonunu etkileyen durumlar ve biyolojik etkileri	41
Şekil 22. Endotel hücresinde oksidatif stres kaynakları	43
Şekil 23. HUVE hücrelerinin ters faz ışık mikroskobu altındaki görüntüsü a) Pasaj sonrası 1.gün hücre görüntüsü b) Pasaja hazır 3.gün hücre görüntüsü	51

Şekil 24. Deneysel çalışmalara ve oluşturulan deney gruplarına ait akış şeması	54
Şekil 25. DCFH-DA ile ROT ölçümü prensibi	56
Şekil 26. LC-ESI-MS/MS sisteminin şematik gösterimi	58
Şekil 27. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi	59
Şekil 28. Real-time qPCR yönteminin akış şeması	62
Şekil 29. HUVE hücrelerinin lizis öncesi ve sonrası görüntüleri	63
Şekil 30. Araştırma akış şeması	67
Şekil 31. WST-1 testi için hücre sayısı ve reaktif inkübasyon süresinin belirlenmesi	69
Şekil 32. Üç saatlik H ₂ O ₂ uygulamasının a) % hücre canlılığına ve b) % ROT düzeyine etkisi	70
Şekil 33. Yarım saatlik H ₂ O ₂ uygulamasının a) % hücre canlılığına ve b) ROT düzeyine etkisi	71
Şekil 34. H ₂ O ₂ 'in IC ₅₀ dozunun belirlenmesi a) logaritmik dönüşüm grafiği b) GraphPad Prism programı ile elde edilen IC ₅₀ değeri	72
Şekil 35. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin ROT oluşumu üzerine etkisi	74
Şekil 36. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin ROT oluşumu üzerine etkisi	76
Şekil 37. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin 8-OH-dG düzeylerine etkisi	79
Şekil 38. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin R-cdA düzeylerine etkisi	80
Şekil 39. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin S-cdA düzeylerine etkisi	81
Şekil 40. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin 8-OH-dG düzeylerine etkisi	83
Şekil 41. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin R-cdA düzeylerine etkisi	84
Şekil 42. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin S-cdA düzeylerine etkisi	85

Şekil 43. VDR, APE1 ve beta aktin'e ait örnek bir amplifikasyon eğrisi	86
Şekil 44. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin a) VDR ve b) APE1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	87
Şekil 45. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin a) VDR ve b) APE1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi	89



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Bazı D vitamini analogları ve yapıları	21
Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin endojen ve ekzojen kaynakları	25
Tablo 3. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri	27
Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler	47
Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar	49
Tablo 6. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümüne ait sıvı kromatografi parametreleri	61
Tablo 7. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümüne ait tandem kütle spektrometre parametreleri	62
Tablo 8. Hücreden total RNA eldesi için hazırlanan hücre lizis karışımının içeriği	63
Tablo 9. cDNA sentezi için hazırlanan karışımının içeriği	64
Tablo 10. qPCR reaksiyonu için hazırlanan karışımının içeriği	66
Tablo 11. H ₂ O ₂ 'in IC ₅₀ dozunu belirlenmek için kullanılan dozların logaritmik dönüşümü ve % hücre canlılık değerleri	71
Tablo 12. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen ROT düzeyleri ve p değerleri	75
Tablo 13. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen ROT düzeyleri ve p değerleri	77
Tablo 14. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen 8-OH-dG düzeyleri ve p değerleri	79
Tablo 15. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen R-cdA düzeyleri ve p değerleri	80
Tablo 16. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen S-cdA düzeyleri ve p değerleri	81

Tablo 17. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen 8-OH-dG düzeyleri ve p değerleri	83
Tablo 18. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen R-cdA düzeyleri ve p değerleri	84
Tablo 19. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen S-cdA düzeyleri ve p değerleri	85
Tablo 20. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen VDR mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri	88
Tablo 21. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen APE1 mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri	88
Tablo 22. Farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen VDR mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri	90
Tablo 23. Farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen APE1 mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri	90

KISALTMALAR

25(OH)D: 25-hidroksivitamin D

1,25-dihidroksivitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃): Kalsitriol

19-nor-1,25-dihidroksivitamin D₂ (19-nor-1,25(OH)D₂): Parikalsitol

VDR: D vitamini reseptörü

8-OH-dG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin

S-cdA: (5'S)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin

R-cdA: (5'R)-8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin

cdA: 8,5'-siklopürin-2'-deoksiadenozinler

BER: Baz kesip çıkarma onarımı

APE1: Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1

SID-MRM-MS/MS: Stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme-tandem kütle spektrometresi

HUVEC: İnsan umbilikal ven endotel hücresi

DBP: D vitamini bağlayıcı protein

25-hidroksivitamin D₃ (25(OH)D₃): Kalsidiol

CYP2R1: Mikrozomal 25-hidroksilaz

CYP27A1: Mitokondriyal 25-hidroksilaz

CYP27B1: Mitokondriyal 25-hidroksivitamin D-1α-hidroksilaz

CYP24A1: 24-hidroksilaz

RANKL: Reseptör aktivatör nükleer faktör-κB ligand

PTH: Paratiroid hormonu

FGF23: Fibroblast büyüme faktörü 23

RXR: Retinoid X reseptörü

DBD: DNA bağlayan bölge

LBD: Ligand bağlayan bölge

VDRE: D vitamini yanıt elementi

MAPK: Mitojen-aktif edilmiş protein kinaz

cAMP: Siklik adenin monofosfat

cGMP: Siklik guanin monofosfat

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ZK159222: VDR antagonisti
Th-1 ve -2: T yardımcı hücre-1 ve -2
TNF α : Tümör nekroz faktör alfa
UV: Ultraviyole ışını
ROT: Reaktif oksijen türleri
 $^1\text{O}_2$: Singlet oksijen
 $\text{O}_2^{\cdot-}$: Süperoksit anyon radikali
 H_2O_2 : Hidrojen peroksit
 $\text{OH}^{\cdot}$: Hidroksil radikali
NO: Nitrik oksit
8-OH-Gua: 8-hidroksiguanin
NER: Nükleotid kesip çıkarma onarım
AP: Abazik, apürinik/apirimidinik
FEN1: Flap endonükleaz 1
XRCC1: X-ray onarım çapraz bağlayıcı 1
Ref-1: Redoks efektör faktör 1
ESCODD: Avrupa oksidatif DNA hasarı standartlar komitesi
ELISA: Enzim-bağlı immünsorbent testi
Comet: Tek hücre jel elektroforezi
FBS: Fetal dana serumu
PBS: Fosfat tampon tuzu
DMSO: Dimetil sülfoksit
IC₅₀: Hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden doz
DCFH-DA: 2',7'-diklorofluorescein diasetat
WST-1: (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum]-1,3-benzen disülfonat)
DCFH: 2',7'-diklorofluorescein
DCF: 2',7'-diklorofluorescein
LC-MS/MS: Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre
RT: Alıkonma zamanı (retention time)
m/z: Kütle/yük
ESI: Elektrosprey iyonizasyon

Tandem MS: Sıralı kütle spektrometresi

QQQ: Triple quadrupole kütle analizörü

IS: İnternal standart

MRM: Çoklu reaksiyon izleme

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

qPCR: Kantitatif real-time PCR (Real-time qPCR)

cDNA: Komplementer DNA

UPL: Evrensel prob kütüphanesi

Cq: Kantitatif döngü



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, karşılaştığım sorunlara sabırlı ve hoşgörülü yaklaşımıyla beni daima cesaretlendiren, bu zorlu süreçte desteğini ve sevgisini her daim hissettiğim değerli danışmanım **Prof. Dr. Gül Hüray İşlekel'e**,

Tez çalışmalarım sırasındaki bilimsel katkıları yanı sıra her zaman güler yüzlü ve destekleyici yaklaşımlarından dolayı doktora tez izleme komitesindeki değerli hocalarım **Prof. Dr. Gülgün Oktay ve Doç. Dr. Zeynep Yüce'ye**,

Biyokimya Anabilim Dalı'nda almış olduğum doktora eğitimimde emeği geçen ve desteğini esirgemeyen başta bu süreçteki Anabilim Dalı Başkanlarımız **Prof. Dr. Sezer Uysal ve Prof. Dr. Canan Çoker** olmak üzere değerli Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Bilimsel birikimini ve her türlü desteğini esirgemeyen, yurtdışı araştırmalarımız için laboratuvarının kapılarını bizlere her daim açan değerli hocam **Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu'na**,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımını ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım **Dr. Melis Kant ve Dr. Öğretim Üyesi Gamze Tuna'ya**,

Deneyisel çalışmalarım sırasında laboratuvar imkanlarını sağlayan **ARLAB ve İBG çalışanlarına**,

Doktora eğitimim süresince her zaman güler yüzleri ile bizlere yardım eden başta değerli **Sağlık Bilimleri Enstitüsü Öğrenci İşleri çalışanları olmak üzere tüm çalışanlara**,

Doktora eğitimim süresince her türlü yardımlarını benden esirgemeyen çok sevgili Anabilim Dalı sekreterimiz **Eda Nesrin Olum'a**, güler yüzü ve pozitif enerjisiyle her konuda bana destek olan sevgili ablam **Fadime Engin'e** ve laboratuvar çalışmalarımda her türlü sorunla ilgilenen, bilgi ve deneyimlerine her zaman ihtiyaç duyduğum değerli abim **Emin Çavuşlu ve tüm AD. çalışanlarına**,

Tez çalışmalarımda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşlarım başta **Dr. Ebru Taylan, Güneş Eroğlu, Öykü Geyik** olmak üzere tüm arkadaşlarıma,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu süreçte de göstermiş oldukları destekleri ve varlıkları için çok sevgili dostlarım **Sare Karataş, Meltem Gültekin, Türkan Yavuz, Duygu Gürsoylu, Esra Yılmaz, Gül Hızal, Tuğba Şahin, Selin Şenel'e**,

Tüm hayatım boyunca sonsuz desteği ile yanımda olan ve bugünlere gelmemde gösterdikleri sabır ve fedakârlıkla beni bu yolda yalnız bırakmayan canım annem **Emine Akış** ve babam **Osman Akış başta olmak üzere çok değerli aileme** ve biricik yeğenlerim **Yusuf Talha ve İbrahim Ethem'e** teşekkürlerimi sunarım.

Merve AKIŞ

İNSAN UMBLİKAL VEN ENDOTEL HÜCRESİNDE KALSİTRİOL VE PARİKALSİTOLÜN OKSİDATİF DNA HASARI VE ONARIMI ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Merve AKIŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı,
35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Giriş ve amaç: Memeli hücrelerinde, çeşitli endojen ve ekzojen ajanlar ile ortaya çıkan oksidatif stres diğer hücresel makromoleküller yanı sıra DNA yapısında da hasara yol açabilir. Oluşan DNA hasarı onarılmadığı takdirde, çeşitli mutasyonlara ve genomik kararsızlığa neden olur. Oksidatif stres ile ilişkili kronik hastalıkların gelişiminde D vitamini eksikliğinin önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Aktif D vitamini kalsitriolün, bilinen klasik etkilerinin yanı sıra, son zamanlarda antioksidan, hücre büyümesi ve farklılaşması gibi klasik olmayan etkileri bildirilmiştir. Ancak, kalsitriolün supra-fizyolojik dozlarda gösterdiği hiperkalsemik etki nedeniyle klasik endikasyonu dışında klinik kullanımı sınırlıdır. Sentetik bir D vitamini analogu olan parikalsitol, kalsitriole benzer fizyolojik özelliklere sahip olup, daha az hiperkalsemik etki göstermektedir. Kalsitriol ve parikalsitol, hücre içindeki etkilerinin çoğunu D vitamini reseptörü (VDR) aracılığıyla gerçekleştirir. D vitamini ve oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişki, D vitamini eksikliğinin yüksek prevalansı ve genomik kararsızlığın hayati önemi nedeniyle oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı, insan umbilikal ven endotel hücrelerinde oluşturulan hidrojen peroksit (H_2O_2) aracılı oksidatif stres modelinde farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün reaktif oksijen türleri ve hasarlı DNA nükleozidlerinin oluşumu ve DNA onarım enzimi APE1 ekspresyonu üzerine olası etkilerinin incelenmesi; bu olası etkilerde VDR'nin rolünün araştırılmasıdır.

Yöntemler: HUVE hücreleri, 24 saat fizyolojik (0.1 nM) ve supra-fizyolojik (10 nM ve 100 nM) dozlardaki kalsitriol ve parikalsitol ile muamele edildikten sonra yarım saat 300 μM H_2O_2 'e maruz bırakıldı. VDR'nin rolünü değerlendirmek amacıyla, deneyler 100 nM ZK159222 antagonisti varlığında tekrarlandı. ROT oluşumu diklorofluorescein

diasetat (DCFH-DA) probu kullanılarak fluorimetrik olarak değerlendirildi. Hasarlı DNA nükleozidlerinin (8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA) düzeyleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre ile ölçüldü. DNA onarım enzimi APE1 ve VDR'nin mRNA ekspresyonları real-time qPCR yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Fluorimetrik ROT ölçüm sonuçlarına göre, kalsitriol ve parikalsitolün çalışılan tüm dozlarında ROT düzeylerini anlamlı olarak azalttığı belirlendi ($p<0.01$). Tandem kütle spektrometrik yöntem ile hasarlı DNA nükleozid düzeylerinin ölçümünde, hem kalsitriol hem de parikalsitol uygulaması ile *R*-cdA, *S*-cdA ve 8-OH-dG düzeylerinin anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi; bu etki özellikle supra-fizyolojik dozlarda daha belirgindi ($p<0.05$). Parikalsitol, ROT oluşumunda ve hasarlı nükleozid *S*-cdA düzeyinin azalmasında doza bağlı bir etki gösterdi. Kalsitriol ve parikalsitolün bu yararlı etkileri ZK159222 antagonisti varlığında ortadan kalktı ($p<0.05$). mRNA ekspresyon çalışmaları sonucunda, kalsitriol ve parikalsitolün APE1 mRNA ekspresyonu üzerine etkisi bulunamazken, kalsitriolün fizyolojik dozunun sadece H₂O₂ uygulanan gruba göre VDR mRNA ekspresyonunu arttırdığı belirlendi ($p<0.01$), ancak diğer dozlarda bu etki görülmedi.

Sonuç: Tez çalışmasının tüm bulguları değerlendirildiğinde, sonuç olarak; farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün, insan umbilikal ven endotel hücrelerini H₂O₂ aracılı oksidatif stresten koruyabileceği, parikalsitolün oksidatif hasara karşı kalsitriolden daha etkili olduğu, kalsitriol ve parikalsitolün bu yararlı etkilerinin VDR aracılığı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Bulgularımızın oksidatif DNA hasarı - D vitamini ilişkisini araştıran gelecek çalışmalara ışık tutacağı ve oksidatif stres ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde ve tedavisinde uygulanacak terapötik yaklaşımlar için temel oluşturacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: D vitamini, Kalsitriol, Parikalsitol, D vitamini reseptörü, Oksidatif DNA hasarı, DNA onarımı, HUVEC

INVESTIGATION OF CALCITRIOL AND PARICALCITOL EFFECTS ON OXIDATIVE DNA DAMAGE AND REPAIR IN HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIAL CELLS

Merve AKIŞ

Dokuz Eylul University, Institute of Health Sciences, Department of Biochemistry,
35340, Inciralti, Izmir

ABSTRACT

Introduction and aim: Increasing levels of oxidative stress caused by endogenous and exogenous agents may lead to DNA damage, besides other macromolecules in the living cells. In case of unrepaired DNA damage, a variety of mutations and genomic instability might occur. Vitamin D deficiency is thought to play a role in the development of chronic diseases associated with oxidative damage. Active vitamin D calcitriol, besides its known classic effects, is reported recently to have non-classical effects such as antioxidant, regulation of cell growth and differentiation, etc. However, calcitriol has hypercalcemic effects at supra-physiological doses. Paricalcitol, a synthetic vitamin D analog, has physiological properties similar to calcitriol, but shows less hypercalcemic effects. Calcitriol and paricalcitol exerts most of their actions via binding to vitamin D receptor (VDR). The relation between vitamin D and oxidative DNA damage is noteworthy due to the high prevalence of vitamin deficiency and importance of genomic instability. The aim of this study is: to investigate the dose-dependent effects of calcitriol and paricalcitol on the formation of ROS, levels of oxidatively induced DNA damage and expressions of DNA repair enzyme APE1 and VDR in a model of hydrogen peroxide (H₂O₂)-generated oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods: HUVECs were pretreated for 24 h with physiologic (0.1 nM) and supra-physiologic (10 nM and 100 nM) doses of calcitriol and paricalcitol, before exposure to H₂O₂ (300 µM) for half an hour. Also, to evaluate the role of VDR, experiments were repeated in the presence of 100 nM ZK159222 antagonist. The generation of ROS was

assessed fluorometrically using the probe dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA). Damaged DNA nucleosides (8-OH-dG, *R*-cdA and *S*-cdA) were measurement using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. mRNA expressions of DNA repair enzymes APE1 and VDR were measured by real-time qPCR.

Results: Regarding fluorometric ROS measurement data, we have found that, all doses of calcitriol and paricalcitol significantly reduced ROS formation ($p<0.01$). Tandem mass spectrometric assay results revealed that, both calcitriol and paricalcitol pretreatments attenuated damaged DNA nucleosides (8-OH-dG, *R*-cdA and *S*-cdA) in HUVECs, compared to only H_2O_2 treatment group, especially in supra-physiological doses ($p<0.05$). Effects of paricalcitol on ROS formation and reduction of damaged nucleoside (*S*-cdA) levels, were dose-dependent. These useful effects of calcitriol and paricalcitol were inhibited in the presence of ZK159222 ($p<0.05$). For all doses of calcitriol and paricalcitol no effect on APE1 expression was observed. Physiological dose of calcitriol increased mRNA expression of VDR compared to only H_2O_2 treatment group ($p<0.01$), but not other doses.

Conclusions: This study demonstrated that, calcitriol and paricalcitol protect from H_2O_2 generated oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells, being paricalcitol more effective. These protective effects of calcitriol and paricalcitol in preventing oxidative DNA damage have been shown to be mediated by VDR. We think that our findings will enlighten further studies investigating oxidative DNA damage-vitamin D relationship and will also create a basis for the therapeutic approaches in the prevention and treatment of oxidative stress related diseases.

Key words: Vitamin D, Calcitriol, Paricalcitol, Vitamin D receptor, Oxidative DNA damage, DNA repair, HUVEC

1. GİRİŞ VE AMAÇ

D vitamini, kemik metabolizması ve kalsiyum homeostazındaki bilinen klasik etkileri yanı sıra, son yıllarda apoptoz, inflamasyon, immün yanıt, hücre çoğalması ve farklılaşmasının düzenlenmesi gibi klasik olmayan etkileri ile ön plana çıkmaktadır. D vitamini aktif formu kalsitriolün böbrekteki sentezi yanı sıra, vasküler endotel hücrelerinin de yer aldığı çok sayıda böbrek-dışı dokuda sentezlenebildiği gösterilmiştir (1). Kalsitriolün hiperkalsemik etkilerinden dolayı klinikte terapötik ajan olarak kullanımı sınırlıdır; bu nedenle düşük kalsemik etkili analogları terapötik amaçlı kullanılmaktadır (2,3). Başlıca sentetik analoglardan olan parikalsitol, kalsitriol ile benzer fizyolojik özellikte olmakla birlikte, daha az kalsemik ve fosfatemik etki göstermektedir (4). Kalsitriol ve parikalsitol biyolojik etkilerinin önemli bir kısmını nükleer D vitamini reseptörü (VDR) aracılı transkripsiyonel bir mekanizma ile gerçekleştirmektedir. VDR'nin neredeyse tüm dokularda bulunması ve genom üzerinde DNA onarım genlerinin de dahil olduğu yüzlerce genin kontrolünü sağlayan VDR bağlanma bölgelerinin keşfedilmesi ile, son yıllarda D vitaminine ve onun biyolojik süreçler üzerindeki etkisine olan ilgi büyük bir hızla artmaktadır (5).

Dünyada yaklaşık her iki insandan birinde D vitamini eksikliği (serum 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] < 50 nmol/L) olduğu bildirilmiştir. Diğer yandan, D vitamini eksikliğin, oksidatif stres ile ilişkili kardiyovasküler hastalıklar, diyabet gibi kronik hastalıkların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. D vitamini eksikliğin yüksek prevalansı ve oksidatif stresin yol açtığı genomik kararsızlığın ölümcül hastalıklarla olan ilişkisi nedeniyle, D vitamini ve oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişki son yıllarda dikkat çeken bir konu haline gelmiştir (6,7). D vitamininin antioksidan rolünün henüz tam olarak gösterilememesi ile birlikte, nükleer reseptörü VDR aracılığı ile DNA yapısındaki hasarın onarımını düzenleyerek, oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisi olabileceği düşünülmektedir (8–10). Çalışmamızda, kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarı ve onarımı üzerindeki olası etkilerinde VDR'nin fonksiyonunu incelemek amacıyla VDR antagonisti kullanıldı. Buna ek olarak, VDR mRNA ekspresyonları değerlendirildi.

Aerobik organizmalarda normal hücrel metabolik olaylar sırasında veya ekzojen kaynaklar aracılığıyla sürekli oluşan reaktif oksijen türleri, hücrel

makromolekülleri hedef almaktadır. DNA yapısında oluşan oksidatif hasar yaşlanma, diyabet, kanser ve diğer birçok hastalık mekanizması ile yakından ilişkili olması nedeniyle özellikle ön plana çıkmaktadır. Başlıca oksidatif DNA hasar ürünleri okside nükleozidler, baz ve şeker modifikasyonlarıdır. Özellikle adenin ve guanin bazlarında oluşan hasarlar en mutajenik olan ve literatürde en sık karşılaşılanlardır. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), güçlü mutajenik etkisi nedeniyle nükleer ve mitokondriyal DNA'da en sık çalışılan ve tespit edilen okside nükleozid hasar ürünü olup, duyarlı bir *in vivo* oksidatif stres biyobelirtecidir. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (*R*-cdA ve *S*-cdA) ise, fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde bulunması, kimyasal kararlılığı ve baz-şeker kalıntılarının birlikte hasar gördüğü tek ürün olma özelliği ile birçok hastalık için potansiyel bir biyobelirteç olarak son yıllarda özellikle üzerinde durulan önemli hasar ürünleridir (11–13). Çalışmamızda kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarına etkisini hasarlı DNA nükleozidleri 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA düzeyleri ile belirledik.

Memeli hücrelerinde oksidatif DNA hasar ürünlerini hızla tespit edip onaran farklı mekanizmalar bulunmaktadır. DNA yapısında oluşan hasarlar onarım mekanizmaları ile onarılmadığında, artan hasarlı DNA ürünleri mutasyonlara ve genomik kararsızlığa yol açar. Bu nedenle hasarın, onarım mekanizmaları ile birlikte değerlendirilmesi objektif sonuçlar elde edilmesi açısından son derece önemlidir (12). Apürinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1), oksidatif DNA hasarının birçok formunun onarımında birincil mekanizma olan baz kesip çıkarma onarımının (BER) anahtar enzimidir (14). Biz de araştırmamızda, hasarlı DNA nükleozidlerinin onarımda rol oynayan temel DNA onarım enzimi APE1'in mRNA ekspresyonlarını değerlendirdik.

Stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme-tandem kütle spektrometresi (SID-MRM-MS/MS) son yıllarda, çeşitli biyolojik örneklerde düşük konsantrasyondaki DNA hasar ürünlerinin belirlenmesinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle giderek konvansiyonel yöntemlerin yerini almaktadır. Stabil izotop işaretli internal standartların kullanıldığı bu yöntemle aynı anda birden çok oksidatif DNA hasar ürününün mutlak kantitasyonu yapılabilmektedir (11,15).

Birçok fizyolojik fonksiyonda yer alan ve insan vücudunda yaygın olarak bulunan vasküler endotel hücresi oksidatif stresin ana hedeflerindendir. Akut ve kronik oksidatif stres, endotelin disfonksiyonunda ciddi nedensel bir etkidir. Yaşlanma, ateroskleroz,

diyabet, hipertansiyon gibi birçok patolojik süreçte endotel disfonksiyonun varlığı gösterilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, D vitamini takviyesinin vasküler endotel hücrelerindeki oksidatif hasara karşı koruyucu bir etkiye sahip olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, kardiyovasküler hastalıkların oluşma riskini azaltmada D vitaminin bu etkisi umut verici bir strateji haline gelmiştir (8,9,16,17). Çalışmamızda oksidatif stres ortamındaki makrovasküler endotel fonksiyonunun araştırılması için klasik bir model olan insan umbilikal ven endotel hücrelerini (HUVEC) kullanmayı tercih ettik.

Bu bilgiler ışığında tez çalışmasının amacı; HUVE hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres modelinde, farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün reaktif oksijen türleri ve hasarlı DNA nükleozidlerinin oluşumu ve DNA onarım enzimi APE1 ekspresyonu üzerine olası etkilerinin incelenmesi; bu olası etkilerde VDR'nin rolünün araştırılmasıdır.

Çalışmanın hipotezleri; insan umbilikal ven endotel hücrelerinde kalsitriol ve parikalsitol reaktif oksijen türlerinin ve hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeylerini azaltarak, DNA onarım enzimi APE1'in ekspresyonunu artırarak oksidatif strese karşı koruyucu rol oynamaktadır. Tüm bu etkileri VDR aracılığı ile gerçekleştirmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

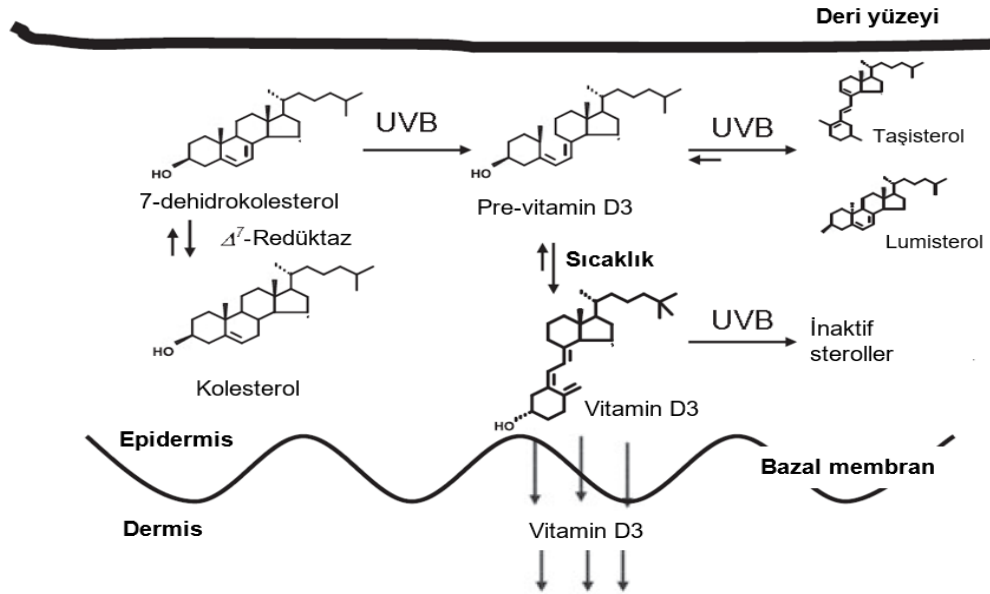
2.1. D Vitamini

2.1.1. D Vitamini Tanımı ve Tarihçesi

D vitamini güneş ışınları etkisi ile deride sentez edilebilen ve yağda eriyen bir vitamindir. 1913 yılında McCollum ve Davis tarafından yapılan çalışmalar ile keşfedilen vitamin (18), 1922 yılında McCollum tarafından “D vitamini” olarak adlandırıldı (19). D vitamini keşfedildiğinde bir vitamin olarak tanımlanmış olsa da, 20.yüzyılın ikinci yarısından sonra yapılan çalışmalar ile D vitamininin gerçekte bir prohormon olduğu gösterildi (20).

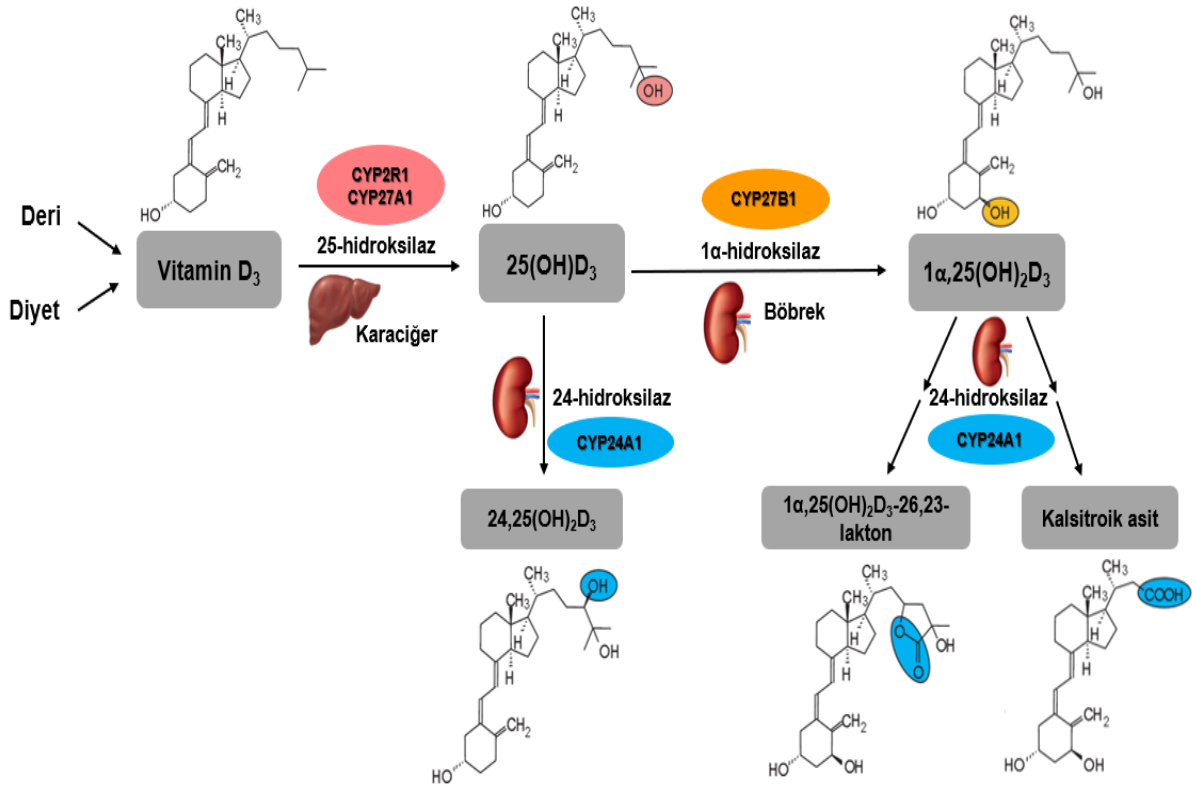
2.1.2. D Vitamini Sentezi ve Metabolizması

Vitamin D₃ deride doğal olarak oluşan D vitaminidir. Deride 7-dehidrokolesterol'den (pro-vitamin D₃) UVB ışınları (290-315 nm) etkisiyle sentezlenir. Oluşan pre-vitamin D₃, sıcaklığa bağlı olarak enzimatik olmayan bir reaksiyon ile vitamin D₃'e (kolekalsiferol ya da kalsiol) izomerize olur (**Şekil 1**). Pre-vitamin D₃ ve vitamin D₃'ün fazlası taşisterol ve lumisterol gibi biyolojik olarak inaktif fotoizomerlere ya da inaktif sterollere dönüştürülür. Vitamin D₂ (ergokalsiferol) ise, bitkide bulunan ergosterolden (pro-vitamin D₂) UV ışığı etkisi ile üretilmektedir (21,22).



Şekil 1. Vitamin D₃'ün deride sentezi (21)

D vitamininin bu iki formu biyolojik olarak inaktiftir ve kanda D vitamini bağlayıcı protein (DBP) ile taşınarak karaciğere gelirler. Vitamin D₃ ve D₂'nin karaciğere ulaştıktan sonraki metabolizmaları aynıdır. Karaciğerde, vitamin D₃'ün 25. karbon atomundan hidroksillenmesi ile 25-hidroksivitamin D₃ [25(OH)D₃, kalsidiol] sentezlenir (**Şekil 2**). Hidroksilasyon basamağı mikrozomal sitokrom P450 enzimi olan 25-hidroksilaz (CYP2R1) ve/veya mitokondriyal sitokrom P450 enzimi 25-hidroksilaz (CYP27A1) tarafından katalizlenir. 25-hidroksivitamin D₃, mitokondriyal 25-hidroksivitamin D-1α-hidroksilaz enzimi (CYP27B1) aracılığı ile böbrek proksimal tübüllerinde metabolik olarak aktif olan D vitamini hormonu 1α,25-dihidroksivitamin D₃'e [1α,25(OH)₂D₃, kalsitriol] dönüştürülür (1). Renal 1α-hidroksilaz enzimi paratiroid hormonu tarafından aktive edilirken, kalsitriol tarafından inhibe edilir. Bu iki hormonun serum düzeyleri diyetel kalsiyum alımı ile ters ilişkilidir. Kalsitriol, böbrekten seruma salınarak endokrin hormon olarak bağırsak ve kemikte kalsiyum metabolizmasının kontrolünü gerçekleştirir (23).



Şekil 2. D vitamini metabolizması (24,25)

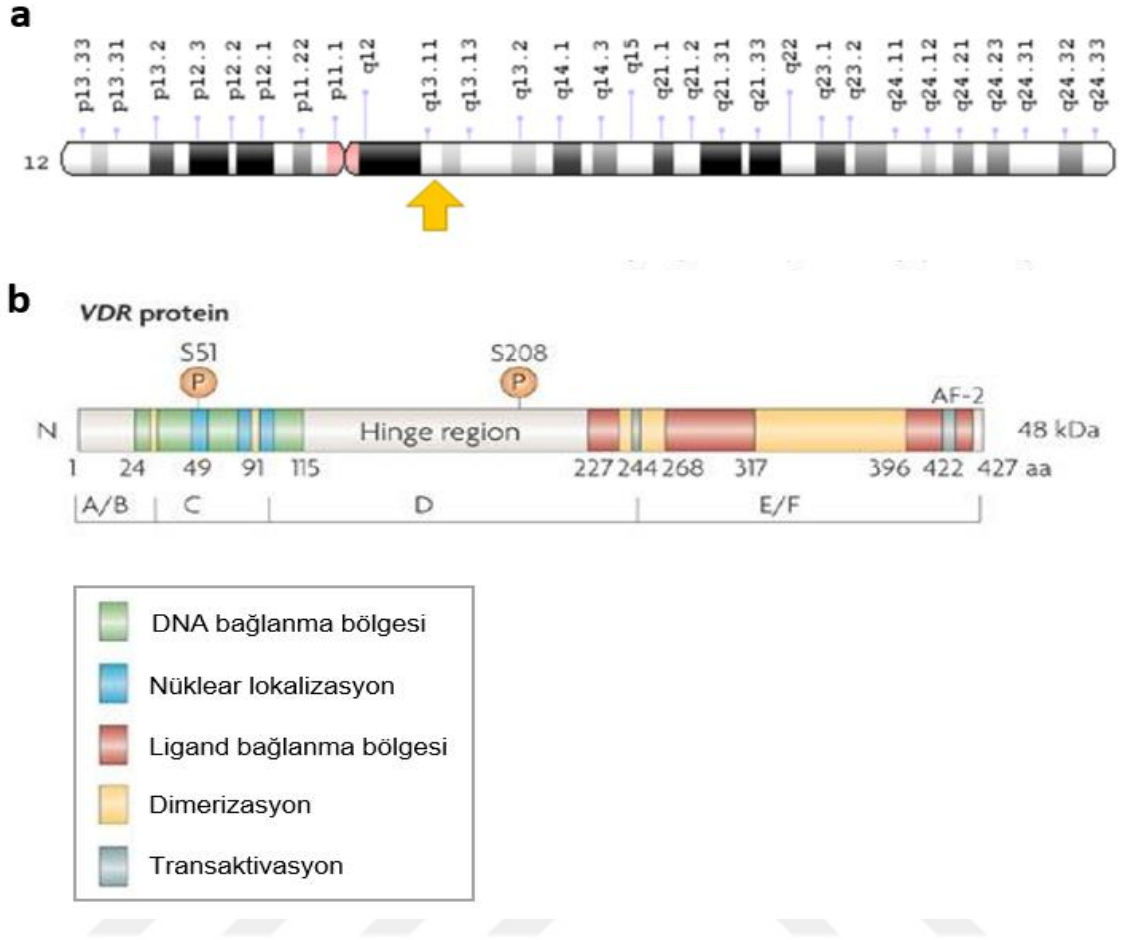
2.1.3. Kalsitriolün Etki Mekanizması

Kalsitriolün etki mekanizmasına D vitamini reseptörü (VDR) aracılık eder. VDR, D vitamini hedef genlerinin aktivasyonu için retinoid X reseptörü (RXR) ile oluşturduğu heterodimer yapısı ile fonksiyon gösterir. VDR-RXR kompleksi dimerize olduktan sonra, hedef genlerin promoter bölgelerinde bulunan D vitamini yanıt elementine (VDRE) bağlanarak gen aktivasyonu ya da inhibisyonunu sağlar.

2.1.3.1. D Vitamini Reseptörü (VDR)

1969 yılında keşfedilen nükleer VDR, steroid hormon reseptör ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (5,26). VDR hedef hücrelerde hem sitoplazmada hem de nükleus içinde bulunabilir, ancak çoğunlukla nükleus içinde yerleşmiştir (23). Kalsitriol molekülü üzerindeki 25-hidroksil ve 1 α -hidroksil grupları, VDR'nin kalsitriole yüksek özgüllük ve afinitede bağlanmasına katkı sağlar (27). Hedef hücrelerde kalsitriole bağlı yaklaşık 900 genin ekspresyonunu doğrudan düzenlemektedir. Mineral homeostazisinin ayarlanmasında rol oynayan doku ve organlar dışında, endotel hücresinin de içinde bulunduğu yaklaşık 36 hücre ve dokuda tanımlanmıştır (24,27–29).

