

Betül ZORKAYA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2022



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

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA
VİTAMİN D’NİN ATEROGENEZLE İLİŞKİLİ
ADAY GENLERİN İFADE DÜZEYİNE ETKİSİ**

BETÜL ZORKAYA

**DANIŞMAN
PROF. DR. AYŞE EVRİM BAYRAK
II. DANIŞMAN
DOÇ. DR. FATMA KAYA DAĞISTANLI**

GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL-2022

İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans eğitimlerim süresince bilgisi, tecrübesi ve eğitimci kişiliğiyle bana çok şey katan ve beni hep destekleyen beni bugünlere ulaştıran sevgili danışmanım Prof. Dr. Ayşe Evrim Kömürcü-Bayrak'a,

Çalışmalarımın İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda geçen süresince hep yanımda olan, bilgisi tecrübesiyle yol gösteren, yanında çok şey öğrendiğim sevgili 2. danışmanım Doç. Dr. Fatma Kaya Dağıstanlı'ya,

Çalışmalarım süresince yardımlarını ve bilgilerini paylaşmayı esirgemeyen sevgili Doç. Dr. Gamze Tanrıverdi'ye ve sevgili çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Ayşe Seda Akdemir'a ve Uzm. Bio. Aynur Abdulova'ya, ayrıca son aşamalarda da olsa yardımlarından Tuğçe Özbilenler, Sakina Rzayeva ve Nergiz Bayramova'ya,

Özellikle teknik destek konusunda yardımlarını esirgemeyen Aziz Sancar DETAE Lab3 çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Aslı Karacan ve Uzm. Bio. Aybike Sena Özuynuk'a ve manevi desteğinden Meryem Sarıkaya'ya,

Lisans stajı ve sonrasında lisans bitirme projesi zamanlarımdan beri üzerimde emeği olan Uzm. Bio. Muhammed Abdulvahid Kalkan'a ve deney hayvanı çalışması tecrübesini benimle paylaşan Uzm. Bio. Gizem Çelebi'ye,

Tüm yüksek lisans hayatım boyunca yanımda olan canım arkadaşlarım 'Event Team' üyelerine,

Eğitim hayatım boyunca her zaman arkamda olan, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-37296

İÇİNDEKİLER

TEZ	
ONAYI.....	HATA
! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	
BEYAN.....	H
ATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.	
İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	ii
İ	
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER	
LİSTESİ.....	vii
SEMBOLLER	/
LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR	
ÖZET.....	xiii
V	
ABSTRACT.....	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Metabolik Sendrom.....	4
2.1.1. Tanımı.....	4
2.1.2. Patogenezi.....	5
2.1.3. Koroner Kalp Hastalıkları (KVH) ile İlişkisi.....	7
2.2. Ateroskleroz.....	8
2.2.1. Tanımı.....	8
2.2.2. Histolojisi ve Fizyopatolojisi.....	9
2.2.3. Patogenezi.....	15
2.2.4. Metabolik Sendrom Ve Ateroskleroz İlişkisi.....	19
2.3. Metabolik Sendrom İçin Deneysel Hayvan Modeli Araştırmaları.....	22
2.3.1. Diyet manipülasyonu ile oluşturulan MetS hayvan modelleri.....	22
2.3.2. Genetik modifikasyon veya cerrahi yöntem ile oluşturulan MetS hayvan modelleri.....	23
2.3.3. Farmakolojik manipülasyon ile oluşturulan MetS hayvan modelleri.....	24

2.4. Vitamin D.....	25
2.4.1. Tanımı.....	25
2.4.2. Metabolik Sendrom ve Aterosklerozda Vitamin D Çalışmaları.....	26
2.5. Mikro RNA'lar.....	27
2.5.1. Tanımı.....	27
2.5.2. Biyogenezi.....	28
2.5.3. Metabolik Sendrom ve Aterosklerozda miRNA Araştırmaları.....	29
2.5.4. Aort Dokusunda Araştırılmak Üzere Seçilen Proteinler.....	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
4. BULGULAR.....	488
5.TARTIŞMA.....	72
KAYNAKLAR.....	82
HAM VERİLER.....	101
FORMLAR.....	102
ETİK KURUL KARAR.....	103
PATENT HAKKI İZNİ.....	104
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	105
ÖZGEÇMİŞ.....	106

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Metabolik Sendromun Klinik Tanısı.....	5
Tablo 2-2: Kan Damarlarının Özellikleri.....	13
Tablo 3-1: Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar.....	33
Tablo 3-2: Moleküler tekniklerde kullanılan kimyasallar.....	34
Tablo 3-3: İmmunohistokimya da kullanılan kimyasallar.....	34
Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar.....	35
Tablo 3-5: Kullanılan sarf malzemeler.....	35
Tablo 3-6: miRNA'lara özgü kullanılan TaqMan primer-prob assay'leri.....	43
Tablo 3-7: miRNA'lar için cDNA Sentez prosedürü.....	44
Tablo 3-8: cDNA sentezi için sıcaklık-zaman protokolü.....	44
Tablo 3-9: Araştırılan miRNA'ların Gerçek-Zamanlı PZR içerikleri.....	45
Tablo 3-10: Araştırılan miRNA'ların Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR sıcaklık-zaman protokolü.....	46
Tablo 4-1: Deney gruplarına ait açlık kan glukozları (mg/dl) ortalaması.....	49
Tablo 4-2: Tüm deney gruplarına ait idrar verileri.....	50
Tablo 4-3: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının (gr) ortalaması.....	51
Tablo 4-4: Deney hayvanlarının bel çevrelerinin (cm) ortalaması.....	53
Tablo 4-5: Deney hayvanlarının deri kalınlıklarının (mm) ortalaması.....	54
Tablo 4-6: 15. hafta sonunda deney gruplarından alınan aort dokusunda miRNA'ların ifade düzeyleri.....	56
Tablo 4-7: Deney hayvanlarının α -SMA immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	62
Tablo 4-8: Deney hayvanlarının p16 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	64
Tablo 4-9: Deney hayvanlarının AMPK immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	66
Tablo 4-10: Deney hayvanlarının TIMP3 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi.....	68
Tablo 4-11: miR-21 ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	70
Tablo 4-12: miR-146a ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar.....	71

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Metabolik sendrom (MetS) risk faktörleri.....	7
Şekil 2-2: Değiştirilebilen (mavi) ve değiştirilemeyen (kırmızı) kardiyovasküler hastalık risk faktörleri.....	8
Şekil 2-3: Aorta duvarı kesiti.....	9
Şekil 2-4: Endotel hücrelerin çevresinde fenestralı (pencere) elastik bazal lamina.....	10
Şekil 2-5: Büyük bir elastik arterin enine kesiti.....	11
Şekil 2-6: Düz kas hücrelerinin kasılması.....	12
Şekil 2-7: Düz kas hücrelerinin gevşemesi.....	12
Şekil 2-8: Mikro damar ağındaki küçük damarlar (arteriyoller ve venüller) ve çevresindeki bağ dokusu bileşenleri.....	13
Şekil 2-9: Temel ateroskleroz süreci. Ateromatöz plak oluşumunda hücresel etkileşimler.....	17
Şekil 2-10: Aterosklerotik plak evreleri	18
Şekil 2-11: Bir ateromatöz lezyonun fotomikrografları.....	19
Şekil 2-12: Metabolik sendrom risk faktörleri ve aterosklerotik sonuçları.....	21
Şekil 2-13: miRNA biyogenezi.....	29
Şekil 4-1: Açlık kan glukozu takibi (mg/dl).....	50
Şekil 4-2: Vücut ağırlığı takibi (gr).....	52
Şekil 4-3: Bel çevresi takibi (cm).....	54
Şekil 4-4: Deri kalınlığı takibi (mm).....	55
Şekil 4-5: Deney grupları arasında miR-21 ifade düzeyi değişimi.....	57
Şekil 4-6: Deney grupları arasında miR-146a ifade düzeyi değişimi.....	58
Şekil 4-7: Aort dokusunun Hematoksilen-Eosin boyanması.....	59
Şekil 4-8: Aort dokusunun Masson Trichrome boyanması.....	60
Şekil 4-9: Aort dokusunda Von Kossa Boyama Yöntemi ile kalsiyum birikimlerinin (↑) gösterilmesi.....	61
Şekil 4-10: α-SMA immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi.....	62
Şekil 4-11: α-SMA antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları.....	63
Şekil 4-12: p16 immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi.....	64

Şekil 4-13: p16 antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları.....	65
Şekil 4-14: AMPK immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi.....	66
Şekil 4-15: AMPK antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları.....	67
Şekil 4-16: TIMP3 immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi.....	69
Şekil 4-17: TIMP3 antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları.....	70



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

1,25(OH)2D: 1,25-dihidroksivitamin D

25(OH)D: 25-hidroksi kolekalsiferol

α -SMA: Alfa-düz kas aktin

μ m: mikrometre

μ l: mikrolitre

AMPK: 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz

CRP: C-reaktif protein

DGRCR8: DiGeorge syndrome critical region 8

DM: Diabetes Mellitus

DNA: deoksiribonükleik asit

ET-1: endotelin-1

FGF: fibroblast büyüme faktörü

gr: gram

GTC: Guanidin izotiyosiyanat

H₂O₂: hidrojen peroksit

HDL: yüksek yoğunluklu lipoprotein

ICAM-1: intersellüler adezyon molekül-1

IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu

IL-1 β : interlökin-1 β

IL-6: interlökin-6

IU: uluslararası ünite

KAH: koroner arter hastalığı

kg: kilogram

KH: Köpük hücreleri

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

KY: kolesterol yarıkları

LDL: düşük yoğunluklu lipoprotein

MetS: Metabolik sendrom

mg: miligram

MI: miyokard infarktüsü

miRNA: mikroRNA

mL: mililitre

mm: milimetre

MMP: matriks metalloproteinaz

mRNA: mesajcı RNA

MS: Metabolik sendrom (MetS) grubu

MetSD: Metabolik sendrom Vit D grubu

NCEP ATP III: Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Yetişkin Tedavi Paneli III

NF-kB: adiponektin, aktive B hücresi

ng: nanogram

NO: nitrik oksit

nt: nükleotid

O₂: oksijen

OH: hidroksil

ONOO: peroksinitrit

PAI-1: plazminojen aktivatör inhibitör-1

PDGF: platelet(trombosit)-kaynaklı büyüme faktörü

piRNA: piwi etkileşimli RNA

pre-miRNA: prekürsör miRNA

pri-miRNA: primer miRNA

PVAT: perivasküler yağ dokusu

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RISC: RNA- indüklenmiş susturma kompleksi

RNA: ribonükleik asit

RNAaz II: RNA polimeraz II

RNAaz III: RNA polimeraz III

RNAi: RNA interferans
RT: Revers transkripsiyon
siRNA: küçük interferans RNA
SK: Kontrol grubu
SKD: Vit D kontrol grubu
STM: skinfold thickness-based method
STZ: streptozotosin
T1DM: Tip 1 Diabetes Mellitus
T2DM: Tip 2 Diabetes Mellitus
TA: tunika adventisya
TIMP3: Tissue inhibitors of Metalloproteinases 3
Tİ: tunika intima
TM: tunika mediya
TNF- α : tümör nekroz faktörü alfa
UTR: Untranslated region
UVB: ultraviyole
VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekül-1
VDR: vitamin D reseptörü
VitD: Vitamin D
VitD3: kolekalsiferol
VSMC: vasküler düz kas hücresi
WHO: Dünya Sağlık Örgütü
ZDF: Zucker diyabetik yağı

ÖZET

Zorkaya, B. (2022). Metabolik Sendromlu Sıçanlarda Vitamin D'nin Aterogenezle İlişkili Aday Genlerin İfade Düzeyine Etkisi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Hipertansiyon, santral obezite, dislipidemi, hiperglisemi gibi metabolik durumların birlikte bulunduğu Metabolik Sendromda(MetS), yüksek yağlı ve fruktozlu beslenmenin neden olduğu aterosklerozda, moleküler patogeneze halen net değildir. Bu çalışmada, MetS sıçan modelinde, ateroskleroz gelişim sürecinde Vitamin D'nin (VitD) aort doku morfolojisi ve endotel hasarı üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

Yüksek yağlı-fruktozlu(%17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem + %20 fruktozlu su) diyetle MetS oluşturulan ve normal(standart) yemle beslenen 10-12 haftalık Sprague Dawley erkek sıçanların (n=32) aort dokularına VitD'nin etkisi, miR-21-5p ve miR-146a-5p ifade düzeylerindeki değişimler kantitatif RT-PZR ile, doku morfolojisindeki histolojik değişimler Hematoksilen-Eosin, Masson üçlü boyası ve Von Kossa boyamaları ile, miR-21-5p'nin hedef gen ürünü TIMP3 ile ayrıca α -SMA, p16, AMPK aort dokularında immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Kontrol ve MetS gruplarının yarısına, 12 hafta boyunca VitD(170 IU/ hafta, oral) uygulaması yapıldı. Tüm sıçanların deri kalınlığı, bel çevresi, ağırlık ve kan glukozu takipleri yapıldı. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Deney sonunda, gruplar arasında VitD'nin kan glukozu ve bel çevresi değerlerine başlangıca göre anlamlı bir etki gösterdiği belirlendi($p \leq 0.05$). Gruplar arasında miR-146a-5p'in ifade düzeylerinin VitD ile arttığı belirlendi($p \leq 0.05$). Histopatolojik incelemede, MetS grubunda düz kas hücrelerinin bazı alanlarda vakuolize olduğu ve sağlıklı görünümünden uzaklaştığı ve damar yapısının bozulduğu saptanarak VitD ile bu hasarın büyük ölçüde düzeldiği gözlemlendi. MetS grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında p16, α -SMA ve AMPK immün pozitif hücrelerin sayısında artma, miR-146a-5p'in ifade düzeylerinde istatistiksel olarak bir fark gözlenmese de TIMP3 immün pozitif hücrelerin sayısında azalma olduğu görüldü.

Sonuç olarak yüksek yağlı-fruktozlu diyet ile oluşturulan metabolik sendromun damar yapısını bozduğu vitamin D'nin oluşan hasarı büyük ölçüde düzelttiği saptandı.

Anahtar Kelimeler: Ateroskleroz, metabolik sendrom, vitamin D, Yüksek yağlı diyet, Yüksek fruktoz diyeti, miRNA, α -SMA, p16, AMPK, TIMP3

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Project No. TYL-2021-37296

ABSTRACT

Zorkaya, B. (2022). The effect of Vitamin D on the expression levels of candidate genes associated with Atherogenesis in Rats with Metabolic Syndrome. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics. Master Thesis. İstanbul.

In Metabolic Syndrome(MetS) where metabolic conditions like hypertension, central obesity,dyslipidemia,hyperglycemia coexist, and in atherosclerosis caused by high-fat and fructose nutrition, molecular pathogenesis is unclear.Aimed determine effect of Vitamin D(VitD) on aortic tissue morphology and endothelial damage during development of atherosclerosis in MetS rat model.

Effect of VitD on aortic tissues of 10-12 weeks old Sprague Dawley male rats (n=32) fed normal(standard) diet and induced MetS on a high-fat-fructose(17%fat and 17%fructose feed+20%fructose water) diet,miR-21-5p and changes in miR-146a-5p expression levels by quantitative RT-PCR, histological changes in tissue morphology by Hematoxylin-Eosin,Masson triple stain and Von Kossa stains, target gene product of miR-21-5p TIMP3 and also α -SMA,p16,AMPK investigated immunohistochemically in aortic tissues.Half of control and MetS groups administered VitD(170 IU/week, oral) for 12 weeks. Skin thickness,waist circumference,weight,blood glucose monitored in all rats.Results evaluated statistically.

End of experiment determined VitD had a significant effect on blood glucose and waist circumference values between groups compared to baseline($p \leq 0.05$).Expression levels of miR-146a-5p found to increase with VitD between groups($p \leq 0.05$).In histopathological examination, it was observed that smooth muscle cells in MetS group vacuolized in some areas and moved away from their healthy appearance,and vascular structure deteriorated, and this damage was largely corrected with VitD.Compared other groups, MetS group showed increase number of p16, α -SMA and AMPK immune positive cells, and decrease number of TIMP3 immune positive cells, although there was no statistical difference in expression levels of miR-146a-5p.

Result, it was determined that metabolic syndrome caused by a high-fat-fructose diet, disrupted vascular structure, and vitD greatly corrected damage.

Key Words: Atherosclerosis, metabolic syndrome, vitamin D, High-fat diet, High fructose diet, miRNA, α -SMA, p16, AMPK, TIMP3.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University.

Project No.TYL-2021-37296

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Erişkinlerde en önemli mortalite ve morbidite sebebi olan ateroskleroz, endotel fonksiyon bozukluğuna neden olan endotel hasarını takiben gelişen enflamasyona bağlı kronik bir damar hastalığıdır (Libby P ve ark. 2019; Ross MH ve Pawlina W 2014). Aterosklerozun lezyonları olan aterosklerotik plaklar, özellikle büyük elastik arterlerin intima katmanlarını etkilemektedir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Abdominal obezite başta olmak üzere yüksek trigliserid, düşük HDL kolesterol, hipertansiyon ve yüksek açlık kan glukozu gibi risk faktörlerinden en az ikisinin bir arada bulunması metabolik sendrom (MetS) olarak tanımlanmaktadır (Gancheva S ve ark. 2015; Alberti KG ve ark. 2009). Hipertansiyon, obezite, dislipidemi, diabetes mellitus gibi metabolik durumlar da endotel hasarı ve beraberinde ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalık gelişimi için risk faktörleri arasında sayılmaktadır (Ross MH ve Pawlina W 2014; Li Y ve ark. 2018).

DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal modifikasyonlar olan epigenetik düzenlemeler, özellikle mikroRNA'ları (miRNA) içeren kodlamayan RNA'lar, çeşitli mekanizmalar üzerinden etkisini göstermektedir (Hitit M ve ark. 2015; Uluşan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Bartel DP 2004). miRNA epigenetik mekanizmasının disregülasyonuna ilişkin çalışmalarla MetS gibi multifaktöriyel hastalıkların patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması sağlanması amaçlanmaktadır, fakat henüz epigenetik işaretlerin MetS gelişimi ve ilerlemesindeki rolü halen net değildir (Ramzan F ve ark. 2021).

İnsan sağlığında önemli bir rolü olan diyet ve beslenme de dahil olmak üzere çevresel faktörlerin epigenetik modifikasyonlar yoluyla metabolik süreçlere etki ettiği bilinmektedir (Ramzan F ve ark. 2021; Ramos-Lopez O ve ark. 2020). miRNA'lar ile etkileşime girebilen diyet faktörleri, bu sayede gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayarak hastalık fenotiplerinin önlenmesi veya ilerlemesiyle ilişkili hücrel fenotipleri kontrol ederler. Yüksek yağlı ve fruktozlu beslenmenin metabolik sendroma katkıda bulunduğu gösterilmiştir (García ME ve ark. 2010; Maiztegui B ve ark. 2009; Castro MC ve ark. 2011; Wong ve ark. 2016). Yüksek yağlı diyet ile oluşturulan hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, lipid metabolizması, aterojenik mekanizmalar, yağ dokusu iltihabı, enflamatuar gen regülasyonu ve adipogenez gibi MetS'in patogeneziyle

ilişkili miRNA ifadelerinin değiştiği gösterilmiştir (Ramzan F ve ark. 2021, Silveira A ve ark. 2022; Arner P ve Kulyté A 2015; Ortega FJ ve ark. 2013). Aterosklerotik lezyon oluşumunda ve ilerlemesinde rol alan genlerin düzenlenmesinde miRNA'ların rolünün önemi büyüktür (Feinberg MW ve ark. 2016). Enflamatuar belirteçleri hedef aldığı tahmin edilmekte olan miR-1, miR-19a, miR-21, miR-27a, miR-33, miR-124, miR-125a, miR-146a, miR-155, miR-187, miR-199a, miR-214, miR-223 gibi miRNA'ların çok azı ateroskleroz açısından araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında seçilen miR-146a ve miR-21'in ve hedef genlerinin MetS ve beraberinde aterosklerotik süreçte ifadeleri daha önceki çalışmalarda araştırılmış olup artan ifadelerinin aterosklerozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ramos-Lopez O ve ark. 2020; Feinberg MW ve ark. 2016; Raitoharju E ve ark. 2011). miR-21 vasküler yaralanma çalışmalarında düz kas hücresi proliferasyonunu artırıcı role sahip olsa da, aterosklerotik lezyon oluşumundaki görevi henüz net değildir ve aterosklerotik ilerlemeyi azaltıp azaltmadığını değerlendirebilmek için daha fazla çalışılması gerektiği belirtilmektedir (Feinberg MW ve ark. 2016).

Ayrıca, beslenme ve diyetle vitamin D gibi takviye alımları veya deride Vit D3 sentezi, epigenetik mekanizmalarla (DNA metilasyonu, miRNA ifadesi ve histon modifikasyonları) gen ifadesi düzenlenmesinde rol oynayarak enflamasyon, obezite, glikoz intoleransı gibi MetS patofizyolojisinde yer alan süreçleri iyileştirmesiyle metabolik homeostazın sağlanması açısından önem taşımaktadır (Ramzan F ve ark. 2021).

Yüksek yağ-fruktoz diyeti ile beslenen sıçanlarda, oksidatif stres, bozulmuş glukoz toleransı, dislipidemi ile artan vücut ağırlığı, karın çevresinde yağ birikimi ve buna bağlı erken evre ateroskleroz oluşumu beklenmektedir (Cardellini M ve ark. 2009). Diğer yandan bir başka yüksek yağ/glukoz diyeti ve STZ ile oluşturulmuş diyabetik aterosklerozlu sıçanların iliyak arterlerinde miRNA profillemesi ile farklı ifade edilen miRNA'lar ve rol aldıkları metabolik yollar belirlenmiştir (Li Y ve ark. 2018). Bu çalışmada, literatürdeki metabolik sendrom hayvan modelleri değerlendirilmiş ve özel diyet ile oluşturulmuş MetS modeli kullanılarak günlük hayata en yakın modelin elde edilmesi hedeflendi. Oluşturulan Metabolik Sendrom (MetS) sıçan modelinin erken evre ateroskleroz gelişiminde vitamin D (VitD) ve miRNA ifade düzeyleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için literatür bilgilerine göre uygun bir model olarak değerlendirildi. Bu amaçla, doymuş hayvansal yağ ve işlenmiş gıdalarda sıklıkla

kullanılan fruktoz miktarı fazla diyet ile diyabet ve santral obezite oluşturularak ateroskleroz gelişiminin başlaması sağlanmıştır.

Bu çalışmanın amacı, yüksek yağ-fruktoz diyeti ile oluşturulan Metabolik Sendromlu (MetS) (Gancheva S ve ark. 2015) grup ile normal diyetle beslenen kontrol gruplar karşılaştırılarak aterogenezin başlangıç patogenezi olan endotel hasarında, ilgili gen düzenlenmesinde görev aldığı bilinen miR-21-5p ve miR-146a-5p miRNA'ların aort dokusunda değişen gen ifadeleri arasındaki ilişkiyi belirlemek ve Vitamin D'nin doku morfolojisi ve endotel hasarı üzerinde nasıl bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktır.

Bu araştırmada ile, ateroskleroz etiyopatogenezinin daha iyi anlaşılıp hem bu patolojinin önlenmesine hem de yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine katkı sağlayabilecek ve ileride yapılması planlanan daha kapsamlı araştırmalar için önbilgilerin elde edilmesi hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Metabolik Sendrom

2.1.1. Tanımı

Metabolik sendrom (MetS), diyabet, hipertansiyon, dislipidemi ve abdominal obezite gibi hastalıklardan oluşan bozulmuş enerji metabolizması durumudur. MetS gelişimi için en önemli faktör, insülin direnci ve viseral obezitedir. Bunların varlığı, bireyi kardiyovasküler olaylara daha yatkın hale getirmektedir (Gancheva S ve ark. 2015; Khan Y ve ark. 2018). MetS'in tanımı için Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Yetişkin Tedavi Paneli III (NCEP ATP III), Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) gibi çeşitli kuruluşlar farklı tanımlar kullanmakta ve bu kriterlere göre MetS tanısı konulmaktadır. Her bir tanımlama, birkaç farklı parametre dışında ortak özelliklere sahiptir ve insülin direncine odaklanarak yüksek riskli popülasyonları belirleme amacındadır (Zainuddin LR ve ark. 2011; Khan Y ve ark. 2018; Desroches S ve Lamarche B, 2007). IDF'ye göre viseral obezite ile birlikte yüksek trigliseritler, düşük HDL-kolesterol, hipertansiyon ve insülin direncinin bir sonucu olarak açlık hiperglisemisi gibi risk faktörlerinden en az ikisinin varlığı MetS olarak tanımlanmaktadır (Tablo 2-1) (Gancheva S ve ark. 2015; Alberti KG ve ark. 2009; Sherling DH ve ark. 2017). Ayrıca bu tanıma göre MetS tanısı için zorunlu olduğuna karar verilen bel çevresi ölçümü ile santral obezite değerlendirilmektedir (Desroches S ve Lamarche B, 2007). MetS, artan prevalansı nedeniyle dünya çapında önemli bir sorun olarak değerlendirilmektedir. MetS'in bu yaygınlığı yaşa, cinsiyete, ırka, etnik kökene ve kullanılan MetS tanımına bağlı olarak %10-84 arasında değişim gösterir (Kaur JA, 2014). IDF'ye göre dünya çapında yetişkinlerin yaklaşık %25'i MetS tanısına sahiptir ve erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bir yaygınlığa sahiptir (Alberti KG ve ark. 2006; Bee Jr YT ve ark. 2008). Ayrıca, Asya etnik kökeninin MetS'a diğer etnik kökenlere göre daha yatkın olduğu belirtilmektedir (Zainuddin LR ve ark. 2011).

Tablo 2-1: Metabolik Sendromun Klinik Tanısı

RİSK FAKTÖRÜ/TANI KRİTERİ	TANIMLAMA SEVİYESİ
Abdominal obezite: Bel çevresi	
Erkeklerde	>94 cm (veya 102 cm)
Kadınlarda	>80 cm (veya 88 cm)
Trigliserit yüksekliği	≥150 mg/dl
HDL kolesterol düşüklüğü	
Erkeklerde	<40 mg/dl
Kadınlarda	<50 mg/dl
Kan glukoz yüksekliği	≥110 mg/dl
Kan basıncı yüksekliği	≥130/85 mmHg

2.1.2. Patogenezi

MetS, çeşitli klinik durumların kombinasyonu olduğu için tek bir nedeni yoktur. MetS gelişimine neden olan faktörler kalıtsal veya çevresel olabilmektedir. Aile öyküsü, Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM), hipertansiyon, insülin direnci ve etnik köken MetS gelişme riskini artıran faktörlerdir (Wong SK ve ark. 2016). Ayrıca, yaşlanma (*senesens*) MetS için bir diğer önemli risk faktörüdür (Bonomini F ve ark. 2015). Hareketsiz yaşam tarzı, kötü beslenme alışkanlıkları gibi çevresel faktörler MetS gelişimine katkı sağlamaktadır. Ancak kontrol edilemeyen MetS'a bağlı olarak kardiyovasküler hastalıklar (KVH) gibi diğer ciddi tıbbi komplikasyonlar meydana gelmektedir (Wong SK ve ark. 2016; Lakka HM ve ark. 2002).

İlk araştırmalardan beri (Reaven GM 1988), MetS'a sebep olan temel nedenlerden biri insülin direnci ve abdominal obezite olduğu düşünülmektedir (Grundy SM 2016; Fahed G ve ark. 2022). İnsülin, yüksek kan glukozuna yanıt olarak pankreas beta hücreleri tarafından salgılanan bir peptid hormonudur. Dokularda aşırı yağ birikimiyle gelişen abdominal obezitenin varlığıyla ortaya çıkan bir durum olan insülin direnci, protrombotik bir durum oluşturarak yağ dokusundan pro-enflamatuar sitokin salınımını artırır (Fahed G ve ark. 2022). Bunların hepsi KVH ve T2DM risklerini arttırmada önemli bir rol oynar (Reaven GM 1988; Fahed G ve ark. 2022). Dolayısıyla MetS, eşlik eden T2DM olmasa bile KVH için bir risk faktörüdür. MetS, hiperinsülinemi,

disglisemi, dislipidemi ve hipertansiyona bağılı olarak oluşmaktadır (Fahed G ve ark. 2022).

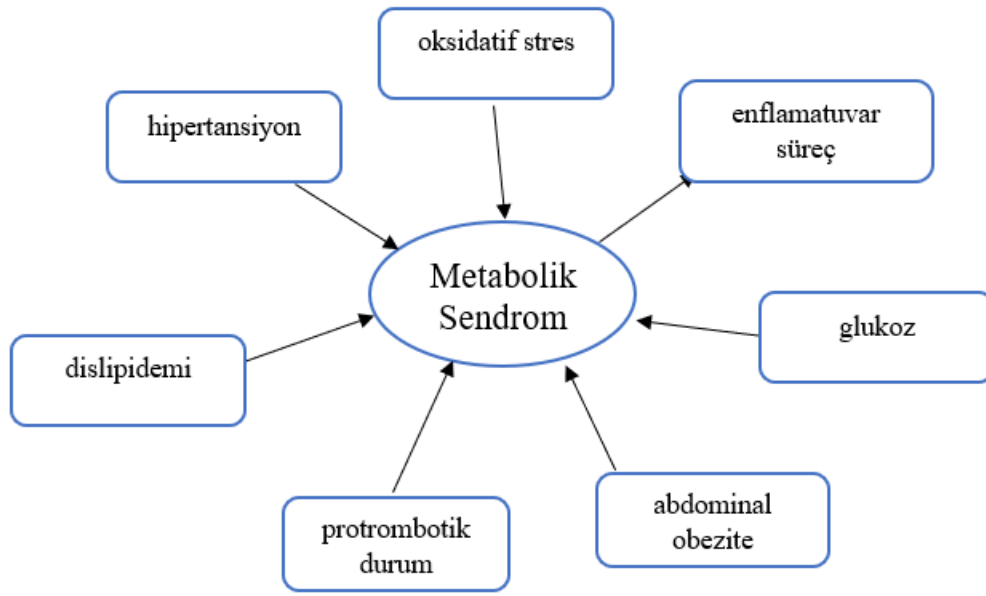
Abdominal obezite, diğerk tüm MetS risk faktörleriyle güçlü bir şekilde ilişkilidir ve aşırı beslenme durumu klinik bir göstergedir (Grundy SM, 2016). Bir endokrin organ olan yağ dokusundan salınan çeşitli adipokinler arasında leptin ve adiponektin gibi hormonlar, anjiyotensinojen ve plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) gibi peptitler, interlökin (IL-6) ve tümör nekroz faktörü α (TNF- α) gibi enflamatuar sitokinler ve insulin direnci MetS'in patofizyolojisinde önemli roller oynamaktadırlar (Fahed G ve ark. 2022).

Salınan hormonlardan leptin düzeylerinin obezite ve vücut yağ düzeyleriyle orantılı olduğu, bir çalışmada (Considine RV ve ark. 1996) gösterilmiştir. Glikoz homeostazını ve insulin duyarlılığından sorumlu leptin, vücut enerji depoları yeterli olduğunda, gıda alımını baskılar ve enerji harcamasını uyarır. Obezite durumunda metabolik dengesizlikte leptin başarısız olur ve yüksek leptin seviyeleriyle artmış KVVH risk ve enflamasyon ile obezite, MetS, KVVH birbirleriyle bağlantılı durumlardır (Fahed G ve ark. 2022). Yağ dokusunda yapılan bir çalışmada da (Huang BW ve ark. 2004) yüksek fruktoz alan grubun plazma leptin konsantrasyonu kontrol grubununkinden daha yüksek olduğu gösterilmiştir.

Adiponektin ise leptine ters çalışarak anti-aterojenik, anti-enflamatuar ve anti-diyabetiktir ve adiponektin, aktive B hücrelerinin (NF-kB) enflamatuar yolunun nükleer faktör kappa-hafif zincir arttırıcısını etkiler, insülin duyarlılığını arttırır, vasküler düz kas hücresi (VSMC) proliferasyonunu inhibe eder ve plak oluşumunu stabilize eder (Fahed G ve ark. 2022). Koroner kalp hastalığı, diyabet, hipertansiyonu olan hastalarda yapılan çalışmalarda (Ouchi N ve ark. 1999; Pischon T ve ark. 2004; Hotta K ve ark. 2000; Chow WS ve ark. 2007) düzeylerin azaldığı ve adiponektinin bu hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynadığı görülmüştür (Fahed G ve ark. 2022).

Ancak tüm bunlara rağmen aşırı yağ dokusunun MetS için gerçek neden olduğu anlamına gelmemektedir (Grundy SM, 2016). Örneğin, devam eden obezite varlığında kalori kısıtlamasının toplam vücut ağırlığını sadece %5-10 oranında azalttığı saptanmıştır ancak önemli ölçüde T2DM riski azalmasıyla birlikte yeni başlangıçlı MetS risk faktörleri azaltılmıştır (Grundy SM, 2015; Orchard TJ ve ark. 2005; Goldberg RB ve Mather K 2012).