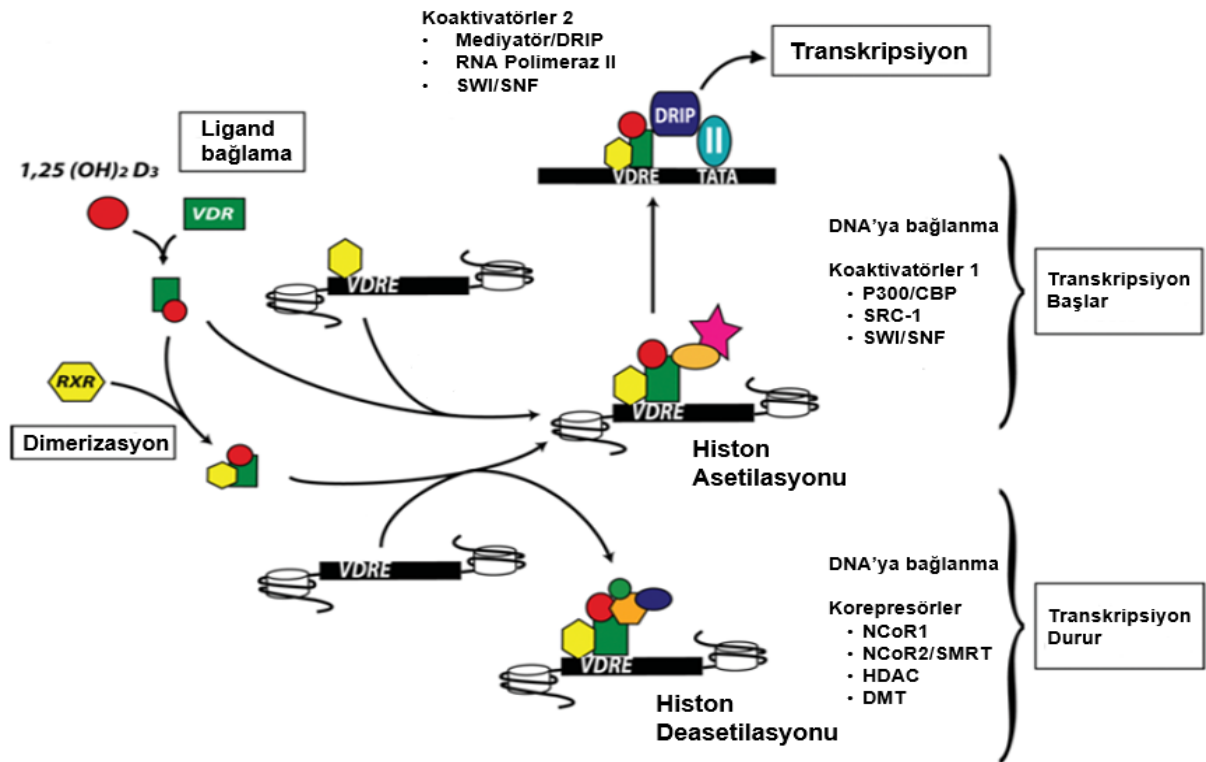
İnsan VDR geni 12.kromozomda lokalizedir (**Şekil 3a**). Sekiz kodlanan ekzon ve altı kodlanmayan ekzona sahiptir. VDR proteini ise 427 aminoasitten oluşur. VDR proteini oldukça korunmuş iki temel fonksiyonel bölge içerir (**Şekil 3b**). Bunlar, N-terminal DNA bağlayan bölge (DBD) ve C-terminal ligand bağlayan bölgedir (LBD). DBD ve LBD bir menteşe bölgesi aracılığıyla birleşir. DNA bağlayan bölge sisteinden zengin çinko parmak bölgesidir. İki adet çinko parmak bölgesi bulunur ve bunların her biri sabit dört sistein kalıntısı ile tetrahedral olarak düzenlenen tek bir çinko atomu içerir. Ligand bağlayan bölge ise, en az 12 α -heliks ve üç β -tabaka yapısından oluşmaktadır. Kalsitriolün bağlanması VDR ile RXR ve koregülatör kompleksleri arasındaki etkileşimi kolaylaştırarak konformasyonel bir değişim meydana getirir (30).



Şekil 3. VDR **a)** gen lokalizasyonu ve **b)** protein yapısı (31,32)

VDR hedef genin başlangıç noktasının genellikle 1 kb uzaklık içinde bulunan D vitamini yanıt elementleri (VDRE) aracılığı ile etki gösterir. VDRE, spesifik olmayan üç bazın ayırdığı altı nükleotidlik (hekzanükleotid) tekrarlı diziler içerir. Bu dizi motifi DR3 olarak bilinmektedir. Bu dizinin 5' ucu RXR'e ve 3' ucu VDR'ye bağlanır. Genom üzerindeki VDR-bağlayan bölgeler hücre tipine spesifiktir. Hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmak ya da baskılamak için diğer bazı proteinlerin de (koregülatörler) transkripsiyon kompleksine bağlanması gerekmektedir (**Şekil 4**). Transkripsiyon kompleksi VDR'ye direkt olarak bağlanan bir bölge içerir. Bu kompleksler hem gene hem de hücreye spesifik olabilir ve bu şekilde hücreden hücreye kalsitriolün etkisinin seçiciliğine fırsat verebilmektedir (5,20).

VDR'nin hücre içindeki varlığı kalsitriol tarafından kontrol edildiği gibi, çeşitli sistemik faktörler, peptid hormonlar, kalsiyum ve fosfor tarafından da transkripsiyonel olarak düzenlenmektedir. Kalsitriolün kendi reseptörü olan VDR'nin mRNA düzeylerini doğrudan arttırabildiği gösterilmiştir. Kalsitriol aynı zamanda VDR protein düzeylerini de arttırır ve VDR'nin seçici fosforilasyonunu teşvik eder (33).



Şekil 4. Kalsitriolün gen regülasyonu mekanizması (23)

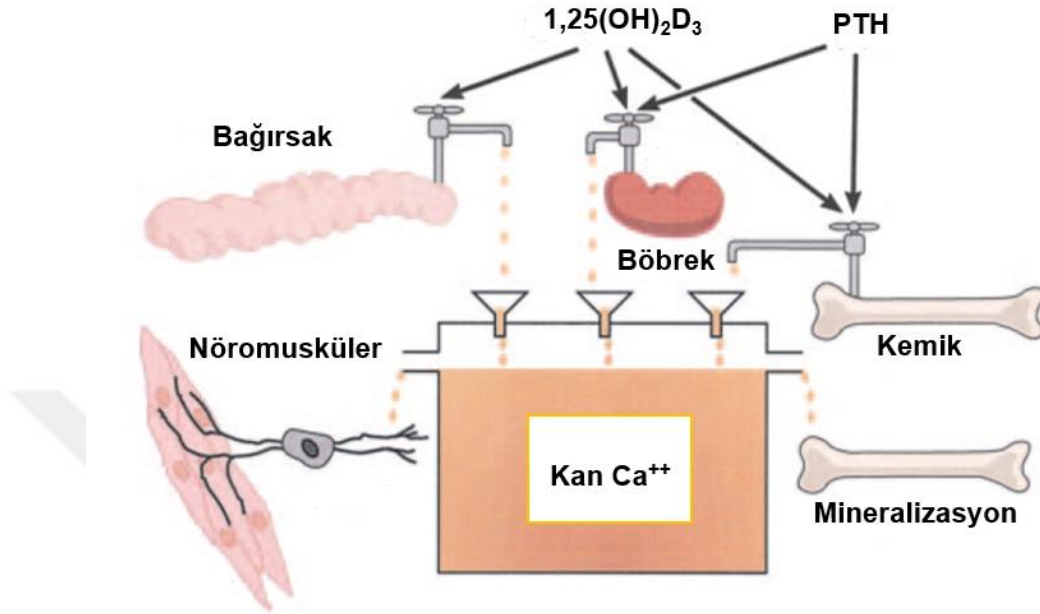
2.1.4. Kalsitriolün Klasik (Kalsemik) Etkileri

Aktif D vitamini hormonu kalsitriol, bağırsak, böbrek ve kemiklerde kalsiyum ve fosfat metabolizmasını düzenleyerek kan kalsiyum ve fosfat düzeylerinin korunması sağlar (34).

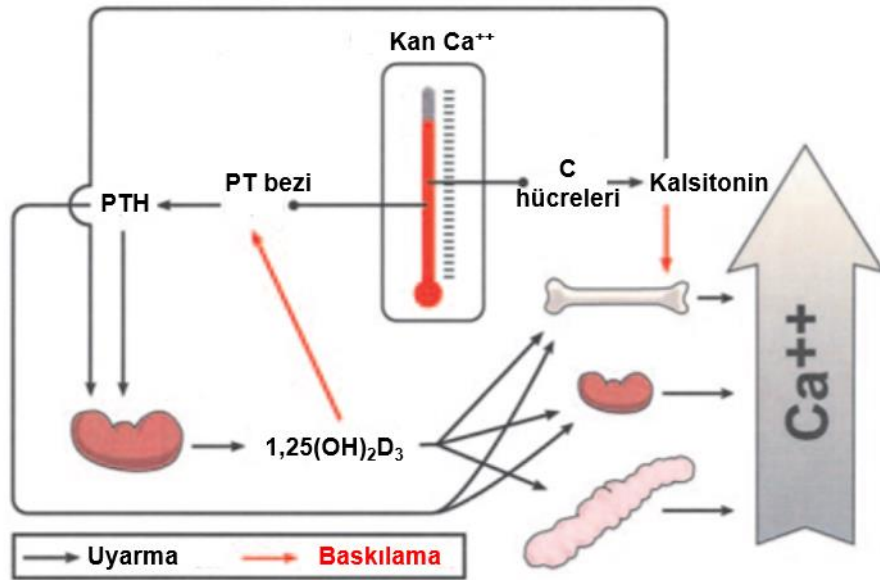
Kan kalsiyum düzeyi çok dar bir aralıkta kontrol edilmektedir. Bu düzey kemik mineralizasyonunun tam olarak sağlanması için yeterlidir. Kan kalsiyum ve fosfat düzeyleri düşerse, kemik mineralizasyonunda azalma meydana gelir. Bu durum çocuklarda raşitizm, yetişkinlerde osteomalazi (kemik yumuşaması) hastalıklarına neden olmaktadır. Kalsitriol, kan kalsiyum konsantrasyonunu üç farklı etki ile düzenlemektedir (**Şekil 5**). Normal koşullar altında, ilk olarak diyetten gelen kalsiyum kullanılır. Bu amaçla aktif bağırsak kalsiyum Emilimi ile ilişkili proteinlerin ekspresyonu (epitelyal kalsiyum kanalları ve kalsiyum-bağlayıcı protein) ve aktif fosfat Emilimi uyarılır. Diyetten gelen kalsiyumun yetersiz olduğu durumda ise kalsitriol kemikten kalsiyumun mobilize edilmesinde önemli bir rol üstlenerek kan kalsiyum düzeylerinin normal aralıkta tutulmasını sağlar. Bunun için iki mekanizma vardır: 1) reseptör aktivatör nükleer faktör- κ B ligand (RANKL) üretimi için osteoblastların uyarılması, 2) uyarılan RANKL'nin osteoklastojenezisi uyarması ve kemik rezorpsiyonu için osteoklastları aktive etmesidir. Diyetle yeterli kalsiyum alınamadığı durumda bir diğer mekanizma da distal renal tübüllerden kalsiyumun geri Emiliminin sağlanmasıdır. Kalsitriolün böbrek ve kemik üzerindeki etkilerinde paratiroid hormonu (PTH) gereklidir (1,20,35).

Kan kalsiyum düzeyleri aynı zamanda endokrin sistem aracılığı ile de kontrol edilmektedir (**Şekil 6**). Paratiroid bezinde kan kalsiyum düzeylerine duyarlı proteinler bulunmaktadır. Kalsiyum konsantrasyonları normal düzeyin altına düştüğünde, G-protein bağlı transmembran proteinleri PTH'ın salınımını uyarır. PTH, saniyeler içinde osteoblastlara ve proksimal kıvrımlı tübül hücrelerine ulaşır. Kalsitriol böbrekten kalsiyum Emilimini sağlarken, diğer yandan PTH ile birlikte bağırsaktan kalsiyum Emilimini ve kemikten kalsiyum mobilizasyonunu uyarır. Kanda kalsiyum düzeyleri arttığında paratiroid bezinden PTH salınımı kalsitriol tarafından inhibe edilir. Diğer yandan, kan kalsiyum düzeylerinin aşırı yükseldiği durumda, tiroid bezlerinde bulunan C-hücreler tarafından kalsitonin peptidi salınarak kemikten kalsiyum mobilizasyonu

engellenir. Kalsitonin aynı zamanda böbrekte 1α -hidroksilazı uyararak kalsitriol sentezini sağlar (20).



Şekil 5. Kalsitriol ve paratiroid hormonun kan kalsiyum düzeylerine etkisi (20)



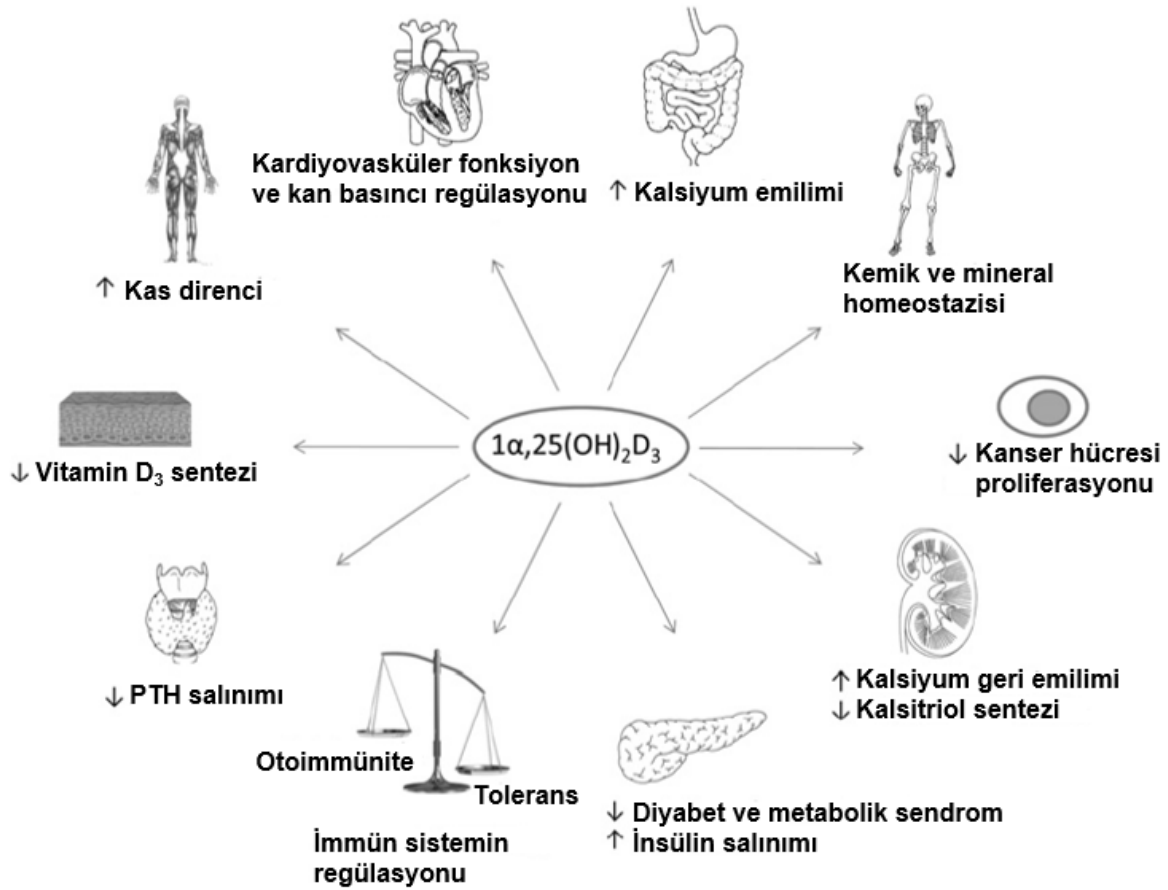
Şekil 6. Kalsitriol ve endokrin sistemin kan kalsiyum düzeylerine etkisi (20)

Kalsitriol, kan fosfat düzeylerini de üç farklı yol ile düzenlemektedir. Yüksek kalsitriol düzeyleri kan kalsiyum konsantrasyonunu artırma yoluyla PTH salınımını inhibe eder ve fosfatın böbrekten atılımı azalır. Diğer taraftan, yüksek kalsitriol düzeyleri osteosit ve osteoblastlar tarafından sentezlenen fibroblast büyüme faktörü FGF23'ün düzeylerini azaltarak, fosfat atılımını sınırlar. Bağırsakta fosfat emilimini artırıp, kemikte fosfatın rezorpsiyonunu sağlayarak kan fosfat düzeylerini artırır (36).



2.1.5. Kalsitriolün Klasik Olmayan (Non-kalsemik) Etkileri

Böbrek dışı dokularda kalsitriolün, VDR'nin ve 1α -hidroksilaz enziminin varlığı, D vitamininin kalsiyum ve fosfat homeostazisindeki bilinen klasik rolü dışında, hücre büyümesi ve farklılaşması, otoimmünite, insülin sekresyonu, kan basıncı düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik süreçte önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir. Endotel hücresi, makrofaj, plasenta, deri gibi bazı doku ve hücreler lokal olarak sentez edebildiği kalsitriolün otokrin/parakrin etkileri ile hücresel süreçleri düzenleyebilmektedir (1,34,37,38) (**Şekil 7**).



Şekil 7. Kalsitriolün periferel dokulardaki ana hedefleri ve etkileri (37)

İmmün sistem: Aktive edilmiş T hücrelerde VDR'nin varlığının keşfedilmesiyle yapılan ilk çalışmalar ile birlikte, D vitamini immün sistem regülatörü olarak önerilmiştir (39). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, makrofajlar, dentritik hücreler ve B hücreler gibi birçok immün hücrede VDR'nin varlığı sayesinde kalsitriolün hem doğal hem de kazanılmış bağışıklığı düzenlediği gösterildi.

Kalsitriol doğal bağışıklık yanıtını uyarırken, kazanılmış bağışıklık yanıtını inhibe etmektedir. Doğal bağışıklık yanıtı polimorfonükleer hücreler, monosit ve makrofajlardaki Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonunu içerir. Toll-benzeri reseptörlerin aktivasyonu makrofaj ve polimorfonükleer hücrelerin lizozomlarında bulunan katelisin gibi antimikrobiyal peptidlerin uyarılmasında neden olur. Katelisinlerin ekspresyonu hem miyeloid hem de epitel hücrelerde kalsitriol tarafından uyarılır. Kazanılmış bağışıklık yanıtı ise, antijen sunan hücreler, dentritik hücreler ve makrofajlar, T ve B hücreler tarafından başlatılır (5,40). Kalsitriol monositlerin makrofajlara farklılaşmasını uyarır ve bu hücreler tarafından inflamatuvar sitokinlerin ve kemokinlerin salınımını azaltır (41). Kalsitriol T yardımcı hücreler (Th-1 ve Th-2) arasındaki immün dengenin potansiyel bir düzenleyicisidir. Lokal ya da sistematik olarak üretilen kalsitriol, dentritik hücrelerin olgunlaşmasını ve TNF α gibi proinflamatuvar sitokinlerin Th1-aracılı salınımını inhibe eder (42).

Kalsitriolün tiroidit, romatoid artrit, tip 1 diyabet, inflamatuvar bağırsak ve sistemik lupus hastalıkları gibi otoimmün hastalıkların başlangıcını inhibe ettiği gösterilmiştir (40,43). Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, D vitamininin immün sistem homeostazında, otoimmün hastalıkların önlenmesinde ve enfeksiyon riskinin azaltılmasında bir araç olabileceğini göstermektedir (44).

Kardiyovasküler hastalıklar: Kalp yetersizliği ve koroner arter hastalığını içeren kardiyovasküler hastalıklar dünya çapında mortalite ve morbiditenin ana nedenlerindendir. Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar kardiyovasküler sağlık için D vitamininin önemini vurgulamaktadır. Düşük D vitamini düzeyleri kardiyovasküler hastalıklar ve mortalitenin artan riski ile ilişkilendirilmiştir (37,45). Arteriyel damarlar, endotel, vasküler düz kas ve kardiyomiyositlerde D vitaminini metabolize eden enzimlerin ve VDR'nin eksprese edildiğinin gösterilmesi ile kardiyovasküler sistem D vitamini için bir hedef haline gelmiştir (1,46). D vitamini, makrofaj kolesterol alımı ve

köpük hücre oluşumunun inhibisyonu, vasküler düz kas hücre proliferasyonunun ve endotel hücrelerde adezyon moleküllerinin ekspresyonunun azalması, lenfositlerden salınan sitokinlerin inhibisyonu aracılığıyla ateroskleroza karşı koruyucu rol üstlenmektedir (47). Ayrıca, renin biyosentezini direkt olarak baskılaması ile renin-anjiyotensin-aldosteron sisteminin düzenlenmesinde anahtar role sahiptir (37,48). İnsanlarda yapılan çalışmalarda, D vitamininin renin-anjiyotensin sistemini düzenleyerek daha düşük kan basıncı sağladığı rapor edilmiştir (49).

VDR ve 1α -hidroksilazın susturulduğu farelerde yapılan çalışmalar, bu farelerde hipertansiyon ve kardiyak hipertrofinin geliştiğini göstermiştir (48). Kardiyomiyosit, endotel ve vasküler düz kas hücrelerinde yapılan deneysel çalışmalarda ise, düşük 25(OH)D düzeylerinin sol ventriküler hipertrofi, vasküler disfonksiyon ve renin-anjiyotensin sistem aktivasyonu ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir (50). Endotel hücrelerde VDR geninin delesyonu, azalan nitrik oksit sentaz ekspresyonu nedeniyle bozulan kan damarı gevşemesi endotel disfonksiyona neden olmuştur (51). Tüm bu nedenlerle, D vitaminin kardiyovasküler sistem üzerinde yararlı etkilere sahip olduğu ve serum düzeylerinin kardiyovasküler hastalıkların önemli bir bağımsız belirtici olabileceği düşünülmektedir (48,52).

Diyabet: VDR, pankreasın insülin üreten beta hücrelerinde ve insülinin diyabet ile ilişkili hedef hücrelerinde eksprese edilmektedir (37). Tip 1 diyabetin dünya çapındaki insidans hızını D vitamini eksikliği ile ilişkilendiren çalışmalar giderek artmaktadır. D vitamini takviyesinin tip 1 diyabetin gelişimine karşı yaşamın erken dönemlerinde koruyucu bir faktör olduğu belirtilmektedir (1). Ayrıca, D vitamini eksikliğin tip 2 diyabette insülin salınımında azalmaya ve insülin direncinde artışa neden olduğu gösterilmiştir. Diyabetli hastalarda yapılan çalışmalarda ise, D vitamini eksikliğin azalmış beta hücre fonksiyonu ve bozulmuş glukoz toleransı ile ilişkili olduğu bulunmuştur. UV maruziyetinde ve mevsimsel süreçlerdeki varyasyonların bozulmuş glukoz toleransı ve tip 2 diyabetin insidans ve prevalansı ile korele olabileceği belirtilmektedir (53,54).

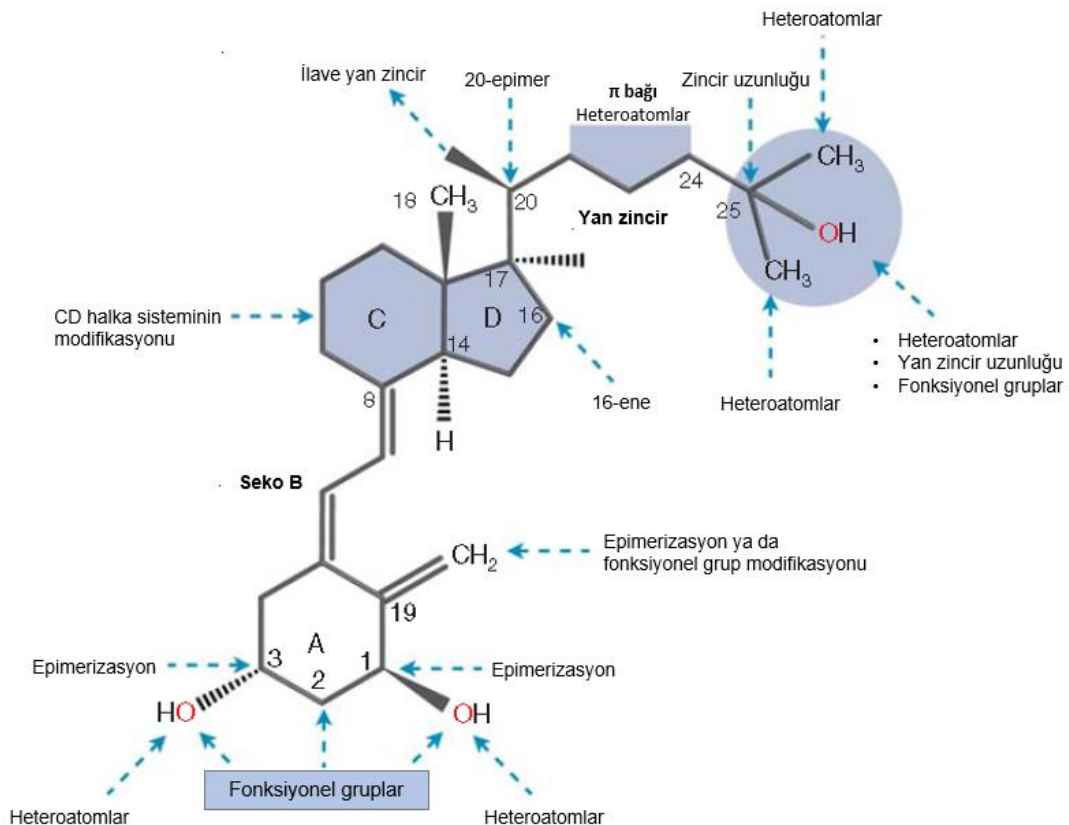
Kanser: Çoğu kanser hücresinde VDR'nin yanı sıra 1α -hidroksilaz ve 24α -hidroksilaz enzimleri de eksprese edilir ve kalsitriol metabolizması lokal olarak düzenlenir (30). D vitamini antiproliferatif ve antiinflamatuvar etkilere sahiptir. Ayrıca,

kanser hücrelerinin büyümesini engellemede, anjiyogenez ve metastazın azalması etkili role sahiptir (55,56). D vitamini eksikliği kanser hastalarında yaygındır ve hastalığın ilerleyişi ile ilişkilidir. Yapılan ekolojik, gözlemsel ve deneysel çalışmalardan elde edilen veriler, D vitamininin kanser riskini azalttığını kanıtlamaktadır (44). VDR geni susturulan farelerde yapılan bir çalışmada, karsinogeneze olan hassasiyetin artabileceği *in vivo* olarak kanıtlanmıştır (48). Ayrıca, artmış VDR ekspresyon düzeyinin daha iyi prognoz ve daha uzun sağkalım ile korele olduğu rapor edilmiştir (30,57). D vitamini kanserde önemli bir mekanizma olan hücre döngüsünün kontrolünde rol oynamaktadır. Çok sayıda araştırma, kalsitriol ve analoglarının hücre döngüsünün G₀/G₁ fazındaki hücrelerin durdurulması, farklılaşmalarının uyarılması ve apoptotik hücre ölümünün uyarılması yoluyla kanser hücre büyümesinin yavaşladığını göstermiştir (30,58,59). Buna ek olarak, kalsitriol ve analoglarının geleneksel antikanser ilaçların tümör karşıtı etkilerini güçlendirdiği rapor edilmiştir (60,61).

2.1.6. D Vitamini Analogları

Son 25 yıldır, kalsitriolün moleküler yapısındaki kimyasal modifikasyonlar ile birçok sentetik analogu sentez edilmektedir (3). Bugüne kadar bilenen 3000'den fazla D vitamini analogu bulunmaktadır. Kimyasal modifikasyonlar ya kalsitriolün yapısındaki halkalarda (A, C, D) ya da yan zincirinde gerçekleştirilmektedir (**Şekil 8**). Modifikasyonların iki temel stratejisi vardır; VDR-ligand bağlanma afinitesini arttırmak ve bileşiğin metabolik kararlılığını düzenlemektir (62).

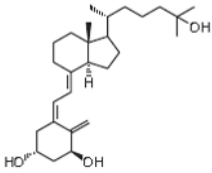
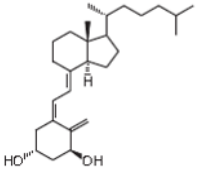
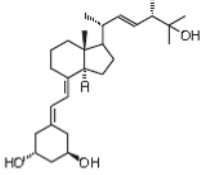
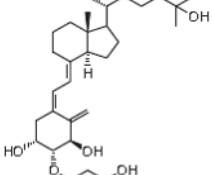
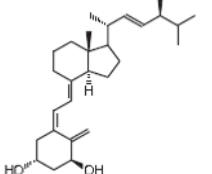
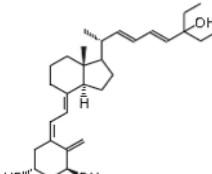
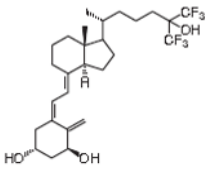
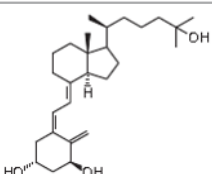
D vitamini analogları VDR'ye bağlanarak sergiledikleri etkiler açısından VDR agonisti ya da antagonisti olarak adlandırılırlar. Analogların her iki tipi de reseptörün ligand bağlama cebindeki aynı bölgeye bağlanmaktadır. Ancak agonistler VDR'nin 12. heliksinin (kısa transaktivasyon bölgesi içerir, AF-2) pozisyonunu stabilize ederken, antagonistler bu stabilizasyonu önler ve koregülatör dengesini korepresörlere doğru kaydırır (62).



Şekil 8. Kalsitriol yapısındaki modifikasyonlar (62)

Kalsitrioldeki agonistik modifikasyonların amacı, kalsitriolün biyolojik etkilerini iyileştirirken aynı zamanda kalsemik ve fosfatemik etkilerini azaltmaktır. VDR agonistleri VDR'e bağlandığında konformasyonel bir değişim meydana getirirler. VDR'nin agonist aracılı bu konformasyonel değişimin sonrasında meydana gelebilecek ana sonuçlar; korepresör proteinlerin ayrılmasının uyarılması, RXR ile etkileşimin artması ve koaktivatör proteinler ile etkileşimin uyarılmasıdır (63,64). Kalsitriolün normal fizyolojik serum konsantrasyonu pikomolar (pM) düzeyindedir, ancak klasik olmayan etkileri için nanomolar (nM) düzeylere ihtiyaç vardır. Diğer taraftan, supra-fizyolojik (nM) konsantrasyonlardaki kalsitriol hiperkalsemiye neden olur. Sentetik D vitamini analogları ise bu gibi yan etkileri minimize ederler (3,62). Aynı zamanda anabolik 1α -hidroksilazı (CYP27B1) azaltırken, katabolik 24-hidroksilazı (CYP24A1) artırırlar (65). Sekonder hiperparatiroidizm, sedef hastalığı ve osteoporoz gibi bazı hastalıklarda D vitamini analogları tedavi seçeneği olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. Bazı D vitamini analogları ve yapıları (3)

Analog adı	Yapısı	Analog adı	Yapısı
Kalsitriol { $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ }		Alfakalsidol { $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ }	
Parikalsitol {19-nor- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ }		Eldekalsidol { 2β -(3-hydroxypropoxy)- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ }	
Dokserkalsiferol { $1\alpha(\text{OH})\text{D}_2$ }		Seokalsitol { $22,24$ -diene- $24,26,27$ -trishomo- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ }	
Falekalsitriol { $26,27$ F6- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ }		20-epi- $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	

2.1.6.1. VDR Agonisti: Parikalsitol (19-nor-1 α ,25(OH) $_2$ D $_2$)

Parikalsitol üçüncü nesil bir VDR aktivatörüdür (4). Yapısal olarak kalsitriole benzer olmakla birlikte, kalsitriolün 19. karbon atomuna bağlı metiliden grubunun iki hidrojen atomu ile yer değiştirmesi ve yan zincirdeki 20. ve 22. karbonlar arasında bir çifte bağ oluşumu ile sentez edilmektedir. Faz 3 klinik çalışmalar kapsamında, sekonder hiperparatiroidizmli hemodiyaliz hastalarında hiperkalsemi ve hiperfosfatemi olmaksızın PTH salgısını baskıladığı gösterilmiştir (66–68). Bu etki sayesinde 2005 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)’nden ticari ismi Zemplar™ (AbbVie) olan ilaç formülasyonunun üretilmesi için onay almıştır (66).

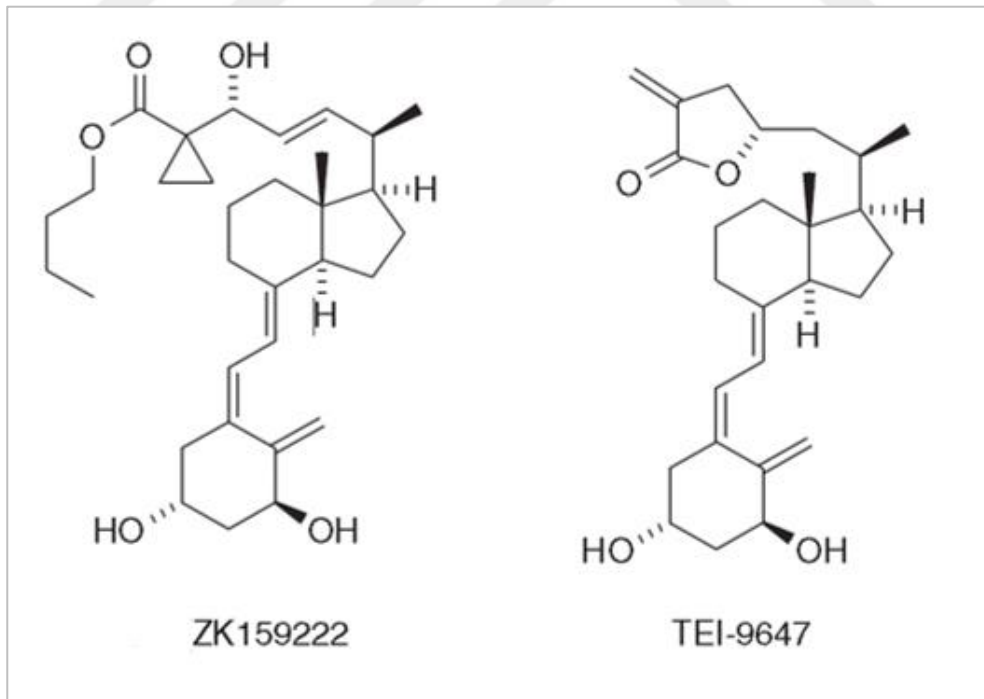
Parikalsitol aktif bir D vitamini analogu olması nedeniyle metabolizmada herhangi bir hidroksilasyon basamağına gerek duymadan direkt VDR’ye bağlanabilmektedir (69). Dolaşımda DBP ile taşınarak hedef hücrelerin nükleusuna transloke olur. Kalsitriole benzer şekilde fizyolojik etkiler gösterir. Kalsitriole göre intestinal kalsiyum ve fosforun emiliminde ve kemikten kalsiyum mobilizasyonunda 10 kata kadar azalma sağlamaktadır (4). Parikalsitolün tüm bu özellikleri yanı sıra, VDR ve DBP’e bağlanma afinitesi kalsitriol ile aynıdır (30). Bu nedenlerle, çalışmamızda sentetik analoglar arasında kalsitriol ile en yakın özelliklere sahip olan parikalsitolü kullanmayı tercih ettik.

Sekonder hiperparatiroidizmli hastalarda yapılan çalışmalar dışında, diyabet ve kanser gibi çeşitli hastalıklarda da parikalsitolün etkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar ile araştırılmıştır (3,70–73). İmmünoglobulin A nefropatili hastaların yanı sıra, diyabetik hastalarda da parikalsitol ve kalsitriolün antiproteinürik etkileri gösterilmiştir. Park ve ark. gastrik kanser hücrelerinde yaptıkları bir ksenograft çalışmasında, parikalsitol uygulamasının tümör boyutunu küçülttüğü ve intraperitoneal metaztazın büyümesini azalttığı bulunmuştur (3,73). Benzer şekilde prostat ve pankreatik kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda da, parikalsitolün kalsitriole benzer anti-proliferatif aktivite sergilediği gösterilmiştir (74,75). Eşit miktarlarda kalsitriol ve parikalsitol ile muamele edilen insan koroner arter düz kas hücrelerinde, aynı genlerin düzenlendiğini bulunmuştur (3).

2.1.6.2. VDR Antagonisti: ZK159222

Literatürde uzun zamandır bilinen iki temel VDR antagonisti vardır. Bunlar 25-karboksilik ester türevi olan ZK159222 (Schering, Almanya) ve 26,23-lakton türevi olan TEI-9647'dir (Teijin, Japonya) (**Şekil 9**). Kalsitriol ile yapısal olarak karşılaştırıldığında, her iki tip antagonist de yan zincirinde büyük halka yapısına sahiptir. VDR'ye bağlanma afiniteleri açısından kalsitriol ile kıyaslandığında ise, ZK159222'nin afinitesi kalsitriole yakinken, TEI-9647'nin afinitesi 10 kat daha düşüktür (62). Bu nedenle, çalışmamızda ZK159222 antagonisti ile çalışmayı tercih ettik.

ZK159222'nin antagonistik mekanizmasının temeli; yapısında bulunan büyük halka uzantılarının VDR'nin ligand bağlama domainindeki 12. heliksi antagonistik bir pozisyon içine iterek, oluşan konformasyonun koaktivatörler ile etkileşimi bloke etmesine dayanır. Korepresörlerin varlığında antagonistik konformasyon stabilize olur (62,76). ZK159222, VDR-RXR-VDRE kompleksine sub-nanomolar düzeyde bir afinite gösterir. Ayrıca, kalsitriol varlığına bağlı olarak, VDR için zayıf bir agonist (%20 etkinlik) olduğu belirtilmektedir (76).



Şekil 9. VDR antagonistlerinin yapısı (62)

2.1.7. D Vitamini Eksikliği

D vitamini eksikliği küresel bir sağlık sorunudur. Son yıllarda yapılan epidemiyolojik çalışmalar dünya çapında D vitamini yetersizliğinin (serum 25(OH)D<30 ng/mL) prevalansını %50 olarak belirtirken, yaklaşık 1 milyar insanda D vitamini eksikliği (serum 25(OH)D<10 ng/mL) görüldüğünü rapor etmiştir. Bilindiği üzere D vitamininin klasik etkileri nedeniyle, D vitamini eksikliği çocuklarda raşitizm ve büyüme geriliği ile, yetişkinlerde osteoporoz ve osteomalazi ile ilişkilendirilmektedir. Ancak, son dönemde D vitamini eksikliğin kanser, koroner kalp hastalığı, nörolojik hastalıklar, tip II diyabet, otoimmün hastalıklar ve depresyon gibi çeşitli kronik hastalıklarla bağımsız olarak ilişkili olduğu gösterilmesi ile endişe verici bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir (44,77). Bu nedenle, kemik dışı sağlık sorunlarının önlenmesinde ve tedavisinde D vitaminin rolü dikkati çeken bir araştırma konusu olmuştur.

D vitamini eksikliği durumunu gösteren en iyi parametre serum 25(OH)D düzeyleridir. 25(OH)D düzeyleri hem deri sentezinden elde edilen vitamin D₃'ü, hem de diyetten alınan vitamin D₂ ve vitamin D₃ formlarını yansıtmaktadır (78). Amerikan Endokrin Derneği'nin önerisine göre, 30-60 ng/mL arasındaki dolaşım düzeyine ulaşmak ve bunu sürdürmek gerekmektedir. Bu aralık sadece optimal kemik sağlığı için değil, aynı zamanda genel sağlık durumu için de gereklidir (44,49). Serum 25(OH)D düzeyi 150-200 ng/mL aralığının üzerinde süreklilik göstermedikçe, D vitamini toksisitesinin karakteristik belirtileri olan hiperkalsemi, akut böbrek yetmezliği ve renal kalsifikasyon gözlenmemektedir (79).

2.2. Oksidatif DNA Hasarı ve DNA Onarımı

2.2.1. Reaktif Oksijen Türleri

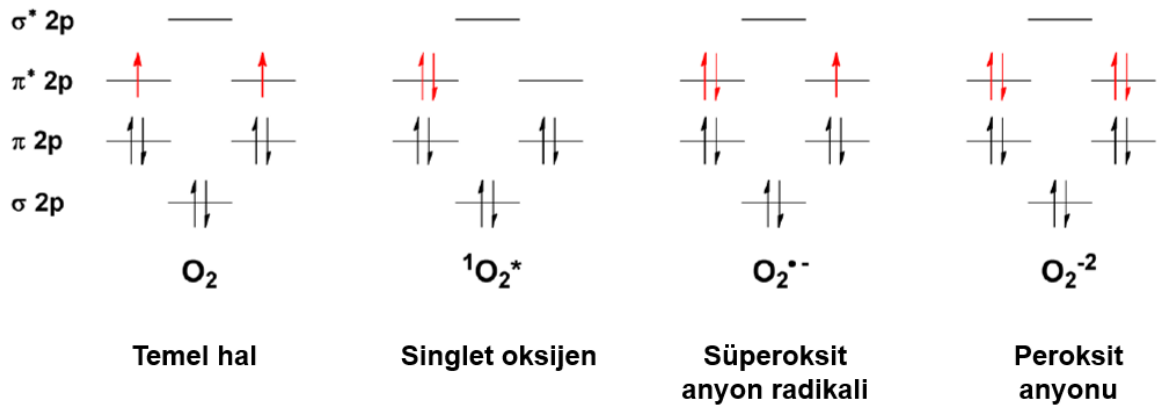
Reaktif oksijen türleri yapılarında bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran ve oksijenden türev alan reaktif moleküllerdir. Canlı organizmada meydana gelen bu reaktif türler kararsız konfigürasyonları nedeniyle hücresel makromoleküller olan nükleik asitler, protein, lipid ve karbohidratlar ile reaksiyona girme eğilimindedirler (80,81). Reaktif oksijen türleri (ROT) çeşitli endojen ve ekzojen kaynaklar aracılığı ile oluşabilirler (**Tablo 2**).

Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin endojen ve ekzojen kaynakları (82)

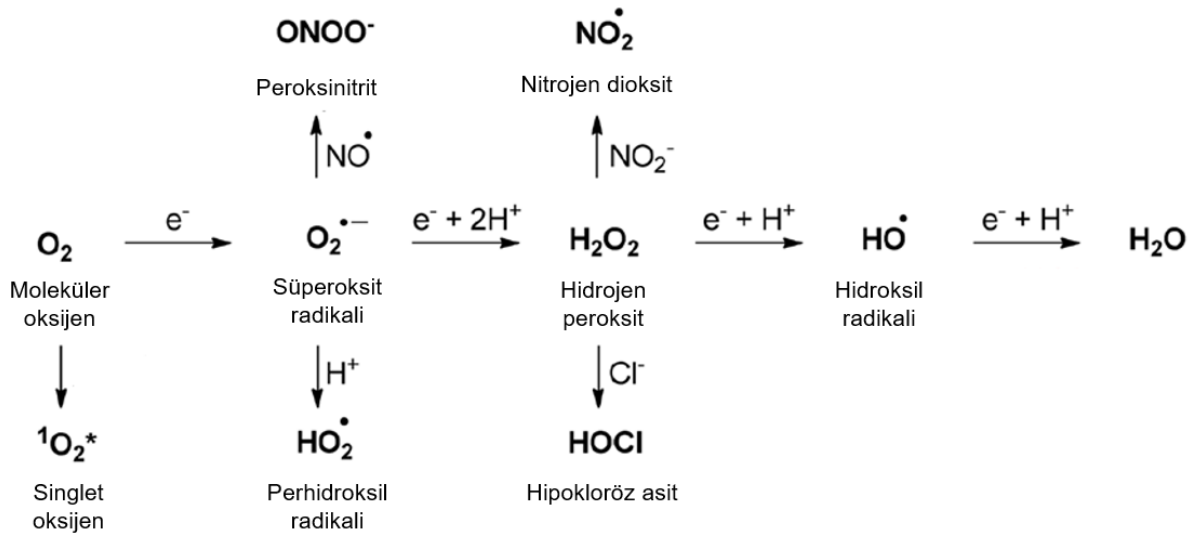
Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
Mitokondri - Elektron transport zinciri - Oksidoredüktazlar	Kimyasallar - Alkol, sigara, benzen - Herbisitler, çevresel gazlar
Endoplazmik retikulum - Sitokrom P450 enzim sistemi - Yağ asidi desatürasyonu - Protein katlanması	Radyasyonlar - UV ışınları - X-ray - Radyoaktif materyal
Sitozol - Ksantin oksidaz - Kateşolaminler, flavinler	İlaçlar, ksenobiyotikler
Peroksizomlar Peroksizomal oksidazlar	
Plazma membranı - Lipid oksidasyonu - NADPH oksidaz	
Lizozomlar Redoks reaksiyonu	

Temel hal durumundaki oksijen molekülünün elektronik yapısı, aynı zamanda potansiyel bir tehlike oluşturmaktadır. Moleküler oksijen (O_2), paralel spinlerde iki adet eşleşmemiş elektron içerir (**Şekil 10**). Yapısındaki eşleşmemiş elektronlar nedeniyle paramanyetik özellik gösterir. Bu durum oksijeni tek değerlikli bir yoldan indirgenmeye yatkın hale getirir. Bunun bir sonucu olarak da, normal aerobik metabolizma oksijenin indirgenmesiyle tehlikeli reaktif ara ürünler oluşturur (79,83,84). Bir saniyeden daha kısa bir süre içinde gerçekleşen reaksiyonlar hücre içinde hızlı bir reaksiyon kaskatı başlatır ve en sonunda hücre hasarı ile sonuçlanır (85).

Aerobik koşullar altında oksijenin %90'ı mitokondriyal elektron transport zincirindeki sitokrom oksidaz tarafından direkt olarak suya indirgenir. Bu oksijen miktarının yalnızca %2-3'ü ROT'a dönüştürülür. Moleküler oksijenin birer elektron aktarımı ile başlayan kaskat, toplamda dört elektron indirgenmesi sonrası suyun oluşumuyla tamamlanır. Bir elektron transfer reaksiyonları ile başlıca süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$) radikali, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşur (**Şekil 11**) (80,86). Biyolojik sistemlerdeki radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri **Tablo 3**'de verilmiştir.



Şekil 10. Moleküler oksijenin temel hali, singlet oksijen ve bazı reaktif oksijen türleri için moleküler orbital diyagramı (83)

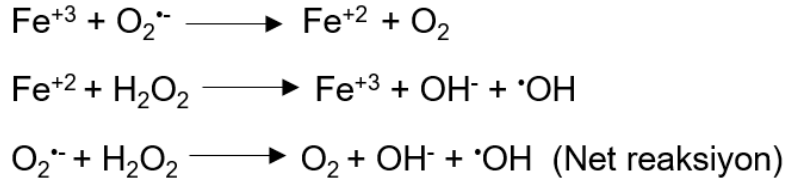


Şekil 11. Elektron transfer reaksiyonları ile reaktif oksijen türlerinin oluşumu (83)

Tablo 3. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (87)

Reaktif Oksijen Türleri	
Serbest radikaller	Radikal olmayanlar
Süperoksit anyonu, $O_2^{\bullet-}$	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, $^{\bullet}OH$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Hidroperoksil, $HO_2^{\bullet}$	Ozon, O_3
Peroksil, $RO_2^{\bullet}$	Singlet oksijen, 1O_2
Alkoksil, $RO^{\bullet}$	Organik peroksit, $ROOH$
Karbonat, $CO_3^{\bullet-}$	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Karbon dioksit, $CO_2^{\bullet-}$	Pernitröz asit, $ONOOH$

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Süperoksit radikali hem bir indirgeyici hem de bir oksidan olarak görev yapmaktadır. En önemli kaynağı ise mitokondriyal elektron transport zinciridir. Moleküler oksijene bir elektron aktarımı kaskatında başlangıç reaksiyonu, süperoksiti oluşturmak için oksijene bir elektron aktarımıdır. Süperoksit anyonu membranlardan kolayca geçemez ve yarı ömrü kısa olduğu için lokal olarak etki gösterir. Asıl önemli etkileri, hidrojen peroksit, hidroksil radikali ve peroksi radikallerin oluşumunu sağlamasıdır. Süperoksit radikali, süperoksit dismutaz enzimi ile ya da spontan olarak daha uzun ömürlü ve membrandan geçebilen hidrojen peroksit'e dönüştürülür. Geçiş metal iyonları ile (demir, bakır gibi) reaksiyona girerek de biyolojik sistemlerde bilinen en güçlü radikal olan hidroksil radikalini ($\cdot OH$) oluşturur. Enzimatik olmayan bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu denir (**Şekil 12**) (84).



Şekil 12. Haber-Weiss reaksiyonu

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Süperoksit radikaline bir elektron aktarımı ile stabil ve radikal olmayan hidrojen peroksit oluşur. Hidrojen peroksit, süperoksit radikalının olduğu her durumda oluşabilmektedir. İnsan hücrelerinde oksijen metabolizmasının bir yan ürünü olarak mikromolar düzeylerde bulunabilmektedir. Genel olarak, hidrojen peroksit biyomoleküller ile düşük oranlarda reaksiyona girdiği ve spesifik enzimler ile uzaklaştırılabildiği için nispeten zararsızdır. Bununla birlikte, Haber-Weiss reaksiyonu dışında, hidrojen peroksit demir-kükürt komplekslerinden, hem grubundan ya da metal-depolayan proteinlerden salınan serbest demir, bakır gibi metallerin varlığında Fenton reaksiyonu ile yüksek oranda reaktif $\cdot OH$ oluşumuna yol açabilmektedir (**Şekil 13**) (83,88).



Şekil 13. Fenton reaksiyonu

Hidrojen peroksit hücre içerisine girdiğinde bazı biyokimyasal olayları tetikler. Bunlardan bazıları; DNA hasarı, hücre içi ATP'nin baskılanması, hekzos monofosfat ve glutatyon indirgenme yollarını aktivasyonu, hücre içi sülfhidrillerin oksidasyonu, poli(ADP-riboz) polimeraz aktivasyonu, hücre içi kalsiyumun hızlı yükselişidir (89).

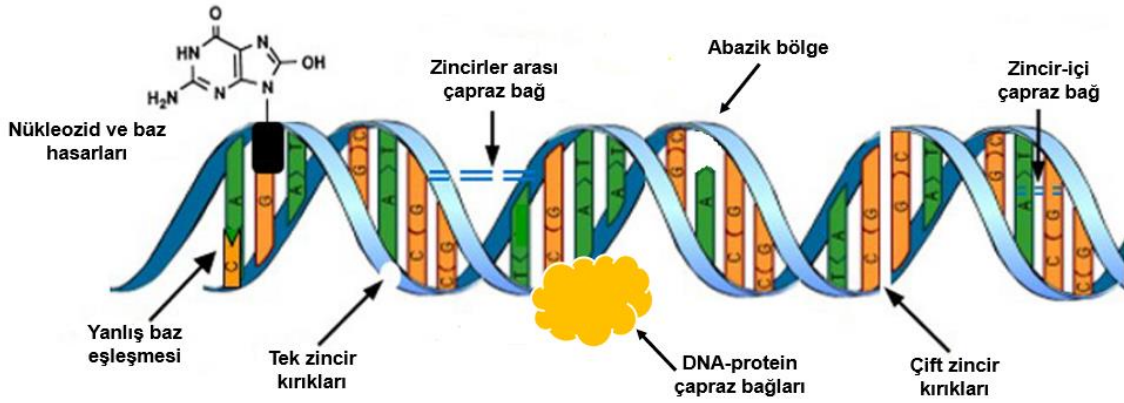
Hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$): Moleküler oksijenin üç elektron indirgenmesiyle oluşan hidroksil radikali, en reaktif serbest radikal olarak bilinir. Biyolojik sistemlerde yaklaşık bir nanosaniyelik yarı ömre sahiptir. Yarı ömrü çok kısa olmasına rağmen, birçok biyolojik molekül ile çok hızlı bir şekilde reaksiyona girerek hücrede ve diğer hücre içi yapılarda ciddi hasara neden olabilmektedir (90). Hidroksil radikali Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları dışında, suyun iyonizan radyasyona maruziyeti sonrasında da oluşmaktadır (91). Hidroksil radikali lipid peroksidasyonu gibi kimyasal zincir reaksiyonlarını başlatarak ya da DNA ve proteini okside ederek hücre hasarına neden olur. DNA'ya yaptığı ataklar, DNA onarım mekanizmaları ile tamir edilmezse mutasyonlara ve kansere neden olmaktadır (92).

Reaktif oksijen türlerinin temel biyolojik etkisi oksidatif stresin uyarılmasıdır. Oksidatif stres, radikal türler ile antioksidan sistemler arasındaki dengenin radikaller lehine bozulması olarak tanımlanmaktadır. Yüksek konsantrasyonlardaki reaktif oksijen türlerinin oluşturduğu oksidatif stres durumu DNA, protein ve lipid dahil olmak üzere birçok hücresel ve ekstraselüler bileşenlere zarar verebilir (93). Özellikle DNA oksidasyonu, mutasyonlara ve gen ekspresyonlarında değişikliklere neden olabileceği için endişe vericidir. Mitokondriyal DNA, DNA onarım enzimlerinin yokluğu sebebiyle oksidatif stres-aracılı mutasyonlara daha duyarlıdır (94).

2.2.2. Oksidatif DNA Hasarı

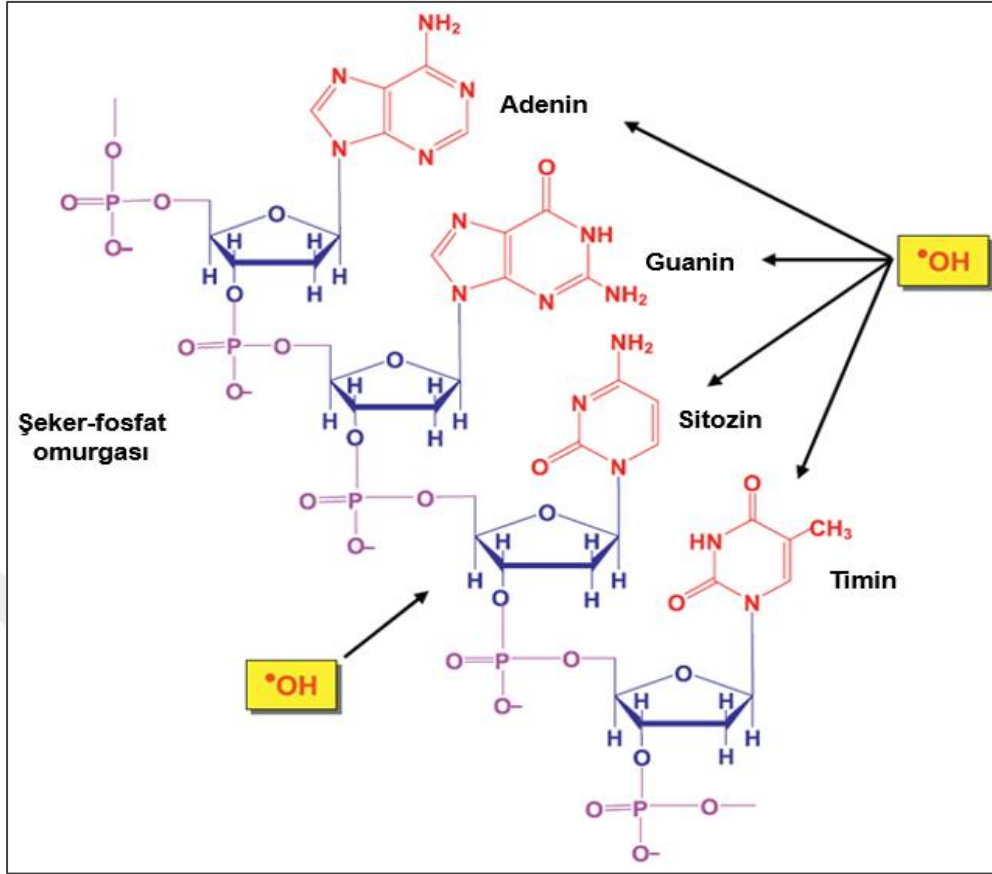
DNA hücrenin genetik materyalidir ve DNA'da meydana gelen kalıcı hasarlar proteinlerin fonksiyon bozukluğuna ya da etkilenen proteinlerin tamamen inaktive olmasına neden olur. Bu yüzden hücre yaşamı için esansiyeldir (80).

Oksijen metabolizması yoluyla DNA hasarının uyarılmasına ek olarak, DNA hasarı iyonizan radyasyon, UV ışığı ve kimyasal mutajenler gibi diğer çevresel etkenlerle de oluşabilir (95). DNA yapısındaki bu değişiklikler nükleozid ve baz değişiklikleri olabileceği gibi, zincir kırıkları, çapraz bağlar, abazik bölgeler gibi daha karmaşık değişiklikler de meydana gelebilir (**Şekil 14**). Reaktif oksijen türleri tarafından DNA yapısında oluşturulan bu hasarlar onarım mekanizmaları ile onarılmazsa, genomik kararsızlığa yol açarak karsinogenez gibi hastalık süreçlerine yol açar (96).



Şekil 14. DNA yapısında meydana gelen oksidatif hasar tipleri (97)

En reaktif radikal olan hidroksil radikali başta olmak üzere tüm reaktif oksijen türleri çeşitli mekanizmalar ile DNA'nın bileşenlerinde çok sayıda modifikasyon meydana getirir. Bu şekilde oluşan DNA hasarı "**oksidatif DNA hasarı**" olarak adlandırılır (98). DNA, fosfat gruplarının negatif yükü nedeniyle bir anyon gibi davranır. DNA'nın bu özelliği demir (Fe^{+2}) ve bakır (Cu^{+}) gibi birçok katyonik iyonun bağlanmasına olanak sağlar. Diğer yandan, deoksiriboz şeker molekülü de demir bağlama özelliğine sahiptir. Bu durum, DNA yapısında 'bölge-spesifik' hidroksil radikali ataklarına olanak sağlamaktadır (93) (**Şekil 15**).



Şekil 15. Hidroksil radikalının DNA'da atak yaptığı bölgeler (11)

2.2.2.1. DNA Nükleozid Hasarları

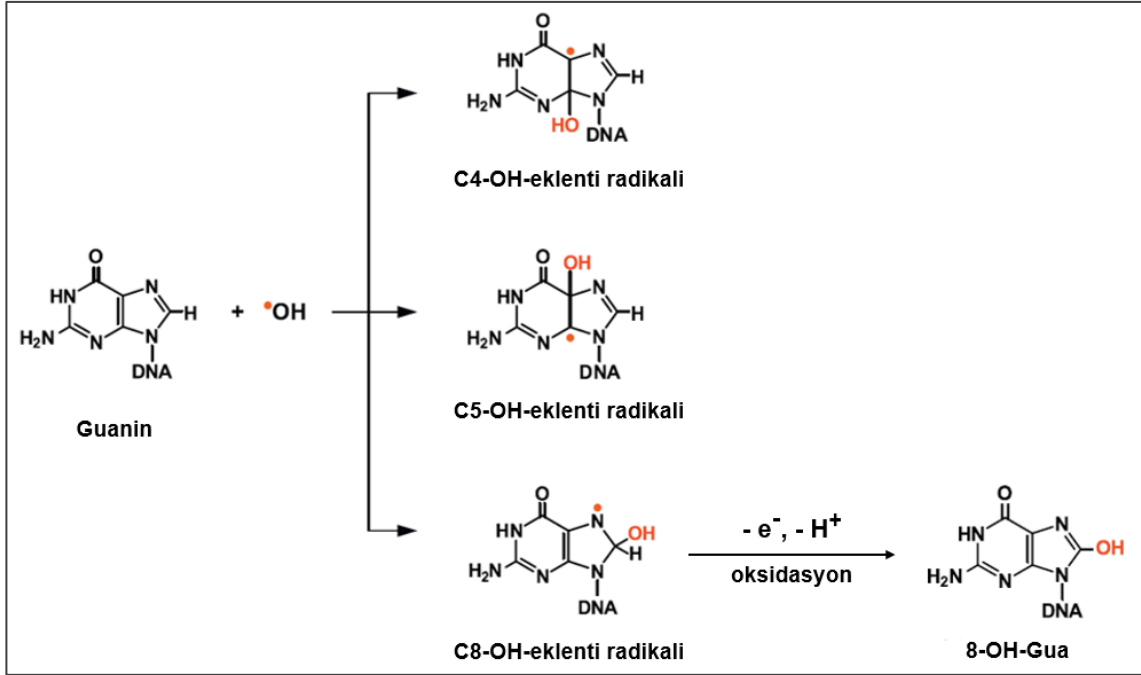
Oksidatif hasar ile oluşan 30'dan fazla nükleobaz modifikasyonu olduğu bilinmektedir (99). Oluşan bu hasarlı DNA ürünleri DNA polimerazın etkisine bağlı olarak ölümcül ve/veya mutajenik olabilmektedir. Guanin (G, Gua) bazı, dört DNA bazı içinde en düşük redoks potansiyeline sahip olanıdır. Bu sebeple diğer bazlara göre çok daha kolay okside olur. Guaninden türev alan bir lezyon olan 8-hidroksiguanin (8-OH-Gua), en yaygın bulunan ve literatürde en çok çalışılan hasarlı DNA bazıdır. Diğer yandan, adeninden (A, Ade) türev alan 8,5'-siklopürin-2'-deoksiadenozinler (cdA) ise aynı nükleozidin hem baz hem de şeker biriminde eş zamanlı oluşan hasar nedeniyle özgün bir nükleozid hasarıdır (11,99).

2.2.2.1.1. 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG)

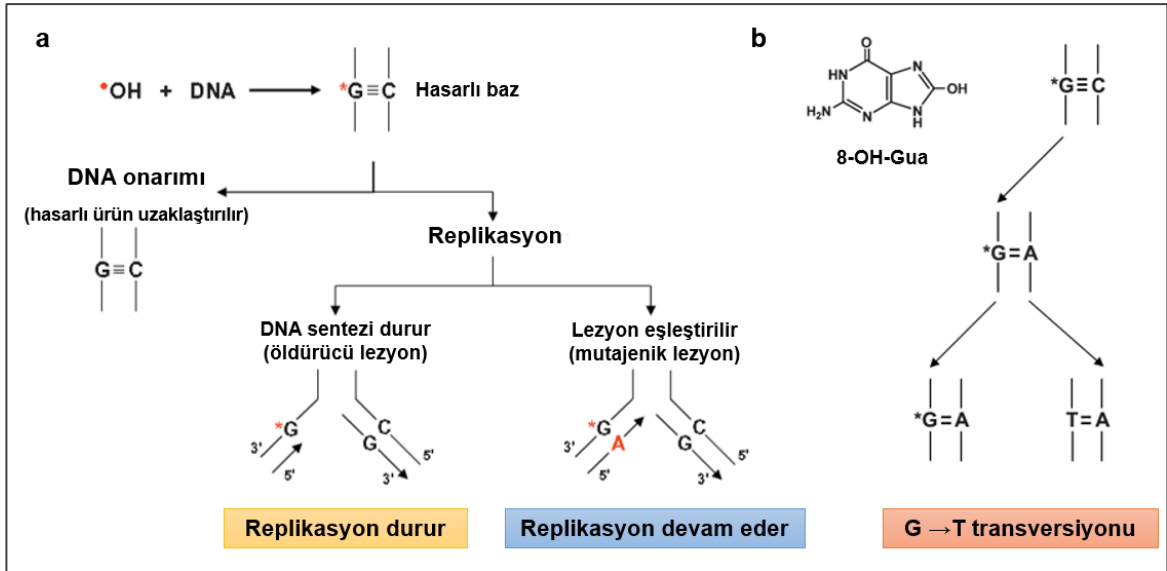
8-hidroksi-deoksiguanozin, ilk olarak 1980'li yılların başında Japon araştırmacılar tarafından *in vitro* çalışmalar ile tanımlanmıştır (100,101). 8-OH-dG, 8-OH-Gua radikalinin şeker yapısı ile bağlı olan nükleozid formudur. 8-OH-Gua ve 8-OH-dG, stabil yapıları ve kolayca oluşma potansiyelleri ile DNA'nın oksidatif hasar tipleri arasında en sık karşılaşılan ürünlerdir (102,103). Ayrıca, 8-OH-dG'nin kolay ölçümü ve güçlü mutajenik özellikleri nedeniyle, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda en çok araştırılan DNA ürünü olmuştur (96).

Guanin bazı düşük redoks potansiyeli nedeniyle, iyi bir elektron vericisidir ve kolayca hidroksil radikali tarafından okside edilebilir (96,104). Hidroksil radikalinin guanin bazı ile reaksiyonu sonucu oluşan ana ürün 8.karbon (C8) eklentili radikaldir. Bu radikalin bir elektron ve bir proton kaybetmesi ile 8-OH-Gua oluşur (**Şekil 16**). 8-OH-Gua'nın normal oluşum düzeyi, nükleer DNA için her 10^6 guanin kalıntısında 0.3 ila 6 baz iken, mitokondriyal DNA için her 10^5 guanin kalıntısında 1-3 baz'dır. Ortalama olarak, bir hücre içinde her gün 10^5 8-OH-Gua kalıntısı üretildiği belirtilmektedir (99,105–107).

8-OH-Gua'nın mutajenik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. DNA replikasyonu sırasında, adenin ile yanlış eşleşerek guanin → timin (G→T) transversiyonuna neden olmaktadır (108) (**Şekil 17**). 8-OH-dG, başlıca baz kesip çıkarma onarımı (BER) mekanizması ile DNA zincirinden kesilir. Kesildikten sonra başka hiçbir reaksiyona katılmaz. Metabolik bir son ürün olarak, 8-OH-dG seviyesi stabil seviyede tutulur ve diyet gibi faktörlerden etkilenmez. Yarı ömrünün diğer oksitlenmiş ürünlerden daha uzun olması sebebi ile de klinik olarak kolayca saptanabilir (105). Ayrıca, 8-OH-Gua oksidatif stresin ana biyobelirteçlerinden biri olarak kabul edilmektedir (99).



Şekil 16. 8-OH-Gua oluşum mekanizması (11)



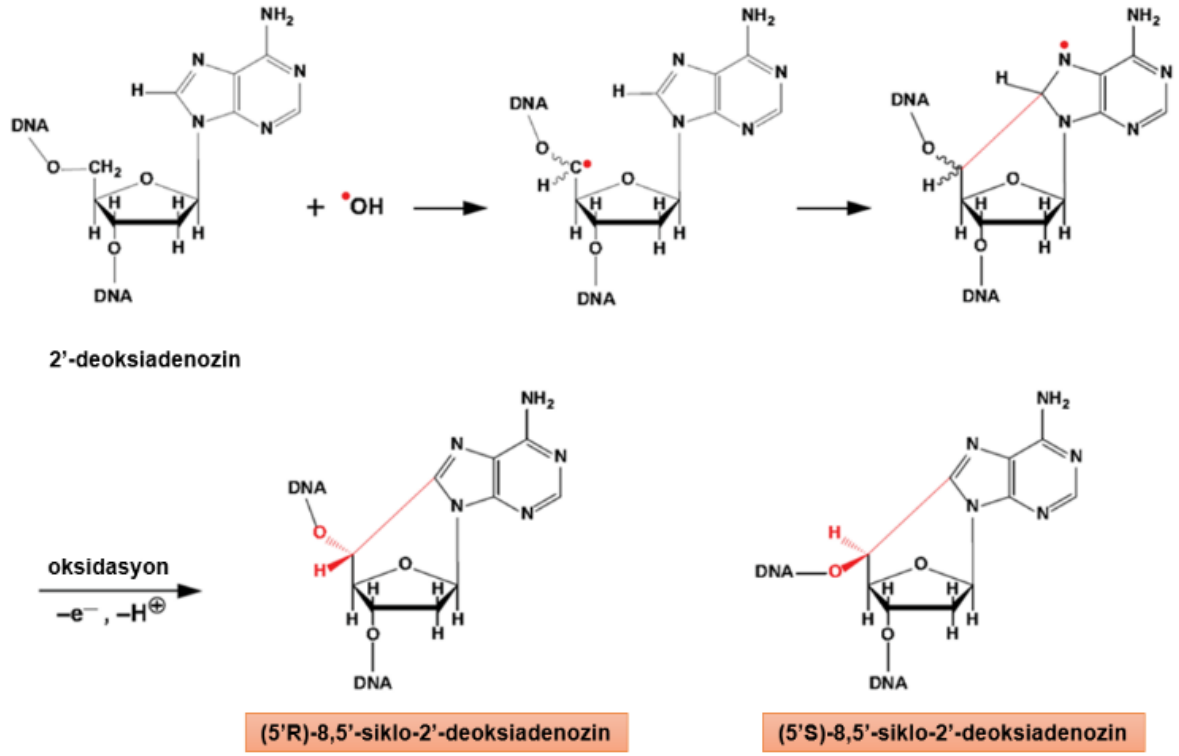
Şekil 17. 8-OH-Gua'nin **a)** onarımı ve replikasyona etkisi, **b)** yanlış eşleme sonrası G→T transversiyonu (11)

2.2.2.1.2. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (*R*-cdA ve *S*-cdA)

8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler, hidroksil radikalının oksijen yokluğunda aynı nükleozid içindeki şeker molekülünün 5. karbon atomu ile (C5') adenin bazının 8. karbonu (C8) arasında kovalent bağlı halkasal yapı oluşturması ile meydana gelirler (**Şekil 18**). Bu yapı aynı anda hem baz hem de şeker molekülünde hasar oluşması nedeniyle benzersizdir ve tandem lezyon olarak adlandırılır. Oksijenin varlığı bu reaksiyonu inhibe ederek, C5'-merkezli radikallerin oluşumunu sağlar (13,109).

8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler 5'*R* ve 5'*S* olmak üzere iki diasteriomer olarak bulunur ve birçok farklı hücre ve organizmada *in vivo* ve *in vitro* olarak gösterilmiştir (13,15,110). Çift zincirli DNA yapısında *S*-diasteriomerlerin oluşumu *R*-diasteriomerlere göre tercih edilir. Her iki diasteriomerde DNA'nın çift sarmal yapısını eşit derecede bozmaktadır (111). 5'*S* diasteriomerin insan kan, meme ve fare karaciğeriindeki düzeyleri 0.26-0.70 lezyon/10⁷ nükleozid aralığında olduğu belirtilmektedir (13,112,113). 8-OH-dG düzeyi, 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinlere göre 10-20 kat daha fazladır (95).

Günümüzde bu lezyonlar oksidatif stres için güçlü biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir ve hücrelerdeki onarım mekanizmalarına karşı dirençli olmaktadır (114). 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler spesifik olarak nükleotid kesip çıkarma onarım (NER) mekanizması tarafından onarılırlar. Ancak, son zamanlarda çift iplikli DNA'nın 3' terminal bölgesinde bulunan *S*-cdA'nın BER mekanizmasında anahtar rol oynayan apürinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1) tarafından da onarıldığı rapor edilmiştir (115–117). Onarılamayan ve bu nedenle biriken 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler yaşayan hücreler için zararlı sonuçlara neden olabilir. Yapılan son çalışmalarda, *S*-cdA'nın transkripsiyonu bloke ettiği, DNA polimerazları inhibe ettiği ve transkripsiyonel mutageneze neden olduğu gösterilmiştir (115,116,118).



Şekil 18. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinlerin oluşum mekanizması (11)

2.2.2.1.3. DNA Nükleozid Hasarının Ölçüm Yöntemleri

Oksidatif DNA hasarının ölçümü için geçmişte çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan en çok bilinenler immünokimyasal yöntemler, tek jel hücre elektroforezi, ELISA, DNA onarım enzimlerinin kullanıldığı alkali elüsyon, ince tabaka kromatografi, yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC)'dir. Genel olarak, bu teknikler ölçülen analitlerin yapısal tanımlaması yapılmadan ve tek bir hasar ürününün ölçülmesi ile analiz yapmaktadır. Kütle spektrometrik (MS) teknikler, diğerlerinin aksine ölçülen analitin hem yapısal tanımlamasını hem de stabil izotop işaretli internal standartlar kullanarak tam kantitasyonunu gerçekleştirir. Kompleks karışımlarda yapılan analizlerde gaz kromatografi (GC-MS), veya sıvı kromatografi (LC-MS) ile birlikte kullanılmaktadır (98,119).

Son dönemlerde DNA hasarı ile ilgili yapılan çalışmalarda görece kolay ölçümü ve güçlü mutajenik etkisi nedeniyle en çok araştırılan parametre 8-OH-dG'dir. Ancak biyobelirteç olarak tek bir DNA hasar ürününün ölçümü, DNA yapısında dört bazda aynı anda oluşan serbest radikal kaynaklı geniş hasarın gözden kaçmasına yol açabilir. Ayrıca, hasarın onarım mekanizmaları ile birlikte değerlendirilmesi objektif sonuçlar elde edilmesi açısından son derece önemlidir (12). DNA hasar ürünlerinin belirlenmesinde Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (ESCODD) tarafından referans yöntem olarak kabul edilen ve birden fazla DNA hasar ürününün ölçümüne olanak sağlayan stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme-tandem kütle spektrometri (SID-MRM-MS/MS) yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle giderek immunohistokimya, ELISA, tek hücre jel elektroforezi (comet analiz) gibi duyarlılığı görece düşük veya semikantitatif yöntemlerin yerini almaktadır (11,15,120)

2.2.3. DNA Onarımı

DNA onarımı yaşam için esansiyeldir. Bu yüzden, onarılmamış DNA lezyonları canlı organizmalarda hasar verici sonuçlara neden olabilir. Bu tür lezyonlar genomda birikerek, giderek artan mutasyon oranına ve genomik kararsızlığa yol açar (11,121). Genomik kararsızlık DNA replikasyonu, DNA onarımı, apoptoz, hücre döngüsü regülasyonu ve kromozomal kararlılık ile ilişkili proteinleri etkiler (122).

DNA onarım mekanizmaları altı başlık altında toplanabilir.

- Doğrudan onarım
- Baz kesip çıkarma onarımı (BER)
- Nükleotid kesip çıkarma onarımı (NER)
- Yanlış eşleşme onarımı
- DNA çift zincir kırığı onarımı
- Çapraz bağların onarımı

Okside DNA baz lezyonları temelde iki şekilde uzaklaştırılırlar: bir glikozilaz aktivitesi tarafından tek bir lezyonun uzaklaştırılması ile ilişkili baz kesip çıkarma onarımı ve hasarlı lezyonu içeren bir oligonükleotidin uzaklaştırılması ile ilişkili daha karışık bir proses olan nükleotid kesip çıkarma onarımıdır (123). Nükleotid kesip çıkarma onarımında hasarlı bazlar, çok alt birimli bir enzim sistemi olan “kesip çıkarma nükleazları” ile uzaklaştırılır. Nükleotid kesip çıkarma onarımı beş temel basamakta gerçekleşir (124). Bunlar; a) hasarın tanınması, b) ökaryotlarda lezyon bölgesinin içinde olduğu 24-32 nükleotidlik oligomerin kesilmesi, c) kesilen oligomerin çıkarılması, d) oluşan boşluğun DNA polimeraz tarafından doldurulması ve e) ligasyondur.

2.2.3.1. Baz Kesip Çıkarma Onarımı (BER)

Baz kesip çıkarma onarımı mekanizması, hasarlı DNA lezyonlarının spontan oluşan abazik bölgelerin ve tek zincir kırıklarının onarımında rol oynar (125). BER'de meydana gelen defektler, kansere karşı duyarlılık ve nörodejeneratif bozukluklar ile ilişkilendirilmiştir (126).

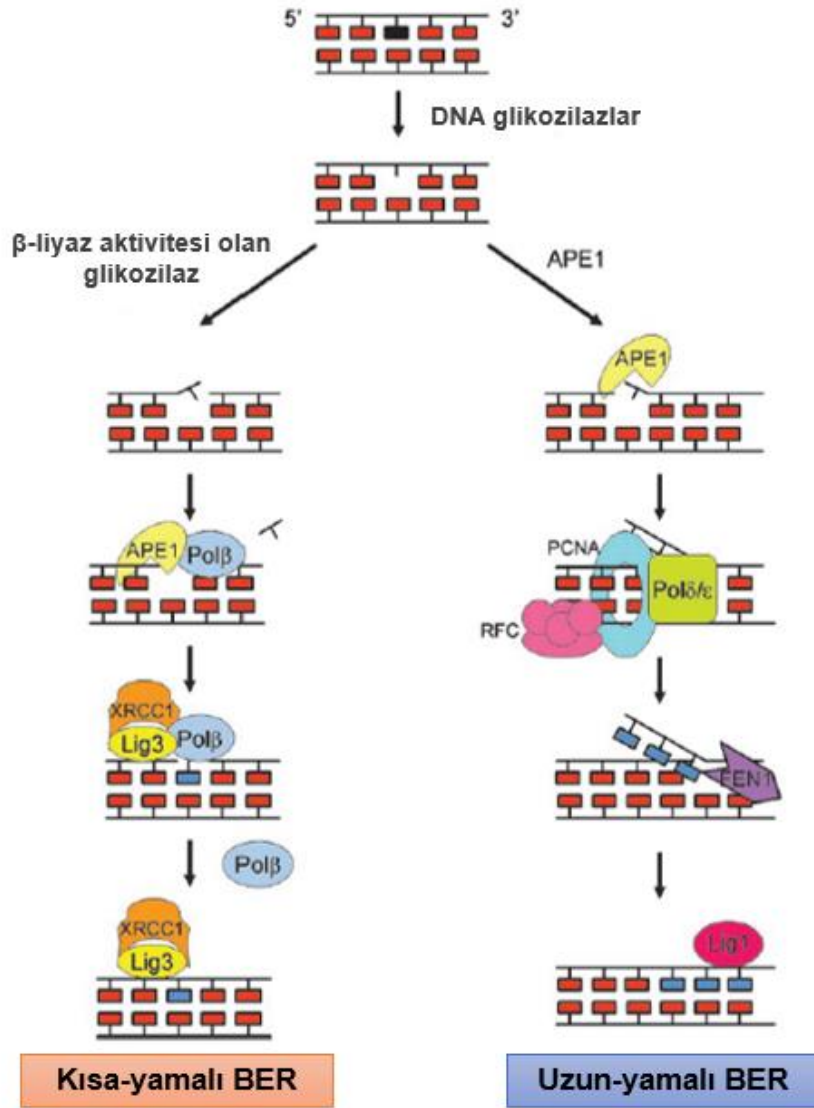
BER yolağı, başlıca dört temel basamakta gerçekleşir (**Şekil 19**).

1) Hasarlı bazın tanınması ve uzaklaştırılması: Hasarlı baza spesifik olan DNA glikozilazlar (tek- ya da iki-fonksiyonlu), hasarlı bazları tanıyarak, baz ve şeker birimleri arasındaki N-glikozidik bağı hidroliz ederler. Yalnızca glikozilaz aktivitesine sahip “tek-fonksiyonlu” glikozilazlar; urasil-DNA glikozilaz (UNG) ve N-metilpürin-DNA glikozilaz (MPG)’dır. 8-hidroksiguanin DNA glikozilaz (OGG1), mutY homolog (MUTYH), endonükleaz III-benzeri 1 (NTH1) ve endonükleaz VIII-benzeri 1 (NEIL1) gibi “iki-fonksiyonlu” DNA glikozilazlar ise, hem glikozilaz aktivitesi hem de 3’ AP liyaz aktivitesi sergiler. Her bir glikozilaz kendi substratı için yüksek seçiciliğe sahiptir (125,127).

2) Abazik bölgenin oluşumu: Tek-fonksiyonlu glikozilazlar hasarlı bazın uzaklaştırılması ile hidrolitik bir AP [abazik, (apürinik/apirimidinik)] bölgesi oluştururlar. Oluşan abazik bölgenin 5’ ucu apürinik/apirimidinik endonükleaz 1 (APE1) tarafından kesilir. Böylece 5’-deoksiriboz-5-fosfat ve 3’-hidroksil zincir kırığı ürünü oluşur (125). AP liyaz aktivitesi olan glikozilazlar ise, bir β -eliminasyon reaksiyonu vermek üzere AP deoksiriboz şekerin 1’-aldehiti ile bir schiff bazı oluşturur. Bu eliminasyon yolu ile DNA’nın 3’ ucundan kırılma gerçekleşir (124). APE1, 3’-fosfodiesteraz aktivitesi sayesinde β -eliminasyon ile oluşturulan aldehit kalıntısını uzaklaştırır. AP bölgesi, spontan olarak ya da N-glikozidik bağı hasar görerek hidroliz olması ile de yüksek sıklıkla oluşabilmektedir. Çeşitli sıçan dokularında ve insan karaciğerinde AP bölgesinin kararlı hal düzeyinin hücre başına 50.000 – 200.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir. AP bölgeleri normal DNA replikasyonunu bloke eden, sitotoksik ve mutajenik sonuçlara neden olan oldukça tehlikeli lezyonlardır (125,126,128).