Ayrıca, MetS için ağırlık kaybı dışında birçok tedavi yaklaşımı uygulanmaktadır. Bunlar; yaşam tarzı değişikliği ile birlikte sağlıklı zayıflama diyeti, egzersiz, davranış terapisi olup ayrıca dislipidemi, hiperglisemi ve hipertansiyona yönelik farmakolojik yaklaşımlar ve metabolik cerrahidir (Altınel R ve ark. 2021).

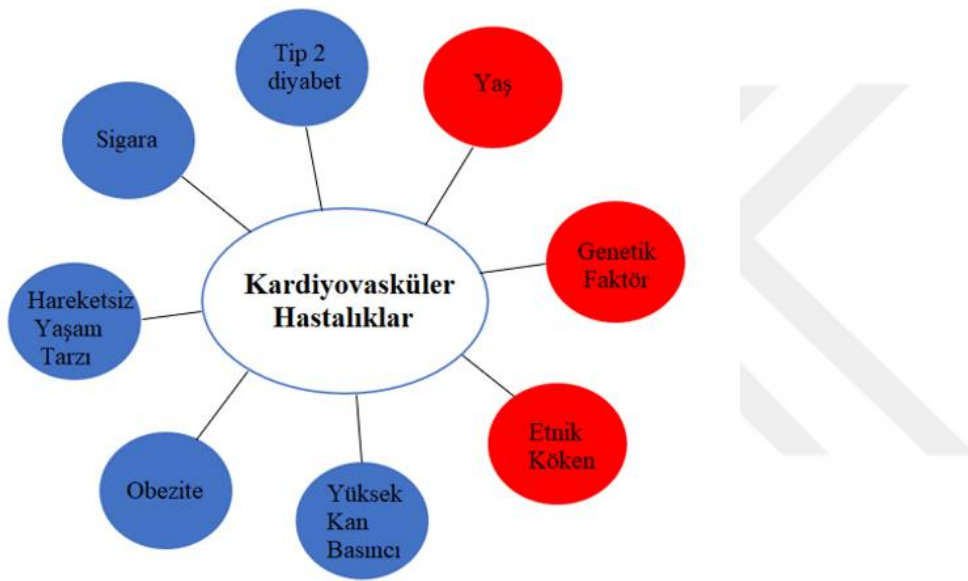


Şekil 2-1: Metabolik sendrom (MetS) risk faktörleri

2.1.3. Koroner Kalp Hastalıkları (KVH) ile İlişkisi

Diyabet, bel çevresinde yağlanma, hipertansiyon ve lipid seviyelerindeki bozukluk ile karakterize olan MetS, kardiyovasküler hastalığa yol açan risk faktörlerinin birlikte bulunduğu bir metabolik durumdur. Bu nedenle MetS kriterleri, kardiyovasküler hastalık riski açısından erken uyarı sayılmaktadır. Bu erken uyarılarla birlikte fiziksel aktivite gibi yaşam tarzı değişikliği ile ileride oluşabilecek kardiyovasküler hastalıkların tedavi süresi ve yoğunluğu azaltılabilir (Balkau B ve ark. 2007; Khan Y ve ark., 2018). Daha belirgin risk faktörlerini kontrol altına almak için bazen ilaç tedavileri veya bariatrik cerrahi gibi radikal girişimler gerekebilir (Grundy SM, 2016). MetS'in bir sonucu olarak, 5 kat daha fazla DM (diabetes mellitus) gelişme riski olduğu ve 5-10 yıl içinde de 2 kat daha fazla kardiyovasküler hastalık gelişme riski olduğu gösterilmiştir (Khan Y ve ark., 2018; Alberti KG ve ark. 2009). MetS'in her bir kriteri kardiyovasküler hastalıklar için bağımsız birer risk faktörüdür. Bu risk faktörlerinin kombinasyonu ile kardiyovasküler hastalığın oranları ve şiddeti artmaktadır.

Mikrovasküler disfonksiyon, koroner ateroskleroz ve kalsifikasyon, kardiyak disfonksiyon, miyokard enfarktüsü ve kalp yetmezliği başlıca MetS'a bağlı gelişen kardiyovasküler hastalık durumlarıdır (Tune JD ve ark. 2017). MetS'a klinik olarak hangi faktör veya faktörlerin sebep olduğu kesin olarak açıklanamıyor olsa da, bu komorbiditelerin T2DM ve aterosklerotik kardiyovasküler hastalıkların gelişim riskini önemli derecede artıran patolojik bir durum olduğu kabul edilmiştir (Sperling LS ve ark. 2015).



Şekil 2-2: Değiştirilebilen (mavi) ve değiştirilemeyen (kırmızı) kardiyovasküler hastalık risk faktörleri (Lewis SJ 2002)

2.2. Ateroskleroz

2.2.1. Tanımı

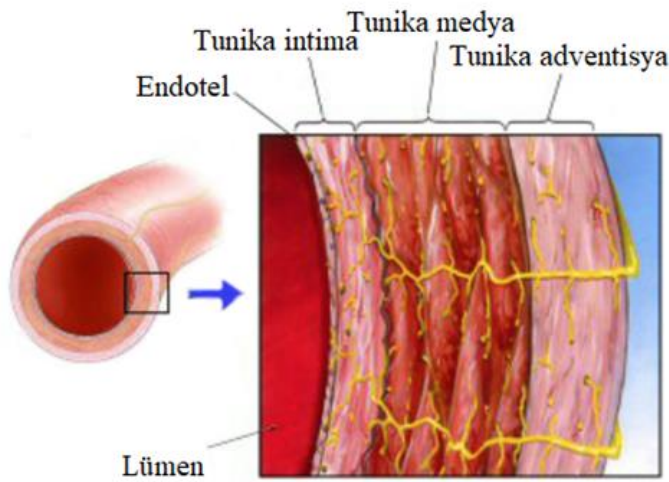
Arter duvarında uzun süre semptom göstermeden gelişen ateroskleroz, patogenezinin ilgi çekici karmaşıklığı ve klinik etkilerinin önemi gerekçesiyle patoloji araştırmalarının temel konularından birini oluşturmaktadır (Van der Wal AC ve Becker AE. 1999). Ateroskleroz, arteriyel sistemin kronik enflamatuar bir durumu olarak tanımlanır. Trombotik komplikasyonlar, antienflamatuar tedavi ile potansiyel olarak önlenebilecek miyokard enfarktüsü (MI), iskemik inme ve periferik arteriyel hastalıklara neden olarak, morbidite ve mortaliteyi büyük ölçüde belirlemektedir (Base de Datos SA, 2001; Libby

P ve ark. 2019). Ayrıca ani ölüm riskini arttıran aterosklerotik plaklar, damarın tıkanmasına yol açan tromboza neden olabilmektedir. Bu trombozun sonuçları, oluşan blokajın lokasyonuna göre değişkenlikler göstermekle birlikte, genellikle ilgili arterin beslediği miyokard alanları oksijenden yoksun kalarak nekroza doğru yol alabilir ve MI gerçekleşebilir (Base de Datos SA, 2001).

Aterosklerotik lezyonlar kan damarlarında en sık meydana gelen edinsel anomalilerdir. Ölümlerin yarısından fazlası ateroskleroza bağlı gelişen iskemik kalp hastalığı, MI, inme ve ekstremitelerin kangreni gibi komplikasyonlardan kaynaklanır. Endotel fonksiyon bozukluğuna neden olan endotel hasarını takiben gelişen aterosklerotik lezyonlar, esas olarak büyük elastik arterlerin tunika intima'sında bulunmaktadır. Yüksek LDL kolesterolü hiperlipidemi, hiperglisemi (diyabet), hipertansiyon, sigara kullanımı ile ilişkili artmış toksin düzeyleri endotel hasarı risk faktörleri arasında sayılmaktadır (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.2.2. Histolojisi ve Fizyopatolojisi

Arterler, venler ve kapillerlerden oluşan damar ağında en büyük elastik arter aortadır. Histolojik olarak iç tabaka tunika intima, orta tabaka tunika mediya ve dış tabaka tunika adventisya olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Şekil 2-3). Ayrıca bunların hepsi perivasküler yağ dokusu ile (PVAT) çevrilidir (Ross MH ve Pawlina W 2014; Milutinović A ve ark. 2020).



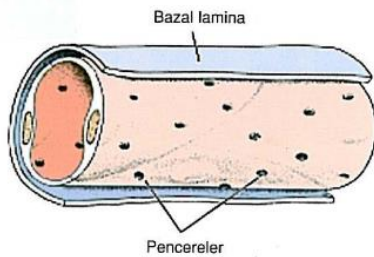
Şekil 2-3: Aorta duvarı kesiti

Damarın en iç tabakası olan Tunika intima, üç bileşenden oluşmaktadır: (1) tek tabaka halinde yassı epitel hücreleri olan endotel, (2) endotel hücrelerinin çevresinde bazal lamina, (3) subendotelyal tabaka.

Kan ve lenf damar sistemlerini oluşturan yapıların tümünün iç yüzeyi tek katlı yassı epitel olan endotel ile döşelidir. Pürüzsüz bir iç epitel hücre tabakası sayesinde arterler dışarıdan sert olsalar bile kanın kolayca akmasını sağlayan endotel hücreleri, damar duvarının yapısal ve fonksiyonel bütünlüğünde rol almaktadırlar (Ross MH ve Pawlina W 2014). Ayrıca, tunika mediya tabakasındaki düz kas hücrelerinin kasılma ve gevşemelerini kontrol eden endotel hücreleri, lokal kan akımını ve basıncını da etkilemektedir.

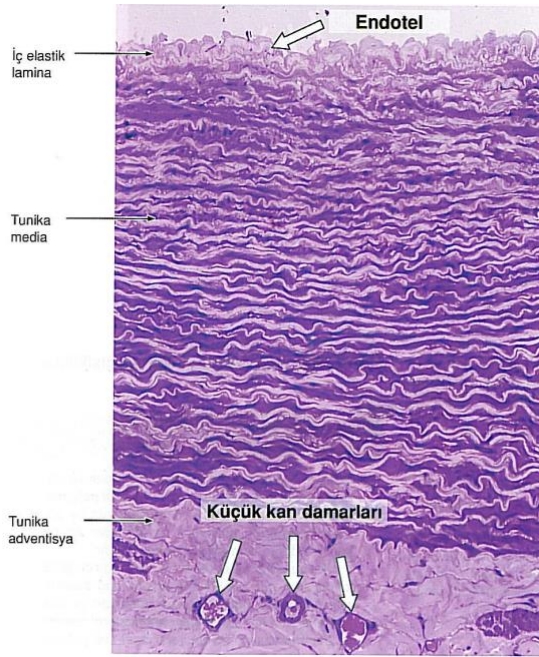
Endotel hücreleri; trombosit ve lökosit yapışmasını önlemek, zararlı maddelerin arteriyel duvara yayılmasını önlemek, tromboz sürecini kontrol etmek amacıyla nitrik oksit (NO), prostaglandin I gibi biyoaktif madde salgırlar (Wang D, 2017; Milutinović A ve ark. 2020). Fenestrasyon ile bu maddelerin tabakalar arasında difüzyonu sağlanır ve maddelerin damar duvarının derinlerindeki hücrelere ulaşması sağlanır. Yeni doğmuş bir bebekte intima tek hücreli bir tabakadan oluşur ve yaş aldıkça veya endotel hasarı ile birlikte internal (iç) elastik membran (lamina) parçalanabilir, kaybolabilir veya kalınlaşabilir. Çok katmanlı hale gelen yetişkinlerin intiması, mediyadan daha kalındır. Bu yaygın görülen durum iyi huyludur ve ateroskleroza ilerlemez. Ancak, ilerleyen kalınlaşmalarda patolojik süreç başlayacaktır (Milutinović A ve ark. 2020).

Bazal lamina; kollajenden, proteoglikanlardan ve glikoproteinlerden oluşan ince bir ekstraselüler tabakadır. Gevşek bağ dokusundan oluşan subendotelyal tabakada seyrek düz kas hücreleri bulunmaktadır. Arterlerde ve küçük kan damarlarında (arteriyoller) subendotelyal tabakada, internal elastik membran (lamina) denen fenestralı (pencere) lameller bulunur (Şekil 2-4).



Şekil 2-4: Endotel hücrelerin çevresinde fenestralı (pencere) elastik bazal lamina (Junqueira LC ve Carneiro J 2006)

Orta tabaka **tunika mediya** birden çok düz kas hücresi katmanından oluşmaktadır. Duvarın büyük kısmını mediya oluşturmaktadır. Arterlerde bu tabaka venlere göre daha kalındır. Eksternal (dış) elastik membran ile tunika mediya, tunika adventisya'dan ayrılır. Eksternal elastik membran, internal elastik membrana göre daha incedir. Tunika mediyanın elastik laminaların arasında çok sayıda düz kas hücreleri, elastik lifler, kollajen ve proteoglikanlar bulunmaktadır (Şekil 2-5). Düz kas hücreleri çeşitli mediyatörlerin etkisi ile gevşeyip kasılarak, arterin vazodilatasyonu ve vazokonstriksiyonu gerçekleşir (Şekil 2-6 ve 2-7) (Ross MH ve Pawlina W 2014).



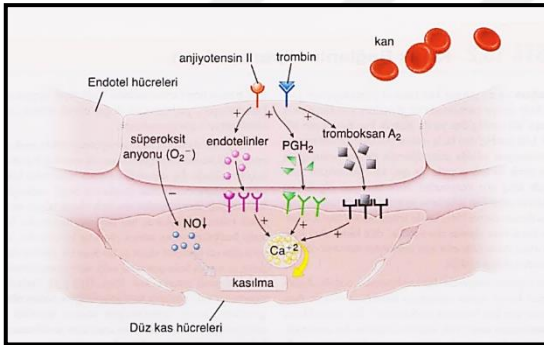
Şekil 2-5: Büyük bir elastik arterin enine kesiti, Boya: PT (Junqueira LC ve Carneiro J 2006)

Elastinden oluşmuş lameller fenestralıdır. Bu sayede maddelerin difüzyonu kolaylaşır. Ayrıca lamellerin sayı ve kalınlıkları kan basıncı ve yaşla bağlantılı olup doğumda neredeyse bulunmayan lamellerin sayısı yetişkinlik döneminde 40-70'e çıkar. 50'li yaşlardan itibaren veya ateroskleroz ile birlikte dejenerasyon bulguları göstermeye başlayan laminalar giderek kollajen ile yer değiştirirler. Kas ve elastik dokunun yerini fibröz doku alır. Bu da aorta duvarının elastikiyetini yavaş yavaş kaybetmesine yol açar ve hasarlı damarın çapında bir artışa neden olur. Hipertansiyon durumunda lamellerin sayı ve kalınlıkları artar (Base de Datos SA, 2001; Ross MH ve Pawlina W 2014).

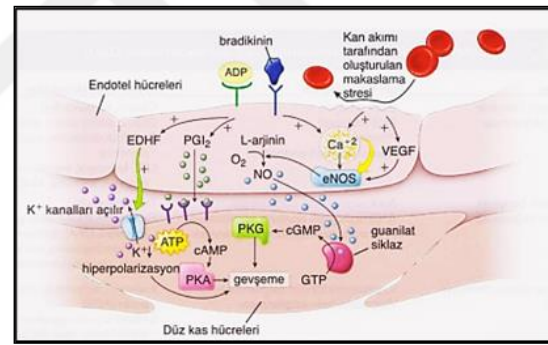
Tunika mediyanın bütün ekstraselüler bileşenleri düz kas hücreleri tarafından üretilmektedir. Düz kas hücreleri tabakalar halinde düzenlenip arterin enine kesitlerinde

dairesel dizi şeklinde görünürler. Düz kas hücrelerinin nükleusları uzundur ve bu hücreler iğ biçimlidirler. Hücrelerin çevresinde eksternal (bazal) laminalar görülür. Tunika media tabakasında fibroblast bulunmaz. Düz kas hücreleri, elastik ve kolajen lifler ile ara madde olan proteoglikanların sentezinden sorumludur. Ayrıca, endotel hücreleri büyüme faktörlerini sentezler ve düz kas hücreleri, bu PDGF (platelet(trombosit)-kaynaklı büyüme faktörü), FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi büyüme faktörlerine yanıt olarak çoğalıp komşu intima'ya göç edebilirler. Bu özellik, aterosklerozda görülebilecek patolojik olaylarda ve hasarlı damar duvarının onarımında önemlidir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Sağlıklı bir arterde düz kas hücreleri mediyadaki tek hücrelerdir ve genellikle kasılma fenotipindedirler. Alfa-düz kas aktin (α -SMA) gibi çeşitli kasılma proteinlerini eksprese ederler. Aterogenez sırasında ise, düz kas hücreleri damar duvarında çoğalarak birikir. Bu süreçte, düz kas hücreleri α -SMA ekspresyonunu kaybederek mezenkimal kök hücrelerin ve miyofibroblastların belirteçlerini eksprese ederler (Milutinović A ve ark. 2020).