3) Doğru bazın yerleştirilmesi: AP bölgesi oluşturulduktan sonra, onarım mekanizması iki farklı yoldan devam eder. Kısa-yamalı BER yolağında, yalnızca hasarlı olan tek nükleotidin uzaklaştırılması sağlanır. Uzun-yamalı BER yolağında ise, hasarlı nükleotidin içinde bulunduğu 2-13 nükleotidlik bölge onarılır. Kesip çıkarılan nükleotid bölgeleri kısa-yamalı BER’de DNA polimeraz β ile doldurulur. Uzun-yamalı BER mekanizmasında ise, DNA polimeraz δ/ϵ ile birlikte diğer proteinlerde kesilen bölgenin onarılmasında rol oynar. 5'-ucunda kalan kesilmiş oligonükleotid endonükleaz FEN1 tarafından uzaklaştırılır (129).

4) Ligasyon: Son basamakta DNA zincirinin birbirine bağlanması için gerekli olan fosfodiester bağlarının oluşumu DNA ligaz enzimleri ile gerçekleştirilir. Kısa-yamalı BER yolağında, Ligaz 3 ile XRCC1 kompleksi, uzun-yamalı yolakta ise Ligaz 1 enzimi görev almaktadır.

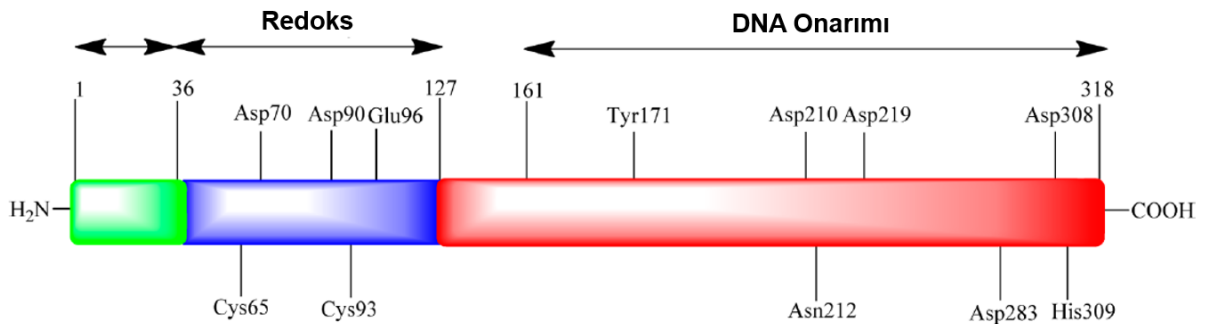


Şekil 19. Baz kesip çıkarma onarım mekanizması (124)

2.2.3.2. Apürinik/apirimidinik Endonükleaz 1 (APE1)

APE1, 318 amino asit içeren 35 kDa moleküler ağırlığında globüler bir proteindir (**Şekil 20**) (130). APE1 proteinini kodlayan gen 14. kromozomun q11.2 bölgesinde lokalizedir. 2.6 kilobaz uzunluğunda ve dört intron, beş ekzon bölgesi içerir (131,132). APE1 çoğu hücre tipinde eksprese edilmektedir ve her hücrede 10^5 - 10^6 molekül düzeyinde bulunmaktadır. Yarılanma ömrü 8 saattir. Hem sitoplazmada hem de nükleusda yer alır. Ancak, sitoplazmada nükleusa oranla daha yüksek düzeylerde (130).

APE1 proteininin N-terminal bölgesinin ilk 35 amino asitlik kısmı protein-protein etkileşimleri ve RNA bağlanma aktivitesi ile ilişkilidir. Bu bölge oksidatif stres altında sitoplazmik APE1'in nükleusa transferinde önemli bir rol oynar. C-terminal bölgesindeki 161-318 amino asitlik kısım, BER yolağındaki DNA onarım aktivitesinden sorumludur. N-terminaldeki 36-127 amino asitin bulunduğu bölge ise, çeşitli transkripsiyon faktörlerinin redoks regülasyonunda temel rol oynar. Bu tür redoks regülasyonu hücre büyümesi, anjiyogenez, inflamasyon, apoptoz gibi süreçlere katkı sağlar. APE1, indirgenmiş inaktif haldeki transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirerek DNA'ya bağlanmalarını artırır. Bu nedenle, APE1 redoks efektör faktör 1 (Ref-1) olarak da adlandırılmaktadır. DNA onarımı ve redoks regülasyonu fonksiyonları birbirinden bağımsızdır (130,133,134).

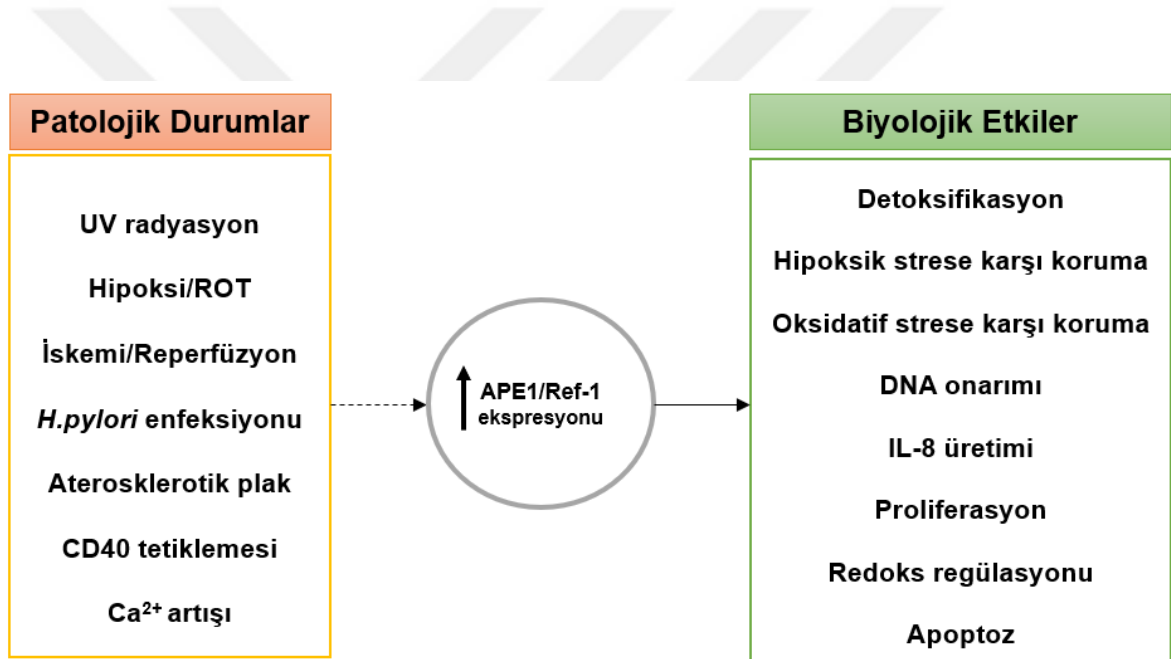


Şekil 20. İnsan APE1 proteininin yapısı (130)

APE1 multifonksiyonel bir proteindir. Baz kesip çıkarma onarımında anahtar bir role sahiptir. 5'-endonükleaz aktivitesine ek olarak, daha az olacak şekilde 3'-fosfodiesteraz, 3'-diesteraz, 3'-fosfataz, 3'→5'-ekzonükleaz ve nükleotid kesme onarımı (NIR) aktivitelerine de sahiptir. APE1, DNA'daki kodlamayan abazik bölgelerin tanınması ve kesilmesinden sorumlu birincil enzimdir (132,135).

APE1 gen ekspresyonu transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel düzeyde düzenlenmektedir. Hidrojen peroksit ve hipokloröz asitin APE1 gen ekspresyonunu arttırdığı belirtilmektedir. Ayrıca, oksidatif stres de ekspresyonunu uyarmaktadır (130).

Şekil 21'de APE1'in ekspresyonunu arttıran patolojik durumlar ve biyolojik etkileri gösterilmektedir.

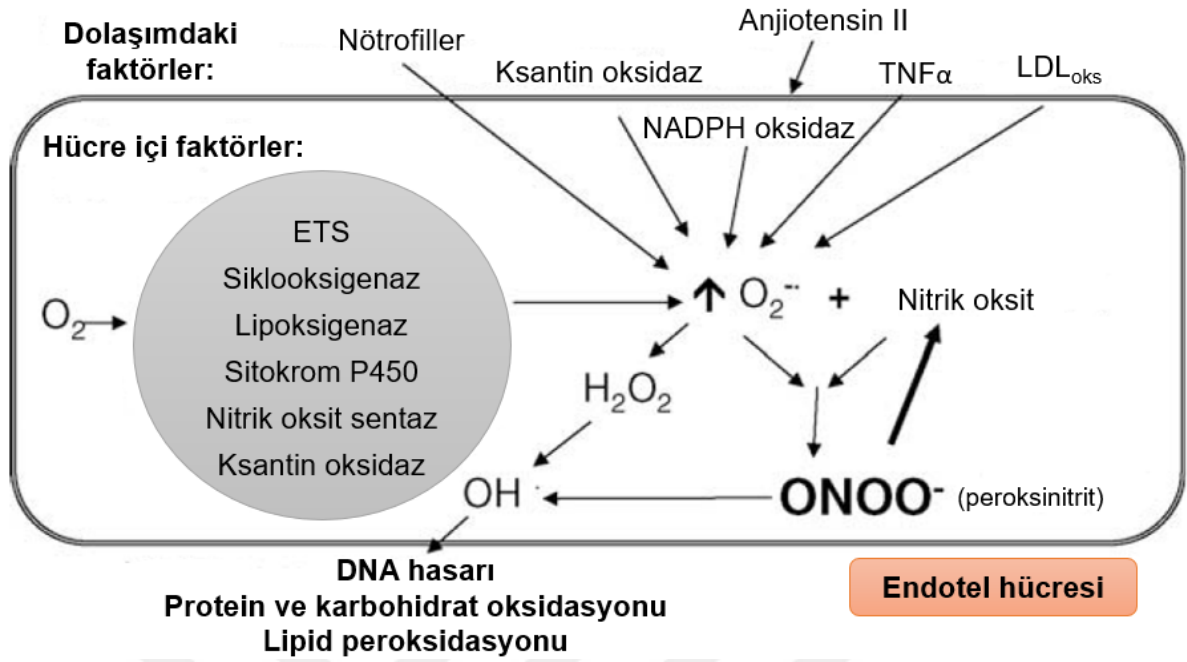


Şekil 21. APE1'in ekspresyonunu etkileyen durumlar ve biyolojik etkileri (130)

2.3. İnsan Endotel Hücresi

Endotel hücreleri, kan damarlarının iç yüzeyini astar gibi saran hücrelerdir. Dolaşımdaki kan ve vasküler boşluk arasındaki arayüzde stratejik olarak konumlanmıştır. Bu nedenle, potansiyel olarak vücuttaki her hücreye erişimi mümkündür. Endotel hücreleri, çeşitli dolaşım moleküllerini doğrudan dolaşıma salgılamaktadır. Bununla birlikte, endotel hücreleri hücresel ve çözünür plazma bileşenleri (örneğin sitokinler, lipoproteinler, trombositler, lökositler, plasental membranlar, antikorlar ve diğer dolaşım faktörleri) için önemli bir hedeftir (136,137).

Endotel hücresi, fizyolojik hemostaz, kan damarı geçirgenliği ve kan damarının diğer fizyolojik ve patolojik uyaranlara verdiği yanıtta önemli bir rol oynar (137). Normal fizyolojik koşullar altında endotel, homeostatik dengeyi sağlar (136). Makromoleküllerin ve dolaşımdaki hücrelerin kandan dokulara geçişini düzenleyen vasküler endotel hücresi, çeşitli hastalıkların ve patofizyolojisinde kritik rol oynayan oksidatif stresin ana hedefidir (**Şekil 22**). Reaktif oksijen türlerinin yüksek konsantrasyonları hücre hasarına ve ölümüne yol açmaktadır (138). Sistemik inflamasyon sırasında, kan dolaşımında bulunan reaktif oksijen türleri kan damarlarının iç duvarındaki endotelial hücreler ile doğrudan etkileşime girer. Bu şekilde endotel hücrelerde hücre içi oksidatif stresi artırır. Ayrıca, reaktif oksijen türleri endotel hücre içinde de üretilebilir ve böylece hücre içi oksidatif stres düzeyini yükseltir (139). Bu nedenle, vasküler endoteldeki akut ve kronik oksidatif stres, vasküler endotelin disfonksiyonunda ciddi nedensel bir etkidir. Özellikle, oksidatif stres durumu vasküler endotelial geçirgenliği artırır ve endotelial sinyal iletimindeki değişiklikler ile ilişkili olan lökosit adezyonunu destekler (136). Endotel hücre yapısının ve fonksiyonunun anormallikleri, tromboz, ateroskleroz ve vaskülit gibi kan damarı duvarları hastalıklarına önemli ölçüde katkı sağlar. Endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, obezite ve diyabetten preeklampsiye kadar birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir (130,137,138,140).



Şekil 22. Endotel hücresinde oksidatif stres kaynakları (136)

İnsan umbilikal ven endotel hücresi (HUVEC), göbek kordonu damarlarındaki endotelden türev alan hücrelerdir. HUVEC, oksidatif stres, anjiyogenez, hipoksi ve inflamasyon gibi süreçlerde endotel fonksiyonunun ve hastalıkların çeşitli yönlerinin araştırılmasında klasik bir model sistemi sağlar (141). Özellikle, HUVE hücreleri reaktif oksijen türlerinin neden olduğu oksidatif hasarın önlenmesi için çeşitli antioksidanların endotel hücreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmalarda iyi bir model oluşturmaktadır (142). Diğer yandan endotel hücreleri, yüksek genomik kararlılıkları ve direnç geliştirmeye eğilimlerinin düşük olması nedeniyle birçok terapötik ajan için de cazip hedeflerdir (2).

Tüm bu nedenlerle, çalışmamızda kalsitriol ve parikalsitolün H₂O₂ aracılı oksidatif DNA hasarı ve DNA onarımı üzerine olası yararlı etkilerini araştırmak amacıyla oksidatif stresin ana hedeflerinden biri olan insan umbilikal ven endotel hücre hattını kullanmayı tercih ettik.

2.4. D Vitamininin Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımındaki Rolü

Oksidatif stres; reaktif oksijen türlerinin geçici veya kronik olarak artan konsantrasyonu nedeniyle hücresel metabolizmanın bozulduğu ve DNA, protein gibi önemli biyomoleküllerin hasara uğradığı bir durumdur (86). Hücrelerde meydana gelen oksidatif stres, DNA hasarını artırır ya da hasarın onarımını engelleyerek telomer kısalmasını, çeşitli mutasyonları, fenotipik değişimleri ve apoptozu uyarır. Tüm bu fonksiyonel etkiler yaşlanma, karsinogenez, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi metabolik hastalıkların patogenezinde ve/veya progresyonunda direkt ya da indirekt olarak rol oynamaktadır (7,143). Oksidatif stresin değerlendirilmesinde, hücre yaşamı için esansiyel olan DNA yapısında meydana gelen hasarın ölçümü oldukça değerlidir. Ayrıca, hasarlı DNA ürünleri organizmadaki oksidatif DNA hasar oluşumu ve DNA onarım hızı arasındaki dinamik dengenin en duyarlı göstergeleridir.

D vitamini eksikliğinin oksidatif stres ile ilişkili kronik hastalıkların gelişiminde rol oynadığı düşünülmektedir. D vitamini eksikliğinin dünya çapındaki yüksek prevalansı ve oksidatif stresin yol açtığı genomik kararsızlığın hayati öneme sahip olması nedeniyle, D vitamini ve oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişki son yıllarda dikkati çekmektedir. D vitamini eksikliğinin tedavi edilebilir ve hatta önlenebilir olması, D vitamini ve oksidatif stresin neden olduğu patolojik durumlar arasındaki ilişkinin araştırılmasında büyük önem taşımaktadır (6,7).

Literatürde D vitamini ve DNA hasarı/onarımının incelendiği sınırlı sayıda insan ve hayvan çalışmalarında çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (6,7,9,144–149). Yapılan bu çalışmaların birçoğunda oksidatif DNA hasarı, duyarlı olmasına rağmen tekrarlanabilirliği düşük ve fizyolojik değişikliklerden etkilenen tek hücre jel elektroforezi ile ve genellikle tek bir hasar ürününün ölçümü ile değerlendirilmiştir.

Hücre kültüründe yapılan çalışmalar incelendiğinde, ağırlıklı olarak kanser hücre hatları kullanılmış ve UV ışınları ile oluşan DNA hasarı ve onarımını değerlendiren çalışmalar yapılmıştır (60,150–158). Bu çalışmalarda DNA hasarı genellikle 8-OH-dG, timin dimerleri ve DNA çift zincir kırıkları tek hücre jel elektroforezi ya da immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Ancak, yapılan literatür araştırmasında, oksidatif stresin ana hedeflerinden biri olan ve birçok kronik hastalık

ile yakından ilişkisi bulunan endotel hücresinde, D vitamininin oksidatif DNA hasarına ve onarımına etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Tüm bu bilgiler ışığında, çalışmamızda kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarı ve onarımı üzerine olası etkilerini hasarlı DNA nükleozidleri 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA'nın ölçümü ve BER mekanizmasında rol oynayan APE1 ekspresyon düzeyleri ile inceledik.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Ocak 2013-Eylül 2014 tarihleri arasındaki süreçte, tez önerisi ve etik kurul başvuruları yapıldı, kabulleri alındı ve BAP proje başvurusu tamamlandı. Deneysel çalışmalar Eylül 2014-Mart 2018 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmanın hücre kültürü çalışması olması nedeniyle evreni ve örneklemini bulunmamaktadır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışma materyali olarak insan umbilikal ven endotel hücre (HUVEC) hattı kullanılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımlı değişkenleri; hücre canlılığı, reaktif oksijen türlerinin düzeyi, hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeyleri ve mRNA ekspresyon değişimleridir.

Araştırmanın bağımsız değişkenleri ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), kalsitriol ile parikalsitolün farklı dozları ve VDR antagonistidir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tablo 4. Çalışmada kullanılan sarf malzemeler

Malzeme Adı	Markası/Kod	Kullanım Amacı
İnsan umbilikal ven endotel hücresi (HUVEC)	Gibco, C-003-5C	Çalışmalarda kullanılan hücre
Hidrojen peroksit	Merck,1072091000	Oksidatif stres oluşturma ajanı
Kalsitriol	ChemCruz, SC-202877	Etkisi araştırılan ajan
Parikalsitol	Abbvie, Zemplar 5µg/1 mL	Etkisi araştırılan ajan
VDR Antagonisti, ZK 159222	Bayer Shering Pharma	VDR antagonisti olarak etkisi araştırılan ajan
Endotel hücre büyüme ortamı	Gibco, Medium200	Hücrelerin büyümesi için bazal ortam
Ham's F12 hücre büyüme ortamı	Gibco, 21765-029 Millipore, FG0815	Hücrelerin büyümesi için bazal ortam
Düşük serum büyüme ilavesi (LSGS)	Gibco, S-003-10	Büyüme ortamına eklenen büyüme ilavesi
Penisilin/Streptomisin	Gibco, 1514-0122	Büyüme ortamına eklenen antibiyotik
L-glutamin	Gibco, 25030024	Büyüme ortamına eklenen aminoasit
Fetal dana serumu (FBS)	Gibco,10270106	Büyüme ortamına eklenen serum
Fosfat tamponu (PBS)	Gibco, 10010023	Hücrelerin yıkanması için kullanılan tampon
Tripsin/EDTA	Biochrom, L2143	Hücrelerin kaldırılması
Tripsin nötralize edici solüsyon	Gibco, R-002-100	Tripsinin etkisini nötrleme
Tripan mavisi	Gibco, 15250-061	Hücre sayımı
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Appllichem, A3672.0050	Hücrelerin dondurulması ve kimyasal hazırlığı
Ultra saf su	Gibco, A12873-01	Kimyasal hazırlığı
Etanol moleküler biyoloji grade	Merck, 1085430250	Kalsitriolün hazırlığı
Propilen glikol	Sigma, P4347	Parikalsitolün hazırlığı

Diklorofluoresin diasetat (DCFH-DA)	Sigma, D-6883	Reaktif oksijen türlerinin ölçümü
WST-1 hücre proliferasyon solüsyonu	Roche,11644807001	Hücre canlılığı analizi
Genomik DNA izolasyon kiti	Macherey-Nagel, 740952.50	DNA izolasyonu
Tris	Sigma, T1503	Kütle spektrometrik analiz
Sodyum asetat 3 hidrat	Sigma, S-8625	Kütle spektrometrik analiz
Çinko klorür	Applichem, A6285.0500	Kütle spektrometrik analiz
Fosfodiesteraz	Sigma, P3243	Kütle spektrometrik analiz
Alkalen fosfataz	Roche, 10108138001	Kütle spektrometrik analiz
Nükleaz P1	US Biological, L14041870	Kütle spektrometrik analiz
Filtreli ependorf, 3 kDa	Pall, Nanosep	Kütle spektrometrik analiz
Asetonitril LC grade	Merck, 106018.2500	Kütle spektrometrik analiz
Metanol LC grade	Merck, 106018.2500	Kütle spektrometrik analiz
Cell lizis kiti	Roche, 06366821001	RT-PCR çalışmaları
cDNA sentez kiti	Roche, 07912439001	RT-PCR çalışmaları
Primer problar	Roche, 05532957001	RT-PCR çalışmaları
Prob master	Roche, 04707494001	RT-PCR çalışmaları
Cryo vial	Greiner, 122278	Hücrelerin dondurulması
96 kuyucuklu plak, koyu	Greiner, 655086	Reaktif oksijen türlerinin ölçümü
96 kuyucuklu plak	Jet Biofil, TCP 011096	WST-1 analizi
6 kuyucuklu plak	Jet Biofil	RT-PCR analizi
25 cm ² ve 75 cm ² flask	Corning, 430639, 431464U	Hücrelerin büyütülmesi ve LC-MS/MS analizleri
15 ml ve 50 mL falkon	Isolab, Corning	Genel kullanım
5 mL ve 10 mL serolojik pipetler	Jet Biofil, Sarstedt	Genel kullanım
Neubauer lamı	Marienfeld, 0640110	Hücre sayımı

Tablo 5. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
Laminar akımlı kabinet	Heraus, HERAsafe, class 2	Hücre kültürü çalışmaları
CO2 inkübatörü	Thermo Scientific, 311	Hücrelerin büyütülmesi
Ters faz ışık mikroskobu	Nikon, Eclipse TS100	Hücrelerin gözlemlenmesi
Sıvı kromatografi (LC)	Shimadzu LC-20AD	Kütle spektrometrik analiz
Tandem kütle spektrometre (MS/MS)	Applied Biosystem, 4000 QTRAP	Kütle spektrometrik analiz
SpeedVac	Thermo, Savant ISS110	Örneklerin konsantre edilmesi
Mikroplak okuyucu	BioTek, Synergy HT	Reaktif oksijen türleri ölçümü
Hassas terazi	Precisa, XB220A	Kimyasal tartımı
pH metre	J.P. Selecta, 4120500	Kimyasal hazırlığı
Otoklav	Hirayama, HICLAVE HV-50	Sterilizasyon
Su banyosu	Memmert	Ortamların ısıtılması
Kuru blok ısıtıcı	WiseTerm, HB-48	Genel kullanım
RT-PCR cihazı	Roche, LightCycler 96	RT-PCR analizi
Nanodrop	Thermo, 2000	DNA miktarı ölçümü
Sabit açılı santrifüj	Heraeus, Biofuge stratos	Genel kullanım
Sabit açılı santrifüj	Hettich, 320R	Hücrelerin çöktürülmesi
Sıvı azot tankı (-196 °C)		Hücrelerin saklanması
Derin dondurucu -80 °C	Thermo Scientific, Forma 705	Hücrelerin saklanması
Derin dondurucu -20 °C	Uğur	Sarf malzemelerin saklanması
Buzdolabı +4 °C	Uğur	Sarf malzemelerin saklanması

3.6.2. Hücre Ortamlarının Hazırlanması

HUVE hücrelerinin büyümesi için %10 inaktive edilmiş FBS, %1 L-glutamin (2 mM) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/mL) içeren M200 ve Ham's F12 bazal kültür ortamları kullanıldı. Bazal ortamlar içerisine öncelikle HUVE hücrelerinin büyümesine yardımcı olan düşük serum büyüme ilavesi eklendi. Bu ilave içeriğinin son konsantrasyonları; %2 FBS, 1 µg/mL hidrokortizon, 10 ng/mL epitel büyüme faktörü, 3 ng/mL fibroblast büyüme faktörü ve 10 µg/mL heparindir.

3.6.3. Hücrelerin Çözülmesi, Sayımı, Pasajlanması ve Dondurulması

3.6.3.1. Hücrelerin Çözülmesi

Sıvı azot tankında veya -80 °C'de saklanan kriyo tüpler içindeki hücreler alındıktan sonra hızlıca 37 °C'de çözüldü. Hücre süspansiyonu, önceden 37 °C su banyosunda ısıtılan 8 mL büyüme ortamı içeren tüpe yavaşça aktarıldı. Tüp oda sıcaklığında 500 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek hücreler çöktürüldü. Santrifüj sonrası üst faz atılarak, dibe çöken hücre pelleti istenen hacimdeki büyüme ortamı ile süspanse edildi. Hücreler 25 cm² veya 75 cm² hücre flasklarına ekildi. Ters-faz ışık mikroskobu altında ekim yapılan hücre yoğunluğu incelendikten sonra flasklar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre kaldırıldı.

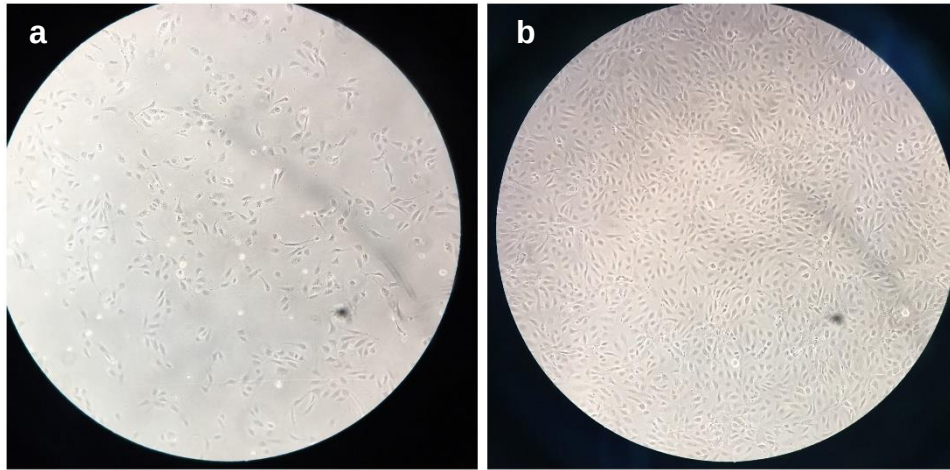
Ekimin ertesi günü hücre flasklarında yapışmayan ölü hücreleri temizlemek amacıyla hücre ortamları yenilendi. Sonrasında hücreler istenen konfluensiye ulaşmaya kadar iki günde bir yeni hücre ortamı eklendi.

3.6.3.2. Hücrelerin Sayımı ve Tripan Mavisi ile Hücre Canlılığının Kontrolü

Yeni çözülen hücrelerde ve konfluensiye ulaşan hücrelerin tripsin ile kaldırılması sonrasında %0.4 tripan mavisi kullanılarak hücre sayımı yapıldı. Bunun için büyüme ortamı ile süspanse edilen hücrelerden 20 µL alınarak 1:1 oranında tripan mavisi ile karıştırıldı. Karışımdan 10'ar µL alınarak Neubauer lamının iki tarafına pipetlendi. Ters faz mikroskobu yardımıyla canlı (renksiz) ve ölü (mavi renkli) hücreler sayıldı. Mililitredeki canlı ya da ölü hücre sayısı [(4 alandaki toplam hücre sayısı) / 4 x 10⁴ x seyreltme faktörü] formülünden hesaplandı. Her flask için 2 kere sayım yapılarak ortalama hücre sayısı kaydedildi. % hücre canlılığını belirlemek için; [(canlı hücre sayısı) / (ölü+canlı hücre sayısı) x 100] formülü kullanıldı.

3.6.3.3. Hücrelerin Pasajlanması

Kültür flasklarındaki hücreler yaklaşık %80-90 konfluensiye ulaştığında pasajlandılar (**Şekil 23**). Flasklarda bulunan eski hücre ortamları atıldıktan sonra, flask hacmine göre PBS ile yıkandı. 25 cm² flask için 1 mL, 75 cm² flask için 2.5 mL tripsin/EDTA eklenerek hücreler yaklaşık 1 dk 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası flask yüzeyinden kalkmamış olan hücreler flaskın yan yüzeyine hafifçe vurularak kaldırıldı. Tripsinin etkisini nötralize etmek amacıyla eklenen hacmin 2-3 katı kadar tripsin nötralize edici solüsyon eklendi. Hücreler steril falkon tüplere alınarak 500 rpm'de 15 dk santrifüjlendi. Üst faz uzaklaştırıldı ve hücre pelleti büyüme ortamı ile süspanse edildi. Hücre sayımı yapıldıktan sonra uygun oranda yeni steril flasklara bölünerek pasajlandı. Flaskların üzerine pasaj sayısı, pasaj oranı ve pasajlama tarihi yazılarak inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 23. HUVE hücrelerinin ters faz ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

a) Pasaj sonrası 1.gün hücre görüntüsü **b)** Pasaja hazır 3.gün hücre görüntüsü

3.6.3.4. Hücrelerin Dondurulması

Dondurulmaya hazır hücre pelleti en fazla 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde %10 FBS içeren tam ortam ile çözüldü. Hücre süspansiyonu üzerine 1:1 oranında %20 DMSO %80 FBS içeren dondurma ortamı eklenerek kriyo tüplere aktarıldı. Bu şekilde hücreler %10 DMSO ve %45 FBS ortamında dondurulmuş oldu. Kriyo tüplerin üzerine pasaj numarası, pasaj oranı ve dondurma tarihi yazılarak içerisinde izopropanol

bulunan kriyo kutusu (Mr. Frosty) içerisine kondu. -80 °C’de yavaşça dondurulduktan sonra, uzun süreli saklama için sıvı azot içerisine alındı.

3.6.4. Reaktiflerin Hazırlanması

3.6.4.1. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)’in Hazırlanması

Oda sıcaklığında depolanan H₂O₂ %30’luk (9.79 M) çözelti halinde temin edildi. 500 mM ve 10 mM H₂O₂ ara stok çözeltileri steril saf su ile hazırlandı. Deneyler için kullanılacak H₂O₂’in uygulama süresi ve IC₅₀ (%50 hücre canlılığını inhibe eden) dozunu belirlemek amacıyla, 50 µM - 1000 µM aralığında değişen H₂O₂ dozları %2 FBS içeren hücre ortamı ile dilüe edilerek hazırlandı.

3.6.4.2. DCFH-DA Reaktifinin Hazırlanması

2’,7’-diklorofluorescein diasetat (DCFH-DA) reaktif oksijen türlerinin ölçümü için kullanılan bir reaktiftir. 50 mg DCFH-DA, DMSO ile çözülerek 30 mM ana stok olarak hazırlandı. Ana stok çözelti -20 °C’de saklandı. Ara stok çözelti (65 µM) büyüme ortamı ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı.

3.6.4.3. Kalsitriolün Hazırlanması

Kalsitriol (MA: 416.64 g/mol) %100 etanol ile çözülerek 240 µM ana stok şeklinde hazırlandı. Çalışmada kullanılacak kalsitriol dozları ana stoktan büyüme ortamı ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı. Kalsitriol ana stok çözeltisi -20 °C’de saklandı.

Kalsitriol etanol içerisinde çözündüğü için, çözgen etkisini dışlamak amacıyla etanol kontrolleri hazırlandı. Bu kontroller hazırlanan kalsitriol dozlarındaki etanol yüzdesine bağlı olarak sırasıyla %0.00004, %0.004 ve %0.04 şeklinde hazırlandı.

Kalsitriol dozları literatürde yapılan çalışmalar doğrultusunda seçildi. Fizyolojik doz olarak 0.1 nM, düşük supra-fizyolojik doz olarak 10 nM ve yüksek supra-fizyolojik olarak 100 nM dozları kullanıldı (8,159).

3.6.4.4. Parikalsitolün Hazırlanması

Parikalsitol (MA: 416.64 g/mol) 5 µg/mL enjeksiyonluk çözelti içeren ampul şeklinde alındı. Ana konsantrasyonu 10 µM olan çözelti, yardımcı madde olarak %20 etanol, %30 propilen glikol ve %50 distile su içerir. Çalışmada kullanılan parikalsitol

dozları ana stoktan büyüme ortamı ile dilüe edilerek taze olarak hazırlandı. Parikalsitol ana stok çözeltisi vidalı kriyo tüp içerisine aktarılarak -20 °C’de saklandı.

Parikalsitol propilen glikol ve etanol ile hazırlandığı için, çözgen etkisini dışlamak amacıyla propilen glikol/etanol kontrolleri hazırlandı. Bu kontroller hazırlanan parikalsitol dozlarındaki yüzdelere bağlı olarak sırasıyla %0.0003/%0.0002, %0.03/%0.02 ve %0.3/%0.2 şeklinde hazırlandı.

Parikalsitol dozları kalsitriole benzer şekilde, 0.1 nM, 10 nM ve 100 nM olarak kullanıldı.

3.6.4.5. VDR Antagonisti ZK159222’nin Hazırlanması

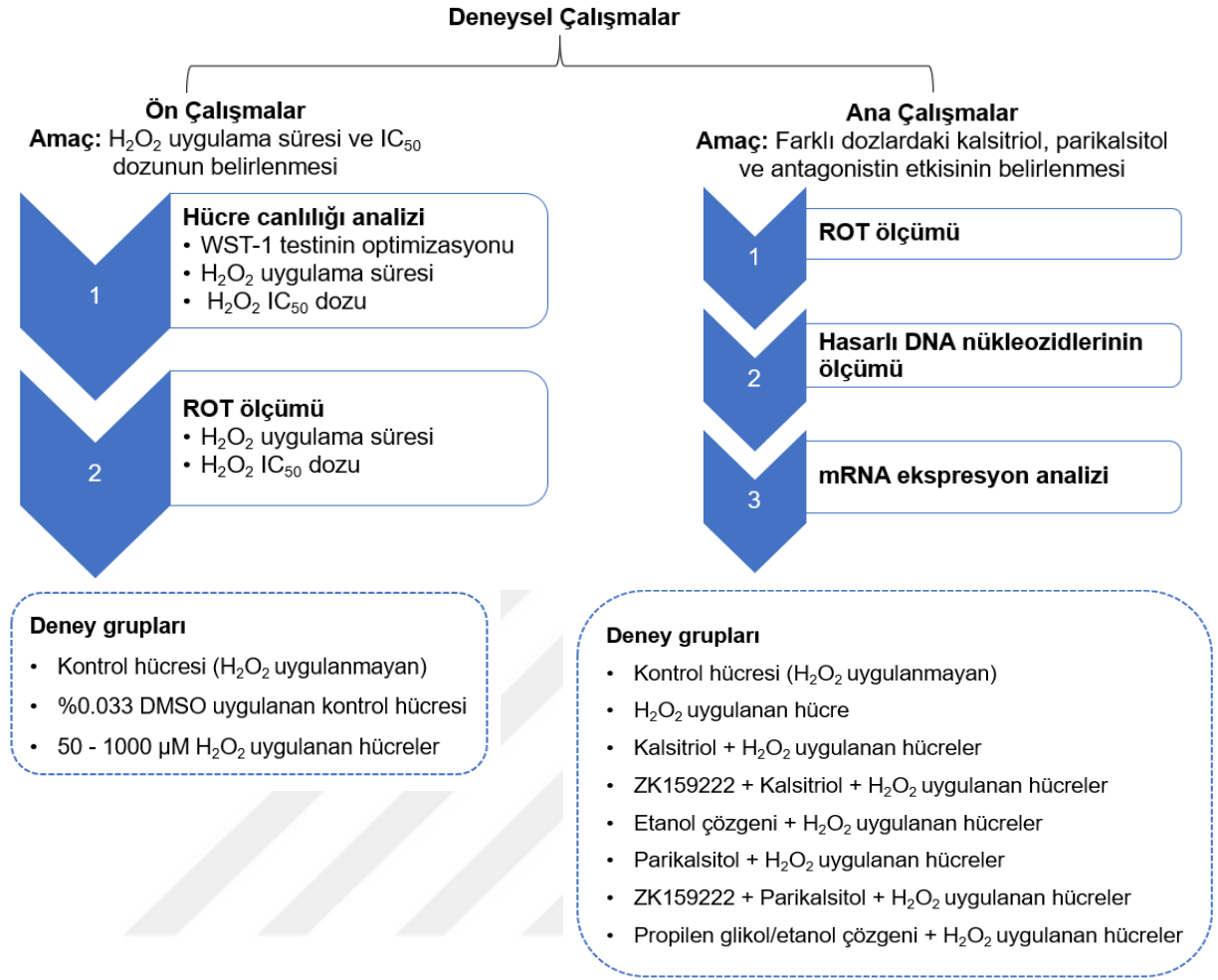
ZK159222 (MA: 512.73 g/mol), Bayer Shering Pharma (Almanya) tarafından sentez edildi. Antagonist %100 etanolde çözülerek 487.5 µM ana stok çözeltisi şeklinde hazırlandı ve -20 °C’de saklandı. Çalışmada kullanılacak 100 nM ZK159222 dozu büyüme ortamı ile dilüe edilerek taze olarak kullanıldı.

3.6.5. Deneysel Çalışmalar

Çalışmamızda öncelikle H₂O₂’in uygulama süresi ve IC₅₀ dozunu belirlemek amacı ile ön çalışmalar gerçekleştirildi. Bu ön çalışmalar kapsamında hücre canlılık analizi ve reaktif oksijen türlerinin ölçümü yapıldı.

Ön çalışmalar sonrasında, farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün HUVEC kültüründe H₂O₂ ile oluşturulan oksidatif stres ortamında, ROT ve hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeylerine, DNA onarım enzimi APE1 ve VDR mRNA ekspresyonları üzerine etkisi araştırıldı. Ayrıca, bu etkilerin VDR sinyalizasyonu ile gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermek amacıyla ZK159222 antagonisti kullanıldı.

Deneysel çalışmalara ve oluşturulan deney gruplarına ait akış şeması aşağıda verilmiştir (**Şekil 24**).



Şekil 24. Deneysel çalışmalara ve oluşturulan deney gruplarına ait akış şeması

3.6.5.1. Hücre Canlılık Analizi

H₂O₂'in uygulama süresi ve IC₅₀ dozunu belirlemek amacıyla WST-1 (4-[3-(4-iyodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolyum]-1,3-benzen disülfonat) testi kullanıldı. Testin prensibi; stabil bir tetrazolyum tuzu olan WST-1, canlı hücrede mitokondri solunum zincirine ait süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi tarafından suda çözünebilen formazan bileşiğine dönüştürülür. Bu biyoredüksiyon reaksiyonu büyük oranda canlı hücredeki NAD(P)H'in glikolitik üretimine bağlıdır. Bu nedenle, oluşan formazan boyanın miktarı hücre kültüründeki metabolik olarak aktif olan hücre sayısı ile doğrudan ilişkilidir. Oluşan sarı-turuncu renkli boya 450 nm ve 630 nm referans dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür.

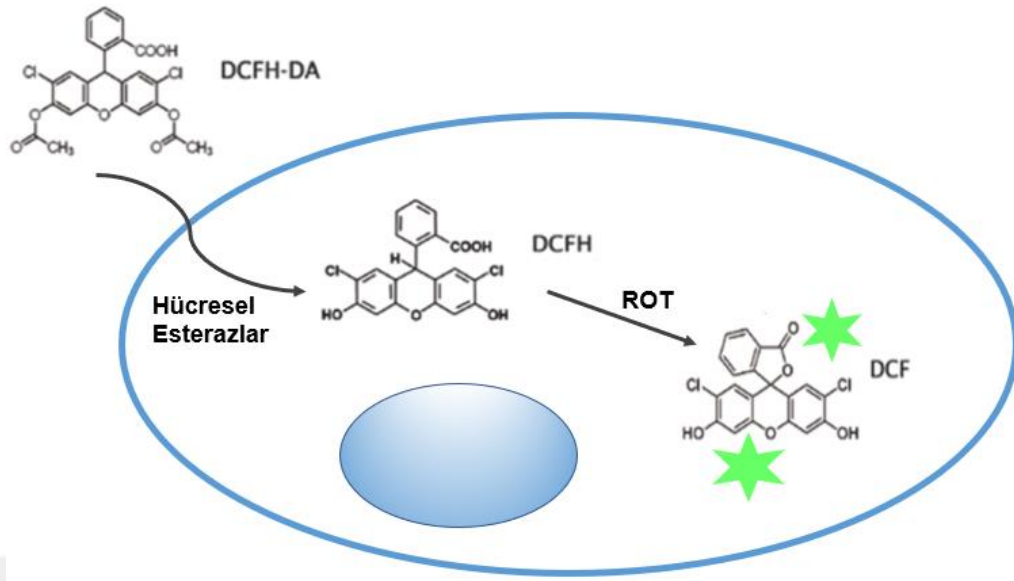
Çalışmalar WST-1 kit içeriğine uygun olarak 96 kuyucuklu plaklarda yapıldı. HUVE hücreleri ekildikten 24 saat sonra çalışmalar gerçekleştirildi. Deneye başlamadan önce, kullanılan HUVE hücresi için hücre sayısı ve reaktifin inkübasyon süresi optimize edildi. Bunun için 2500, 5000, 7500 ve 10000 canlı hücre ekimi ve 0.5, 1, 2 ve 4 saatlik inkübasyon süreleri denendi.

HUVE hücresi için uygun hücre ekim sayısı (5000) ve reaktif inkübasyon süresi (2 saat) belirlenmesinin ardından, önce H_2O_2 'in uygulama süresi daha sonra da IC_{50} dozu için deneyler gerçekleştirildi. Bunun için, hücreler 100 μ L içerisinde 5000 hücre olacak şekilde kuyucuklara ekildi. 24 saat yapışmaları beklendikten sonra kuyucuklar içerisindeki eski ortamlar atılarak PBS ile yıkandı. H_2O_2 , farklı sürelerde (0.5-3 saat) ve farklı dozlarda (50-1000 μ M, 100 μ L içerisinde) kuyucuklara eklenerek inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında WST-1 reaktifinden her kuyuya 10 μ L eklenerek 2 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. Mikroplak okuyucuda ölçüm alındı.

Bu çalışmalarda kontrol olarak H_2O_2 'in uygulanmadığı hücreler kullanıldı. Ayrıca, ROT ölçümünde kullanılan reaktifin DMSO ile çözülmesi sebebiyle, reaktifin içerdiği yüzdenin (%0.033) hücre canlılığına etkisinin olup olmadığını değerlendirmek amacıyla DMSO kontrolü kullanıldı. % hücre canlılığı, tüm koşulların kontrole oranlanması ile hesaplandı. H_2O_2 'in IC_{50} değeri ise, kullanılan dozların logaritmasına karşılık % canlılık değerlerine göre çizilen grafikten hesaplandı.

3.6.5.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Ölçümü

ROT ölçümü, 2',7'-diklorofluorescein diasetat (DCFH-DA) reaktifi ile gerçekleştirildi. DCFH-DA hücre membranından geçebilen ve fluoresan özellikte olmayan bir probdur. Hücre içerisine alındığında esterase tarafından de-esterifiye edilerek yine fluoresan olmayan 2',7'-diklorofluorescein'e (DCFH) dönüşür. DCFH-DA deasetile olduktan sonra hücre dışına çıkamaz. DCFH, hücre içindeki ROT varlığında okside olarak oldukça yüksek fluoresan özelliğe sahip 2',7'-diklorofluorescein'e (DCF) dönüşür (**Şekil 25**). Oluşan DCF'nin yeşil fluoresans şiddeti 485 nm eksitasyon ve 535 nm emisyon dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 25. DCFH-DA ile ROT ölçümü prensibi (160)

ROT ölçümü için koyu renkli 96 kuyucuklu plaklar kullanıldı. Her bir kuyucuğa ekilen hücre sayısı WST-1 çalışması ile belirlenen 5000 canlı hücreydi. H_2O_2 'in uygulama süresi ve IC_{50} dozunu belirlemek için yapılan ROT ölçüm çalışmaları WST-1 analizi ile paralel yürütüldü. Bunun için, hücreler 100 μ L içerisinde 5.000 hücre olacak şekilde kuyucuklara ekildi. 24 saat yapışmaları beklendikten sonra kuyucuklar içerisindeki eski ortamlar atılarak PBS ile yıkandı. H_2O_2 , farklı sürelerde (0.5-3 saat) ve farklı dozlarda (50-1000 μ M, 100 μ L içerisinde) kuyucuklara eklenerek inkübe edildi. 10 μ M DCFH-DA reaktifinden eklendi ve plaklar alüminyum folyo ile kapatılarak 30 dk inkübe edildi (161). İnkübasyon sonrası hücrelerdeki floresans miktarı mikropalak okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

H_2O_2 'in uygulama süresi ve IC_{50} dozu belirlendikten sonra, kalsitriol ve parikalsitolün farklı dozlarının ve ZK159222 antagonistinin ROT oluşumu üzerine etkisi araştırıldı. HUVE hücreleri 100 μ L içerisinde 5000 hücre olacak şekilde ekilerek, 24 saat plak yüzeyine yapışmaları beklendi. PBS ile her bir kuyucuk yıkandıktan sonra, farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitol 100 μ L hücre ortamı içinde olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve 24 saat inkübe edildi. Antagonist ilavesi kalsitriol ve parikalsitol uygulamasından 1 saat önce yapıldı. İnkübasyon sonrasında, kuyucuklar tekrar PBS ile yıkandı. H_2O_2 'in belirlenen dozu 100 μ L olacak şekilde kuyucuklara eklendi ve

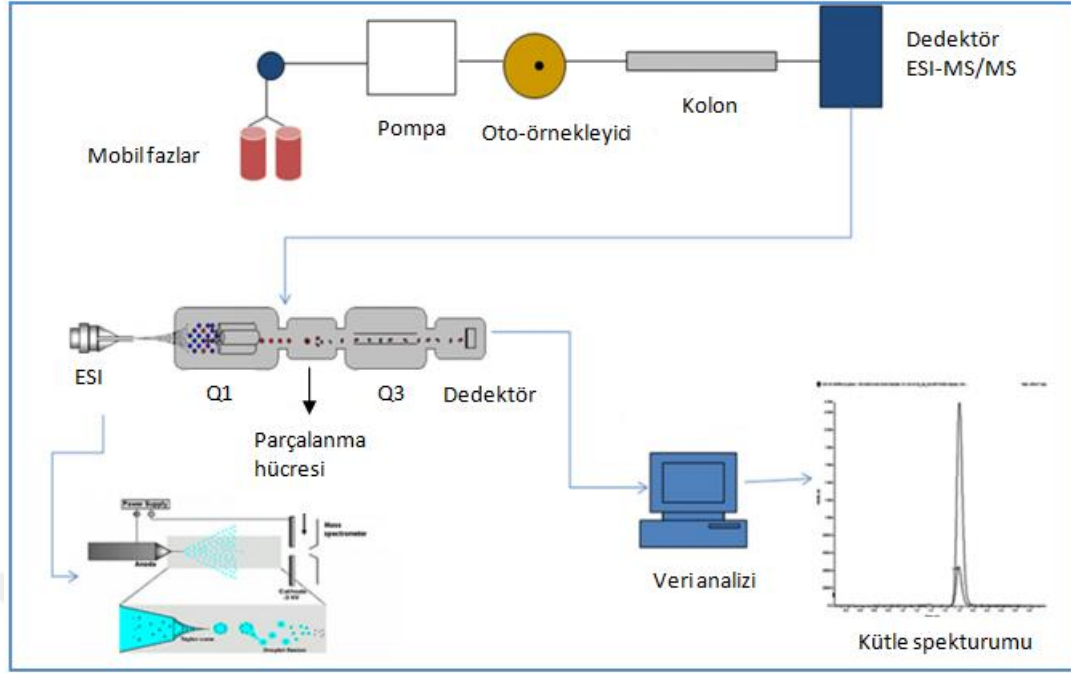
belirlenen uygulama süresinde inkübe edildi. Daha sonra, 10 μ M DCFH-DA reaktifinden eklendi ve plaklar alüminyum folyo ile kapatılarak 30 dk inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücrelerdeki floresans miktarı mikropalak okuyucuda spektrofotometrik olarak ölçüldü.

3.6.5.3. Hasarlı DNA Nükleozidlerinin Ölçümü

Hasarlı DNA nükleozidleri 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA'nın ölçümü sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) ile gerçekleştirildi. Veri analizi için Analyst Software Version 1.5 kullanıldı.

Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri, sıvı kromatografik bir ayırımın ardından kütle spektrometresinde moleküllerin m/z oranlarına göre ölçümlerinin yapıldığı yüksek duyarlılık, özgüllük ve doğruluğa sahip bir yöntemdir (**Şekil 26**). LC-MS/MS sisteminde ilk adım, bileşiklerin kromatografik olarak ayrımıldığı sıvı kromatografi (LC) kısmında gerçekleşir. LC, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan kompleks biyolojik karışımların sabit faz ile hareketli faz arasındaki farklı etkileşimlerine göre ayrılmasını sağlar. Karışımdaki bileşikler kolon içerisinde farklı hızlarda hareket ederek kromatografik olarak birbirlerinden ayrılırlar. Alıkonma zamanı [retention time (RT)] olarak adlandırılan, bileşiklerin kolona ilk girdikleri andan itibaren kütle spektrometresine ulaşmaları için geçen süre her bileşik için karakteristiktir.

Kütle spektrometresinin (MS) prensibi, iyonize edilen analitlerin elektromanyetik bir alan içerisinde sıvı fazdan gaz fazına geçirilerek analitlere özgü kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrıştırılması esasına dayanır. En sık kullanılan MS iyonizasyon tekniklerinden biri olan ESI (Elektrosprey iyonizasyon) ile sıvı örneğin bir iğne ucundan püskürtülerek kararsız yüklü damlacıklar haline gelmesini sağlar. İyonizasyon kaynağından yüklü halde geçen damlacıklar belirlenen m/z oranlarına göre ayrılacağı kütle analizörü kısmına gelir. Kütle analizöründeki elektriksel alan belirli iyonların geçişine izin verirken, istenmeyen diğer iyonları tutarak bir m/z filtresi görevini yapar. İki kütle analizörünün ard arda geldiği sisteme sıralı kütle spektrometresi (Tandem MS) adı verilir.



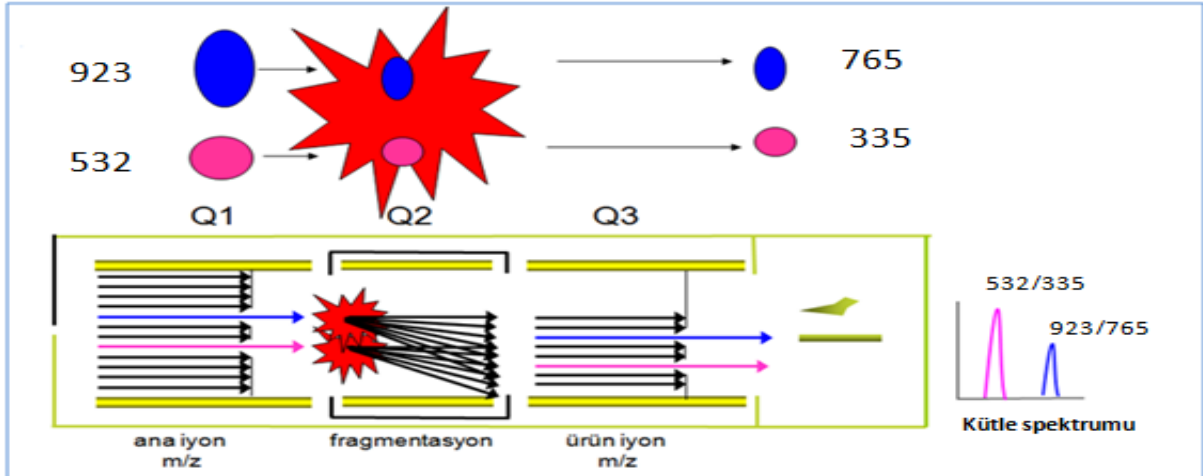
Şekil 26. LC-ESI-MS/MS sisteminin şematik gösterimi (159)

Triple quadrupole lineer iyon trap (QQQ/LIT), tandem MS özelliğinde olup analitlerin mutlak kantitasyonuna ve kalitatif karakterizasyonuna olanak sağlayan hibrid bir kütle analizörüdür. Ardışık üç quadropolden oluşan triple quadropol kütle analizörlerinde (QQQ) ana iyonların filtrelenmesinin gerçekleştirildiği Q1 olarak adlandırılan ilk kısımda analite ait belirli m/z değerindeki ana iyon seçilir. Seçilen ana iyon Q2 kısmına iletilerek inert N_2 gazı varlığında parçalanır. Q2’de oluşan ürün iyonlar Q3’e geldiklerinde belirlenen m/z değerlerindeki ürün iyon(lar) seçilir. Seçilen ana iyon/ürün ikilisi (transition) dedektöre ulaştığında m/z değerine karşı iyonların sinyal yoğunluğu (intensite) kütle spekturumu olarak kaydedilir. Kantitasyon amacıyla kullanıldığında, Q3 bölgesi standart quadrupole kütle spektrometresi olarak çalıştırılır; kalitatif tanımlayıcı çalışmalarda bu bölgenin lineer iyon trap özelliğinden yararlanılarak duyarlılık artırılmış olur. Her iki konfigürasyonun birlikte kullanımı ile tek tek kullanımlarına göre daha yüksek duyarlılık ve doğrulukta sonuçlar alınabilir.

SID-MRM LC-MS/MS, adli toksikolojide ilaç düzeyi araştırmaları, yenidoğan metabolik hastalıklarının taranması ve tanısı, hormon/vitamin/biyolojik aminler, pestisit vb. analizleri gibi pek çok alanda kullanılan hedefli yüksek doğruluk ve özgüllüğe sahip bir kantitasyon modudur (162). Analitin LC’deki kromatografik alıkonma zamanı bilgisine ek olarak, MRM-MS/MS’de o analite özgü ve daha önceden tanımlanmış

birden fazla ana iyon/ürün iyon(lar) ikilisinin izlenmesi ile kantitasyonun kesinliği artırılmış olur (163) (**Şekil 27**).

Bu yöntemde ayrıca kantitasyonun güvenilirliğini arttırmak amacıyla çalışmanın başında her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart (IS) eklenmesiyle MS öncesi (ekstraksiyon, HPLC enjeksiyonu vb.) ve MS koşullarında (iyonizasyon vb.) oluşabilecek değişiklikler normalize edilmiş olur. Internal standartlar ^{13}C , ^{15}N veya ^2H (döteryum) ile işaretlenebilir. Stabil izotop işaretli IS'lerin kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve fragment iyon dağılımı hedef analit ile aynıdır. IS'nin hedef analitten tek farkı ^{12}C yerine ^{13}C 'ün, ^{14}N yerine ^{15}N 'in ve ^1H atomu yerine ^2H atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleye sahip olmasıdır.



Şekil 27. MRM modunda seçilen ana iyon/ürün iyon ikilisinin izlenmesi

SID-MRM LC-MS/MS ile hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda güvenilir bir şekilde yöntem geçerlilik çalışmaları yapılmış ve optimize edilmiş bir yöntemdir. Bu çalışma ile laboratuvarımızda ilk kez hücre kültürü örneklerinde hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümü gerçekleştirilmiştir.

3.6.5.3.1. Hücrelerin Hazırlanması

Bu çalışma için 75 cm²'lik hücre flasklarında büyütülen hücreler kullanıldı. Hücreler yaklaşık %70-80 konfluent hale geldiğinde, %10 FBS içeren ortamda hazırlanan farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitol uygulanarak 24 saat inkübe edildi.

ZK159222 antagonisti uygulanacak hücreler için, kalsitriol ve parikalsitol uygulamasından 1 saat önce antagonist uygulandı. Kontrol grubu olarak hiçbir uygulama yapılmayan hücreler kullanıldı. İnkübasyon sonrasında, hücreler PBS ile yıkanarak %2 FBS ortamı içerisinde hazırlanan 300 µM H₂O₂ ile 30 dk muamele edildi. Hücreler PBS ile yıkandıktan sonra tripsin ile flask yüzeyinden kaldırıldı. Hücreler 500 rpm'de 15 dk santrifüjlenerek hücre pelleti elde edildi.

3.6.5.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Hücrelerden genomik DNA elde etmek amacı ile spin kolon prensibine dayalı ticari bir kit kullanıldı. Yöntemin prensibi; kullanılan örneğe ait genomik DNA'nın açığa çıkarılarak silika membran içeren kolona geri dönüşümlü bağlanmasının ardından kolondan elüe edilmesine dayanır.

Çalışmada elde edilen hücre pelletleri üzerine hücre lizis tamponları ve proteinaz K eklenip kuvvetli bir şekilde vortekslenerek 70 °C'de yaklaşık 15 dk inkübe edildi. Soğuk etanol kullanılarak DNA görünür hale getirildikten sonra hücre örnekleri kolona yüklendi. Kolon, yıkama tamponları ile yıkanarak kirlilikler temizlendi. Son olarak elüsyon tamponu ile genomik DNA kolondan elüe edildi.

3.6.5.3.3. Genomik DNA Miktarının Ölçümü

Elde edilen genomik DNA miktarı Nanodrop cihazı kullanılarak ölçüldü. Bu cihaz, küvet ve kapiller ihtiyacı olmadan 0.5-2 µL gibi çok küçük hacimde ölçüm alma imkânı sağlayan bir spektrofotometredir. Örneklerdeki DNA'nın 260 ve 280 nm'de absorbanları ölçüldükten sonra, DNA'nın miktarı ve saflığı aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu\text{g/mL}) = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260\text{nm}}$$

$$\text{DNA saflığı} = A_{260\text{nm}} / A_{280\text{nm}}$$

Miktarı belirlenen örnekler her birinde 50 µg DNA olacak şekilde hazırlanarak SpeedVac cihazında kurutuldu.

3.6.5.3.4. Üç Enzim Hidrolizi

Kurutulan 50 µg DNA örneği 50 µL digestion buffer (10 mM Tris tamponu pH 7.5 ve 45 mM çinko klorür içeren 1 M sodyum asetat) ile çözüldü. Stabil izotop işaretli internal standartlar 8-OH-dG¹⁵N₅, R-cdA¹⁵N₅, S-cdA¹⁵N₅ ve üç enzim karışımı (nükleaz P1, fosfodiesteraz 1 ve alkalin fosfataz) eklenerek vortekslendi. 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 14000 g'de 5 dk santrifüjlenen örnekler 3 kDa moleküler kütle sınırı olan ultrafiltrasyon membranları ile 14000 g'de 45 dk filtrelendi. Elde edilen filtratlar HPLC viallerine aktararak LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi (164).

3.6.5.3.5. Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre Koşulları

HPLC sistemimiz Shimadzu Prominence modüler bir sistem olup pompalar (LC-20AD), oto-örnekleyici (SIL-20AC HT), degasser ünitesi (DGU-20A3) ve kolon fırınından (CTO-10AS) oluşmaktadır. Hasarlı DNA nükleozidleri ölçümüne ait sıvı kromatografi parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (**Tablo 6**).

Tablo 6. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümüne ait sıvı kromatografi parametreleri

Mobil fazlar	A: %0.1 formik asit içeren filtrelenmiş distile su B: %0.1 formik asit içeren asetonitril
Analitik kolon	Agilent Zorbax SB-C18, 2.1x150 mm, 3.5 µM
Guard kolon	Agilent Eclipse XBD C8, 2.1x12.5 mm, 5 µM
Akış hızı ve türü	0.3 mL/dk, gradient
Enjeksiyon hacmi	10 µL (standartlar için), 20 µL (örnekler için)
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C
Toplam analiz zamanı	26 dk
Alıkonma zamanları	8-OH-dG ve 8-OH-dG ¹⁵ N ₅ için; 4.5 dk R-cdA ve R-cdA ¹⁵ N ₅ için; 2.4 dk S-cdA ve S-cdA ¹⁵ N ₅ için; 3.8 dk

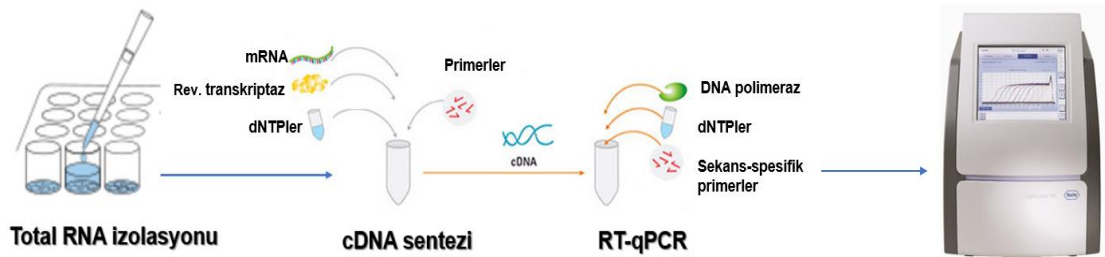
Çalışmamızda kullanılan tandem kütle spektrometresi elektrosprey iyonizasyon kaynağı (Turbo V®) ile bağlı 4000 QTRAP (AB Sciex) modelidir. Azot jeneratörü (Peak Scientific) ve vakum pompası (Oerlikon) ile birlikte çalışmaktadır. Hasarlı DNA nükleozidleri ölçümüne ait tandem kütle spektrometre parametreleri aşağıdaki tabloda verilmiştir (**Tablo 7**).

Tablo 7. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ölçümüne ait tandem kütle spektrometre parametreleri

İyonizasyon türü	Elektrosprey (ESI)
İyonizasyon modu	Çoklu reaksiyon izleme (MRM)
İyonizasyon polaritesi	Pozitif
MRM iyon çiftleri (ana iyon/ürün iyon) (m/z: kütle/yük)	8-OH-dG için; m/z 284→168 8-OH-dG ¹⁵ N ₅ için; m/z 289→173 R-cdA ve S-cdA için; m/z 250→164 R-cdA ¹⁵ N ₅ ve S-cdA ¹⁵ N ₅ için; m/z 255→169

3.6.5.4. mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Analizi

DNA onarım enzimi APE1 ve VDR mRNA ekspresyon düzeyleri “gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real-time PCR)” yöntemi ile belirlendi. Floresans-temelli kantitatif real-time PCR (qPCR) olarak da bilinen real-time PCR, DNA amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresan sinyalinin ölçülmesine dayanan bir PCR yöntemidir (165). Aşağıdaki şekilde real-time qPCR yönteminin genel akış şeması gösterilmiştir (**Şekil 28**).



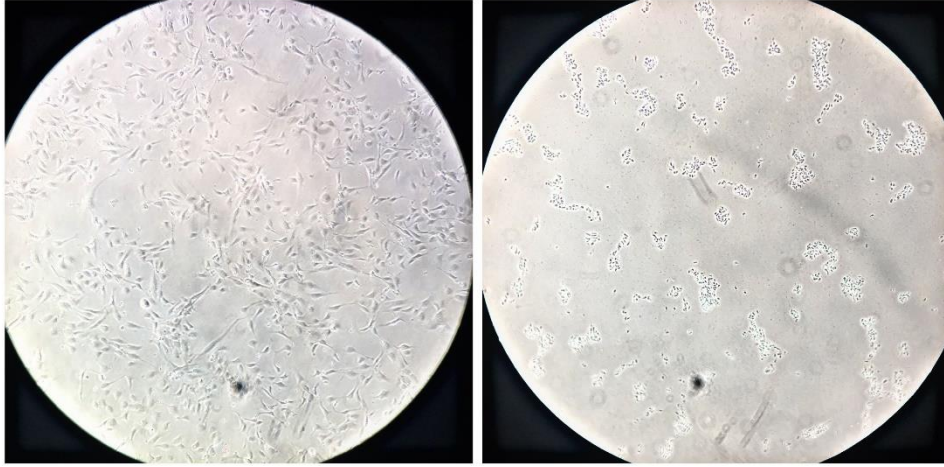
Şekil 28. Real-time qPCR yönteminin akış şeması

3.6.5.4.1. Total RNA İzolasyonu

Hücrelerden total RNA elde etmek amacıyla, kültüre hücrelerin lizis edilerek direkt komplementer DNA (cDNA) sentezi adımına geçilmesine olanak sağlayan “RealTime ready cell lysis (Roche)” kiti kullanıldı. 6 kuyucuklu plaklara ekilen hücreler istenen koşullarda hazırlandıktan sonra, hücreler tripsin ile kaldırılmadan yalnızca PBS ile yıkandı. Her bir kuyucuğa aşağıdaki tabloda verilen hücre lizis karışımı eklendi (**Tablo 8**). Yaklaşık 5 dk beklendikten sonra mikroskop altında bakılarak hücrelerin parçalanmış olduğu gözlemlendi (**Şekil 29**).

Tablo 8. Hücreden total RNA eldesi için hazırlanan hücre lizis karışımının içeriği

Karışımın içeriği	Eklenen miktar
Lizis tamponu	39.5 µL
RNaz inhibitörü	0.5 µL



Şekil 29. HUVE hücrelerinin lizis öncesi ve sonrası görüntüleri

3.6.5.4.2. Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

Revers transkriptaz enzimi ile tek iplikli RNA'dan tek iplikli cDNA sentezi işlemidir. RNA'ya random hekzamer primerler bağlandıktan sonra revers transkriptaz enzimi ortamda bulunan deoksिनुकлеотидleri kullanarak primerleri uzatır ve böylece cDNA sentezlenmiş olur. Reaksiyon sıcaklığının artışı ile enzimin inaktive olması ve mRNA-cDNA çift iplikli yapısı denatüre olarak birbirinden ayrılması ile işlem tamamlanır.

Çalışmamızda cDNA sentezi için "Evoscript Universal cDNA Master (Roche)" kiti kullanıldı. Sentez için hazırlanan karışımın içeriği tabloda verilmiştir (**Tablo 9**).

Tablo 9. cDNA sentezi için hazırlanan karışımının içeriği

Karışımın içeriği	Eklenen miktar
Reaksiyon tamponu *Random primerler, oligo(dT), dNTP ve magnezyum asetat içerir.	4 µL
Termolabil nükleaz	0.5 µL
Enzim mix *Revers transkriptaz ve RNaz inhibitörlerini içerir.	2 µL
PCR grade su	11,5 µL

18 µL'lik bu karışım vortekslenip beyaz renkli 96 kuyucuklu mikropalak içindeki kuyucuklara eklendi. Total RNA'nın elde edildiği hücre lizatlarından 2 µL alınarak her bir kuyucuğa ilave edildi. Plakın üzeri yapışkanlı band ile iyice kapatılarak 1000 g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında plak LightCycler® 96 (Roche) cihazına yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı. Elde edilen cDNA'lar ve RNA örnekleri -20 °C'de saklandı.

- 45 °C, 900 saniye
 - 85 °C, 300 saniye
 - 65 °C, 900 saniye
 - 37 °C, 300 saniye
- } Preinkübasyon işlemi
- Soğutma işlemi

3.6.5.4.3. Real-time qPCR

Aynı tüp içerisinde hem amplifikasyonun hem de deteksiyonun gerçekleştiği real-time qPCR tekniğinde, PCR reaksiyonu sıcaklık döngülerinin değişimi ile gerçekleşmektedir. İlk döngüde (denatürasyon), 95 °C gibi yüksek sıcaklıkta çift iplikli DNA'nın ayrılması sağlanır. İkinci döngüde (primer bağlanması, annealing), sıcaklık 55-60 °C'ye düşürülerek primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması sağlanır. Son döngüde ise (zincir uzaması, extension), sıcaklık Taq polimeraz enziminin optimum aktivite gösterdiği 72 °C civarlarına yükseltilir ve Taq polimerazın dNTP'leri kullanarak primerleri seçici olarak uzatması sağlanır (165).

qPCR yönteminde iki farklı ürün saptama yöntemi vardır. Bunlardan biri; çift zincirli DNA'ya yerleşebilen floresan bir boyanın (SYBR green gibi) kullanıldığı dizi spesifik olmayan saptama yöntemidir. Bu yöntem görece ucuz olmasına rağmen yalancı pozitif sonuçlar vermektedir. İkinci saptama yöntemi olan dizi spesifik sistem ise, spesifik olarak hedef dizileri tanıyan floresan rezonans enerji transfer problemlerine (hidroliz ve hibridizasyon problemleri gibi) dayanmaktadır. Çalışmamızda saptama yöntemi olarak son yıllarda yaygın olarak kullanılan hidroliz problemlerini kullandık. Bu problemlerin diğer bir ismi TaqMan problemleridir. TaqMan probu çift taraflı olarak işaretlenmiş bir oligonükleotid dizisinin bir ucunda bildirici (reporter) florofofor diğer ucunda engelleyici (quencher) florofofor bulunur. Prob bütün halindeyken, engelleyici boya bildirici boyayı baskılamaktadır ve böylece sinyal oluşumu engellenmektedir. Reaksiyon sırasında, Taq DNA polimerazın probu hidroliz etmesi sonrasında bildirici ve engelleyici boya birbirinden ayrılır ve floresan ışımaya gerçekleşir. Bu nedenle hidroliz problemleri qPCR reaksiyon özgülüğüne ek bir katkı sağlamaktadır (166). Hidroliz problemleri üretici firma tarafından “Evrensel prob kütüphanesi (UPL)” teknolojisi kullanılarak hedef diziye spesifik bir şekilde dizayn edilmekte ve tüm qPCR etkinliği ve koşulları (T_m sıcaklığı, reaksiyon programı vb.) optimize edilmektedir.

Çalışmamızda qPCR için “RealTime Ready catalog assay (Roche)” ile çalışıldı. Referans gen olarak beta aktin (β -aktin) kullanıldı. qPCR reaksiyonu için hazırlanan karışımın içeriği tabloda verilmiştir (**Tablo 10**).

Tablo 10. qPCR reaksiyonu için hazırlanan karışımının içeriği

Karışımın içeriği	Eklenen miktar
Prob master *Enzim ve dNTPleri içerir.	10 µL
Gen spesifik RealTime Ready *Primer ve hidroliz problemlerini içerir.	1 µL
Nükleaz free su	4 µL

qPCR reaksiyon karışımı çalışılacak olan genlere göre ayrı ayrı hazırlandı. 15 µL'lik bu karışım vortekslenip beyaz renkli 96 kuyucuklu mikropak içindeki kuyucuklara eklendi. Elde edilen cDNA'lardan 5 µL alınarak her bir kuyucuğa ilave edildi. Plakın üzeri yapışkanlı band ile iyice kapatılarak 1000 g'de 1 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında plak LightCycler® 96 (Roche Diagnostic) cihazına yerleştirilerek aşağıdaki program uygulandı.

- 95 °C, 600 saniye, 1 döngü → Preinkübasyon işlemi
 - 95 °C, 10 saniye, 45 döngü
 - 60 °C, 30 saniye, 45 döngü
 - 72 °C, 1 saniye, 45 döngü
 - 37 °C, 30 saniye, 1 döngü → Soğutma işlemi
- } Amplifikasyon işlemi

Sonuçların analizi LightCycler 96 (SV 1.1) yazılımı ile gerçekleştirildi. Her bir örneğe ait hedef gen (APE1 ve VDR) ekspresyonu, referans gen (β-aktin) ekspresyonuna oranlanarak $2^{-\Delta\Delta Cq}$ (Cq: quantification cycle) yöntemi ile aşağıdaki hesaplamalar doğrultusunda rölatif kantitasyon yapıldı.

$\Delta Cq_{\text{kontrol}} = \text{kontrolde ait hedef genin Cq değeri} - \text{kontrolde ait referans genin Cq değeri}$

$\Delta Cq_{\text{örnek}} = \text{örneğe ait hedef genin Cq değeri} - \text{örneğe ait referans genin Cq değeri}$

Normalize edilmiş hedef gen ekspresyonu = $2^{-(\Delta Cq_{\text{örnek}} - \Delta Cq_{\text{kontrol}})} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Ocak - Haziran 2013	• Tez önerisi hazırlanması • Tez önerisi sunumu ve kabulü
Eylül 2013 - Mart 2014	• Proje önerisinin hazırlanması
Eylül 2014 - Şubat 2015	• Projenin kabul edilmesi • Malzeme alımları
Şubat 2015 - Haziran 2016	• HUVE hücrelerinin çoğaltılması • H₂O₂ uygulama süresi ve IC₅₀ dozunun belirlendiği ön çalışmaların gerçekleştirilmesi ➤ WST-1 hücre canlılık analizi ➤ ROT ölçümü çalışmaları
Haziran 2016 - Mart 2018	• HUVE hücrelerinde kalsitriol, parikalsitol ve VDR antagonistinin etkilerinin araştırılması ➤ ROT ölçümü çalışmaları ➤ LC-MS/MS çalışmaları ➤ qPCR çalışmaları

Şekil 30. Araştırma akış şeması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 5.03 programı kullanılarak gerçekleştirildi. İki grup arasındaki karşılaştırmalar student's t testi ile analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm çalışmalar en az üç kez tekrar edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızın sınırlılıkları:

- mRNA düzeyinde ekspresyonları incelenen APE1 ve VDR geninin, uygulanan koşullar altında protein düzeylerindeki olası değişimlerinin etkisi proje bütçesinin sınırlı olması nedeniyle incelenememiştir.
- Çalışmamızda kullanılan sentetik antagonist ile VDR proteini üzerinde farmakolojik bir inhibisyon sağlanmaya çalışılmıştır. VDR'nin siRNA yöntemi ile gen düzeyinde susturulmasının sağlanması ile meydana gelebilecek hücresel etkiler araştırılamamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

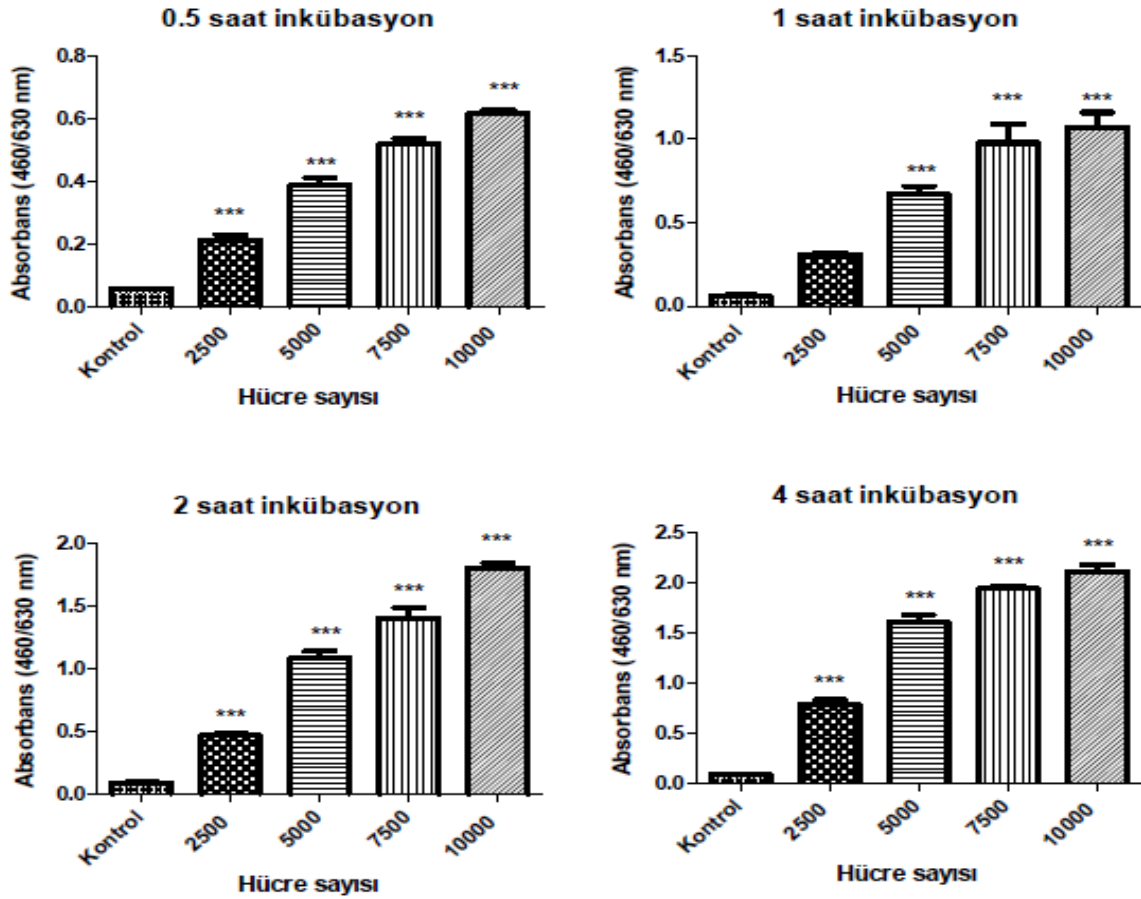
Çalışmamız için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 24.03.2014 tarih ve 2014/11-13 protokol numarası ile etik kurul onayı alındı. Daha sonra, 17.05.2018 tarih ve 2018/12-38 karar numarası ile çalışma başlığının değişikliği talebi etik kurul tarafından kabul edilmiştir (EK 1).

4. BULGULAR

4.1. Ön Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.1.1. WST-1 Testi için Hücre Sayısı ve Reaktif İnkübasyon Süresinin Belirlenmesi

Çalışmamızda 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilecek çalışmalar için hücre sayısı ve reaktif inkübasyon süresi belirlenirken, spektrofotometrik ölçümden elde edilen absorbans değerleri dikkate alındı. Ana çalışmalarda absorbans değerlerinde meydana gelebilecek azalmalar ve artmalar nedeniyle çok düşük ve yüksek absorbans değerleri tercih edilmedi. Bu nedenle elde edilen sonuçlar doğrultusunda 5000 canlı hücre ekimi uygun bulundu. Hücre canlılığı analizi için WST-1 reaktifinin inkübasyon süresi ise 2 saat olarak belirlendi (**Şekil 31**).