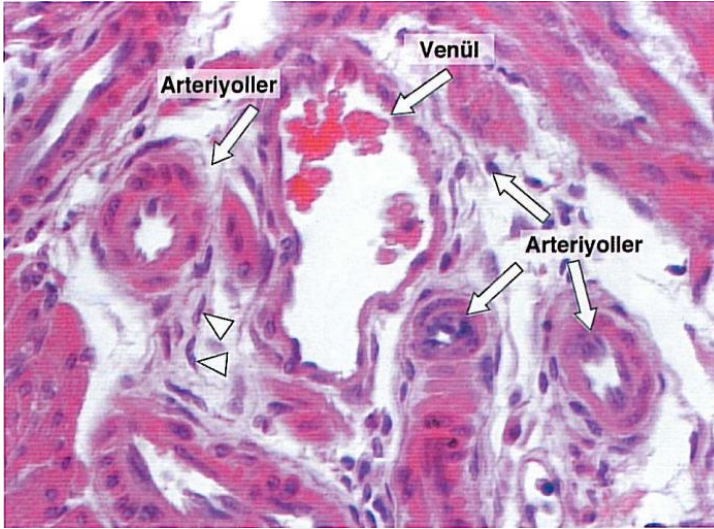
Şekil 2-6: Düz kas hücrelerinin kasılması



Şekil 2-7: Düz kas hücrelerinin gevşemesi

En dıştaki tabaka olan **tunika adventisya** kollajen ve az miktarda elastik liflerinden oluşmuş bağ dokusu tabakasıdır. Aorta gibi elastik arterlerde tunika adventisya, tunika medyanın kalınlığının yarısından daha inceyken, ven ve venüllerde daha belirgin bir şekilde kalınlaşır. Fibroblastlar ve makrofajlar ise bu tabakanın ana hücreleridir. Ayrıca büyük arter ve venlerde tunika adventisya, vazo vazorum denen medyanın dış kısmını besleyen küçük kan damarları (Şekil 2-8) ile nervi vaskularis denen otonomik sinir ağını da içerir. Damar lümeninden duvarın iç kısmına besin sağlanır. Bu tabakadaki kan basıncı artışı aterom plak patogenezinde rol oynamaktadır (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Aterosklerozun ilk adımı olan endotel hasarında meydana gelen enflamasyonda, çok sayıda lökosit postkapiller venüllerden dokulara göç eder (Ross MH ve Pawlina W 2014).



Şekil 2-8: Mikro damar ağındaki küçük damarlar (arteriyoller ve venüller) ve çevresindeki bağ dokusu bileşenleri. Ok başları fibroblastları göstermektedir. HE boyası. Küçük büyütme (Junqueira LC ve Carneiro J 2006)

Histolojik olarak, farklı tipteki arterler ve venler birbirlerinden damar duvarı kalınlığı ve tabakaların içeriğindeki farklılıklarla ayırt edilirler. Tablo 2-2’ de farklı tiplerdeki kan damarlarının özelliklerini özetlemektedir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Tablo 2-2: Kan Damarlarının Özellikleri

Arterler

Damar	Çap	Tunika İntima (iç tabaka)	Tunika Mediya (orta tabaka)	Tunika Adventisya (dış tabaka)
Büyük arter (elastik arter)	>10 mm	Endotel Bağ dokusu Düz kas	Düz kas Elastik lameller	Bağ dokusu Elastik lifler Tunika mediyadan daha ince
Orta boy arter (müsküler arter)	2-10 mm	Endotel Bağ dokusu Düz kas Belirgin internal	Düz kas Kollajen lifleri Nispeten az elastik doku	Bağ dokusu Az miktarda elastik lif Tunika mediyadan

Küçük arter	0,1-2 mm	elastik membran Endotel Bağ dokusu Düz kas İnternal elastik membran	Düz kas (8-10 hücre tabakası) Kollajen lifleri	daha ince Bağ dokusu Az miktarda elastik lif Tunika mediyadan daha ince
Arteriyol	100-100 µm	Endotel Bağ dokusu Düz kas	Düz kas (1-2 hücre tabakası)	İnce, iyi sınırlanmamış bağ dokusu kılıfı
Kapiller	4-10 µm	Endotel	Yok	Yok
Venler				
Damar	Çap	Tunika İntima (iç tabaka)	Tunika Mediya (orta tabaka)	Tunika Adventisya (dış tabaka)
Postkapiller venül	10-50 µm	Endotel Perisitler	Yok	Yok
Müsküler venül	50-100 µm	Endotel	Düz kas (1-2 hücre tabakası)	Bağ dokusu Az miktarda elastik lif Tunika mediyadan daha kalın
Küçük ven	0,1-1 mm	Endotel Bağ dokusu Düz kas (2-3 tabaka)	Düz kas (tunika intima ile devamlılık gösteren 2-3 tabaka)	Bağ dokusu Az miktarda elastik lif Tunika mediyadan daha kalın
Orta boy ven	1-10 mm	Endotel Bağ dokusu Düz kas Bazı durumlarda internal elastik membran	Düz kas Kollajen lifleri	Bağ dokusu Az miktarda elastik lif Tunika mediyadan daha kalın
Büyük ven	>10 mm	Endotel Bağ dokusu Düz kas	Düz kas (2-15 tabaka) Kalbe yakın bölgesinde kalp kası Kollajen lifleri	Bağ dokusu Az miktarda elastik lif, longitudinal düz kaslar Tunika mediyadan çok daha kalın

Sonuç olarak, arterlerin kronik enflamatuvar bir hastalığı olan aterosklerozda, arter duvarının özellikle iç tabakası olmak üzere her üç tabakasında yapısı ve işlevi etkilenir. Kalp dokusunu besleyen koroner arterlerin damar duvarındaki aterosklerotik değişimler sonucu koroner arter hastalığı (KAH) meydana gelir (Milutinović A ve ark. 2020).

2.2.3. Patogenezi

Arterlerin kronik enflamatuvar hastalığı olan ateroskleroz üzerine son yıllarda oldukça çalışılmasına rağmen, bu kompleks hastalığın patogenezi halen tam olarak açıklanamamıştır (Milutinović A ve ark. 2020).

Aterogenezin, kolesterol depo hastalığı veya bir kalsiyum deposu olmasından ayrılıp aktif bir süreç olarak kabul edilmesi, bazı temel enflamatuvar mekanizmaların altını çizerek deneysel çalışmaları, ateroskleroza destekleyen moleküler ve hücresel enflamasyon yollarının aydınlatılmasına yöneltmiştir (Geovanini GR ve Libby P 2018). Enflamasyon mekanizmaların aterom oluşumundaki ana rolünü destekleyen çok sayıda veri mevcuttur. Mononükleer fagositler, enflamasyon ve ateroskleroz arasında bağlantı kurarak bu hastalığın tüm evrelerine katkıda bulunurken, lökosit alımı ve pro-enflamatuvar sitokinler, aterogenezin erken fazında önemli rol oynar (Libby P 2002; 2012).

Patofizyolojik olarak aterogenez sürecinin adımları:

- Endotel hasarı,
- LDL'nin oksidasyonu,
- Köpük hücre oluşumu,
- Lipid çekirdeğinin oluşumu,
- Fibröz kılıf oluşumu,
- Aterom plak oluşumudur.

Endotelial hücreler enflamatuvar aktivasyona uğrar (Libby P 2012). Böylelikle damar endotelinin fonksiyonu değişerek endotel hasarı oluşur. Oksidatif stresle serbest radikallerin artışı ile birlikte endotelial homeostazın düzenleyicisi antioksidan olan nitrik oksitte (NO) bir azalma ve endotel hasarı gelişir (Ritchie SA ve Connell JM 2007). Vazokonstriktör ve büyümeyi arttırıcı fonksiyonların artmasıyla birlikte LDL kolesterole geçirgenliği ve lökosit hücrelerinin endotele yapışmaları da artar. Endotel

hasarı ile oksijen (O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-) ve peroksinitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif oksijen türlerinin üretiminde artışının olması kan dolaşımındaki LDL'nin intimaya geçişini ve oksidasyonunu artırır (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Endotel hasarına bir yanıt olarak, monositler ve diğer lökositler kan dolaşımından ateroma girer ve makrofajlara farklılaşarak bölgede birikirler (Libby P 2002; Ross MH ve Pawlina W 2014). Kemokinler ve kemoatraktan proteinler, daha fazla enflamatuar hücrelerin intima içine alınmasına katılır (Libby P ve ark. 2009).

Doku makrofajları haline gelen monositler, okside olmuş LDL partiküllerini endositozla alıp fagosite ederek köpük hücrelerini oluşturur (Şekil 2-9) (Ross MH ve Pawlina W 2014, Zengin H, 2012).

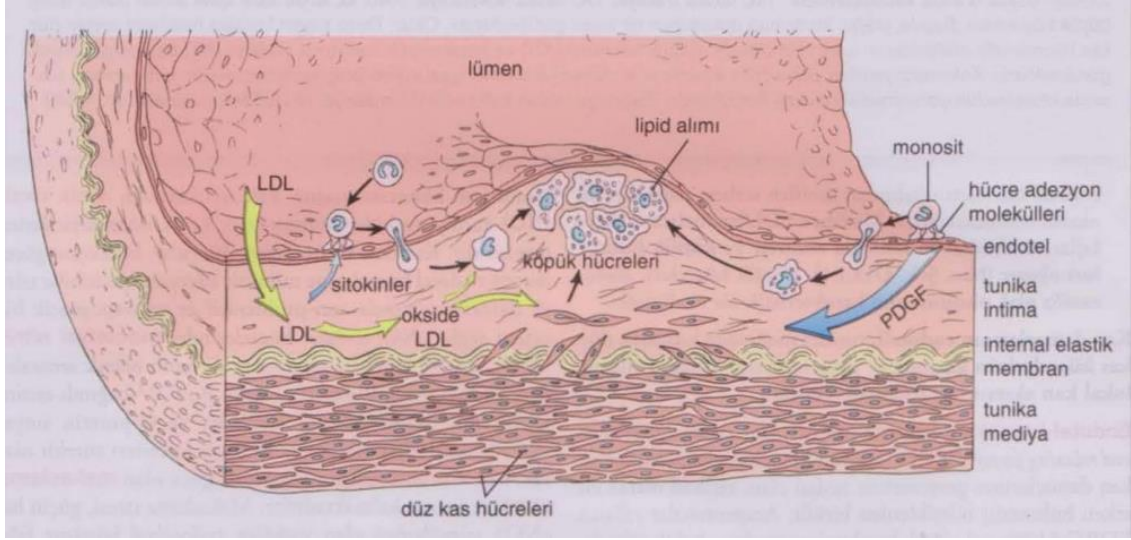
LDL oksidasyonu sonucu oluşan peroksitlerin etkisiyle makrofajlar apoptoza uğrayarak veya nekrozla ölürler ve böylece lipidler serbest kalarak lipid çekirdeğini oluştururlar. Lipid çekirdek çevresinde bulunan makrofaj kümeleri proteolitik enzimlerden olan matriks metalloproteinazlarını (MMP) üreterek lokal enflamasyona yanıtı yükseltir ve bağ dokusunun yıkımında rol alır (Falk E 2006).

Lipid çekirdeğin etrafı düz kas hücrelerinden ve onların ürettiği bağ dokusundan oluşmuş bir fibröz kılıf ile örtülüdür. Fibröz başlık kalın ise stabildir, fakat inceldikçe komplikasyonlara sebep olabilecek yırtılmaya yatkındır.

Hala henüz klinik bir önemi olmayan yağlı çizgiler, aterosklerotik lezyonun başlangıcı olarak köpük hücreleri tarafından oluşturulur. Lezyona girecek olan kandaki LDL miktarı artarsa lezyon ileri komplike evrelere geçecektir (Zengin H, 2012).

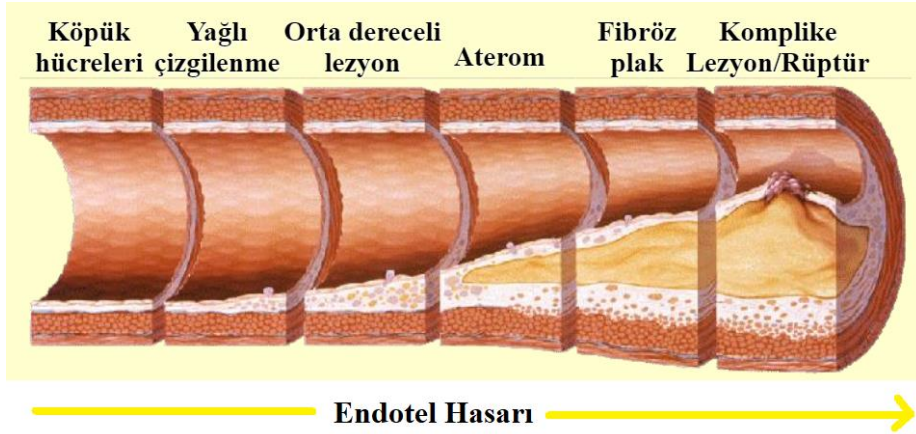
Zamanla risk faktörlerinin iyileşmemesi durumuyla bölgeye düz kas hücrelerinin göçü, çoğalması ve bağ dokusu artışı ile lezyon ileri evrelere geçerek yeniden şekillenip büyür ve fibröz yağlı plak haline gelir. Bu kalın fibröz bağ dokusu tabakasına ateromatöz plak veya fibröz plak denir ve bu lezyon en dış kısımda endotel olmak üzere düz kas hücrelerini, makrofajları, köpük hücrelerini, T lenfositleri, kolesterol kristallerini ve hücre yıkıntılarını içerir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Ayrıca, kemik gibi hem lipid hem de bağ dokusu da kalsifiye olabilir; koroner arterlerdeki kalsifikasyon genelde ateroskleroz sebebiyle oluşur (Falk E 2006).



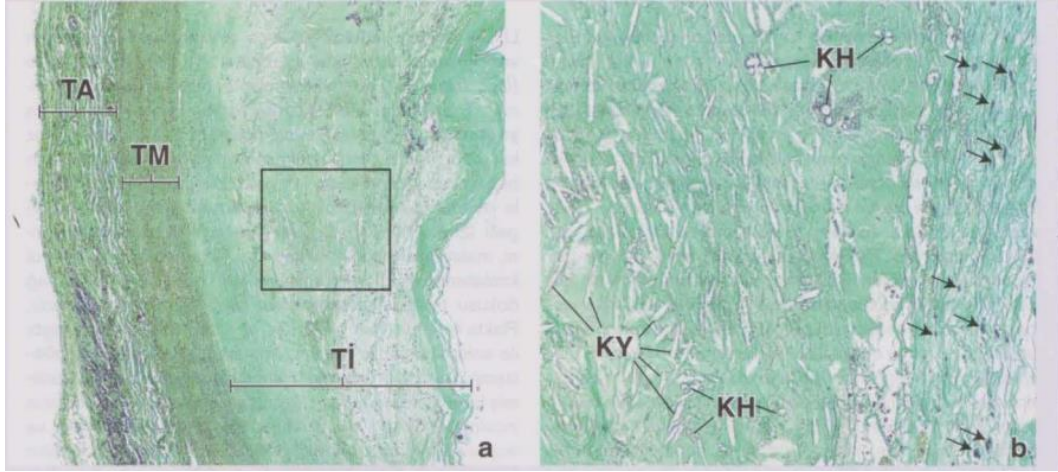
Şekil 2-9: Temel Ateroskleroz Süreci. Ateromatöz plak oluşumunda hücrelerel etkileşimler (Ross MH ve Pawlina W 2014)

Monosit göçünü başlatan adezyon molekülleri endotel hücreleri tarafından eksprese edilirler. Düz kas hücreleri, platelet(trombosit)-kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve endotel hücrelerinden salınan diğer büyüme faktörleri tarafından uyarılarak tunika mediyadan tunika intima'ya göç ederler (Şekil 2-9). Çok sayıda düz kas hücresinin göç etmesiyle birlikte düz kas hücrelerinin tunika intimada çok miktarda proteoglikanlar, kollajen gibi ekstraselüler matriks üretmeleri sebebiyle tunika intima kalınlığı artar (Ross MH ve Pawlina W 2014). Endotel hücreleri, serbest radikalleri üretirler ve bu serbest radikaller tarafından okside edilmiş modifiye LDL'ler endositozla makrofajlar tarafından alınırlar (Şekil 2-9) ve böylece aterom plak oluşumunun karakteristik bir özelliği olan köpük hücreleri oluşur. Şekil 2-10'da gösterilen evrelemede, aterogenezin ileri evresinde köpük hücrelerini içeren fibrotik aterom plaklar oluşmaya başlamaktadır (Ross MH ve Pawlina W 2014; Aydemir, S. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi 2019).