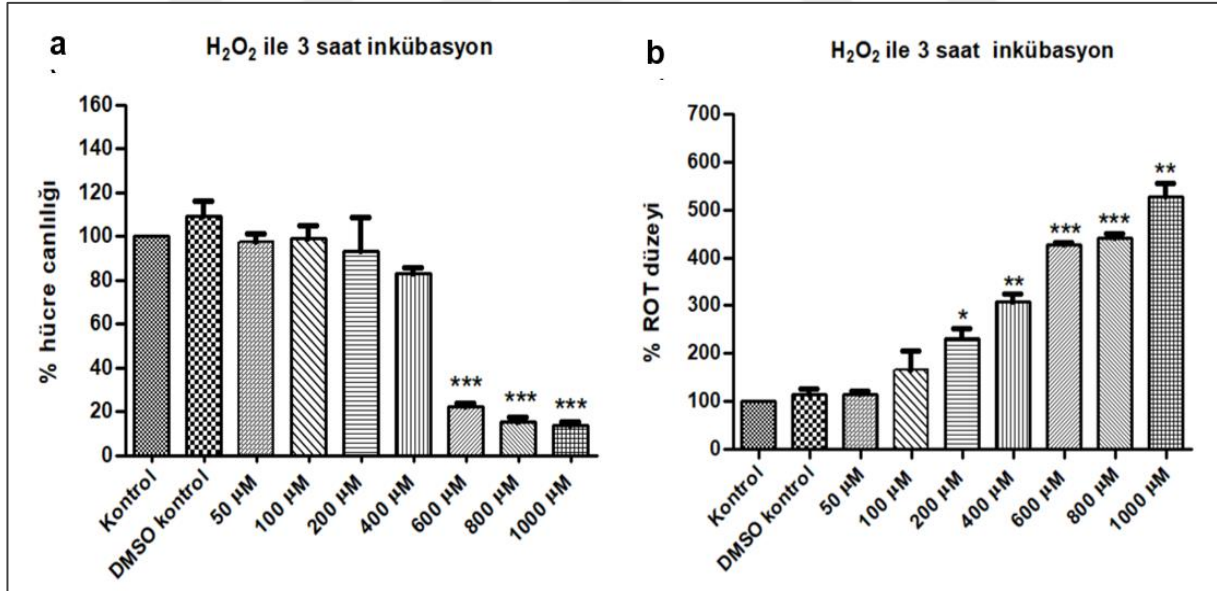
Şekil 31. WST-1 testi için hücre sayısı ve reaktif inkübasyon süresinin belirlenmesi

*** $p < 0.0001$, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında

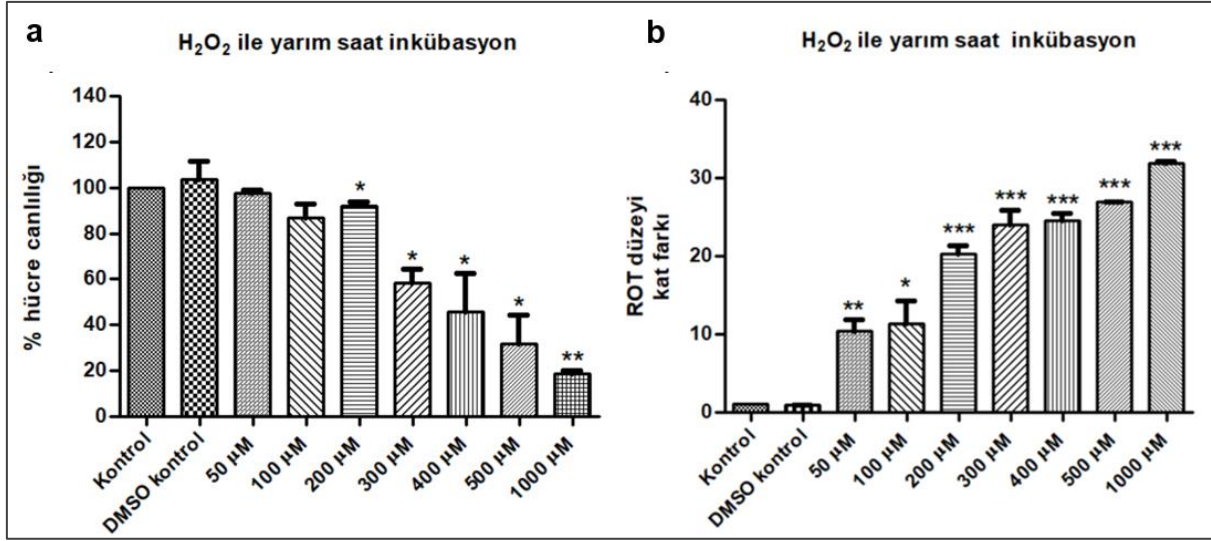
4.1.2. Hidrojen Peroksit Uygulama Süresinin Belirlenmesi

Hidrojen peroksitin (H_2O_2) uygulama süresi, hücre canlılığı analizi ve reaktif oksijen türlerinin ölçümü ile belirlendi. İlk olarak, farklı dozlarda üç saatlik H_2O_2 uygulama süresi çalışıldı (**Şekil 32**). 600-1000 μM arasındaki uygulamalarda hücre canlılığının yaklaşık %20'lere indiği gözlemlendi. ROT düzeylerinde ise 200-1000 μM arasındaki uygulamalarda anlamlı artış görüldü. Yapılacak çalışmalar açısından %20 canlılık oranı düşük bulunduğu için üç saatlik uygulama süresi tercih edilmedi. Bu nedenle uygulama süresi yarım saate indirilerek benzer dozlarda yeniden çalışıldı.

Yarım saatlik H_2O_2 inkübasyonu sonrası doza bağlı olarak hücre canlılığında azalma ve ROT oluşumunda artış gözlemlendi (**Şekil 33**). Hücre canlılığı açısından değerlendirildiğinde; 200 μM ile 1000 μM arasında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görüldü. ROT düzeylerinde ise, 50 μM 'dan itibaren tüm dozlarda kontrole göre anlamlı artış gözlemlendi. DMSO kontrolünün hücre canlılığına ve ROT oluşumuna etkisi, kontrole göre anlamlı değildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, H_2O_2 uygulama süresi yarım saat olarak belirlendi.



Şekil 32. Üç saatlik H_2O_2 uygulamasının **a)** % hücre canlılığına ve **b)** % ROT düzeyine etkisi (kontrole göre * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$)



Şekil 33. Yarım saatlik H₂O₂ uygulamasının **a)** % hücre canlılığına ve **b)** ROT düzeyine etkisi (kontrole göre *p<0.05, **p=0.002, ***p<0.0001)

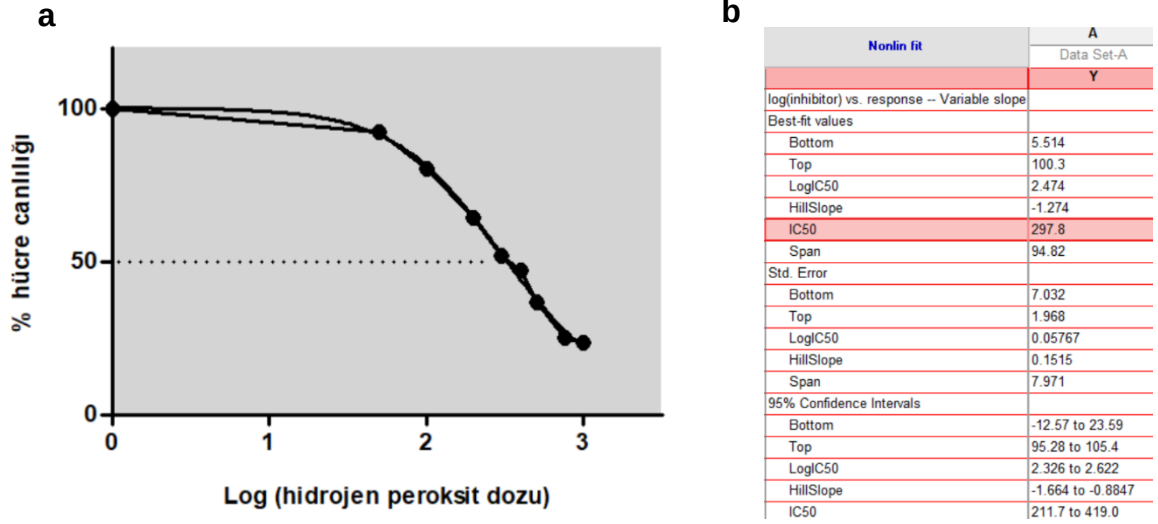
▼ ROT düzeyleri kontrole göre en az 10 kat yüksek kaldığı için buradaki grafik kat farkı olarak verilmiştir.

4.1.3. Hidrojen Peroksit IC₅₀ Dozunun Belirlenmesi

HUVE hücrelerinde hücre canlılığını %50 oranında inhibe eden H₂O₂ dozunu belirlemek amacıyla WST-1 testi yapıldı. H₂O₂ dozlarının logaritmasına karşı % hücre canlılığı değerlerine göre çizilen grafikten, IC₅₀ dozunun 300 µM olduğu belirlendi (Tablo 11 ve Şekil 34). Şekil 33 b’de, 300 µM H₂O₂ uygulaması kontrole göre ROT oluşumunda yaklaşık 20 katlık anlamlı bir artış sağlamıştır.

Tablo 11. H₂O₂’in IC₅₀ dozunu belirlenmek için kullanılan dozların logaritmik dönüşümü ve % hücre canlılık değerleri

	Log (H ₂ O ₂ dozu)	% Hücre canlılığı
Kontrol	0	100
50 µM H ₂ O ₂	1,70	92,51
100 µM H ₂ O ₂	2,00	80,50
200 µM H ₂ O ₂	2,30	64,34
300 µM H ₂ O ₂	2,48	52,00
400 µM H ₂ O ₂	2,60	47,26
500 µM H ₂ O ₂	2,70	36,74
750 µM H ₂ O ₂	2,88	25,24
1000 µM H ₂ O ₂	3,00	23,69



Şekil 34. H₂O₂'in IC₅₀ dozunun belirlenmesi **a)** logaritmik dönüşüm grafiği **b)** GraphPad Prism programı ile elde edilen IC₅₀ değeri

Ön çalışmalar sonucunda, HUVE hücrelerinde oksidatif stres oluşturacak H₂O₂ dozunun 300 µM, uygulama süresinin yarım saat olmasına karar verildi.

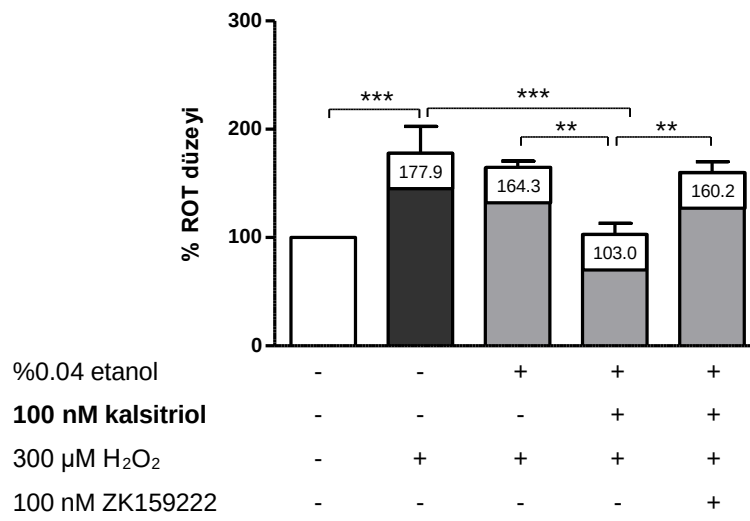
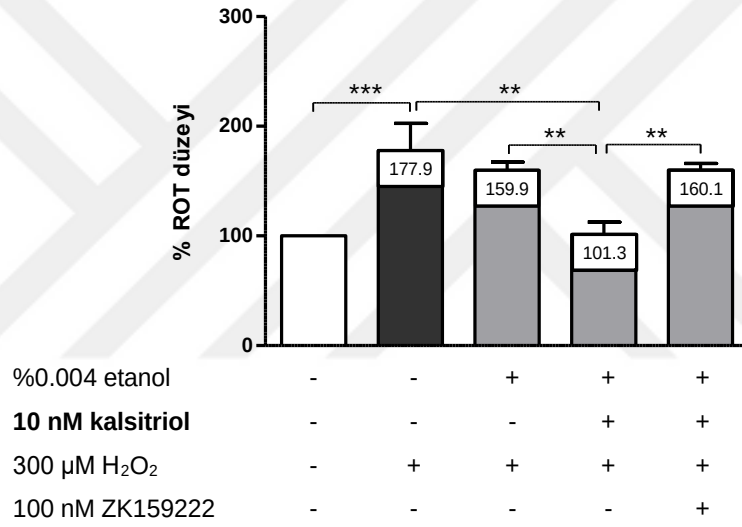
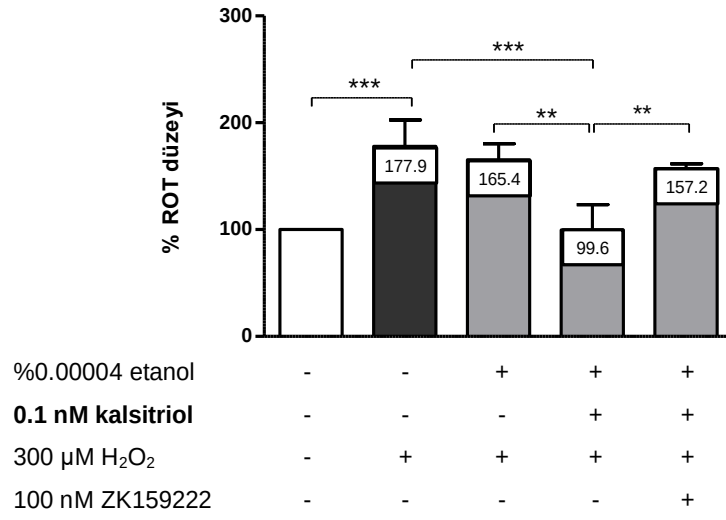
4.2. Ana Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.2.1. Kalsitriol ve Parikalsitolün Reaktif Oksijen Türlerinin Oluşumu Üzerine Etkisi

HUVE hücreleri farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitol ile 24 saat muamele edildikten sonra, 300 μM H_2O_2 ile yarım saat inkübe edildi. Ayrıca, kalsitriol ve parikalsitol uygulanan gruplarda ZK159222 antagonistinin etkisi de belirlendi. Bu çalışmada, kalsitriol ve parikalsitol için çözügen olarak kullanılan sırasıyla etanol ve propilen glikol/etanol yüzdelerinin ROT oluşumuna etkisi de incelendi.

300 μM H_2O_2 uygulaması kontrole göre yaklaşık %80 oranında anlamlı bir ROT artışı sağladı ($p<0.0001$). 0.1, 10 ve 100 nM kalsitriol ile muamele edilen gruplara bakıldığında (**Şekil 35, Tablo 12**), tüm kalsitriol dozları ROT oluşumunu 300 μM H_2O_2 uygulanan gruba göre %80 oranında anlamlı bir şekilde azaltmıştır (sırasıyla; $p=0.0005$, $p=0.0011$, $p=0.0008$).

Kalsitriol uygulaması öncesi hücrelere verilen 100 nM antagonist ise, kalsitriol uygulanan gruplara göre ROT oluşumunu %60 oranında arttırmıştır (sırasıyla; $p=0.0027$, $p=0.0055$, $p=0.0050$). Çözügen kontrollerinin ROT oluşumu üzerine herhangi bir etkisi saptanmadı ($p>0.05$).



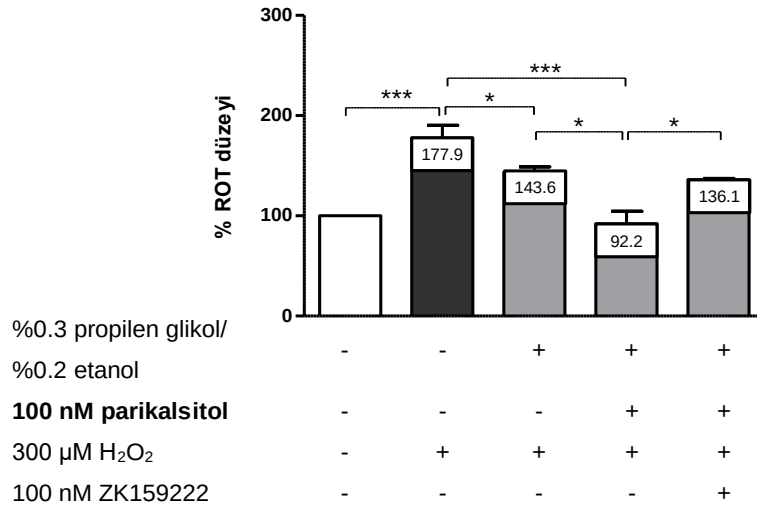
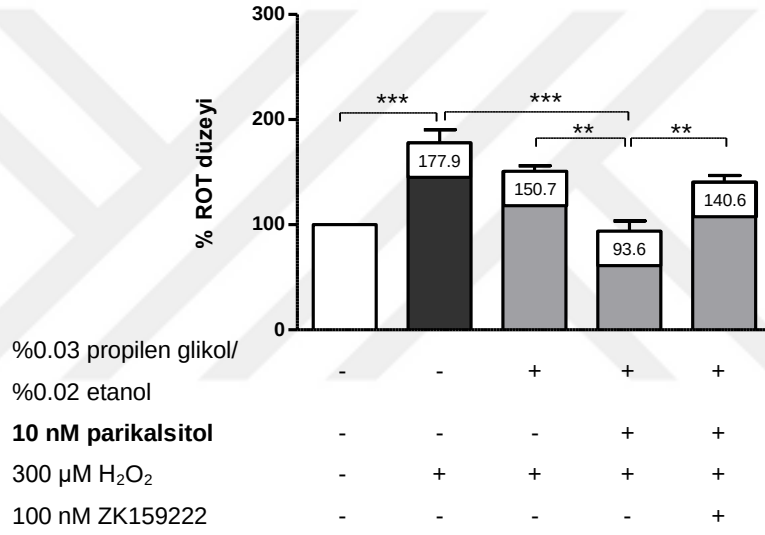
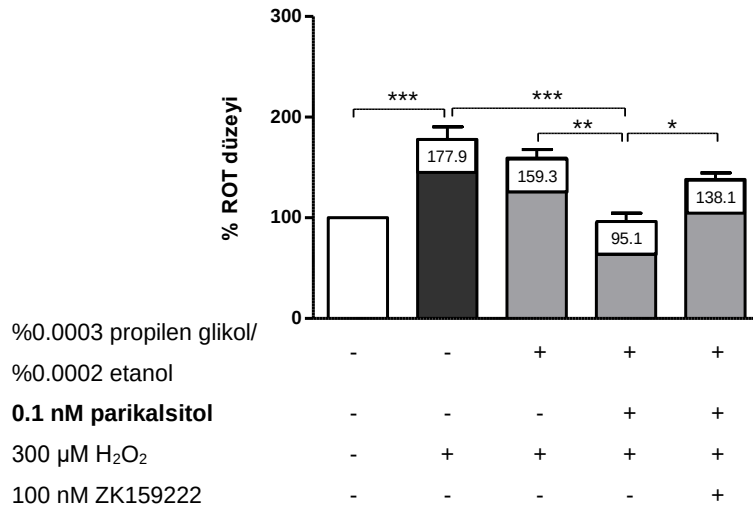
Şekil 35. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin ROT oluşumu üzerine etkisi (**p<0.01, ***p<0.001)

Tablo 12. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen ROT düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	% ROT düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	100.0±0.0008	
300 µM H ₂ O ₂	177.9±12.33	<0.0001*
%0.00004 etanol	165.4±8.68	0.239
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	99.6±9.74	0.0005†/0.0018‡
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	157.2±4.56	0.0027▼
%0.004 etanol	160.0±7.29	0.154
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	101.3±11.39	0.0011†/0.0059‡
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	160.1±6.14	0.0055▼
%0.04 etanol	164.3±6.16	0.210
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	103.0±10.23	0.0008†/0.0027‡
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	160.2±9.91	0.0050▼

ROT düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrole göre, †300 µM H₂O₂ grubuna göre, ‡Çözgen kontrolüne göre, ▼ Kalsitriol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

Farklı dozlardaki parikalsitolün ROT düzeylerine etkisi incelendiğinde (**Şekil 36**, **Tablo 13**), kalsitriole benzer şekilde tüm parikalsitol dozları ROT oluşumunu 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre yaklaşık %85 oranında anlamlı bir şekilde azaltmıştır (sırasıyla; p=0.0003, p=0.0004, p=0.0008). ROT düzeylerinde parikalsitolün dozuna bağlı bir azalma gözlenmekteydi. Parikalsitol uygulaması öncesi hücrelere verilen 100 nM antagonist ise, parikalsitol uygulanan gruplara göre ROT oluşumunu %45 - 65 oranında arttırmıştır (sırasıyla; p=0.007, p=0.0087, p=0.0232). 0.1 ve 10 nM parikalsitolün çözgen kontrollerinin ROT oluşumu üzerine herhangi bir etkisi saptanmadı (p>0.05). Ancak, 100 nM parikalsitolün çözgen kontrolü ROT düzeyini 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı olarak azalttığı gözlenmiştir (p=0.037).



Şekil 36. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin ROT oluşumu üzerine etkisi (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)

Tablo 13. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen ROT düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	% ROT düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	100.0±0.0008	
300 µM H ₂ O ₂	177.9±12.33	<0.0001*
%0.0003 PG/%0.0002 etanol	159.4±8.51	0.152
0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	95.1±9.58	0.0003 [†] /0.0019 [‡]
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	138.1±6.57	0.0011 [▼]
%0.03 PG/%0.02 etanol	150.0±5.49	0.068
10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	93.59±9.99	0.0004 [†] /0.0034 [‡]
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	140.6±6.20	0.0087 [▼]
%0.3 PG/%0.2 etanol	143.6±5.31	0.037 [†]
100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	92.20±12.41	0.0008 [†] /0.0137 [‡]
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	136.1±1.21	0.0232 [▼]

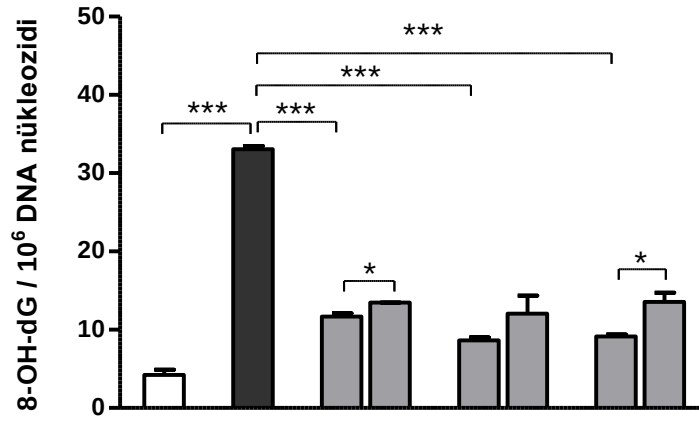
ROT düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. PG: propilen glikol. * Kontrolle göre, [†]300 µM H₂O₂ grubuna göre, [‡]Çözgen kontrolüne göre, [▼] Kalsitriol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

4.2.2. Kalsitriol ve Parikalsitolün Hasarlı DNA Nükleozidleri Üzerine Etkisi

HUVE hücrelerinde hasarlı DNA nükleozidleri 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA düzeyleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile ölçüldü. Farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün ve ZK159222 antagonistinin etkisi belirlendi.

300 µM H₂O₂ uygulaması, kontrole göre 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA düzeylerinde anlamlı bir artış sağladı (sırasıyla; $p < 0.0001$, $p = 0.0055$, $p = 0.0307$) (**Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39**). Bu artış özellikle 8-OH-dG düzeylerinde daha belirgindi (8 kat). 10 ve 100 nM kalsitriol uygulaması hem 8-OH-dG hem de *S*-cdA düzeylerinde 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı azalma sağlarken, *R*-cdA düzeyleri için yalnızca 10 nM kalsitriol uygulaması anlamlı olarak azalma sağladı. Fizyolojik konsantrasyon olan 0.1 nM kalsitriol uygulaması ise sadece 8-OH-dG düzeylerini 3 kata kadar anlamlı olarak azalttı ($p = 0.0004$).

Kalsitriol öncesi hücrelere verilen 100 nM antagonist ise, 8-OH-dG düzeylerinde 0.1 ve 100 nM kalsitriol uygulanan gruplara göre ve *S*-cdA düzeylerinde 10 nM kalsitriol uygulanan gruba göre anlamlı artma sağladı (sırasıyla; $p = 0.0249$, $p = 0.0321$, $p = 0.0019$) (**Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16**).



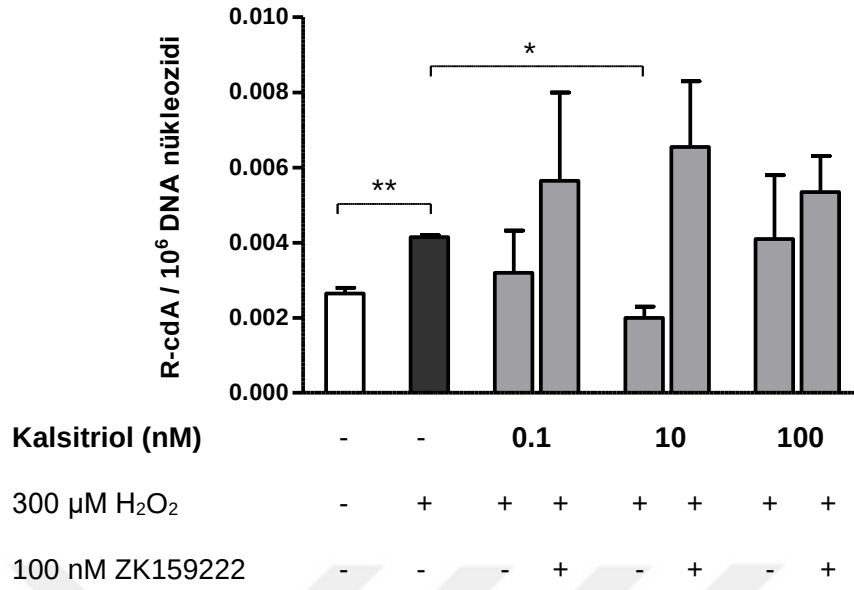
Kalsitriol (nM)	-	-	0.1	10	100
300 µM H ₂ O ₂	-	+	+	+	+
100 nM ZK159222	-	-	-	+	+

Şekil 37. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin 8-OH-dG düzeylerine etkisi (*p<0.05, ***p<0.001)

Tablo 14. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen 8-OH-dG düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	8-OH-dG / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	p
Kontrol	4.23±0.674	
300 µM H ₂ O ₂	33.08±0.405	<0.0001*
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	11.68±0.415	0.0004 [†]
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	13.47±0.015	0.0249 [▼]
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	8.67±0.365	0.0002 [†]
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	12.06±2.298	0.1907
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	9.12±0.285	0.0002 [†]
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	13.55±1.158	0.0321 [▼]

8-OH-dG düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrole göre, [†]300 µM H₂O₂ grubuna göre, [▼] Kalsitriol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

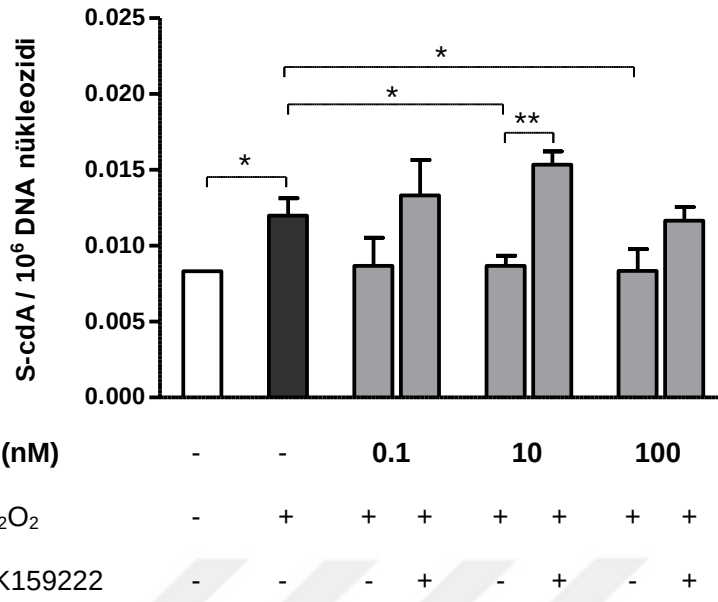


Şekil 38. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin *R*-cdA düzeylerine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Tablo 15. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen *R*-cdA düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	<i>R</i> -cdA / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	p
Kontrol	0.0027±0.0001	
300 µM H ₂ O ₂	0.0042±0.0000	0.0055*
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0032±0.0011	0.280
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0057±0.0024	0.180
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0020±0.0003	0.0097†
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0066±0.0018	0.062
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0041±0.0017	0.490
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0054±0.0010	0.293

R-cdA düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrolle göre, †300 µM H₂O₂ grubuna göre



Şekil 39. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin S-cdA düzeylerine etkisi (*p<0.05, **p<0.01)

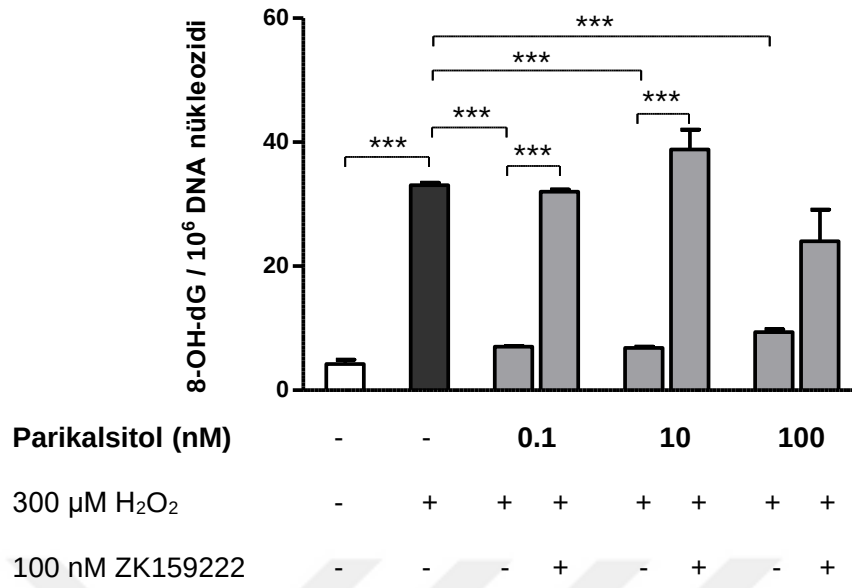
Tablo 16. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen S-cdA düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	S-cdA / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	p
Kontrol	0.0083±0.0007	
300 µM H ₂ O ₂	0.0120±0.0114	0.0307*
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0087±0.0186	0.0764
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0133±0.0023	0.096
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0087±0.0007	0.041†
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0153±0.0009	0.0019▼
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0830±0.0014	0.048†
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0117±0.0009	0.061

S-cdA düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrole göre, †300 µM H₂O₂ grubuna göre, ▼ Kalsitriol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

Farklı dozlardaki parikalsitolün hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeylerine etkisi incelendiğinde (**Şekil 40, Şekil 41, Şekil 42**), tüm parikalsitol dozları 8-OH-dG ve S-cdA düzeylerini 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı bir şekilde azaltırken, 10 ve 100 nM parikalsitol konsantrasyonları R-cdA düzeylerinde anlamlı azalma sağlamıştır. Bu azalma 8-OH-dG düzeylerinde daha belirgindir (4-5 kat) (p<0.0005). Parikalsitol, S-cdA düzeylerinde doza bağlı olarak etki gösterdi.

Antagonist uygulaması 8-OH-dG düzeylerinde 0.1 ve 10 nM parikalsitol uygulanan gruplara göre (4-6 kat) anlamlı artma sağladı (sırasıyla; p=0.0001, p<0.0001). Siklodeoksiadenozinlere bakıldığında; antagonist uygulaması R-cdA düzeylerinde 10 ve 100 nM parikalsitol uygulanan gruplara göre (2-4 kat) anlamlı artma sağlarken, S-cdA düzeylerinde sadece 100 nM parikalsitol uygulanan gruba göre (1.5 kat) anlamlı bir artış gösterdi (sırasıyla; p=0.0126, p=0.016, p=0.0018) (**Tablo 17, Tablo 18, Tablo 19**).

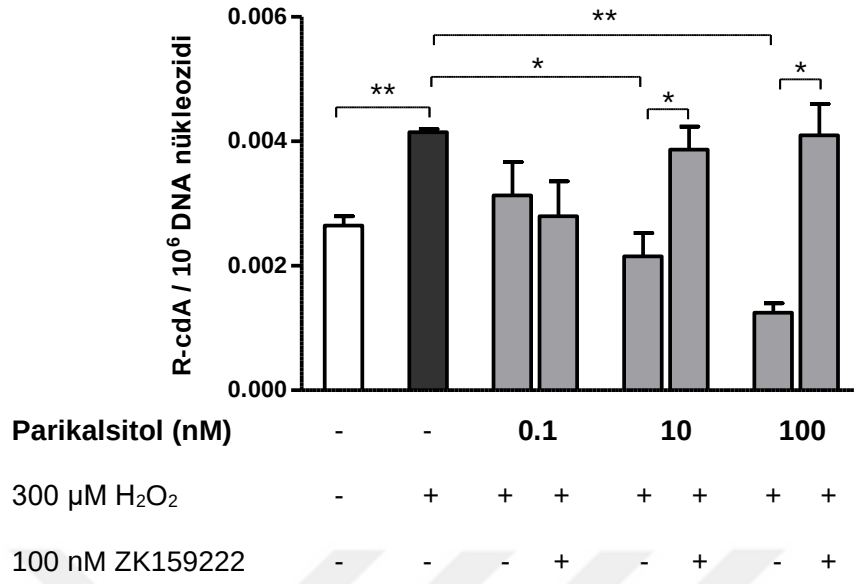


Şekil 40. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin 8-OH-dG düzeylerine etkisi (***) $p < 0.001$)

Tablo 17. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen 8-OH-dG düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	8-OH-dG / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	p
Kontrol	4.23±0.674	
300 μM H ₂ O ₂	33.08±0.405	<0.0001*
0.1 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	7.04±0.095	0.0001†
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	32.02±0.370	0.0001▼
10 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	6.83±0.209	<0.0001†
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	38.84±3.180	<0.0001▼
100 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	9.38±0.455	0.0002†
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 μM H ₂ O ₂	24.03±5.117	0.0645

8-OH-dG düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrolle göre, †300 μM H₂O₂ grubuna göre, ▼ Parikalsitol + 300 μM H₂O₂ grubuna göre

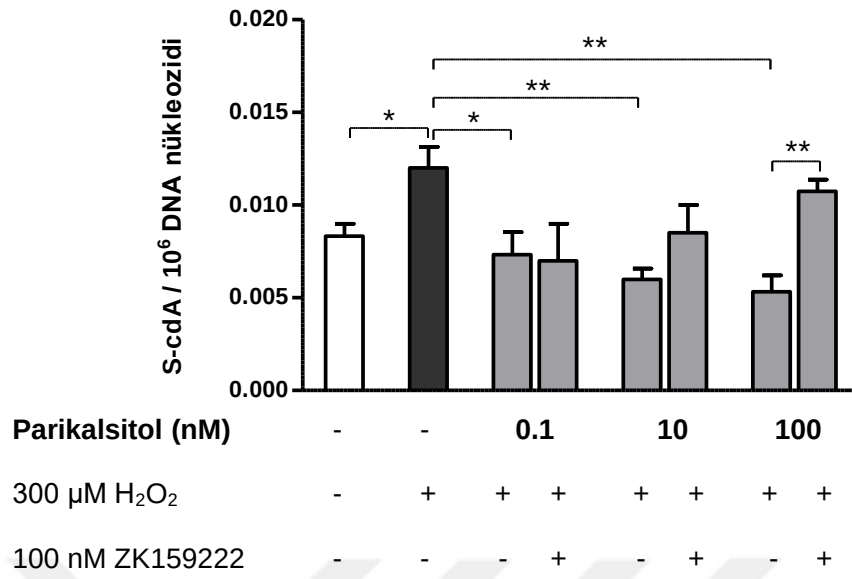


Şekil 41. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin *R*-cdA düzeylerine etkisi (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Tablo 18. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen *R*-cdA düzeyleri ve *p* değerleri

Koşullar	<i>R</i> -cdA / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	<i>p</i>
Kontrol	0.0027±0.0001	
300 µM H ₂ O ₂	0.0042±0.0000	0.0055*
0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0031±0.0005	0.1195
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0028±0.0006	0.344
10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0022±0.0004	0.0121[†]
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0039±0.0004	0.0126[▼]
100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0013±0.0002	0.0015[†]
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0041±0.0005	0.0016[▼]

R-cdA düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. *Kontrole göre, [†]300 µM H₂O₂ grubuna göre, [▼]Parikalsitol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre



Şekil 42. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonistinin S-cdA düzeylerine etkisi (*p<0.05, **p<0.01)

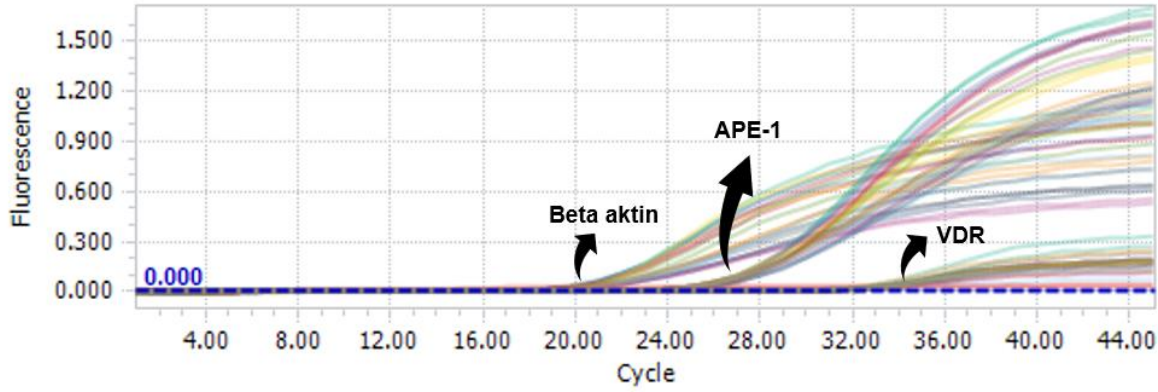
Tablo 19. Farklı dozlardaki parikalsitol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen S-cdA düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	S-cdA / 10 ⁶ DNA nükleozidi (ort ± ss)	p
Kontrol	0.0083±0.0007	
300 µM H ₂ O ₂	0.0120±0.0114	0.0307*
0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0073±0.0120	0.0188[†]
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0070±0.0020	0.4434
10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0060±0.0006	0.0045[†]
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0085±0.0015	0.0799
100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0053±0.0009	0.0034[†]
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.0108±0.0006	0.0018[▼]

S-cdA düzeyi ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrole göre, [†]300 µM H₂O₂ grubuna göre, [▼] Parikalsitol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

4.2.3. Kalsitriol ve Parikalsitolün VDR ve APE1 mRNA Ekspresyon Düzeyleri Üzerine Etkisi

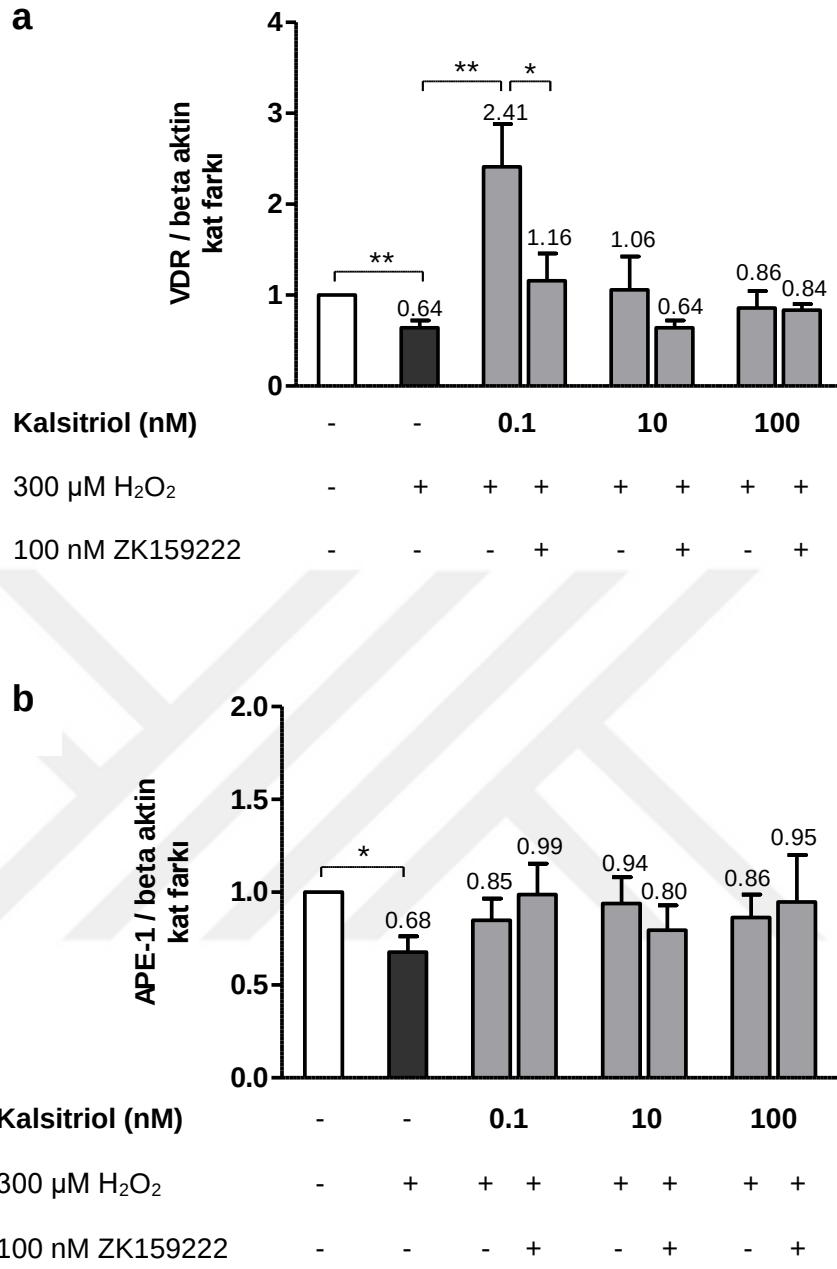
Kalsitriol, parikalsitol ve ZK159222 antagonist uygulaması sonrası HUVE hücrelerindeki VDR ve DNA onarım enzimi APE1'in mRNA ekspresyon düzeyleri, qPCR ile LightCycler® 96 (Roche Diagnostic) cihazının software programı kullanılarak belirlendi. Her gene ait Cq değerleri kullanılarak $2^{-\Delta\Delta Cq}$ yöntemi ile rölatif kantitasyon yapıldı. Rölatif kantitasyon için, hedef genlerin Cq değerleri referans gen olan beta aktin Cq değerlerine oranlandı. Hedef genlere (VDR ve APE1) ve referans gene ait (beta aktin) qPCR amplifikasyon eğrisinin bir örneği **Şekil 43**'de verilmiştir.



Şekil 43. VDR, APE1 ve beta aktin'e ait örnek bir amplifikasyon eğrisi

300 μ M H₂O₂ uygulaması hem VDR hem de APE1 mRNA ekspresyon düzeylerini kontrole göre anlamlı olarak azaltmıştır (sırasıyla; $p=0.0070$, $p=0.0117$) (**Şekil 44**, **Tablo 20**, **Tablo 21**). 0.1 nM kalsitriol uygulaması sonrasında, VDR ekspresyon düzeyi 300 μ M H₂O₂ uygulanan gruba göre yaklaşık 4 kat anlamlı artış sağladı ($p=0.0036$). 0.1 nM kalsitriol öncesi uygulanan 100 nM ZK159222 antagonisti ise kalsitriolün bu etkisini anlamlı şekilde 2 kat azaltmıştır ($p=0.0441$). 10 ve 100 nM kalsitriol uygulaması VDR ekspresyonunu arttırmış olsa da, bu artış anlamlı değildi. Benzer şekilde 10 ve 100 nM kalsitriol öncesi antagonist uygulamasının da, VDR ekspresyonunu azalttığı görüldü. Ancak bu azalma anlamlı değildi.

APE1 ekspresyonları açısından incelendiğinde, kalsitriolün farklı dozları 300 μ M H₂O₂ uygulanan gruba göre APE1 ekspresyonlarında artış sağlasa da, anlamlı bir fark elde edilemedi. ZK159222 antagonist uygulaması da, APE1 düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturmadi.



Şekil 44. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki kalsitriolün ve VDR antagonistinin **a)** VDR ve **b)** APE1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (*p<0.05, **p<0.01)

Tablo 20. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen VDR mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	VDR mRNA ekspresyon düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	1.000±0.00006	
300 µM H ₂ O ₂	0.640±0.082	0.0070*
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	2.410±0.471	0.0036[†]
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	1.160±0.297	0.0441[▼]
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	1.060±0.363	0.1227
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.640±0.080	0.1611
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.860±0.185	0.1415
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.837±0.064	0.4557

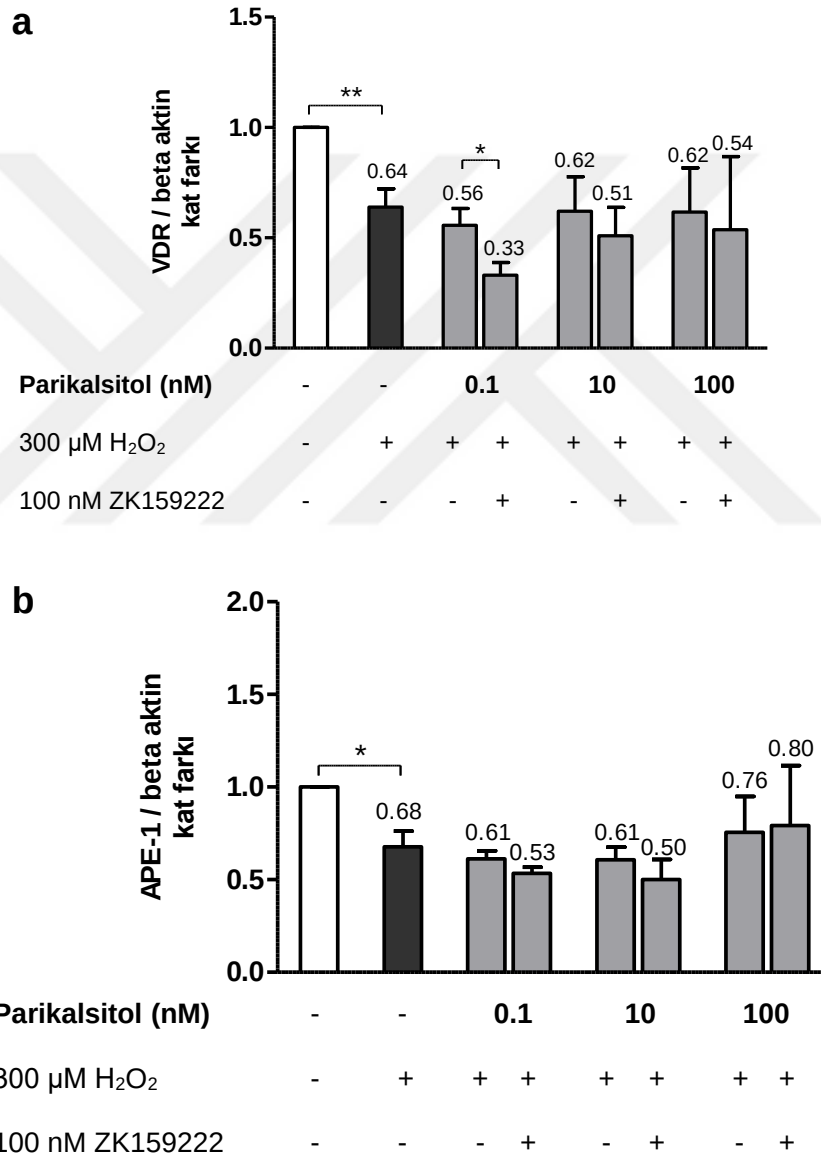
VDR mRNA ekspresyon düzeyi ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. *Kontrole göre, [†]300 µM H₂O₂ grubuna göre, [▼]Kalsitriol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

Tablo 21. Farklı dozlardaki kalsitriol ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen APE1 mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	APE1 mRNA ekspresyon düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	1.000±0.00006	
300 µM H ₂ O ₂	0.678±0.085	0.0117*
0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.850±0.115	0.1350
ZK159222 + 0.1 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.987±0.168	0.2698
10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.940±0.141	0.0754
ZK159222 + 10 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.797±0.132	0.2495
100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.863±0.123	0.1265
ZK159222 + 100 nM kalsitriol + 300 µM H ₂ O ₂	0.947±0.255	0.3915

APE1 mRNA ekspresyon düzeyi ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. *Kontrole göre

Parikalsitolün VDR ve APE1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi incelendiğinde (Şekil 45, Tablo 22, Tablo 23), parikalsitolün farklı dozlarının VDR ve APE1 ekspresyonlarında 300 μ M H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı bir fark elde edilmedi. Yalnızca, 0.1 nM parikalsitol öncesi uygulanan 100 nM ZK159222 antagonisti 0.1 nM parikalsitole göre VDR ekspresyonunu anlamlı olarak yaklaşık 2 kat azaltmıştır (p=0.0389).



Şekil 45. HUVE hücrelerinde farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonisinin **a)** VDR ve **b)** APE1 mRNA ekspresyon düzeylerine etkisi (*p<0.05, **p<0.01)

Tablo 22. Farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen VDR mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	VDR mRNA ekspresyon düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	1.000±0.00006	
300 µM H ₂ O ₂	0.640±0.082	0.0070*
0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.557±0.077	0.2533
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.330±0.058	0.0389▼
10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.620±0.156	0.4535
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.510±0.129	0.3078
100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.617±0.201	0.4545
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.537±0.332	0.4233

VDR mRNA ekspresyon düzeyi ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrolle göre, ▼ Parikalsitol + 300 µM H₂O₂ grubuna göre

Tablo 23. Farklı dozlardaki parikalsitolün ve VDR antagonisti uygulamasından elde edilen APE1 mRNA ekspresyon düzeyleri ve p değerleri

Koşullar	APE1 mRNA ekspresyon düzeyi (ort ± ss)	p
Kontrol	1.000±0.00006	
300 µM H ₂ O ₂	0.678±0.085	0.0117*
0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.613±0.043	0.2863
ZK159222 + 0.1 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.533±0.034	0.1076
10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.607±0.069	0.2834
ZK159222 + 10 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.500±0.110	0.2282
100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.757±0.193	0.3470
ZK159222 + 100 nM parikalsitol + 300 µM H ₂ O ₂	0.793±0.322	0.4634

APE1 mRNA ekspresyon düzeyi ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) ortalama ± standart sapma şeklinde verilmiştir. * Kontrolle göre

5. TARTIŞMA

D vitamini bilinen klasik kalsemik rolü dışında kardiyovasküler, otoimmün hastalıklara karşı koruyucu etkisi ve kanser hücre progresyonunun inhibisyonunu içeren bir dizi iskelet dışı biyolojik cevaplarının keşfedilmesi ile dünya çapında D vitamini ile ilişkili yapılan çalışmalar özellikle son 10 yılda büyük ivme kazanmıştır. Literatürde birçok kronik hastalıkla ilişkilendirilen ve küresel bir sağlık sorunu haline gelen D vitamini eksikliği ile bu hastalıkların patofizyolojisinde önemli bir rol oynayan oksidatif stresin bağlantısını araştıran çalışmalar mevcuttur. Yapılan hücre kültürü ve hayvan çalışmaları D vitamini takviyesinin daha düşük oksidatif strese neden olduğunu bildirilmiştir (152,167–172). Farklı hasta gruplarında yapılan klinik çalışmalarda ise, D vitamininin oksidatif stresi azalttığı yönünde bulgular rapor edilmiştir (173–176). Ancak yapılan bu çalışmalarda, düşük D vitamini düzeyleri oksidatif stresin neden olduğu patolojik durumun bir göstergesi olsa da, D vitamininin antioksidan etki mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ayrıca, yapılan literatür araştırmasında, oksidatif stresin ana hedeflerinden olan endotel hücresinde, sistemik oksidatif hasarın en iyi göstergesi olarak kabul edilen ve birçok hastalık ile yakından ilişkisi bulunan DNA hasarına ve onarımına, D vitamininin etkisinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında geniş kapsamlı bir çalışma planlanarak, insan umbilikal ven endotel hücresinde fizyolojik ve supra-fizyolojik dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarı ve onarımı üzerine koruyucu etkisi olup olmadığı incelenmiştir. Bu amaçla HUVE hücrelerinde hidrojen peroksit ile oluşturulan oksidatif stres modelinde, farklı dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün reaktif oksijen türleri ve hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeyleri yanısıra DNA onarım enzimlerinden APE1 ve VDR'nin mRNA ekspresyonları üzerine doz bağımlı etkileri araştırıldı. Ayrıca, bu olası etkilerde VDR'nin rolünü belirlemek amacıyla VDR antagonisti kullanıldı.

Çalışmamızda HUVE hücrelerinde oksidatif stres modeli oluşturmak üzere kullanılan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçebilme özelliği ve görece reaktif olmayan yapısı nedeniyle fizyolojik bir öneme sahiptir. Yüksek konsantrasyonlarda ise hücre ve doku hasarı oluşumuna dahil olduğu bilinmektedir. Hücre bileşenlerine karşı düşük reaktivite göstermesine rağmen, geçiş metal iyonları

varlığında potansiyel olarak reaktif oksijen türlerini (ROT) oluşturma eğilimindedir (177). Hidrojen peroksit için optimum doz ve süre belirlediğimiz ön çalışmalarımız kapsamında, hücre canlılığı ve ROT oluşumu deneyleri ile ana deneylerde kullanılacak H_2O_2 'in uygulama süresi yarım saat olarak seçildi. HUVE hücrelerinde H_2O_2 'in IC_{50} dozu ise yapılan hücre canlılığı analizi ile 300 μM olarak belirlendi. 300 μM H_2O_2 dozu, reaktif oksijen türlerini kontrole göre yaklaşık 20 kat anlamlı olarak arttırırken ($p < 0.0001$), %50 oranında hücre canlılığını sağladı.

Hücre içinde düzeyi artan reaktif oksijen türleri DNA hasarına yol açmaktadır. DNA yapısında oluşan hasarlar ve bu hasarların onarılması yaşamın devamlılığı açısından oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle DNA hasarının önlenmesi ve onarımının desteklenmesini sağlayacak çeşitli tedavi stratejileri geliştirilmektedir (7). Bu stratejilerden biri olan D vitamini son yıllarda ön plana çıkmaktadır. Literatürde D vitamini ve DNA hasarı/onarımının incelendiği insan ve hayvan çalışmaları bulunmakla birlikte, çelişkili sonuçlar elde edilmiştir (6,7,9,144–149). Yapılan bu çalışmaların birçoğunda DNA hasarı duyarlı olmasına rağmen tekrarlanabilirliği düşük ve fizyolojik değişkenlerden etkilenen tek hücre jel elektroforezi ile veya tek bir hasar ürününün ölçümü ile değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, D vitaminin aktif formu olan kalsitriol klinik uygulamalar açısından bazı kısıtlamalara sahiptir. Kalsitriolün klasik olmayan etkileri için nanomolar düzeylerine ihtiyaç vardır. Ancak, supra-fizyolojik (nM) konsantrasyonlardaki kalsitriol hiperkalsemiye neden olur. Bu nedenle, daha az kalsemik ve fosfatemik etkiler sergileyen sentetik D vitamini analogları sentezlenmeye başlanmıştır (3,62). Aktif bir D vitamini analogu olan parikalsitol metabolizmada herhangi bir hidroksilasyon basamağına gerek duymadan direkt VDR'ye bağlanabilmektedir (69). Parikalsitolün DNA hasarı üzerine etkilerini inceleyen tek bir hayvan çalışması bulunmaktadır (178). Nefrotoksik model oluşturulan sıçanlarda, parikalsitol takviyesinin oksidatif DNA hasarı göstergesi olan 8-OH-dG düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gösterilen bu çalışmada 8-OH-dG düzeyleri HPLC ile belirlenmiştir. Ancak, literatürde parikalsitolün oksidatif DNA hasarına ve onarımına etkisini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda kalsitriole ek olarak parikalsitol analogu da kullanarak DNA hasarı ve onarımı açısından her iki molekülün etkilerini karşılaştırma imkanı elde ettik.

Kalsitriolün etkilerini inceleyen hücre kültürü çalışmalarına bakıldığında, ağırlıklı olarak kanser hücre hatlarının kullanıldığı ve UV ışınları ile oluşan DNA hasarı ve onarımının incelendiği çalışmaların yapıldığı görülmektedir (60,150–158). Bu çalışmalarda DNA hasarı genellikle 8-OH-dG, timin dimerleri ve DNA çift zincir kırıkları tek hücre jel elektroforezi ya da immünohistokimyasal yöntemle değerlendirilmiştir. Parikalsitolün DNA hasarına etkisini inceleyen hücre kültürü çalışması bulunmamaktadır.

Çalışmamız sonuçlarını HUVE hücrelerinde kalsitriol ve parikalsitolün reaktif oksijen türlerinin oluşumu üzerine etkisi açısından değerlendirdiğimizde; kalsitriol ve parikalsitolün 0.1, 10 ve 100 nM dozları, sadece 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre ROT oluşumunu anlamlı olarak azaltmıştır. Parikalsitolün ROT oluşumunu azaltıcı bu etkisi doza bağlı olarak gerçekleşmiştir. Ancak kalsitriolde böyle bir etki görülmemiştir. VDR antagonisti ZK159222 varlığında kalsitriol ve parikalsitol uygulaması yapılan koşullarda, sadece kalsitriol ve parikalsitol uygulananlara göre ROT oluşumu anlamlı olarak artmıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, kalsitriol ve parikalsitolün ROT azaltıcı etkilerinde VDR'nin rolünü desteklemektedir.

Kalsitriol ve parikalsitolün hazırlık aşamasında kullanılan çözümlerin ROT oluşumu üzerine anlamlı bir etkisi bulunmamıştır. Yalnızca 100 nM parikalsitol için kullanılan %0.3 propilen glikol/%0.2 etanol çözgeni, 300 µM H₂O₂ uygulanan gruba göre anlamlı azalma sağlamıştır. Ancak 100 nM parikalsitol uygulaması ile çözgen kontrolüne göre ROT oluşumunda %50 oranında anlamlı bir düşüş sağlamış olması bu etkinin göz ardı edilebileceğini göstermektedir.

Literatürde HUVE hücrelerinde kalsitriolün ROT üzerine etkisini inceleyen sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Polidoro ve ark.'nın apoptozda önemli bir sinyal yolağı olan MEK/ERK/SIRT-1 üzerinden kalsitriolün ROT oluşumuna etkisini inceledikleri çalışmada, 10, 50 ve 100 nM kalsitriol dozları denenmiş ve 6 saat boyunca uygulanan 50 µM H₂O₂'in oluşturduğu ROT düzeylerini anlamlı olarak azalttığı gösterilmiştir (8). Bu etki özellikle kalsitriolün 100 nM dozunda daha belirgindir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar doğrultusunda, kalsitriolün endotel hücresinde antioksidan potansiyelinin olduğu önerilmektedir. Uberti ve ark.'nın otofajik yollar aracılığıyla oluşan oksidatif stres üzerine kalsitriolün etkisini araştırdığı çalışmada ise, 1 nM

kalsitriolün 200 µM H₂O₂ ile 20 dakikada oluşturulan ROT düzeylerini anlamlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (179). Bu iki çalışma dışındaki araştırmalar kalsitriolün H₂O₂ dışındaki farklı ajanlar (yüksek glukoz ve iyonizan radyasyon) ile oluşturulan ROT düzeylerine etkisini değerlendirmiştir. 25 nM-100 nM aralığındaki kalsitriol dozlarının kullanıldığı bu çalışmalarda da, kalsitriolün ROT düzeylerine olan yararlı etkileri gösterilmiştir (16, 180,181). Bizim çalışma sonuçlarımız da, kalsitriolün supra-fizyolojik dozlardaki etkisini inceleyen yukarıdaki çalışmaları destekler nitelikte olup, bunlara ek olarak çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ile kalsitriolün fizyolojik dozunun ROT oluşumunu azaltıcı etkisini gösterdik.

Parikalsitolün HUVE hücrelerinde ROT oluşumuna etkisini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak insan aortik düz kas ve insan renal proksimal tübüler epitel hücrelerinde yapılan benzer iki çalışmada, 30 nM parikalsitolün yüksek fosfat düzeyleri ile oluşturulan ROT artışını önlediği ve 10 nM parikalsitolün bir üremik toksin olan indol sülfat ile oluşturulan ROT düzeyini azalttığı gösterilmiştir (182,183). Çalışmamız, parikalsitolün çalışılan fizyolojik ve supra-fizyolojik tüm dozlarında HUVE hücrelerinde H₂O₂ aracılı ROT oluşumuna yararlı etkisinin gösterildiği ilk araştırmadır.

Çalışmamız HUVE hücrelerinde kalsitriol ve parikalsitolün hasarlı DNA nükleozidlerinin oluşumu üzerine etkisi ve bu etkide VDR'nin rolü açısından irdelendiğinde; kullanılan 300 µM H₂O₂ dozu, her üç hasarlı nükleozid düzeyini kontrole göre anlamlı olarak arttırdığı gözlemlendi. Bu artış özellikle 8-OH-dG düzeylerinde daha belirgindi. Çalışmamızda özellikle supra-fizyolojik dozlardaki kalsitriol ve parikalsitolün sadece H₂O₂ uygulanan gruba göre 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA düzeylerini anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur. Tüm kalsitriol dozları 8-OH-dG düzeylerinde azalma sağlarken, R-cdA ve S-cdA düzeylerinde 10 ve 100 nM kalsitriol dozları etkili olmuştur. Kalsitriole benzer şekilde, tüm parikalsitol dozlarının 8-OH-dG ve S-cdA düzeylerinde azalma sağladığı belirlendi. R-cdA düzeylerinde ise, yalnızca supra-fizyolojik dozların etkili olduğu bulunmuştur. Parikalsitol, S-cdA düzeylerini doza bağlı olarak azaltmıştır. Kalsitriolde ise doza bağlı bir etki gözlenmemiştir.

100 nM ZK159222 uygulaması, sadece kalsitriol ve parikalsitol uygulananlara göre her üç hasarlı nükleozid düzeyini anlamlı olarak arttırmıştır. Kalsitriol uygulanan gruplarda bu etki daha minimal iken (yaklaşık 2 kat), parikalsitol uygulanan gruplarda

hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeyleri yaklaşık 2-6 kat artmıştır. ZK159222 antagonistinin etkisi 10 ve 100 nM kalsitriol ve parikalsitol uygulamalarında daha belirgindir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar, özellikle 10 ve 100 nM supra-fizyolojik kalsitriol ve parikalsitol dozlarının oksidatif DNA hasarının en güvenilir belirteçleri olan hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeylerini azaltıcı etkilerinde VDR'nin rolünü desteklemektedir.

Yapılan literatür incelemesinde, kalsitriolün ve parikalsitolün HUVE hücrelerinde hasarlı DNA nükleozidleri (8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA) üzerine etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. HUVE hücreleri dışında yapılan *in vitro* çalışmalarda ağırlıklı olarak kanser hücre hatları kullanılmış, UV ışınları ile oluşan DNA hasarı parametrelerinin incelendiği çalışmalar yapılmıştır (150–155). UV ışınlarına maruz kalan insan deri hücrelerinde DNA hasarının incelendiği bir çalışmada 1 nM kalsitriolün deri hücrelerini timin dimerleri, 8-OH-dG ve abazik bölgelerin oluşumundan koruyabildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada DNA hasarı tek hücre jel elektroforezi ile değerlendirilmiş, ayrıca 8-OH-dG ve timin dimerleri ise kalitatif olarak immünohistokimyasal yöntemle belirlenmiştir (155). Yapılan diğer bir çalışmada, normal ve kanserli farklı hücre hatlarında 2-10 nM kalsitriolün antioksidan ve kemo-koruyucu özellikleri yanı sıra yapısal DNA hasar sinyallerine etkisi incelenmiş ve kalsitriolün endojen oksidan düzeylerini azalttığı, DNA hasar sinyali ve VDR fosforilasyonu arasındaki etkileşim ile DNA onarım etkinliğini artırdığı gösterilmiştir (156).

Bizim çalışmamızda hasarlı DNA nükleozidleri referans yöntem olarak kabul edilen ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle giderek diğer yöntemlerin yerini almaya başlayan tandem kütle spektrometrik yöntemle çalışılmıştır. Oksidatif DNA hasarının tek bir parametre üzerinden değerlendirilmesi sonuçların güvenilirliğini etkileyebilmektedir. Kullandığımız yöntemin en önemli üstünlüğü aynı anda 8-OH-dG, *R*-cdA ve *S*-cdA hasar ürünlerinin ölçülebilmesidir. Araştırmamız kalsitriol ve parikalsitolün HUVE hücrelerinde H₂O₂ aracılı oksidatif DNA hasarını önleyici etkilerinin gösterildiği ilk çalışmadır. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçlar oksidatif DNA hasarının güvenilir biyobelirteçleri olan hasarlı DNA nükleozidlerinin referans yöntem kullanılarak ölçülmesi açısından da önem taşımaktadır.

Çalışmamız HUVE hücrelerinde kalsitriol ve parikalsitolün DNA onarım enzimi APE1 ve VDR'nin mRNA ekspresyonu üzerine etkileri açısından incelendiğinde; yarım saat süre ile 300 µM H₂O₂'e maruz bırakılan endotel hücrelerinde APE1 mRNA ekspresyonunda anlamlı azalma saptanırken, kalsitriol ve parikalsitolün DNA onarım enzimi APE1 üzerine herhangi bir etkisi bulunmamıştır. Bunun nedeni olarak, kalsitriol ve parikalsitolün APE1 ekspresyonuna yansımada yarım saatlik akut oksidatif stres uygulama süresinin yeterli olmadığı düşüncesindeyiz.

Literatürde kalsitriolün ve parikalsitolün APE1 mRNA ekspresyonlarına etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamaktadır; ancak farklı hücre hatlarında D vitamini ile diğer DNA onarım proteinleri arasındaki ilişkinin gösterildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır (154,156–158,184). Halicka ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, normal ve kanserli farklı hücre hatlarında 2-10 nM kalsitriolün DNA hasar sinyali ve VDR fosforilasyonu arasındaki etkileşim ile DNA onarım etkinliğini arttırdığı gösterilmiştir (156). Graziano ve ark. ise insan fibroblast hücrelerinde yaptıkları çalışma ile onkogen-indüklü yaşlılık sürecinde DNA çift zincir kırıklarını onaran proteinlerin (BRCA1 ve 53BP1) D vitamini/VDR sinyalizasyonu tarafından düzenlendiği rapor edilmiştir (157). Gen profillemeye çalışmalarında DNA onarım genlerinin kalsitriol tarafından indüklenen çok sayıda transkripsiyon genleri arasında olduğu bildirilmiştir (158,184). Sonuç olarak, daha uzun sürelerde oksidatif strese maruziyet koşullarında APE1-D vitamini ilişkisinin inceleyen ileri çalışmalara gereksinim olduğu düşünülmektedir.

Literatürde memeli hücrelerinde yapılan çalışmalarda, kalsitriolün VDR'nin mRNA ve protein düzeylerini doğrudan arttırdığına dair bulgular yer almakla birlikte, VDR'nin kalsitriole bağlı bu regülasyonunun hücre ve doku tipine göre değişebildiği belirtilmektedir (33,185,186). Diğer yandan, makrovasküler endotel hücrelerinde H₂O₂ aracılı oksidatif stres durumunda kalsitriol ve parikalsitolün VDR ekspresyonlarına olan etkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak, daha genel olarak VDR mRNA ekspresyonunun endotel hücrede incelendiği bir çalışma mevcuttur. Durk ve ark.'nın yaptıkları çalışmanın sonuçlarına göre, insan beyin mikrovasküler endotel hücresinde 24 saat preinkübe edilen supra-fizyolojik dozlardaki kalsitriol (10 ve 100 nM), VDR ekspresyonlarında herhangi bir değişiklik oluşturmazken, sıçan beyin mikrovasküler endotel hücresinde aynı koşullarda sadece 100 nM kalsitriol VDR ekspresyonunu kontrole göre 1.5 kat arttırmıştır (187).

Çalışmamızda H₂O₂'e maruz bırakılan makrovasküler endotel hücrelerinde VDR ekspresyonlarının azalması, sonrasında fizyolojik dozdaki kalsitriolün VDR ekspresyonlarını arttırması ve bu etkinin VDR antagonisti ile ortadan kalkmasının belirlenmesi ile, HUVEC de oksidatif stres durumunda kalsitriolün koruyucu etkilerini VDR aracılığı ile gerçekleştirdiği ilk kez gösterilmiş oldu. Elde ettiğimiz bu bulgu ile literatüre önemli bir yenilik getirdiğimizi düşünmekteyiz. Tüm bu bilgiler ışığında, yapılan bu çalışma ile oksidatif stresin ana hedeflerinden biri olan ve birçok kronik hastalık ile yakından ilişkisi bulunan endotel hücresinde, kalsitriol ve sentetik analogu parikalsitolün oksidatif DNA hasarı ve onarımına etkisini inceleyerek, literatürdeki bu eksikliğin tamamlanmasına katkı sağladığımız düşüncesindeyiz.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ışığında sonuçlarımız aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- HUVE hücrelerinde 300 μ M H_2O_2 ile ROT oluşumu sağlanarak %50 hücre canlılığının korunduğu oksidatif stres modeli oluşturuldu.
- Kalsitriol ve parikalsitolün farklı dozları (0.1, 10 ve 100 nM) ROT oluşumunu büyük oranda azaltmıştır. Parikalsitol, ROT oluşumunun azaltılmasında doza bağlı etki göstermektedir. ZK159222 antagonisti kalsitriol ve parikalsitolün bu etkisini önleyerek ROT oluşumunu arttırmıştır. Bu durum kalsitriol ve parikalsitolün ROT'un azaltılmasındaki yararlı etkilerinin VDR aracılı olduğunu göstermektedir. HUVE hücrelerinde parikalsitolün H_2O_2 -aracılı ROT oluşumunu azaltıcı etkisi literatürde ilk kez gösterilmiştir.
- Kalsitriol ve parikalsitolün özellikle supra-fizyolojik dozları (10 ve 100 nM) hasarlı DNA nükleozidleri 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA düzeylerini önemli ölçüde azaltmıştır. Parikalsitol, S-cdA düzeylerinin azalmasında doza bağlı etki göstermektedir. ZK159222 antagonisti kalsitriol ve parikalsitolün bu etkisini önleyerek hasarlı DNA nükleozidlerinin düzeylerini arttırmıştır. Bu durum kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarının önlenmesindeki etkilerinin VDR aracılı olduğunu göstermektedir.
- Kalsitriol ve parikalsitol ROT oluşumu ve oksidatif DNA hasarını azaltıcı etkileri yönünden karşılaştırıldığında, HUVE hücrelerinin oksidatif stresten korunmasında parikalsitolün kalsitriole göre daha etkili olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, özellikle supra-fizyolojik dozlar kalsitriol ve parikalsitolün oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkisinde önemlidir.
- Kalsitriol ve parikalsitolün DNA onarım proteini APE1 mRNA ekspresyonları üzerine etkisi görülmedi. Çalışmamız, kalsitriol ve parikalsitolün HUVE hücrelerinde APE1 mRNA ekspresyonlarının incelendiği ilk çalışmadır.
- Kalsitriolün 0.1 nM fizyolojik dozunun nükleer reseptörü VDR'nin mRNA ekspresyonunu artırırken, diğer dozlarda bu etki görülmedi.

Çalışmamız ile ortaya konan sonuçlar literatüre önemli ve yeni bilgiler sağlarken, ileriye yönelik yapılması planlanan çalışmalar için de yeni araştırma konuları ortaya çıkmaktadır. Araştırmamız ile ilgili öneriler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Çalışmamızda hidrojen peroksitin görece yüksek dozu ve kısa muamele süresi ile HUVE hücrelerinde akut oksidatif stres modeli oluşturuldu. Elde ettiğimiz sonuçlar kalsitriol ve parikalsitolün akut oksidatif streste koruyucu etkilerini göstermiştir. Ancak tüm dünyada ölüm nedenlerinin başında yer alan kronik hastalıklardaki oksidatif stres ortamının değerlendirilebilmesi için, *in vitro* kronik oksidatif stres modeli oluşturularak daha düşük dozda ve uzun süreli hidrojen peroksit uygulaması yapılabilir.
- Deneylerimizde kalsitriol ve parikalsitolün VDR aracılı etkilerinin gösterilmesi için, VDR antagonisti kullanılarak farmakolojik bir inhibisyon sağlandı. Ancak, siRNA aracılığı ile VDR geninin susturulması kalsitriol ve parikalsitolün etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir.
- mRNA ekspresyonları değerlendirilen APE1 ve VDR'nin protein düzeyindeki ekspresyonlarının da araştırılması, kalsitriol ve parikalsitolün etkilerinin değerlendirilmesinde daha yararlı olabileceği görüşündeyiz.
- Çalışmamızda mRNA ekspresyonu bakılan BER mekanizmasının anahtar DNA onarım enzimi APE1'in yanı sıra DNA onarımına katılan diğer enzimlerin de incelenmesi, kalsitriol ve parikalsitolün DNA onarım mekanizmasındaki rolünün anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Gröber U, Spitz J, Reichrath J, Kisters K, Holick MF. Vitamin D: Update 2013 - From rickets prophylaxis to general preventive healthcare. *Dermatoendocrinol* 2013;5:331–47.
2. Furigay P, Swamy N. Anti-endothelial properties of 1,25-dihydroxy-3-epi-vitamin D₃, a natural metabolite of calcitriol. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2004;89–90:427–31.
3. Leyssens C, Verlinden L, Verstuyf A. The future of vitamin D analogs. *Front Physiol* 2014;5:1–18.
4. Dyer CA. Safety and tolerability of paricalcitol in patients with chronic kidney disease. *Expert Opin Drug Saf* 2013;12:717–28.
5. Bikle DD. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. *Chem Biol* 2014;21:319–29.
6. Machado C da S, Venancio VP, Aissa AF, Hernandez LC, Mello MB de, Del Lama JEC, et al. Vitamin D₃ deficiency increases DNA damage and the oxidative burst of neutrophils in a hypertensive rat model. *Mutat Res - Genet Toxicol Environ Mutagen* 2016;798–799:19–26.
7. Wang EW, Collins AR, Pang MYC, Siu PPM, Lai CKY, Woo J, et al. Vitamin D and oxidation-induced DNA damage: Is there a connection? *Mutagenesis* 2016;31:655–9.
8. Polidoro L, Properzi G, Marampon F, Gravina GL, Festuccia C, Di Cesare E, et al. Vitamin D protects human endothelial cells from H₂O₂ oxidant injury through the Mek/Erk-sirt1 axis activation. *J Cardiovasc Transl Res* 2013;6:221–31.
9. Nair-Shalliker V, Armstrong BK, Fenech M. Does vitamin D protect against DNA damage? *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 2012;733:50–7.
10. Yang L, Ma J, Zhang X, Fan Y, Wang L. Protective role of the vitamin D receptor. *Cell Immunol* 2012;279:160–6.
11. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and

- disease. *Cancer Lett* 2012;327:26–47.
12. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E12.
 13. Jaruga P, Xiao Y, Nelson BC, Dizdaroglu M. Measurement of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in DNA in vivo by liquid chromatography/isotope-dilution tandem mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;386:656–60.
 14. Kirkali G, Jaruga P, Reddy PT, Tona A, Nelson BC, Li M, et al. Identification and quantification of DNA repair protein apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) in human cells by liquid chromatography/isotope-dilution tandem mass spectrometry. *PLoS One* 2013;8.
 15. Jaruga P, Dizdaroglu M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair (Amst)* 2008;7:1413–25.
 16. Kanikarla-Marie P, Jain S. 1,25(OH)2D3 inhibits oxidative stress and monocyte adhesion by mediating the upregulation of GCLC and GSH in endothelial cells treated with acetoacetate (ketosis). *J Steroid Biochem Mol Biol* 2016;159:94–101.
 17. Schuch AP, Moreno NC, Schuch NJ, Menck CFM, Garcia CCM. Sunlight damage to cellular DNA: Focus on oxidatively generated lesions. *Free Radic Biol Med* 2017;107:110–24.
 18. McCollum EV DM. Necessity of lipins for growth. *J Biol Chem* 1913;15:167–75.
 19. McCollum EV, Simmonds N, Becker JE SP. An experimental demonstration of the existence of a vitamin which promotes calcium deposition. *J Biol Chem* 1922;53:293–8.
 20. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1689–96.

21. Lehmann B, Meurer M. Vitamin D metabolism. *Dermatol Ther* 2010;23:2–12.
22. Norman AW. The history of the discovery of vitamin d and its daughter steroid hormone. *Ann Nutr Metab* 2012;61:199–206.
23. Fleet JC, Desmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012;441:61–76.
24. Jones G. Metabolism and biomarkers of Vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest* 2012;72:7–13.
25. Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trends Biochem Sci* 2004;29:664–73.
26. Haussler MR, Norman AW. Chromosomal receptor for a vitamin D metabolite. *Proc Natl Acad Sci* 1969;62:155–62.
27. Dusso AS, Brown AJ. Vitamin D: Molecular biology and gene regulation. First Edit. Elsevier Ltd.; 2008.
28. Wang Y, Zhu J, DeLuca HF. Where is the vitamin D receptor? *Arch Biochem Biophys* 2012;523:123–33.
29. Schuster I. Cytochromes P450 are essential players in the vitamin D signaling system. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 2011;1814:186–99.
30. Christakos S, Dhawan P, Verstuyf A, Verlinden L, Carmeliet G. Vitamin D: metabolism, molecular mechanism of action, and pleiotropic effects. *Physiol Rev* 2016;96:365–408.
31. <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/VDR>. VDR gene. Son erişim 27.06.2018 n.d.
32. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: Potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:684–700.
33. Pike JW, Meyer MB, Lee SM. The vitamin D receptor: Biochemical, molecular, biological, and genomic era investigations. Third Edit. Elsevier; 2011.
34. Wranicz J, Szostak-Węgierek D, Wranicz J, Węgierek DS. Health Outcomes of Vitamin D. Part I. Characteristics and Classic Role. *Rocz Panstw Zakl Hig*

- 2014;65:179–84.
35. Underwood JL, DeLuca HF. Vitamin D is not directly necessary for bone growth and mineralization. *Am J Physiol* 1984;246:E493–8.
 36. Lederer E. Regulation of serum phosphate. *J Physiol* 2014;592:3985–95.
 37. Wolden-Kirk H, Gysemans C, Verstuyf A, Mathieu C. Extraskeletal Effects of Vitamin D. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2012;41:571–94.
 38. Lin R. Crosstalk between Vitamin D metabolism, VDR signalling, and innate immunity. *Biomed Res Int* 2016;2016.
 39. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57:1308–10.
 40. Lai Y-H, Fang T-C. The Pleiotropic Effect of Vitamin D. *ISRN Nephrol* 2013;2013:1–6.
 41. Helming L, Böse J, Ehrchen J, Schiebe S, Frahm T, Geffers R, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D₃ is a potent suppressor of interferon γ -mediated macrophage activation. *Blood* 2005;106:4351–8.
 42. Wacker M, Holick MF. Vitamin D - effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. *Nutrients* 2013;5:111–48.
 43. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-Le-Grand)* 2003;49:277–300.
 44. Pludowski P, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-A review of recent evidence. *Autoimmun Rev* 2013;12:976–89.
 45. Judd SE, Tangpricha V. Vitamin D Deficiency and Risk for Cardiovascular Disease. *Am J Med Sci* 2009;338:40–4.