Şekil 2-10: Aterosklerotik plak evreleri (Stary HC ve ark. 1995; Aydemir, S. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi 2019)

Lipid birikimi ve endotel bütünlüğünün kaybına bağlı gelişen aterom plağın evresine göre aterosklerozda, plak ne kadar lipid en zenginse klinik olaylara yol açmaya o kadar meyilli olmaktadır. Şiddetli vakalarda damar duvarı incelmeye bağlı anevrizma gelişmesi görülebilir bu da trombozu (pıhtılaşma) artırarak rüptüre neden olur; zamanla ilerleyen lezyonlarda tunika mediya inceler, ekstrasellüler lipidlerin birikmesiyle ateromda kalsifikasyon ve lezyonda fibröz tabakanın yırtılmasıyla nekroz oluşarak kan stazı (kan akımının durması veya yavaşlaması) ve tromboz (pıhtılaşma) gelişimi ile damarın tıkanması görülebilir (Şekil 2-11). İlk evrelerden plak rüptürü gibi komplike lezyonlara doğru aterosklerozun patofizyolojik sürecinin bu adımları, bazı bireylerde 20'li yaşlarda görülebilmekteyken, çoğu bireylerde 50-60 yaşlarında görülür (Ross MH ve Pawlina W 2014; Van der Wal AC ve Becker AE, 1999; Base de Datos SA 2001).



Şekil 2-11: Bir ateromatöz lezyonun fotomikrografları

- a. Masson Trikom metodu ile boyanmış insan aortası. Bağ dokusu liflerinden, düz kas hücrelerinden, köpük hücreleri (yağ içeren makrofajlar) ve nekrotik materyalden oluşan ve fibröz plak olarak tanımlanan lezyon, tunika intima (Tİ) katmanı gösterilmektedir. Lezyon sebebiyle tunika intima kalınlaşmıştır. TM, tunika mediya; TA, tunika adventisya. X40.
- b. a.'da kare içine alınan alanın daha büyük büyütmesi gösterilmektedir. Oklar ile plağın fibröz bağ dokusunun kollajen liflerini üreten düz kas hücrelerinin nükleusları gösterilmiştir. Köpük hücreleri (KH) ve kolesterolün çözünmesiyle oluşmuş boşluklar olan karakteristik kolesterol yarıkları (KY) da şekilde net olarak görülmektedir. Fibröz plağın geri kalan kısmı ise nekrotik materyal ve lipidden oluşmaktadır X:240 (Ross MH ve Pawlina W 2014).

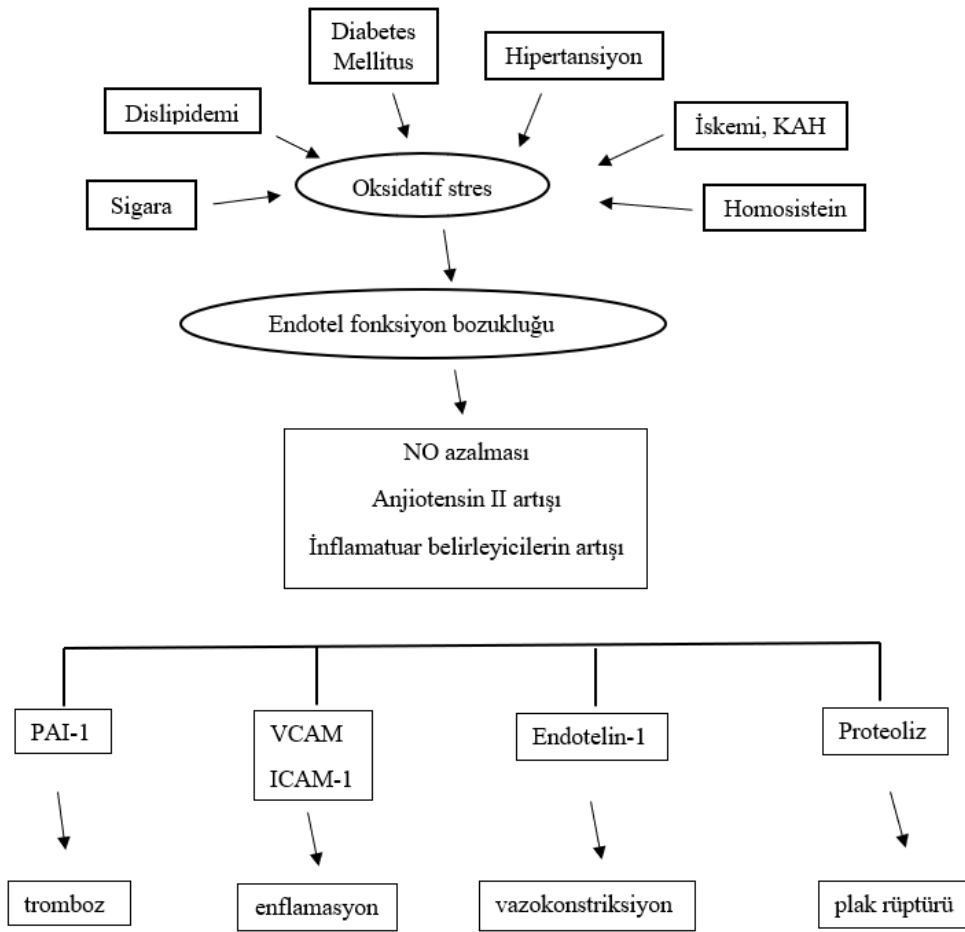
2.2.4. Metabolik Sendrom ve Ateroskleroz İlişkisi

Metabolik sendromun merkezinde olduğu düşünülen ve bir risk faktörü olan abdominal (viseral) obezitenin T2DM ve hipertansiyona etkisinin önemi iyi bilinmektedir (Ritchie SA ve Connell JM 2007; Abbasi F ve ark. 2002). Ancak obezite ve insülin direnci ayrıca kardiyovasküler hastalıkları (KVH) riskinin belirteçlerindendir. Obezite varlığında insülin direnci ve T2DM riski artarken KVH riskinin arttığı da vurgulanması gerekir (Abbasi F ve ark. 2002). Çünkü, metabolik sendrom prevalansının son yıllarda ciddi artışı, ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler hastalık morbidite ve mortalite riskinin artmasına sebep olmuştur (Ritchie SA ve Connell JM 2007; Tune JD ve ark. 2017). Yapılan çalışmalara göre, visceral yağ ve salgılanan adipokinlerin adipozite ile vasküler hastalık arasındaki moleküler ve hücresel mekanizmalarla bağlantılar olduğu yönüne odaklanılmıştır. Adipokinlerin insülin duyarlılığı ve

enflamasyonla ilgili özelliklerin düzenlenmesinde görevli olduğu belirlenmiştir. Kardiyak adipoz (yağ) dokusunun hacmi, obezite ile birlikte arter ve koroner arterlerin çevresinde artmaktadır. Aterosklerotik plakların perivasküler yağ dokusu (PVAT) ile kaplanmış arterlerde meydana gelmeleri sebebiyle buralardan salınan adipokinlerin damarlarda vasküler hasarı ve ateroskleroz gelişimini etkilediği ileri sürülmüştür (Tune JD ve ark. 2017).

Ayrıca bazı çalışmalara göre bir başka odak nokta ise, obezite ve aterosklerozun enflamatuvar etiyolojileri sebebiyle, oksidatif stres üzerinden yapılmıştır. Aterosklerotik süreçlerin tüm adımlarında rol alan bağışıklık hücreleri, hücresel düzeyde endotel ile etkileşerek aterom oluşumunda yer aldığı düşünülmektedir. Bu sebeple, oksidatif streste bir artışla birlikte endotelyal homeostazın düzenleyicisi olan nitrik oksitte (NO) bir azalma ve endotel hasarı gelişir (Ritchie SA ve Connell JM 2007). Fakat halen MetS kaynaklı kardiyometabolik vasküler hastalığın ve visceral obezite ilişkisinin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle yağ dokusu üzerine çalışmalar devam etmektedir (Ritchie SA ve Connell JM 2007; Tune JD ve ark. 2017)

Sonuç olarak, MetS ve risk faktörlerinden biri olan visceral obezite bir pro-enflamatuvar durumdur ve adipokinlerin fizyolojik dengesini değiştirerek insülin direncine, endotel hasarına ve sonunda pro-aterojenik duruma neden olduğu düşünülmektedir (Ritchie SA ve Connell JM 2007).



Şekil 2-12: Metabolik sendrom risk faktörleri ve aterosklerotik sonuçları (Kassi E ve ark. 2011; Savaş Bayar, L. Yüksek lisans tezi, Ankara Üniversitesi 2020)

Şekil 2-12’de şematik olarak gösterildiği gibi ateroskleroz patogenezinde rol oynayan MetS risk faktörlerinden kaynaklı arter duvarında okside LDL’ler sitotoksiktir ve hücrel olarak endotel hasarı oluşturabilir. Endotel hücrelerinde intersellüler adezyon molekül-1 (ICAM-1), vasküler hücre adezyon molekül-1 (VCAM-1) gibi adezyon moleküllerinin üretimi ile aterosklerozun gelişiminde bir diğer etken olan enflamasyon oluşur. Endotel hasarı ile artan anjiotensin II’ nin endotel hücrelerine bağlanır ve güçlü bir vazodilatör (düz kasın gevşemesi) olan NO üretimi azalırken, vazokonstriktör (düz kasın kasılması) ailesinden olan endotelin-1 (ET-1) üretimini artar. NO azalmasıyla birlikte trombozla sonuçlanacak durumun bir risk faktörü olan plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1) artar. Yavaş ve sessizce ilerleyen aterosklerozda, aterom plağın

rüptüre olmasıyla akut koroner sendrom gelişir (Tanrıverdi B ve Savaş Tetik Ş. 2017; Ross MH ve Pawlina W 2014; Tokgözoğlu L, 2009).

2.3. Metabolik Sendrom İçin Deneysel Hayvan Modeli Araştırmaları

İnsanda MetS, hem genetik hem de çevresel faktörlerle multifaktöryel olarak gelişen bir durumdur. Günümüzde yüksek prevalans oranı ile ciddi hastalıklara sebep olabilen MetS için insan metabolizmasını taklit eden uygun deneysel hayvan modellerinin oluşturulması, hastalık patofizyolojisinin değerlendirilmesindeki zorlukların çözülmesi ve bilinmeyen faktörlerin ortaya çıkarılması için oldukça önemlidir (Wong SK ve ark. 2016). Bu sebeple, MetS'in deneysel modelleri, hastalık patogenezinin anlaşılması ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi için değerli araçlardır. Özellikle sıçan ve farelerde oluşturulan hayvan modelleri yaygın kullanılanlar olmakla birlikte tavşan, Yeni Gine kobayı, hamster, koyun gibi diğer deney hayvanlarında da denenmiş birçok deneysel model bulunmaktadır. Ancak halen hiçbir MetS hayvan modeli evrensel olarak kabul edilmemiştir (Gancheva S ve ark. 2015; Wong SK ve ark. 2016). Sıçan, fare gibi kemirgenler gen haritalarının iyi bilinmesi, bir çok mutant soylarının olması, hızlı büyüyüp üreyebilmeleri ve genlerinin kolay modifiye edilmesi sebebiyle araştırmalarda sıklıkla tercih edilmektedir (Gelmez MY ve ark. 2013).

MetS geliştirmek için kullanılan diyet manipülasyonu, genetik modifikasyonu, cerrahi modellemesi ve farmakolojik manipülasyonu (kimyasal ilaçlarla) çeşitli yaklaşımlardan bazılarıdır (Wong SK ve ark. 2016). Bir çevresel faktör olarak yüksek kalori alımına sahip beslenme, insanlarda MetS'in başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edildiği için genellikle diyet ile modeller oluşturulmaktadır (Gancheva S ve ark. 2015).

2.3.1. Diyet manipülasyonu ile oluşturulan MetS hayvan modelleri

Deneysel MetS modelini geliştirebilmek için kullanılan diyetler yüksek miktar karbonhidrat, yağ veya her ikisini birden içerir. Daha önce Panchal ve Brown (2011) tarafından yapılan bir inceleme ile insan MetS'e en yakın kriterleri gösteren sıçan modelinin yüksek karbonhidratlı yüksek yağlı diyet tarafından indüklendiği öne sürülmüştür (Panchal SK ve Brown L 2011; Wong SK ve ark. 2016). Meyve şekeri olarak bilinen fruktoz, model hayvan diyetinde genellikle tercih edilen monosakkarittir. En yaygın kullanılan modellerden biri, birkaç hafta boyunca %10'luk fruktozlu su

verilmesidir (García ME ve ark. 2010; Maiztegui B ve ark. 2009; Castro MC ve ark. 2011). MetS'i indüklemeye glikoz veya nişasta ile beslenmenin, fruktoz ile besleme kadar etkili olmadığı ve fruktozla beslenen farelerin nişasta kullanılarak beslenen farelere kıyasla daha fazla kilo alması gösterilmiştir (Johnson RJ ve ark. 2007; Jürgens H ve ark. 2005). Dolayısıyla, fruktoz hem insanlarda hem de hayvanlarda karbonhidrat yerine yağ gibi davranarak MetS gelişimine neden olduğu belirtilmiştir (Wong SK ve ark. 2016).

Bir diğer yaklaşım ise hayvan yemine farklı yağlar eklenmesidir. Hayvansal yağların, bitkisel yağlara kıyasla MetS gelişiminde daha etkili olduğu gösterilmiştir (Buettner R ve ark. 2006; Buettner R ve ark. 2007). Diyetle oluşturulan deneysel modellerde genellikle domuz yağı veya sığır yağı kullanılmaktadır. Doymuş yağ asitleri bakımından zengin hayvansal yağların ve fruktozun birlikte kullanıldığı karma modeller, MetS ile ilişkili kabul edilmektedir (Panchal SK ve ark. 2011a; Couturier K ve ark. 2010; De Castro UG ve ark. 2013; Panchal SK ve ark. 2011b).

2.3.2. Genetik modifikasyon veya cerrahi yöntem ile oluşturulan MetS hayvan modelleri

Genetik faktörlerin neden olduğu MetS patogenezi incelemek için genetik modifikasyon modellemesi kullanılmaktadır. Genetik indükleme, diyet ile manipülasyona göre MetS gelişimi daha kısadır zamandan tasarruf sağlar fakat maliyet sebebiyle pek tercih edilmemektedir. Genetik modeller arasında db/db (C57BL/KsJ-db/db) fareleri, ob/ob (C57BL/6J-ob/ob) fareleri, Zucker diyabetik yağlı (ZDF) sıçanları ve Otsuka Long-Evans Tokushima yağlı sıçanları yer almaktadır (Wong SK ve ark. 2016). Modellemeler, araştırmacılara MetS ve ilişkili hastalıkların gelişiminde rol alan spesifik moleküler mekanizmalar hakkında bilgi açısından yararlı olsa da insanlarda görülen metabolik sendrom kemirgenlerdeki gibi monogenik bir bozukluk değildir. Örneğin, birçok hayvan modelinde olan leptin geni ve/veya reseptör gen mutasyonları mevcutken, insanda çok nadir görülen resesif genetik değişimler mevcuttur. Bu sebeple, transgenik hayvanların insanlardaki hastalıkları taklit edip edemediğini ve metabolik hastalığın özelliklerini tam yansıtmadığını belirlemek gerekir (Gelmez MY ve ark. 2013; Zhou X ve ark. 2014).

Cerrahi yöntemlerle geliştirilen MetS'te ise hayvanların pankreasının bir kısmı veya tamamı alınmaktadır (Zhou X ve ark. 2014). Böylece T1DM (Tip 1 diabetes mellitus) ve T2DM (Tip 2 diabetes mellitus) diyabet modeli oluşturulur.

2.3.3. Farmakolojik manipölasyon ile oluşturulan MetS hayvan modelleri

Diyabet modeli oluşturmada kullanılan en yaygın ajan streptozotosin (STZ)'dir. Uzun süre yüksek yağlı bir diyetle birlikte düşük doz STZ uygulanarak oluşturulan MetS modelinde yapılan bir çalışmada (Li L ve ark. 2015), tek başına uzun süre yağlı diyetin karşılaştırılması yapılarak STZ uygulanmasının daha hızlı patofizyolojik bir ilerlemeyle MetS geliştiği gösterilmiştir.

Adrenal bezler tarafından salgılanarak doğal olarak oluşan stres hormonu endojen glukokortikoidler ise hayvan modellerinde bir diğer yaygın kullanılan kimyasal ajandır. Glukokortikoidler, dokuların reseptörlerine bağlanarak doğrudan etkilerini gösterirler. Kanseri, otoimmün hastalık gibi çeşitli hastalıklarda ilaç olarak kullanılan ekzojen glukokortikoidler, organ nakillerinde doku reddini önlemek için de kullanılır. Fakat, bu ajanın kullanılması ile glukoz intoleransı, vücut ağırlığı artışı, osteoporoz, bozulmuş kalsiyum homeostazi, merkezi sinir sistemi bozuklukları, ve katarakt gibi yan etkiler meydana gelmektedir. Bu sebeple MetS modeli geliştirmek için hem ekzojen hem endojen glukokortikoidler kullanılır. Glukokortikoidler uygulama yolu, besleme, günlük intraperitoneal enjeksiyonlar veya cerrahi olarak implante edilmiş glukokortikoid peletleri olarak hangisi olursa olsun benzer sonuçlar gözlenir. Hayvanlarda karaciğer ve iskelet kas dokularında lipid birikimleri, karın yağı birikimleri, açlık hiperglisemisini, insülin direnci, dislipidemi, hipertansiyon bulguları glukokortikoid uygulamasıyla gözlenirken, bu farmakolojik manipölasyonun ortadan kaldırılması tüm bu olumsuz koşulları tersine çevirmektedir (Wong SK ve ark. 2016).

Bu çalışmada ise diyet manipölasyonu ile MetS modeli oluşturulmuştur. Günümüzde insanlar, yüksek konsantrasyonlarda sakkaroz içeren yiyecek-ışecekler ile genellikle doymuş yağ asitleri bakımından yüksek olan kırmızı eti yaygın olarak tüketerek çok daha karmaşık olan insan beslenme tipine en benzer olan yüksek fruktoz ve yüksek yağlı beslenme rejimi ile model hayvan modelinin kullanılması tercih edildi. Bu diyet ile sıçanlarda insanlarda olduğu gibi obezite, bozulmuş glikoz toleransı, dislipidemi,

hiperglisemi, T2DM'ye yatkınlık oluşturulması hedeflendi. Dolayısıyla, bu hayvan modeli ile metabolik hastalığın oluşumu, gelişimi ve sonuçları sistematik olarak gözlemlenebilmektedir (Zhou X ve ark. 2014).

Sonuç olarak, MetS'i incelemek için hayvan modellerini kullanmanın avantajı oldukça fazladır. MetS'in insanlarda gerçekleştirilmesi zor olan histolojik, fonksiyonel, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin izlenmesi hayvan modellemeleriyle kolaylaşmaktadır. İstenen metabolik değişikliklere sahip bir MetS hayvan modelinin başarılı bir şekilde geliştirilmesi için mevcut yerleşik yöntemlerin kombinasyonu veya modifikasyonu kullanılarak MetS patogenezi daha iyi anlaşılabilir. Deneysel araştırmalarda, insan MetS'i ile patofizyolojik benzerliğin yanı sıra, bir hayvan modeli oluşturulması aynı zamanda tekrarlanabilir, basit, güvenilir ve minimum dezavantajlarla uygun maliyetli olması sebebiyle tercih edilmektedir (Wong SK ve ark. 2016).

2.4. Vitamin D

2.4.1. Tanımı

Kolekalsiferol (D3 vitamini) ve ergokalsiferol (D2 vitamini) hormonlarının ortak adı olan D vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde görev alır (Kulda V 2012). Yağda çözünebilen bir hormon olan D3 vitamini, kolesterol kökenli olup balık, kırmızı et, süt, yumurta gibi hayvansansal besinlerde bulunurken vitamin D2 bitki ve mantarlardan elde edilir. Günlük vitamin D ihtiyacının bir kısmı bu besinlerden karşılanırken temel vitamin D kaynağı cildin üst epidermisinde yer alan 7-dehidrokolestrolün güneşe maruz kaldıktan sonra fotokimyasal tepkime ile kolekalsiferole (Vit D3) sentezi ile karşılanır (Laird E ve ark. 2010). Vit D3, UVB etkisi ile deride sentezlendikten sonra karaciğerde 25. pozisyonunda hidrolize edilir (Kalsidiol, [25(OH)D], 25-OH Vitamin D, 25-Hidroksi kolekalsiferol) ve daha sonra böbreklerde aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D'e (Kalsitrol, [1,25(OH)2D]) dönüştürülür (Di Rosa M ve ark. 2013). Ardından neredeyse tüm dokularda eksprese edilen vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak birçok transkripsiyon faktörünü aktive eder. Önerilen optimal D vitamini alımı yaşa bağlı olmakla birlikte ilk 1 yaşına kadar çocukların günde 400 IU'ya, 1-50 yaş arası kişilerin günde 200 IU (international unit)'ya, 51-70 yaş arasındaki kişilerin günde 400 IU'ya ve 70 yaşın üzerindeki kişilerin ise günde 600 IU'ya ihtiyacı vardır (Di Rosa M ve ark. 2013).

25-OH Vitamin D serum düzeyleri, D vitamini eksikliğini değerlendirmek için bir göstergedir. Düşük vitamin D durumu enflamatuar bir durum olarak kabul edilen osteoporozun patogenezinde rol oynadığı gibi raşitizme de yol açabilir. Epimediyojik verilere göre ise, romatoid artrit, tüberküloz, enflamatuar bağırsak hastalıkları, multipl skleroz, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve spesifik kanser tiplerinde düşük vitamin D durumları görülmektedir. Ayrıca vitamin D takviyesi ile hipertansiyonlu hastalarda kan basıncının düştüğü, diyabet hastalarında glukoz seviyelerinin iyileştiği ve romatoid artrit ve multipl skleroz semptomlarının iyileştiği gözlemlenmiştir (Zittermann A. 2003; Laird E ve ark. 2010).

2.4.2. Metabolik Sendrom ve Aterosklerozda Vitamin D Çalışmaları

Obezitenin artmasıyla MetS, T2DM, ateroskleroza bağlı kardiyovasküler hastalıkların gelişim riski de beraberinde artmaktadır. Çok sayıda çalışma D vitamini eksikliğinin MetS patogenezinde görevli olduğunu ileri sürmüştür (Zuk A ve ark. 2016; Cheng S ve ark. 2010; Palomer X ve ark. 2008; Wieder-Huszla S ve ark. 2019). Bir çalışmaya göre (Wieder-Huszla S ve ark. 2019), abdominal obezitesi olan kadınlarda D vitamini eksikliği gözlenmiştir. Dolayısıyla, bel çevresi temelinde teşhis edilen obezite için önemli bir tanı kriteridir (riskli bel çevresi > 80 cm) (Mansouri M ve ark. 2019; Wieder-Huszla S ve ark. 2019). MetS için tanı kriterlerinden biri olan obezite insülin direnci gelişiminin ana faktörüdür. Yağ dokusu ve başka dokularda da üretilen pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar sitokinler arasında dengenin bozulması ile visceral yağ dokusunda kronik bir enflamasyon meydana gelir. Obez kişilerde insülin direnci ve diğer MetS faktörlerinin gelişimi, D vitamini eksikliği ile ilişkilidir. Aşırı kilolu ve obez bireylerde görülen vitamin D eksikliği yağ dokusunda vitamin D3'ün tutulması sebebiyle biyoyararlanımın sınırlı olmasından kaynaklanır, bireyin ne kadar fazla miktarda yağ dokusu varsa o kadar fazla vitamin D eksikliğine sahip olduğu belirlenmiştir (Wieder-Huszla S ve ark. 2019).

Bağışıklık ve metabolik sistemlerin düzgün çalışmasını engelleyerek kronik enflamasyona yol açan obezitede ve enflamatuar bir hastalık olan aterosklerozda, interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) pro-enflamatuar sitokinler tarafından düzenlenen serum C-reaktif protein (CRP) seviyesindeki artış önemli bir göstergedir. Çalışmalara göre, IL-6'nın ateroskleroza hızlandırdığı ve in vitro olarak kalsitriolün [1,25(OH)₂D] TNF- α ve IL-6 salgılanmasını doza bağlı olarak baskıladığı

gözlemlenerek, TNF- α ve 25(OH) Vitamin D serum düzeyleri arasında ters bir ilişki bulunmuştur (Zittermann A. 2003).

Ayrıca güneş gören bölgelerle yapılan çalışmalarda, fotokimyasal kaynağının patofizyolojik yollar ile ilgili süreçleri düzenleyen epigenomik mekanizmaları modüle ederek olumlu sağlık etkilerine sahip oldukları bildirilmiştir (Bullón-Vela V ve ark. 2020; Ramzan F ve ark. 2021). Bu nedenle takviye olarak diyetle vitamin D alımları veya deride Vit D3 sentezi, epigenetik mekanizmalarla (DNA metilasyonu, miRNA ifadesi ve histon modifikasyonları) gen ifadesi düzenlemesinde rol oynayarak enflamasyon, obezite, glikoz intoleransı gibi MetS patofizyolojisinde yer alan süreçleri iyileştirmesiyle metabolik homeostazın sağlanması açısından önemlidir (Ramzan F ve ark. 2021).

2.5. Mikro RNA'lar

2.5.1. Tanımı

DNA dizisinde değişiklik olmadan gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal modifikasyonlar olan epigenetik düzenlemeler, özellikle mikroRNA'ları (miRNA) içeren kodlamayan RNA'lar, DNA metilasyonu/asetilasyonu, kromotin modifikasyonları gibi çeşitli mekanizmalar ile birlikte etkisini göstermektedir. Kodlama yapmayan ~22 nükleotid (nt) uzunluğunda olan ve ökaryotlarda gen ve protein ifadesi düzenleyicisi olan miRNA'lar, transkripsiyon sonrasında translasyonun baskılanmasına veya mRNA'nın yıkılmasına neden olmaktadır (Hitit M ve ark. 2015; Ulsan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Bartel DP 2004).

siRNA (küçük interferans RNA) ve piRNA (piwi etkileşimli RNA) gibi küçük RNA'lardan oluşan RNA interferans (RNAi) mekanizması aracılığı ile gen ifadesi düzenlenmesi gerçekleşmektedir. RNAi mekanizması, transkripsiyon sonrası gen ifadesi düzenlenmesinde kullanılan ve çift sarmallı RNA'nın tamamlayıcı mRNA zincirinde gen susturmasının indüklendiği bir süreçtir (Hitit M ve ark. 2015; Ulsan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Han H 2018).

Diğer hayvan ve bitki türleri ile tek hücreli canlılarda da miRNA'lar keşfedilmiştir. İnsan genomunda binlerce miRNA geni vardır ve her birinin yüzlerce hedef genlerinin hücre gelişimi, hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu, DNA onarımı, insulin sekresyonu, yaşlanma, metabolizma, apoptoz yolları gibi canlıların yaşamıyla ilgili

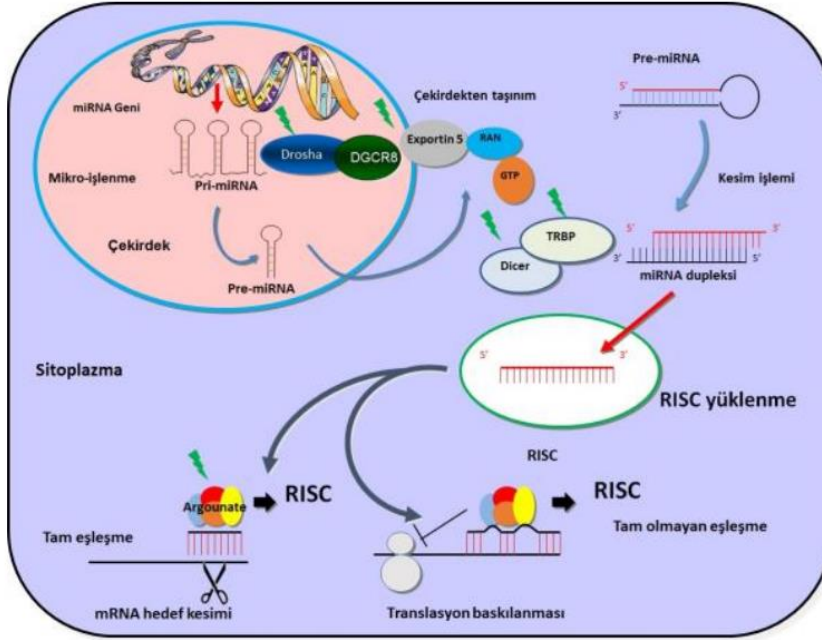
fonksiyonlarda düzenleyicileri olduğu tahmin edilmektedir. Değişmiş miRNA ifadeleri ise metabolik, kanser, enfeksiyon ve nörodejeneratif hastalıklara kadar bir çok hastalıkla ilişkili patogeneze yer alır (Hitit M ve ark. 2015; Ulsan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Ramzan F ve ark. 2021; Karabulut S ve ark. 2018).

2.5.2. Biyogenezi

Fizyolojik süreçler ve hastalıkların fizyopatolojisinde, epigenetik etkilerin moleküler seviyelerde anlaşılabilmesi için miRNA biyogenezinin önemi büyüktür (Hitit M ve ark. 2015). Zamansal ve mekansal kontrol altında olan miRNA'ların biyogenezindeki değişiklikler kanser, metabolik ve nörogelişimsel bozukluklar, enfeksiyon gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Ha M ve Kim VN 2014; Hitit M ve ark. 2015; Ulsan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Ramzan F ve ark. 2021; Karabulut S ve ark. 2018). miRNA biyogenezi kanonik ve kanonik olmayan yollar olarak 2 şekilde sınıflandırılır. Kanonik biyogenez yolu, miRNA'ların işlendiği esas yoldur ve kanonik olmayan yol ise RNA polimeraz III enzimlerinden (drosha, dicer) bağımsız olarak kanonik yolda bulunan proteinlerin farklı kombinasyonlarını kullanır (O'Brien J ve ark. 2018; Ha M ve Kim VN 2014).

Kanonik biyogenez yolunda öncelikle, nükleusta miRNA geninden RNA polimeraz II (RNAaz II) tarafından transkripsiyonu başlar ve saçtokası yapısında primer miRNA (pri-miRNA) sentezlenir. RNA polimeraz III (RNAaz III) enzimi olan Drosha ve onun kofaktörü DGRCR8'den oluşan bir protein kompleksi ile pri-miRNA, prekürsör miRNA (pre-miRNA)'ya dönüşür. Pre-miRNA, eksportin-5 adlı taşıyıcı protein ile sitoplazmaya geçer ve burada diğer bir RNAaz III enzimi olan endonükleaza (dicer) bağlanır. Dicer, ~22 nükleotid uzunluğundaki pre-miRNA'yı keser ve çift iplikli olgun mi-RNA oluşur. Ayrıca dicer tarafından RNA- indüklenmiş susturma kompleksi (RISC) oluşumu başlamış olur. Olgun miRNA'nın çift ipliklerinden biri yıkılır, diğeri RISC ile birleşerek Argonaute'a yüklenir. Tek iplikli miRNA, RISC tarafından yönlendirilerek çoğunlukla hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanır ve tam eşleşme durumunda mRNA'nın yıkılması veya tam eşleşmeme durumunda translasyonun baskılanmasına neden olur. mRNA'da sadece 3'-UTR bölgesine değil, 5'-UTR bölgesine, kodlanan bölgeye veya promotor bölgesine bağlanarak gen ifadesini düzenleyebilmektedir (Hitit M ve ark. 2015; Ulsan Bağcı Ö ve Caner A 2020). Olgun miRNA'lar sadece hücre

içinde kalmayıp hücre dışı sıvılara salgılanarak eksozomlar gibi veziküler cisimlerle kan dolaşımına geçerek gen ifadelerini endokrin bir şekilde düzenlerler, ayrıca birçok biyolojik sıvıda da bulunabilirler (Uluslan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Ramzan F ve ark. 2021).



Şekil 2-13: miRNA biyogenezi (Hitit M ve ark. 2015)

2.5.3. Metabolik Sendrom ve Aterosklerozda miRNA Araştırmaları

RNAi mekanizması ile spesifik miRNA'ları aşırı eksprese ederek veya susturarak miRNA'nın ve hedef genlerinin işleyişini ve fonksiyonlarını araştıran çalışmalar devam etmektedir (Vidigal JA ve ark. 2015, Silveira A ve ark. 2022; Schober A ve ark. 2022). Son yıllarda, miRNA'ların kan dolaşımında ve birçok hücre dışı sıvıda bulunabilmesi sayesinde, hastalıkların tanısında ve prognoz tayininde kullanılabilecek invaziv olmayan biyobelirteçler ile ilgili çalışmalara öncelik verilmektedir (Uluslan Bağcı Ö ve Caner A 2020; Feinberg MW ve ark. 2016, Silveira A ve ark. 2022; Arner P ve Kulyté A 2015). Ayrıca, klasik olan miRNA epigenetik mekanizmasının disregülasyonuna ilişkin çalışmalarla MetS gibi multifaktöriyel hastalıkların patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması sağlanması amaçlanmaktadır; henüz epigenetik işaretlerin MetS gelişimi ve ilerlemesindeki rolü halen net değildir (Ramzan F ve ark. 2021).