46. Pilz S, Tomaschitz A, März W, Drechsler C, Ritz E, Zittermann A, et al. Vitamin D, cardiovascular disease and mortality. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2011;75:575–84.
47. Reid IR, Bolland MJ. Role of vitamin D deficiency in cardiovascular disease. *Heart* 2012;98:609–14.
48. Christakos S, DeLuca HF. Minireview: Vitamin D: Is there a role in extraskeletal health? *Endocrinology* 2011;152:2930–6.
49. Wimalawansa SJ. Non-musculoskeletal benefits of vitamin D. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2018;175:60–81.
50. Al Mheid I, Patel RS, Tangpricha V, Quyyumi AA. Vitamin D and cardiovascular disease: is the evidence solid? *Eur Heart J* 2013;34:3691–8.
51. Ni W, Watts SW, Ng M, Chen S, Glenn DJ, Gardner DG. Elimination of vitamin D receptor in vascular endothelial cells alters vascular function. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2014;64:1290–8.
52. Zittermann A, Gummert JF. Nonclassical vitamin D action. *Nutrients* 2010;2:408–25.
53. Gagnon C, Lu ZX, Magliano DJ, Dunstan DW, Shaw JE, Zimmet PZ, et al. Serum 25-hydroxyvitamin D, calcium intake, and risk of type 2 diabetes after 5 years: results from a national, population-based prospective study (the Australian Diabetes, Obesity and Lifestyle study). *Diabetes Care* 2011;34:1133–8.
54. Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B. The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:2017–29.
55. Freedman DM, Looker AC, Chang S-C, Graubard BI. Prospective study of serum vitamin D and cancer mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1594–602.
56. Grant WB. Weighing the evidence linking UVB irradiance, vitamin D, and cancer risk. *Mayo Clin Proc* 2011;86:362–3; author reply 363.
57. Ditsch N, Toth B, Mayr D, Lenhard M, Gallwas J, Weissenbacher T, et al. The

association between vitamin D receptor expression and prolonged overall survival in breast cancer. *J Histochem Cytochem* 2012;60:121–9.

58. Hisatake J, O'Kelly J, Uskokovic MR, Tomoyasu S, Koeffler HP. Novel vitamin D(3) analog, 21-(3-methyl-3-hydroxy-butyl)-19-nor D(3), that modulates cell growth, differentiation, apoptosis, cell cycle, and induction of PTEN in leukemic cells. *Blood* 2001;97:2427–33.
59. Morales-Tirado V, Wichlan DG, Leimig TE, Street SEA, Kasow KA, Riberdy JM. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 (vitamin D3) catalyzes suppressive activity on human natural regulatory T cells, uniquely modulates cell cycle progression, and augments FOXP3. *Clin Immunol* 2011;138:212–21.
60. Krishnan A V, Feldman D. Mechanisms of the anti-cancer and anti-inflammatory actions of vitamin D. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2011;51:311–36.
61. Deeb KK, Trump DL, Johnson CS. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 2007;7:684–700.
62. Carlberg C, Molnar F, Mourino A. Vitamin D receptor ligands: the impact of crystal structures. *Expert Opin Ther Pat* 2012;22:417–35.
63. Toell A, Gonzalez MM, Ruf D, Steinmeyer A, Ishizuka S, Carlberg C. Different molecular mechanisms of vitamin D3 receptor antagonists. *Mol Pharmacol* 2001;59:1478–85.
64. Herdick M, Steinmeyer A, Carlberg C. Antagonistic action of a 25-carboxylic ester analogue of 1,25- dihydroxyvitamin D3 is mediated by a lack of ligand-induced vitamin D receptor interaction with coactivators. *J Biol Chem* 2000;275:16506–12.
65. Jones G. Extrarenal vitamin D activation and interactions between vitamin D2 , vitamin D3 , and vitamin D analogs. *Annu Rev Nutr* 2013;33:23–44.
66. Kittaka A, Yoshida A, Chiang KC, Takano M, Sawada D, Sakaki T CT. Potent 19-norvitamin D analogs for prostate and liver cancer therapy. *Futur Med Chem* 2012;4:2049–65.

67. Shimizu M, Miyamoto Y, Takaku H, Matsuo M, Nakabayashi M, Masuno H, et al. 2-Substituted-16-ene-22-thia-1 α ,25-dihydroxy-26,27-dimethyl-19-norvitamin D3 analogs: Synthesis, biological evaluation, and crystal structure. *Bioorganic Med Chem* 2008;16:6949–64.
68. Chen TC, Schwartz GG, Burnstein KL, Lokeshwar BL, Holick MF. The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:901–8.
69. Cunningham J, Zehnder D. New vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms. *Kidney Int* 2011;79:702–7.
70. Agarwal R, Acharya M, Tian JIN, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, et al. Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int* 2005;68:2823–8.
71. Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, et al. Paricalcitol Reduces Albuminuria and Inflammation in Chronic Kidney Disease: A Randomized Double-Blind Pilot Trial. *Hypertension* 2008;52:249–55.
72. Szeto C-C, Chow K-M, Kwan BC-H, Chung K-Y, Leung C-B, Li PK-T. Oral calcitriol for the treatment of persistent proteinuria in immunoglobulin A nephropathy: an uncontrolled trial. *Am J Kidney Dis* 2008;51:724–31.
73. Park MR, Lee JH, Park MS, Hwang JE, Shim HJ, Cho SH, et al. Suppressive effect of 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D2 on gastric cancer cells and peritoneal metastasis model. *J Korean Med Sci* 2012;27:1037–43.
74. Chen TC, Schwartz GG, Burnstein KL, Lokeshwar BL, Holick MF. The in vitro evaluation of 25-hydroxyvitamin D3 and 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D2 as therapeutic agents for prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2000;6:901–8.
75. Schwartz GG, Eads D, Naczki C, Northrup S, Chen T, Koumenis C. 19-nor-1 α ,25-dihydroxyvitamin D2 (paricalcitol) inhibits the proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 2008;7:430–6.
76. Teske KA, Yu O, Arnold LA. HHS Public Access 2017;3:45–82.

77. Caccamo D, Ricca S, Currò M, Ientile R. Health risks of hypovitaminosis D: A review of new molecular insights. *Int J Mol Sci* 2018;19.
78. Trummer C, Pandis M, Verheyen N, Grübler MR, Gaksch M, Obermayer-Pietsch B, et al. Beneficial effects of UV-radiation: Vitamin D and beyond. *Int J Environ Res Public Health* 2016;13:1–16.
79. Zittermann A, Prokop S, Gummert JF, Börgermann J. Safety issues of vitamin D supplementation. *Anticancer Agents Med Chem* 2013;13:4–10.
80. Bhattacharya S. Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System. In: Rani V, Yadav UCS, editors. *Free Radicals Hum. Heal. Dis.*, Springer; 2015, p. 17–30.
81. Aldosari S, Awad M, Harrington E, Sellke F, Abid M. Subcellular Reactive Oxygen Species (ROS) in Cardiovascular Pathophysiology. *Antioxidants* 2018;7:14.
82. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016.
83. Krumova K, Cosa G. Chapter I: Overview of reactive oxygen species. *Singlet Oxyg Appl Biosci Nanosci Vol 1* 2016:21.
84. Fridovich I. Oxygen: How do we stand it? *Med Princ Pract* 2013;22:131–7.
85. Marsicano LJ. [Free radicals]. In: Aldred E, Buck C, editors. *Pharmacol. A Handb. Complement. Healthc. Prof.*, vol. 48, Churchill Livingstone; 2009, p. 41–52.
86. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014;224:164–75.
87. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004;142:231–55.
88. Pham AN, Xing G, Miller CJ, Waite TD. Fenton-like copper redox chemistry revisited: Hydrogen peroxide and superoxide mediation of copper-catalyzed

- oxidant production. *J Catal* 2013;301:54–64.
89. Jaimes EA, Sweeney C, Raj L. Effects of the Reactive Oxygen Species Hydrogen Peroxide and Hypochlorite on Endothelial Nitric Oxide Production. *Hypertension* 2001;38.
 90. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact* 2014;224:164–75.
 91. Djordjević VB. Free Radicals in Cell Biology. *Int Rev Cytol* 2004;237:57–89.
 92. Aprioku JS. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *J Reprod Infertil* 2013;14:158–72.
 93. Avendaño C, Menéndez JC, Avendaño C, Menéndez JC. Chapter 4 – Anticancer Drugs Acting via Radical Species, Photosensitizers and Photodynamic Therapy of Cancer. 2008.
 94. Brieger K, Schiavone S, Miller J, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly* 2012;142:1–14.
 95. Chatgililoglu C, Ferreri C, Terzidis MA. Purine 5',8-cyclonucleoside lesions: chemistry and biology. *Chem Soc Rev* 2011;40:1368–82.
 96. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res* 2012;46:382–419.
 97. Castillo WO, Aristizabal-Pachon AF. Galantamine protects against beta amyloid peptide-induced DNA damage in a model for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 2017;12:916–7.
 98. Dizdaroglu M. Free Radical-Induced Damage to DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32:1102–15.
 99. Chernikov A V, Gudkov S V, Usacheva AM, Bruskov VI. Exogenous 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: Biomedical Properties, Mechanisms of Action, and Therapeutic Potential 2017;82:1686–701.
 100. Kasai H, Nishimura S. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res* 1984;12:2137–45.

101. Nishimura S. 8-Hydroxyguanine: a base for discovery. *DNA Repair (Amst)* 2011;10:1078–83.
102. Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147–63.
103. Fleming AM, Alshykhly O, Zhu J, Muller JG, Burrows CJ. Rates of Chemical Cleavage of DNA and RNA Oligomers Containing Guanine Oxidation Products. *Chem Res Toxicol* 2015;28:1292–300.
104. Kasai H. What causes human cancer? Approaches from the chemistry of DNA damage. *Genes Environ Off J Japanese Environ Mutagen Soc* 2016;38:19.
105. Guo C, Ding P, Xie C, Ye C, Ye M, Pan C, et al. Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases. *Oncotarget* 2017;8:75767–77.
106. Nakamoto H, Kaneko T, Tahara S, Hayashi E, Naito H, Radak Z, et al. Regular exercise reduces 8-oxodG in the nuclear and mitochondrial DNA and modulates the DNA repair activity in the liver of old rats. *Exp Gerontol* 2007;42:287–95.
107. Steen S, Jovanovic S. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution. *J Am Chem Soc* 1997;119:617–618.
108. Grollman AP, Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet* 1993;9:246–9.
109. Fuciarelli AF, Koch CJ, Raleigh JA. Oxygen dependence of product formation in irradiated adenosine 5'-monophosphate. *Radiat Res* 1988;113:447–57.
110. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Identification and quantification of 8,5'-cyclo-2'-deoxy-adenosine in DNA by liquid chromatography/ mass spectrometry. *Free Radic Biol Med* 2001;30:774–84.
111. Dirksen ML, Blakely WF, Holwitt E, Dizdaroglu M. Effect of DNA conformation on the hydroxyl radical-induced formation of 8,5'-cyclopurine 2'-

- deoxyribonucleoside residues in DNA. *Int J Radiat Biol* 1988;54:195–204.
112. Kirkali G, Tunca M, Genc S, Jaruga P, Dizdaroglu M. Oxidative DNA damage in polymorphonuclear leukocytes of patients with familial Mediterranean fever. *Free Radic Biol Med* 2008;44:386–93.
 113. Anderson KM, Jaruga P, Ramsey CR, Gilman NK, Green VM, Rostad SW, et al. Structural Alterations in Breast Stromal and Epithelial DNA: The Influence of 8,5-cyclo-2-Deoxyadenosine. *Cell Cycle* 2006;5:1240–4.
 114. Terzidis MA, Chatgililoglu C. An ameliorative protocol for the quantification of purine 5',8-cyclo-2'-deoxynucleosides in oxidized DNA. *Front Chem* 2015;3:47.
 115. Brooks PJ, Wise DS, Berry DA, Kosmoski J V, Smerdon MJ, Somers RL, et al. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *J Biol Chem* 2000;275:22355–62.
 116. Kuraoka I, Bender C, Romieu A, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:3832–7.
 117. Mazouzi A, Vigouroux A, Aikeshev B, Brooks PJ, Saparbaev MK, Morera S, et al. Insight into mechanisms of 3'-5' exonuclease activity and removal of bulky 8,5'-cyclopurine adducts by apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:E3071–80.
 118. Dudycz L, Shugar D. Susceptibility to various enzymes of the carbon-bridged (R) and (S) diastereoisomers of 8,5'-cycloadenosine and their 5'-phosphates. *FEBS Lett* 1979;107:363–5.
 119. Dizdaroglu M, Coskun E, Jaruga P. Measurement of oxidatively induced DNA damage and its repair, by mass spectrometric techniques. *Free Radic Res* 2015;49:525–48.
 120. Jaruga P, Kirkali G, Dizdaroglu M. Measurement of formamidopyrimidines in DNA. *Free Radic Biol Med* 2008;45:1601–9.

121. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Mutat Res* 2015;763:212–45.
122. Beckman RA, Loeb LA. Genetic instability in cancer: theory and experiment. *Semin Cancer Biol* 2005;15:423–35.
123. Cooke MS. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J* 2003;17:1195–214.
124. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Ünsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39–85.
125. Iyama T, Wilson DM. DNA Repair Mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair (Amst)* 2014;12:620–36.
126. Sung JS, Demple B. Roles of base excision repair subpathways in correcting oxidized abasic sites in DNA. *FEBS J* 2006;273:1620–9.
127. Wilson DM, Kim D, Berquist BR, Sigurdson AJ. Variation in base excision repair capacity. *Mutat Res* 2011;711:100–12.
128. Nakamura J, Swenberg JA. Endogenous apurinic/apyrimidinic sites in genomic DNA of mammalian tissues. *Cancer Res* 1999;59:2522–6.
129. Fan J, Wilson DM. Protein-protein interactions and posttranslational modifications in mammalian base excision repair. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1121–38.
130. Kaur G, Cholia RP, Mantha AK, Kumar R. DNA Repair and Redox Activities and Inhibitors of Apurinic / Apyrimidinic Endonuclease 1 / Redox Effector Factor 1 (APE1 / Ref-1): A Comparative Analysis and Their Scope and Limitations toward Anticancer Drug Development. *J Med Chem* 2014;57:10241–56.
131. Evans AR, Limp-Foster M, Kelley MR. Going APE over ref-1. *Mutat Res* 2000;461:83–108.
132. Li M, Wilson DM. Human Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1. *Antioxid Redox Signal* 2014;20:678–707.

133. Mantha AK, Dhiman M, Taglialatela G, Perez-Polo RJ, Mitra S. Proteomic study of amyloid beta (25-35) peptide exposure to neuronal cells: Impact on APE1/Ref-1's protein-protein interaction. *J Neurosci Res* 2012;90:1230–9.
134. Jackson EB, Theriot CA, Chattopadhyay R, Mitra S, Izumi T. Analysis of nuclear transport signals in the human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1/Ref1). *Nucleic Acids Res* 2005;33:3303–12.
135. Raffoul JJ, Heydari AR, Hillman GG. DNA repair and cancer therapy: Targeting APE1/Ref-1 using dietary agents. *J Oncol* 2012;2012.
136. Taylor RN, Davidge ST, Roberts JM. Endothelial Cell Dysfunction and Oxidative Stress. Third Edit. Elsevier Ltd.; 2009.
137. Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol* 1987;18:234–9.
138. Lum H, Roebuck K a. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001;280:C719–41.
139. Montorfano I, Becerra A, Cerro R, Echeverría C, Sáez E, Morales MG, et al. Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF- β 1 and TGF- β 2-dependent pathway. *Lab Investig* 2014;94:1068–82.
140. Gifford SM, Grummer M a, Pierre S a, Austin JL, Zheng J. Functional characterization of HUVEC-CS: Ca²⁺ signaling, ERK 1 / 2 activation, mitogenesis and vasodilator production. *J Endocrinol* 2004:485–99.
141. www.cellapplications.com, Son erişim: 27.06.2018 n.d.
142. Martínez V, Mitjans M, Vinardell MP. Cytoprotective Effects of Polyphenols against Oxidative Damage. *Polyphenols Hum Heal Dis* 2014:275–88.
143. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:241–81.
144. Fedirko V, Bostick RM, Long Q, Flanders WD, McCullough ML, Sidelnikov E, et al. Effects of supplemental vitamin D and calcium on oxidative DNA damage marker in normal colorectal mucosa: A randomized clinical trial. *Cancer*

Epidemiol Biomarkers Prev 2010;19:280–91.

145. Lan N, Luo G, Yang X, Cheng Y, Zhang Y, Wang X, et al. 25-Hydroxyvitamin D₃-deficiency enhances oxidative stress and corticosteroid resistance in severe asthma exacerbation. PLoS One 2014;9:e111599.
146. Grotsky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, Neumann MA, Yaddanapudi SC, Croke M, et al. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells. J Cell Biol 2013;200:187–202.
147. Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, Paximadas D, Kimura M, Nessa A, et al. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. Am J Clin Nutr 2007;86:1420–5.
148. Kállay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, et al. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. Food Chem Toxicol 2002;40:1191–6.
149. Ting HJ, Yasmin-Karim S, Yan SJ, Hsu JW, Lin TH, Zeng W, et al. A positive feedback signaling loop between ATM and the vitamin D receptor is critical for cancer chemoprevention by vitamin D. Cancer Res 2012;72:958–68.
150. Rogers CS, Yedjou CG, Sutton DJ, Tchounwou PB. Vitamin D₃ potentiates the antitumorigenic effects of arsenic trioxide in human leukemia (HL-60) cells. Exp Hematol Oncol 2014;3:9.
151. Bao A, Li Y, Tong Y, Zheng H, Wu W, Wei C. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and cisplatin synergistically induce apoptosis and cell cycle arrest in gastric cancer cells. Int J Mol Med 2014;33:1177–84.
152. Peng X, Vaishnav A, Murillo G, Alimirah F, Torres KEO, Mehta RG. Protection against cellular stress by 25-hydroxyvitamin D₃ in breast epithelial cells. J Cell Biochem 2010;110:1324–33.
153. Slominski AT, Janjetovic Z, Kim TK, Wasilewski P, Rosas S, Hanna S, et al. Novel non-calcemic secosteroids that are produced by human epidermal keratinocytes protect against solar radiation. J Steroid Biochem Mol Biol 2015;148:52–63.

154. Gonzalo S. Novel roles of $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on DNA repair provide new strategies for breast cancer treatment. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;144 Pt A:59–64.
155. Gordon-Thomson C, Gupta R, Tongkao-on W, Ryan A, Halliday GM, Mason RS. $1\alpha,25$ Dihydroxyvitamin D₃ enhances cellular defences against UV-induced oxidative and other forms of DNA damage in skin. *Photochem Photobiol Sci* 2012;11:1837.
156. Halicka HD, Zhao H, Li J, Traganos F, Studzinski GP, Darzynkiewicz Z. Attenuation of constitutive DNA damage signaling by $1,25$ -dihydroxyvitamin D₃. *Aging (Albany NY)* 2012;4:270–8.
157. Graziano S, Johnston R, Deng O, Zhang J, Gonzalo S. Vitamin D/vitamin D receptor axis regulates DNA repair during oncogene-induced senescence. *Oncogene* 2016;35:5362–76.
158. Wu-Wong JR, Nakane M, Ma J, Ruan X, Kroeger PE. Effects of Vitamin D analogs on gene expression profiling in human coronary artery smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2006;186:20–8.
159. Molinari C, Uberti F, Grossini E, Carda S, Invernizzi M, Cisari C. $1\alpha,25$ -dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells. *Cell Physiol Biochem* 2011:661–8.
160. Curtin JF, Donovan M, Cotter TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J Immunol Methods* 2002;265:49–72.
161. Yu M, Kim YJ, Kang D-H. Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:30–9.
162. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the clinical laboratory - Where to from here? *Clin Biochem Rev* 2011;32:5–31.
163. Lange V, Picotti P, Domon B, Aebersold R. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol* 2008;4:222.
164. Nyaga SG, Lohani A, Jaruga P, Trzeciak AR, Dizdaroglu M, Evans MK. Reduced

- repair of 8-hydroxyguanine in the human breast cancer cell line, HCC1937. *BMC Cancer* 2006;6:1–15.
165. Sinton LW, Finlay RK, Lynch PA. Sunlight inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage- polluted seawater. *Appl Environ Microbiol* 1999;65:3605–13.
 166. Nagy A, Černíková L, Vitásková E, Křivda V, Dán Á, Dirbáková Z, et al. MeltMan: Optimization, Evaluation, and Universal Application of a qPCR System Integrating the TaqMan qPCR and Melting Analysis into a Single Assay. *PLoS One* 2016;11:e0151204.
 167. Kallay E, Bareis P, Bajna E, Kriwanek S, Bonner E, Toyokuni S, et al. Vitamin D receptor activity and prevention of colonic hyperproliferation and oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 2002;40:1191–6.
 168. Bao B-Y, Ting H-J, Hsu J-W, Lee Y-F. Protective role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer* 2008;122:2699–706.
 169. Marchionatti AM, Picotto G, Narvaez CJ, Welsh JE, Tolosa de Talamoni NG. Antiproliferative action of menadione and 1,25(OH)₂D₃ on breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009;113:227–32.
 170. Hamden K, Carreau S, Jamoussi K, Miladi S, Lajmi S, Aloulou D, et al. 1-alpha,25 dihydroxyvitamin D₃: therapeutic and preventive effects against oxidative stress, hepatic, pancreatic and renal injury in alloxan-induced diabetes in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2009;55:215–22.
 171. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J* 2012;33:2980–90.
 172. Teixeira TM, da Costa DC, Resende AC, Soulage CO, Bezerra FF, Daleprane JB. Activation of Nrf2-Antioxidant Signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol Prevents Leptin-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Endothelial Cells. *J Nutr* 2017;147:506–13.

173. Tanaka M, Tokunaga K, Komaba H, Itoh K, Matsushita K, Watanabe H, et al. Vitamin D receptor activator reduces oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Ther Apher Dial* 2011;15:161–8.
174. Wu C-C, Chang J-H, Chen C-C, Su S-B, Yang L-K, Ma W-Y, et al. Calcitriol treatment attenuates inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients with secondary hyperparathyroidism. *Tohoku J Exp Med* 2011;223:153–9.
175. Jain SK, Manna P, Micinski D, Lieblong BJ, Kahlon G, Morehead L, et al. In African American type 2 diabetic patients, is vitamin D deficiency associated with lower blood levels of hydrogen sulfide and cyclic adenosine monophosphate, and elevated oxidative stress? *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1154–8.
176. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Margina D, Prada GI, Jansen E. Vitamin D status and oxidative stress markers in the elderly with impaired fasting glucose and type 2 diabetes mellitus. *Aging Clin Exp Res* 2012;24:595–602.
177. Santa-Gonzalez GA, Gomez-Molina A, Arcos-Burgos M, Meyer JN, Camargo M. Distinctive adaptive response to repeated exposure to hydrogen peroxide associated with upregulation of DNA repair genes and cell cycle arrest. *Redox Biol* 2016;9:124–33.
178. Bulut G, Basbugan Y, Ari E, Erten R, Bektas H, Alp HH, et al. Paricalcitol may improve oxidative DNA damage on experimental amikacin-induced nephrotoxicity model. *Ren Fail* 2016;38:751–8.
179. Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, Nava U, Bolis G, Vacca G, et al. Vitamin D Protects Human Endothelial Cells From Oxidative Stress Through the Autophagic and Survival Pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99:1367–74.
180. Marampon F, Gravina GL, Festuccia C, Popov VM, Colapietro EA, Sanità P, et al. Vitamin D protects endothelial cells from irradiation-induced senescence and apoptosis by modulating MAPK/SirT1 axis. *J Endocrinol Invest* 2016;39:411–22.
181. Haas MJ, Jafri M, Wehmeier KR, Onstead-Haas LM, Mooradian AD. Inhibition of endoplasmic reticulum stress and oxidative stress by vitamin D in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2016;99:1–10.

182. Martínez-Moreno JM, Herencia C, de Oca AM, Díaz-Tocados JM, Vergara N, Gómez-Luna M. José, et al. High phosphate induces a pro-inflammatory response by vascular smooth muscle cells and modulation by vitamin D derivatives. *Clin Sci* 2017;131:1449–63.
183. Park JS, Choi HI, Bae EH, Ma SK, Kim SW. Paricalcitol attenuates indoxyl sulfate-induced apoptosis through the inhibition of MAPK, Akt, and NF- κ B activation in HK-2 cells. *Korean J Intern Med* 2017.
184. Krishnan A V, Shinghal R, Raghavachari N, Brooks JD, Peehl DM, Feldman D. Analysis of vitamin D-regulated gene expression in LNCaP human prostate cancer cells using cDNA microarrays. *Prostate* 2004;59:243–51.
185. Pike JW, Meyer MB. The vitamin D receptor: New paradigms for the regulation of gene expression by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinol Metab* 2010;39:255–69.
186. Pike JW, Christakos S. Biology and Mechanisms of Action of the Vitamin D Hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2017;46:815–43.
187. Durk MR, Chan GNY, Campos CR, Peart JC, Chow ECY, Lee E, et al. 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃-liganded vitamin D receptor increases expression and transport activity of P-glycoprotein in isolated rat brain capillaries and human and rat brain microvessel endothelial cells. *J Neurochem* 2012;123:944–53.

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayları

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2014/11-13	Tarih: 20.03.2014
	Prof.Dr.Hüseyin İŞLEKEL'in sorumlusu olduğu "İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültüründe Kalsitriol ve Parikalçitol'un Oksidatif DNA Hasarı Onarımı ve Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile İlişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEÜ Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilgin CÖMERT	İç Hastalıkları (Yoğun Bakım B.D.)	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nihal GELECEK	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.İşıl TEKMEN	Histoloji ve Embriyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda Seren İNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	
Ihsan ÇELİKDİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/12-38	Tarih: 17.05.2018
	Prof.Dr.Hüray İŞLEKEL'in sorumlusu olduğu "İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültüründe Kalsitriol ve Parikalsitol'un Oksidatif DNA Hasarı Onarımı ve Hücre Ölümü Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait 16.05.2018 tarihli araştırıcı dilekçesine ilişkin olarak; - Çalışma başlığının "İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücrelerinde Kalsitriol ve Parikalsitolün Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi, ile ilgili belge incelenerek bilgi edinilmiş ve uygun bulunmuştur.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayrıldı
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	göl Ergör
Prof.Dr.Nejat SARIOŞMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Ayşe Aydan
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Müge KIRAY
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	Bilge KARA
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Ayhan ABACI
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M.Aylin ARICI
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	Murat BEKTAŞ
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılmadı
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	Ahmet Can BİLGİN
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	DEU Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	Mehmet Erhan ÖZKUL

EK 2. ARBİS Özgeçmiş



MERVE AKIŞ

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	17675061328
Doğum Tarihi	24/10/1986
İletişim Adresi	Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Ens. Tıbbi Biyokimya Ad. Kat:2
Telefon	(232) 442 44 28 (544) 622 70 05
E-posta	merve8634@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2012 - Şu Anda (5 yıl 10 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (DR)

01 Temmuz 2009 - 30 Temmuz 2012 (3 yıl 1 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, BİYOKİMYA (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Sağlıklı Ve Fenilketonirili Çocuk Ve Adolesanlarda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliğinin Plazma Metilmalonik Asit Ve Homosistein İle Araştırılması
Tez Konusu: Sağlıklı Ve Fenilketonirili Çocuk Ve Adolesanlarda Fonksiyonel Vitamin B12 Eksikliğinin Plazma Metilmalonik Asit Ve Homosistein İle Araştırılması
Tarih: 26 Temmuz 2012
Tez Danışmanı: GÜL HÜRAY İŞLEKEL

01 Temmuz 2004 - 10 Temmuz 2009 (5 yıl 1 ay)
Lisans, İkinci Öğrenim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Ocak 2018 - Şu Anda (6 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

01 Mayıs 2015 - 01 Ocak 2018 (2 yıl 9 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi)

01 Şubat 2015 - 01 Mayıs 2015 (4 ay) (Tam Zamanlı)
ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ TEMEL TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

G. NURIYEVA, S. KOSE, G. TUNA, M. KANT, M. AKIS, S. ALTUNYURT, G. H. İSLEKEL & Ö. E. DOĞAN, A prospective study on first trimester prediction of ischemic placental diseases, *PRENATAL DIAGNOSIS*, 2017, 0197-3851, 37, 4, 341-349.

N. YUSUFOĞLU, M. KANT, M. AKIS, A. SANLI, N. OZDEMIR & H. İSLEKEL, Evaluation of angiogenesis with serum and tissue vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1 and angiopoietin-2 levels in relation to clinicopathological features in lung cancer patients, *TURKISH JOURNAL OF BIOCHEMISTRY-TURK BIYOKIMYA DERGISI*, 2017, 0250-4685, 42, 5, 527-533.

M. KANT, M. AKIS, M. ÇALAN, T. ARKAN, F. BAYRAKTAR, M. DİZDAROĞLU & H. İSLEKEL, Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5' R)- and (5' S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F-2 alpha as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes, *DNA REPAIR*, 2016, 1568-7864, 48, 1-7.

Bildiriler

M. AKIŞ, M. KANT, Z. YÜCE, M. DİZDAROĞLU & G. H. İŞLEKEL, Effects Of Paricalcitol On Hydrogen Peroxide Induced Oxidative Damage In Human Umbilical Vein Endothelial Cells Through Vitamin D Receptor Signaling, Poster Sunumu, 43. Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018.

M. KANT, M. AKIŞ, M. ÇALAN, T. ARKAN, F. BAYRAKTAR & G. H. İŞLEKEL, Evaluation Of Transcription Factor 7-like 2 Gene Polymorphism In Patients With Prediabetes And Type 2 Diabetes Mellitus, Poster Sunumu, 43. Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018.

D. HARMANCI, K. ENGİN, C. E. DURMAZ, M. KANT, A. YAMAN, M. AKIŞ, S. Ö. YILDIZ, G. H. İŞLEKEL, G. AKDOĞAN & M. S. BAJJIN, Is Clinical Course Of Optic Neuropathy Associated With Oxidative Damage And Dynamics Of Antioxidant Response? A Case-control Study In Patients With Nonarteritic Ischemic Optic Neuropathies, Sözlü Sunum, Congress Of The European Society Of Ophthalmology (soe), 10 Haziran 2017, 13 Haziran 2017.

G. NURIYEVA, S. KÖSE, G. TUNA, M. KANT, M. AKIŞ, S. ALTUNYURT, Ö. E. DOĞAN & G. H. İŞLEKEL, Predictive Power Of Mean Uterine Artery Pulsatility Index, Maternal Serum Placental Growth Factor And Placenta Associated Plasma Protein A Levels For The Development Of Ischemic Placental Diseases, Poster Sunumu, VI. International Congress Of Molecular Medicine, 22 Mayıs 2017, 25 Mayıs 2017.

M. KANT, M. AKIŞ & G. H. İŞLEKEL, Validation Of A Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry Method For The Measurement Of Lipid Peroxidation Product 8-iso-prostaglandin F2 In Urine, Poster Sunumu, 41. Febs Congress, 03 Eylül 2016, 07 Eylül 2016.

R. TURAN, M. AKIŞ, P. KUYUM, S. ÇAKAR, M. KANT, N. ARSLAN & G. H. İŞLEKEL, Evaluation Of Vitamin B12, Methylmalonic Acid And Homocysteine Levels In Obese Adolescents, Poster Sunumu, V. International Congress Of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 20 Mayıs 2015.

M. KANT, G. TUNA, M. AKIŞ, P. JARUGA, F. G. KIRKALI, G. H. İŞLEKEL & M. DİZDAROĞLU, Identification And Quantification Of Dna Repair Protein Apurinic/apyrimidinic Endonuclease-1 In Mcf-7 And Hepg2 Cells By Liquid Chromatography/isotope-dilution Tandem Mass Spectrometry, Poster Sunumu, V. International Congress Of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 20 Mayıs 2015.

F. ACET, M. CELİLOĞLU, E. OKYAY, M. AKIŞ, M. KANT & G. H. İŞLEKEL, The Importance Of Maternal Ischemia Modified Albumin In Foreseeing Perinatal Asphyxia, Poster Sunumu, V. International Congress Of Molecular Medicine, 20 Mayıs 2015, 20 Mayıs 2015.

M. KANT, M. AKIŞ, M. ÇALAN, T. ARKAN, F. BAYRAKTAR, M. DİZDAROĞLU & G. H. İŞLEKEL, Absolute Quantification Of Oxidatively Induced Dna Damage And Lipid Peroxidation Products In Patients With Prediabetes And Type 2 Diabetes Mellitus, Poster Sunumu, Ifcc Worldlab Istanbul 2014, 22 Haziran 2014, 22 Haziran 2014.

M. AKIŞ, M. KANT, I. IŞIK, N. ARSLAN & G. H. İŞLEKEL, Plasma Methylmalonic Acid And Homocysteine As Functional Vitamin B12 Deficiency Markers In Phenylketonuria And Healthy Children, Poster Sunumu, Ifcc Worldlab Istanbul 2014, 22 Haziran 2014, 22 Haziran 2014.

M. AKIŞ, M. KANT, I. IŞIK, N. ARSLAN & G. H. İŞLEKEL, Fenilketonüride Metilmalonik Asit İle Fonksiyonel B12 Vitamin Eksikliğinin Araştırılması, Poster Sunumu, 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 03 Eylül 2013, 03 Eylül 2013, 38, 51, 362 - 362.

M. AKIŞ, M. KANT, I. IŞIK, N. ARSLAN & G. H. İŞLEKEL, Fenilketonürlü Çocuklarda Fonksiyonel B12 Vitamin Eksikliğinin Plazma Metilmalonik Asit Ve Homosistein Düzeyleri İle Araştırılması, Poster Sunumu, Xii. Metabolik Hastalıklar Ve Beslenme Kongresi, 01 Mayıs 2013, 01 Mayıs 2013.

G. H. İŞLEKEL, M. AKIŞ & M. KANT, A Model Of Biochemistry Dry Practical For Learning Liver Functions And Bilirubin Metabolism In Medical School; Student Feedback, Poster Sunumu, Febs Education Workshop Trends In Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips For Postgraduate Students And Beyond, 29 Mart 2012, 29 Mart 2012.

G. H. İŞLEKEL, M. KANT & M. AKIŞ, Metabolic Acid-base Disorder Cases As An Effective Vehicle For Comprehension Of Acid-base Balance, Poster Sunumu, Febs Education Workshop Trends In Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips For Postgraduate Students And Beyond, 29 Mart 2012, 29 Mart 2012.

G. H. İŞLEKEL, N. YUSUFOĞLU, M. KANT, M. AKIŞ, A. ŞANLI & N. ÖZDEMİR, Akciğer Kanseri Doku Ve Serumda Vegf, Angiopoietin-1 Ve Angiopoietin-2 Düzeylerinin Değerlendirilmesi, Poster Sunumu, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım 2011, 02 Aralık 2011.

M. KANT, M. AKIŞ, G. TUNA, G. H. İŞLEKEL, F. G. KIRKALI & M. DİZDAROĞLU, Sıvı Kromatografisi-tandem Kütle Spektrometresi İle Hasarlı Dna Nükleozidleri S-cda Ve 8-oh-dg'nin İdrarda Ölçümü İçin Yöntem Geçerlilik Çalışması, Poster Sunumu, 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 29 Kasım 2011, 02 Aralık 2011.

M. KANT, G. TUNA, M. AKIŞ, G. H. İŞLEKEL & F. G. KIRKALI, The Phd Program In Department Of Medical Biochemistry Institute Of Health Sciences Dokuz Eylül University, Poster Sunumu, 6th Orpheus Conference-phd Quality Indicators For Biomedicine And Health Sciences, 27 Nisan 2011, 27 Nisan 2011, 74 - 74.

M. AKIŞ, M. KANT & G. H. İŞLEKEL, Metilmalonik Asit Ölçümünde Lc-ms/ms-mrm Yönteminin Geçerliliğinin Belirlenmesi, Sözlü Sunum, 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, 27 Ekim 2010, 27 Ekim 2010, 35, 5, 97 - 97.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Gestasyonel Diyabetes Mellitus Ve Bozulmuş Glukoz Toleransı Olan Gebelerde Oksidatif Dna Hasarının Demir Düzeyleri İle İlişkisinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Devam ediyor) .

BAP, ARAŞTIRMACI, D Vitamininin In Vitro Oksidatif Dna Hasarı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Eylül 2014, 01 Eylül 2017.

BAP, ARAŞTIRMACI, PLASENTAL GROWTH FAKTÖR VE UTERİN ARTER DOPPLER İNDEKSLERİNİN KOMBİNE TARAMA TESTİ İLE BİRLİKTE DEĞERLENDİRİLMESİNİN İSKEMİK PLASENTAL HASTALIKLARI ÖNGÖRME ETKİNLİĞİ , Yürütülen Kuruluş:

KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Mayıs 2015, 01 Mayıs 2017.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Nonarteritik İskemik Optik Nöropatilerde Oksidatif Stres Hasarının Değişkenliğinin Değerlendirilmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Aralık 2014, 01 Aralık 2016.

BAP, ARAŞTIRMACI, Prediyabet Ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif Makromolekül Hasarının Ve Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (tcf7l2) Gen Polimorfizminin İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, 01 Aralık 2013, 01 Aralık 2015.

BAP, ARAŞTIRMACI, MATERNAL İSKEMİ MODİFİYE ALBUMİN, NON-STRES TEST VE FETAL DOPPLER ULTRASONOGRAFİNİN PERİNATAL ASFIKSİYİ ÖNGÖRMEDEKİ YERİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Haziran 2013, 01 Haziran 2014.

BAP, ARAŞTIRMACI, ADIPOZ DOKU KÖKENLİ ERİŞKİN KÖK HÜCRE UYGULAMASININ D-GALAKTOZ YAŞLANMA MODELİ OLUŞTURULMUŞ DERİDE YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE GÖSTERİLMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Temmuz 2013, 31 Ocak 2014.

BAP, ARAŞTIRMACI, AKCİĞER KANSERİNDE SERUM VE DOKU PROTEİN BELİRTEÇLERİNİN İNCELENMESİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 04 Ağustos 2008, 04 Ağustos 2012.

BAP, ARAŞTIRMACI, SAĞLIKLI VE FENİLKETONÜRİLİ ÇOCUKLARDA FONKSİYONEL B12 VİTAMİN EKSİKLİĞİNİN PLAZMA METİLMALONİK ASİT VE HOMOSİSTEİN DÜZEYLERİ İLE ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 09 Temmuz 2009, 09 Temmuz 2012.

Ödüller

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Tbd - Prof. Dr. Nazmi Özer Bilim Ödülü İkinciliği, Dna Repair Dergisinde Yayımlanan ?elevated Urinary Levels Of 8-oxo-2?-deoxyguanosine, (5?r)- And (5?s)-8,5?-cyclo-2?-deoxyadenosines, And 8-iso-prostaglandin F2a As Potential Biomarkers Of Oxidative Stress In Patients With Prediabetes? Başlıklı Çalışma İçin, Ödül Alınan Kurum: Türk Biyokimya Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 20 Eylül 2016.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Araştırma Teşvik Ödülü Birinciliği, Depresyonda Dna Hasarının Ve Onarımının Belirtili Dönem Ve Düzeltme İle İlişkisi, Ödül Alınan Kurum: Türkiye Psikiyatri Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 04 Mayıs 2016.