İnsan sağlığında önemli bir rolü olan diyet ve beslenme de dahil olmak üzere çevresel faktörlerin epigenetik modifikasyonlar yoluyla metabolik süreçlere etki ettiği bilinmektedir (Ramzan F ve ark. 2021; Ramos-Lopez O ve ark. 2020). miRNA'larla

etkileşime girebilen diyet faktörleri, bu sayede gen ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayarak hastalık fenotiplerinin önlenmesi veya ilerlemesiyle ilişkili hücrel fenotipleri kontrol ederler. Yüksek yağlı diyet hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda, lipid metabolizması, aterosjenik mekanizmalar, yağ dokusu iltihabı, enflamatuar gen regülasyonu ve adipogenez gibi MetS'in patogeneziyle ilişkili miRNA ifadelerinin değişimleri gösterilmiştir (Ramzan F ve ark. 2021, Silveira A ve ark. 2022; Arner P ve Kulyté A 2015; Ortega FJ ve ark. 2013).

Son yıllarda miRNA'ların hücrel adezyon, proliferasyon, lipid alımı gibi patofizyolojik durumların düzenleyicisi olarak ortaya çıkması ve enflamatuar mediatörlerin üretilmesiyle kronik bir enflamatuar hastalık olan aterosklerozda bu moleküler sinyal yollarının üzerindeki etkileri daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Aterosklerotik lezyon oluşumunda ve ilerlemesinde kritik yönlerin düzenlenmesinde miRNA'ların rolünün önemi büyüktür (Feinberg MW ve ark. 2016).

Enflamatuar belirteçleri hedef aldığı tahmin edilmekte olan miR-1, miR-19a, miR-21, miR-27a, miR-33, miR-124, miR-125a, miR-146a, miR-155, miR-187, miR-199a, miR-214, miR-223 gibi miRNA'ların çok azı ateroskleroz açısından araştırılmıştır. Bu tez çalışmasında seçilen miR-146a ve miR-21'in ve hedef genlerinin MetS ve beraberinde aterosklerotik süreçte ifadeleri daha önceki çalışmalarda araştırılmış olup ifadesi arttırılan miRNA'ların aterosklerozla ilişkili olduğu gösterilmiştir. (Ramos-Lopez O ve ark. 2020; Feinberg MW ve ark. 2016; Raitoharju E ve ark. 2011).

Endotel hücrelerinde pro-enflamatuar veya anti-enflamatuar sinyal yollarının dengesini değiştiren spesifik hedeflerin düzenlenmesinde miRNA'ların rolü bulunmaktadır. TNF- α gibi biyokimyasal uyarılara yanıt olarak, endotelde miR146a ifadesinin artmakta olup bu miRNA'nın endotel damar duvarında bulunan TNF- α ve IL-1 β gibi sitokinlere duyarlı bir miRNA olduğu belirlenmiştir (Feinberg MW ve ark. 2016; Schober A ve ark. 2022). miR-146a ifadesinin insan ve kemirgenlerde aterosklerotik plaklarında artmış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Raitoharju E ve ark. 2011; Feinberg MW ve ark. 2016). Ayrıca, anti-enflamatuar olan miR-146a obezitede yağ dokularında ifadesi azaldığı gösterilmiştir (Ramos-Lopez O ve ark. 2020).

Düz kas hücresinin düzenlenmesinde rol alan miR-21 ise vasküler yaralanma çalışmalarında düz kas hücresi proliferasyonunu artırıcı role sahip oynasa da, aterosklerotik lezyon oluşumundaki görevi henüz net değildir ve aterosklerotik

ilerlemeyi azaltıp azaltmadığını değerlendirebilmek için daha fazla çalışılması gerektiği belirtilmektedir (Feinberg MW ve ark. 2016). Ayrıca, miR-21'in azalmış ifadesinin obezitede artmış enflamatuvar sitokin üretimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ramos-Lopez O ve ark. 2020).

Bu tez çalışmasında, mevcut literatür bilgilere göre seçilen miR-21 ve miR146a'nın MetS modeli sıçan gruplarının aort dokularındaki ifade düzeylerine Vit D'nin etkisi araştırıldı.

2.5.4. Aort Dokusunda Araştırılmak Üzere Seçilen Proteinler

Bu tez çalışmasında, MetS sıçan modelinde, Vitamin D'nin (VitD) ateroskleroz gelişim sürecinde aort doku morfolojisine ve endotel hasarı üzerine etkisi, aşağıda bahsedilen proteinlerin immünohistokimyasal olarak belirlenen seviyeleri ile araştırıldı.

Aort doku kesitlerinde incelenmek üzere seçilen alfa düz kas aktin (α -SMA), vasküler düz kas hücrelerinden eksprese edilir ve fibrojenizde rol oynar. *ACTA2* geni tarafından kodlanır. Sağlıklı bir arterde de düz kas hücreleri bulunur ve mediyadaki tek hücrelerdir ve genellikle kasılma fenotipindedirler. Bu hücreler, α -SMA gibi çeşitli kasılmayı sağlayan proteinleri eksprese ederler. Aterogenez sırasında ise, düz kas hücreleri damar duvarında çoğalarak birikmektedir (Milutinović A ve ark. 2020). Bu sebeple α -SMA incelemesi, gruplar arasında hücre yoğunluklarını belirleyerek aterogenez sürecini gözlemlemek amacıyla araştırmaya dahil edildi.

İmmünohistokimyasal olarak araştırılan diğer bir protein olan p16 ($p16^{INK4a}$), hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol oynayarak hücre bölünmesini yavaşlatan ve vasküler yaşlanma (*senesens*) ile ilişkili olan bir tümör baskılayıcı proteindir. *CDKN2A* geni tarafından kodlanır, bu gendeki bir delesyon ile hücre bölünmesi hızlanarak bir çok kanser türüne neden olabilmektedir (Nobori T ve ark. 1994; Stone S ve ark. 1995). Yaşlanma, MetS için risk faktörleri arasındadır (Bonomini F ve ark. 2015). p16'nın DNA hasarı veya senesens yoluyla aktivasyonu dokularda p16 birikmesine yol açar ve hücrelerin yaşlanmasına neden olur (Rayess H ve ark. 2012). Aort dokusunda aterogenezde yaşlanma sürecinin gözlenmesi amacıyla bu tez çalışması kapsamına dahil edilerek incelendi.

Karaciğer, kas ve yağ dokusunda gerçekleşen lipid, kolesterol ve glikoz metabolizmasını düzenlemekten sorumlu (Fryer LG ve ark. 2002; Saha AK ve ark. 2004; LeBrasseur NK ve ark. 2006) olan 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive

edilmiş protein kinaz (AMPK), ayrıca hücre enerji dengesinin maksimum şekilde dengede tutulmasını sağlar. AMPK obezite, enflamasyon, diyabet gibi metabolik hastalıklarda düzensiz olarak çalışmaktadır (Kismiroglu C ve ark. 2020). İnsülin direnci, diyabet ve kanser gibi kronik hastalıklar için aşırı beslenme ve obezite risk faktörlerindendir. Ana besin kaynaklarından olan glikoz, yağ asitleri ve amino asitlerin birikmesi AMPK'yı baskılayarak insülin direncine neden olur (Coughlan KA ve ark. 2013; Kismiroglu C ve ark. 2020). AMPK aktivasyonunun aterosklerozun ana nedenlerinden biri olan enflamasyonu azalttığı ve buna bağlı olarak ateroskleroz gelişimini belirgin şekilde azalttığı belirlenmiştir (Ou H ve ark. 2018; Ma A ve ark. 2017; Weng SY ve Schuppan D. 2013; Mounier R ve ark. 2013). Bu çalışmada, enerji hemoastazında rol alan AMPK enziminin aktif altüniteleri olan alfa1/alfa2 proteini immünohistokimyasal olarak incelendi.

miR21'in hedef genlerinden biri olduğu bilinen (Nagao Y ve ark. 2012; Hu J ve ark. 2016) ve metalloproteinaz inhibitör olan TIMP3 (Tissue inhibitors of Metalloproteinases 3), hücre dışı alandaki proteinlerle etkileşime girmektedir. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ve TIMP'ler arasındaki denge bozulursa fibroze, matriks proteinlerinin fazla birikmesine veya hücre dışı matris dejenerasyonuna neden olabilir (Takawale A ve ark. 2015; Fan D ve ark. 2020). TIMP3 mRNA, çok sayıda mikroRNA için bir hedef olan uzun bir 3' çevrilmeyen bölgeye (UTR) sahiptir. miRNA'lar TIMP3'e bağlanır ve ekspresyonunu azaltır. Çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda TIMP3 düzeyleri azalır ve TIMP3 artışı hastalığı iyileştirirerek kardiyovasküler hastalıkların TIMP3 için terapötik bir potansiyel olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (Fan D ve ark. 2020; Takawale A ve ark. 2017). TIMP3'ün T2DM'li hastalardan alınan karotis aterosklerotik plaklarda azaldığı belirlenmiştir (Cardellini M ve ark. 2009). TIMP3 eksikliği, ApoE-nakavt farelerinde enflamasyonu arttırmakta ve aterosklerozun ciddileşmesine sebep olmaktadır (Stöhr R ve ark. 2014). TIMP3'ün makrofajlarda aşırı ifadesinde ateroskleroz ilerleyişi azalmaktadır (Casagrande V ve ark. 2012). Ayrıca, başka bir çalışmada, TIMP3'ün endotel hasarında, düz kas hücresi aktivasyonu ve ateroskleroz gelişimi üzerindeki inhibitör etkilerine aracılık ettiği bildirilmiştir (Son D ve ark. 2017). Bu çalışmada, yüksek yağlı yüksek fruktozlu beslenmenin aterogeneze sürecine etkisi TIMP3 proteinin ifadesi üzerinden incelendi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan deney hayvanları

İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Mehmet Akif Ersoy Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Deneysel Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nde (İDEA) inbred üretilmiş 32 adet 10-12 haftalık erkek Sprague Dawley sıçan ile MetS modeli “Diyete Bağlı Endotel Hasarı Oluşturulan Ratlarda RANKL/OPG Sinyal Yolağı Aktiviteleri” başlıklı TYL-2019-32715 proje kapsamında daha önce oluşturuldu. Bu tez çalışmasında kullanılan aort dokuları için Deneysel Araştırma ve Geliştirme Merkezi (İDEA) Etik Kurulundan onay alındı (21.02.2020- 2022/02).

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar Tablo 3-1’de verilmektedir.

Tablo 3-1: Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar

Hayvan deneyinde kullanılan kimyasallar	Markası
Vitamin D	Devit-3 300.000 IU/ml I.M/ORAL Ampul, Deva İlaç
D-(-)-Fruktoz	Merck
Ksilazin	Basilazin %2, Bavet İlaç
Ketamin	Ketax
Formaldehit	EMBOY
%10 formol salin	Manuel hazırlandı
İzotonik NaCl çözeltisi	Polifarma

Moleküler tekniklerde kullanılan kimyasallar Tablo 3-2’de verilmektedir.

Tablo 3-2: Moleküler tekniklerde kullanılan kimyasallar

Moleküler tekniklerde kullanılan kimyasallar	Markası
DEPC (Dietyl Pirokarbonat)	Sigma
%100 isopropanol	Sigma
Kloroform	Merck
Ethanol Absolute Gr For Analysis, 2.5lt	Merck
TRIzol™ Reagent 100 mL	Thermo Fisher
LightCycler® 480 Probes Master	Roche
RNaz ZAP	Sigma

İmmunohistokimyada kullanılan kimyasallar Tablo 3-3’de verilmektedir.

Tablo 3-3: İmmunohistokimyada kullanılan kimyasallar

İmmunohistokimyada kullanılan kimyasallar	Markası
Ethanol Absolute Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Toluen Gr For Analysis, 2,5 lt	Merck
Fosfat Tamponu (PBS Tablet)	MPBio
Sitrat Tamponu (pH:6)	Bio optica 15-M103
Antibody Diluent, 100ml	Zytomed ZUC025-100
Hematoksilen	Mayer’s
Eosin	
Asit alkol	Manuel Hazırlandı
%3 H ₂ O ₂ Çözeltisi	Manuel Hazırlandı
Entellan	Merck

3.1.3. Kullanılan kitler

- Thermo Fisher TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit 200 rx 4366596 kullanılarak cDNA sentezi yapıldı. Seçilen miRNA’ların ifade düzeylerinin kantitatif RT-PZR yöntemi ile belirlemek için TaqMan® MicroRNA Assayler kullanıldı.
- İmmunohistokimya tekniğinde Thermo Scientific UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (RTU) Ref:TP-125-HL 00-2007 Invitrogen Corporation (UK) AEC (red) Substrate Kit (Aminoethyl Carbazole Substrate Kit) kit kullanıldı.
- Atom Scientific LTD. Masson Trichrome Stain Kit (Methyl Blue) Code: RRSK20-2010 kit kullanılarak Masson boyamalar yapıldı.
- Von Kossa boyamada ise Atom Scientific LTD. Von Kossa Stain Kit Code: RRSK38-100 kit kullanıldı.

3.1.4 Kullanılan cihazlar ve sarf malzemeler

Bu tez çalışması kapsamında kullanılan cihazlar Tablo 3-4’de verilmektedir ve kullanılan sarf malzemeler Tablo 3-5’ de verilmektedir.

Tablo 3-4: Kullanılan cihazlar

Kullanılan cihazlar	Markası/Modeli
Bilgisayarlar	Philips
Mikropipetler	Eppendorf
Buzdolapları ve derin dondurucular (+4 °C, -20 °C, -80 °C)	Bosh, Uğur, Thermo
Steril kabin (Sınıf II)	Özkaraçelik, KRB 96
Homojenizasyon aleti	IKA, T 10 Ultra-Turrax
Otoklav, etüv	Elektro-Mag M420B
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific™
Mini santrifüj	Eppendorf
Spectrofotometre (NanoDrop 2000)	Thermo Scientific™
PZR cihazı	Techne 412, BioRad
LightCycler® 480	Roche Diagnostic
Hassas terazi	Shimadzu
Vortex	Elektro-Mag M16
Buz cihazı	Cornelius
Mikrotom cihazı	Reichert 390965
Mikrodalga fırın	Beko 1550
Işık mikroskobu	Leica (DM 2500)
Distile su sistemi	Millipore Elix3
Glukometre ve glucostix	IME-DC
Deri kumpası	BZ-Tech

Tablo 3-5: Kullanılan sarf malzemeler

Kullanılan sarf malzemeler
Filtreli pipet uçları
1,5 ml santrifüj tüpleri/ 0,2 ml PZR tüpleri
96 Well Plate ve sealing film
Kan tüpleri, EDTA’lı tüp
İnsülin enjektörü
İdrar analiz stripleri
Lamel 24x60
Pozitif Yüklü Lam (72’li Kutu)
Şale, beher
Termometre
Mikrotom Bıçağı
İmmunohistokimya boyama kabı

3.2. Yöntem

3.2.1. Deneyisel Hayvan Modelinin Oluşturulması

Bu çalışmada endotel hasarı ve erken evre ateroskleroz gelişimini oluşturmak için metabolik sendrom (MetS) modeli özel diyet ile sağlandı. 10-12 haftalık Sprague Dawley erkek sıçanlar 50*30*30 cm kafeslere 3'er-4'erli olmak üzere yerleştirildi. Sıçanlar 21 derecede, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde zaman periyoduna uygun olarak tutuldu. Deney başlangıcında tüm gruplardaki hayvanların açlık kan şekeri ölçümü glukoz ölçüm (glucometer) cihazı ile yapıldı. Deney hayvanları öncelikle: Metabolik sendrom (MetS ve MetSD) ve sağlıklı (SK ve SKD) gruplar olarak rastgele iki ana gruba ayrıldı. Sonra VitD uygulanan (SKD ve MetSD) ve uygulanmayan (SK ve MetS) şeklinde 4 deney grubu oluşturuldu ve 15 hafta takip edildi. Sıçanlar 26-28 haftalık olduklarında deney sonlandırıldı. Tüm deney gruplarının takiplerine başlandığında, takibin 3. haftasında Vitamin D uygulaması öncesinde ve 15. haftanın sonunda disseksiyon öncesinde sedasyon altındaki sıçanlarda açlık kan glukozu ölçümleri yapıldı. Ayrıca tüm sıçanların haftalık ağırlıkları, bel ve deri kalınlık ölçümleri yapıldı.

Kontrol gruplarındaki sıçanlar (SK ve SKD) standart diyet ve çeşme suyu ile beslendi. MetS gruplarındaki (MetS ve MetSD) sıçanlar, %20'lik fruktozlu su ve %17 yağ - %17 fruktoz içeren yemlerden tüketmeleri sağlandı (Gancheva S ve ark. 2015). SKD ve MetSD gruptaki sıçanlara 12 hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere vitamin D (170 IU/ hafta, oral) (Elseweidy ve ark. 2017) uygulaması yapıldı.

Deney gruplarının ayrıntılı açıklaması aşağıdaki gibidir:

Grup I (n=8) - Sağlıklı kontrol grubu: Deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi. Her hafta ağırlık, deri kalınlığı ve bel çevresi ölçü takibi yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan başlangıçta, 3. hafta ve 15. haftanın sonunda kulak kanından alınan 1'er damla kan, kan glukozu ölçüm şeritlerine (glucostix) yüklenerek ve kan glukoz ölçüm (glucometer) cihazı ile ölçüm yapıldı ve 15. hafta sonunda disseksiyonda kalpten tüm kan örnekleri alınarak serumları ayrılarak biyokimyasal testler için uygun şartlarda saklandı.

Grup II (n=8) - Vitamin D uygulaması yapılan kontrol grubu: Deney süresince çeşme suyu ve standart yem verildi. Her hafta ağırlık, deri kalınlığı ve bel çevresi ölçü takibi yapıldı. Deneyin 3. haftasının sonundan itibaren 12 hafta boyunca haftada 1 kez oral vitamin D uygulaması (170 IU/hafta) yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan başlangıçta, 3. hafta ve 15. Haftanın sonunda kulak kanından alınan 1'er damla kan, kan glukozu ölçüm şeritlerine (glucostix) yüklenerek ve kan glukoz ölçüm (glucometer) cihazı ile ölçüm yapıldı ve 15. hafta sonunda disseksiyonda kalpten tüm kan örnekleri alınarak serumları ayrılarak biyokimyasal testler için uygun şartlarda saklandı.

Grup III (n=8) - Metabolik Sendrom (MetS) grubu: 15 hafta boyunca düzenli olarak %20'lik fruktozlu sudan ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yemlerden tüketerek oluşturulan MetS modeli sıçanların her hafta ağırlık, deri kalınlığı ve bel çevresi ölçü takibi yapıldı. Bu gruptaki sıçanlardan başlangıçta, 3. hafta ve 15. haftanın sonunda kulak kanından alınan 1'er damla kan, kan glukozu ölçüm şeritlerine (glucostix) yüklenerek kan glukoz ölçüm (glucometer) cihazı ile ölçüm yapıldı ve 15. hafta sonunda disseksiyonda kalpten tüm kan örnekleri alınarak serumları ayrılarak biyokimyasal testler için uygun şartlarda saklandı.

Grup IV (n=8) - Metabolik Sendromda (MetS) Vitamin D uygulaması yapılan grup: 15 hafta boyunca düzenli olarak %20'lik fruktozlu sudan ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yemlerden tüketerek oluşturulan MetS modeli sıçanların her hafta ağırlık, deri kalınlığı ve bel çevresi ölçü takibi yapıldı. Deneyin 3. haftasının sonundan itibaren 12 hafta boyunca haftada 1 kez oral vitamin D (170 IU/ hafta) uygulaması yapıldı. Sonuçta bu gruptaki sıçanlardan da başlangıçta, 3. hafta ve 15. Haftanın sonunda kulak kanından alınan 1'er damla kan, kan glukozu ölçüm şeritlerine (glucostix) yüklenerek kan glukoz ölçüm (glucometer) cihazı ile ölçüm yapıldı ve 15. hafta sonunda disseksiyonda kalpten tüm kan örnekleri alınarak serumları ayrılarak biyokimyasal testler için uygun şartlarda saklandı.

Her gruptaki sekizer sıçandan, 15. haftanın sonunda disseksiyon öncesi kulaktan açlık kan glukozu ölçümü yapıldı. Tüm sıçanların intraperitoneal olarak gerçekleştirilmiş ketamin-HCl (50 mg/kg) ve ksilazin-HCl (10 mg/kg) anestezisi ile sedasyonu sağlandıktan sonra kalplerinden alınan tüm kandan serum ayrılarak biyokimyasal testler

için uygun şartlarda saklandı. Ardından tüm sıçanların aort doku örnekleri alınarak bir kısmı %10'luk nötral formalin içinde fikse edilirken dokuların diğer kısmı sıvı azotta (100-200 mg olarak) şok dondurması gerçekleştirildi. Serum örnekleri ve sıvı azot içerisindeki dokular ve -80°C'ye kaldırılarak saklandı.

3.2.2. Dokuların Histolojik İncelemeleri

Deney sonunda alınan aort doku örnekleri, %10'luk formol salin içerisinde +4°C' de bir gece fikse edildikten sonra doku takip prosedürü uygulanarak parafine gömüldü. Mikrotom (Leica) cihazıyla 4 µm'luk parafin doku kesitleri pozitif şarjlı lamalar üzerine alındıktan sonra bir gece 37°C'de etüvde bekletilerek doku kesitlerinin lam üzerine adhezyonu sağlandı.

Aort doku kesitlerinde morfolojik incelemeler yapmak için Hematoksilen-Eosin, Masson Trichrome ve Von Kossa boyaması yapıldı.

3.2.2.1. HEMOTOKSİLEN-EOZİN BOYAMA

1. Boyanacak doku kesitleri toluolde deparafinize edildikten sonra, 3'er dakika sırasıyla %100-96-70 alkol serilerinden geçirildi. Distile su ile çalkalanıp distile suya indirildi, böylece rehidrate edildi.
2. Doku kesitlerine 30 dakika hemotoksilen ile çekirdek boyaması yapıldı.
3. Doku kesitleri, çeşme suyuyla 1-2 kez çalkalandı.
4. Kesitler, asit alkole daldırılıp çıkarıldı. (*Asit alkol* → 100 ml %70 alkol + 1 ml HCl)
5. Kesitler, 15 dakika akan su altında morartıldı.
6. Kesitler, 15 saniye eosin ile sitoplazma boyaması yapıldı.
7. Distile suda 2-3 kez çalkalandı.
8. Doku kesitleri 3'er dakika sırasıyla %70-96-100 alkol serilerinden geçirildi ve toluolde 3-5 dakika bekletildikten sonra entellan ile lamel kapatıldı.

3.2.2.2. MASSON BOYAMA

Kullanılan kitin içinde tavsiye edilen boyama prosedürü uygulandı.

1. Boyanacak doku kesitleri toluolde deparafinize edildikten sonra, 3'er dakika sırasıyla %100-96-70 alkol serilerinden geçirildi. Distile su ile çalkalanıp distile suya indirildi, böylece rehidrate edildi.
2. Weigert hematoksileni, dokuların üzerini kaplayacak şekilde eşit hacimlerde çözelti A ve B karıştırılarak hazırlandı. Doku kesitleri 20 dakika Weigert's Iron hematoksilin ile boyandı, suda hızlıca yıkandıktan sonra hazırlanmış %1 asit alkol solüsyonunda çalkalandı.
3. Doku kesitleri çeşme suyunda durulandı ve akan çeşme suyu altında 25 dakika morartıldı.
4. Kesitler, 4 dakika Ponceau Fuchsin solüsyonu ile boyandı. Distile su ile durulandı.
5. Daha sonra 15 dakika Fosfotungstik asit ile muamele yapıldı.
6. Doku kesitlerini yıkamadan metil mavisi solüsyon ile 5 dakika inkübe edildi.
7. Doku kesitleri distile su ile yıkandıktan sonra 1'er dakika sırasıyla %70-96-100 alkol serilerinden geçirildi ve toluolde 1 dakika bekletildikten sonra entellan ile lamel kapatıldı.

3.2.2.3. VON KOSSA BOYAMA

Kullanılan kitin içinde tavsiye edilen boyama prosedürü uygulandı.

1. Boyanacak doku kesitleri toluolde deparafinize edildikten sonra, 3'er dakika sırasıyla %100-96-70 alkol serilerinden geçirildi. Distile su ile çalkalanıp distile suya indirildi, böylece rehidrate edildi.
2. Dokuların üzerine Gümüş Nitrat solüsyonu eklenerek 1 saat güçlü ışığa maruz bırakıldı.
3. Doku kesitleri, 3 kez distile su ile yıkandı.
4. 5 dakika sodyum tiyosülfat ile muamele edildi.
5. Distile su ile iyice durulandı.
6. Nötral kırmızı ile 5 dakika zıt boyaması yapıldı.
7. Doku kesitleri çeşme suyu ile yıkandıktan sonra 1'er dakika sırasıyla %70-96-100 alkol serilerinden geçirildi ve toluolde 1 dakika bekletildikten sonra entellan ile lamel kapatıldı.

3.2.2.4. İMMUNOHİSTOKİMYA YÖNTEMİ

Alınan parafin doku kesitlerine UltraVision Detection System Large Volume Anti-Polyvalent, HRP (TP-125-HLX, Thermo Scientific, UK) kiti ile monoklonal ve poliklonal antikorlar kullanılarak Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi ile immünohistokimyasal boyama uygulandı. İmmünohistokimyasal boyama için p16 (1:100, Santa Cruz, ABD) ve Anti-alpha smooth muscle actin (α -SMA) (1:100, Abcam ab5694, UK) antikorları ayrıca aort dokularında araştırılan miRNA'ların hedef mRNA ürünlerine ait Tissue inhibitors of Metalloproteinases 3 (TIMP3) (1:200, Abcam ab39184, UK) ve 5'-adenozin monofosfat (AMP) ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) alfa1/2 (1:50, Abcam ab131512, UK) antikorları kullanıldı.

Kit içinde tavsiye edilen boyama prosedürü çalışılan antikorlara göre modifiye edilerek uygulandı:

- 1) İmmünohistokimya yöntemi uygulanacak doku kesitleri toluolde deparafinize edildikten sonra, 3'er dakika sırasıyla %100-96-70 alkol serilerinden geçirilerek distile suya indirildi.
- 2) Antijenleri iyileştirmek için doku kesitleri mikrodalga fırında 10 mM sitrat tampon (pH:6) içerisinde 3 kez 3 dakika kaynatıldı.
- 3) Endojen peroksidazları bloke etmek için metanol ile hazırlanmış %3 H₂O₂ kesitlerin üzerine damlatılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. (3 ml %35 H₂O₂ + 32 ml methanol)
- 4) Doku kesitleri fosfat tuz tamponu (PBS) ile 3 kez 3'er dakika yıkandı.
- 5) Zemin boyanmasının engellenmesi için *Ultra V Block* ile 5 dakika muamele edildi.
- 6) p16 (1:100), α -SMA(1:100), TIMP3 (1:200), AMPK (1:50) primer antikorları antibody diluent (ZUC025-100, Zytomed Systems) ile sulandırıldıktan sonra doku kesitlerinin üzerini kapatacak şekilde yayıldı ve nemli ortamda 1 gece +4°C'de inkübe edildi.
- 7) Ertesi gün oda ısısına alınan boyama kabındaki doku kesitleri PBS ile 3 kez 3'er dakika yıkandı.
- 8) Dokular *Biotinylated Goat Anti-Polyvalent* (2. antikor) ile 15 dakika inkübe edildi.
- 9) Doku kesitleri 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.

10) Dokulara *Streptavidin-Peroksidaz Kompleksi* damlatıldı ve 15 dakika inkübe edildi.

11) Doku kesitleri 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.

12) AEC Substrat-kromojen (3-amino-9-ethylcarbazole) solusyonu doku kesiti yüzeyini kaplayacak biçimde damlatılarak mikroskop altında renk reaksiyonu elde edildi.

- İmmunohistokimya sonrası zıt boyama için Mayer's Hemotoksilen ile 3 dakika nukleus boyaması yapıldı.
- Doku kesitleri, çeşme suyu içerisinde yıkandıktan sonra 10 dakika PBS ile morartıldı. Ardından kesitler distile suya alındı.
- Doku kesitleri gliserin jel kapama solusyonu damlatılarak lamel ile kapatıldı.
- Kapanan kesitler, Leica DM 2500 model ışık mikroskobu ve Leica DFC280 dijital kamera sstem (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ile görüntülenerek fotoğrafları çekildi ve Leica LAS yazılım program yardımı ile değerlendirildi.

Boyama özüllüğünün kontrolü için negatif kontrol kullanıldı. Negatif kontrol doku kesitine antikor yerine PBS eklenerek bu adım atlandı.

İmmunohistokimya görüntülerinin değerlendirilmesi:

α -SMA, p16, TIMP3, AMPK antikorlarının immün boyamalarının değerlendirilmesi için tüm deney gruplarına ait doku kesitlerinde tüm alanda hem immün pozitif hücre boyanma yoğunluğu dikkate alınarak semi-kantitatif değerlendirme yapıldı. Her bir antikorun immün boyanma yoğunluğuna göre 4 kategori oluşturuldu. Buna göre: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf ancak tespit edilebilir boyanma), 2+ (orta yoğunlukta boyanma), 3+ (yoğun boyanma).

Ayrıca p16 immün pozitif hücreler ışık mikroskobunda x400 büyütmede doku kesitlerinde tüm alanlarda sayıldı. immün pozitif hücre yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı. [*İmmün pozitif hücre yüzdesi = (immün pozitif hücre sayısı/ toplam hücre sayısı) x100*]. (Bayoglu ve ark. 2014)

3.2.3. Deney gruplarından elde edilen aort dokularının homojenizasyonu

Her bir gruptan sekizer sıçandan alınarak -80°C ' de saklanan aort dokuları buz üzerine alınarak çözünmelerine izin vermeden hızlıca üzerine QIAzol Lizis Solüsyonu eklenerek (100 mg doku için 1 ml olarak) yine buz üzerinde bıçaklı homojenizatör kullanılarak parçalandı. Homojenizatör bıçak uçları, her bir örnek homojenize edilmeden önce sırasıyla DEPC'li distile su, 4M Guanidin isotiyosiyanat (GTC), 0.1M Sodyum Hidroksit (NaOH) ve tekrar DEPC'li distile sudan geçirilerek temizlendi. Her solüsyon arasında homojenizatör ucu temiz peçete ile kurulandı. Trizol içerisinde homojenat haline getirildikten sonra dokular tekrar -80°C 'de saklandı.

3.2.4. Total RNA izolasyonu

Trizol içerisinde homojenat halde bulunan aort dokuları buz üzerinde çözüldü.

- Kriyotüpte bulunan homojenatlara stok amaçlı 800 μl daha trizol ekleyip pipetaj yapıldıktan sonra 1 ml'si yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak RNA izolasyonu için kullanıldı.
- Her bir homejenat üzerine $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki kloroform 200 μl eklendi (1 ml trizol için 0,2 ml kloroform). 15 saniye vortekslendikten sonra buz üzerinde 2-3 dakika inkübe edildi.
- Örnekler, $+4^{\circ}\text{C}$ 12.000xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Aköz faz dikkatlice yeni tüpe aktarıldı. Üzerine alınabilen aköz faz miktarı kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki %100 izopropanol eklendi. Tüpler, alt üst edilerek karıştırıldı. Örnekler gece boyu -20°C 'de bekletildi.
- Ertesi gün, $+4^{\circ}\text{C}$ 12.000xg'de 10 dakika santrifüj yapıldı. Tüplerin dibinde biriken total RNA pelletine temas edilmeden mikropipet ile süpernatant atıldı ve pellet üzerine 1 ml $+4^{\circ}\text{C}$ 'deki DEPC'li su ile hazırlanmış %75 Ethanol eklendikten sonra tüpler alt üst edilerek çalkalandı.
- $+4^{\circ}\text{C}$ 9.000xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Süpernant atıldıktan sonra tüpler ters çevrilerek pellet kurumaya bırakıldı.
- Pellet kuruduktan sonra 40 μl RNazsız steril suda çözülen örneklerin konsantrasyon ve saflık ölçümleri yapıldıktan sonra -80°C dondurucuda saklandı.

RNA saflığı ve miktarının ölçümü

İzole edilen total RNA'nın konsantrasyonu, protein ve kimyasal kontaminasyonu olup olmadığı belirlenmesinde NanoDrop (nd-2000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) cihazı kullanıldı. 260/280 oranı, RNA'daki protein kirliliğini göstermektedir. Bu değer optimal 1,6-2,0 arasında olması önerilmektedir. 260/230 oranı kimyasal kirliliği göstermektedir; 1,6-2,0 aralığında olması önerilir. Bu değerler arasında ölçülen RNA örnekleri kaliteli olarak kabul edilmiştir.

3.2.5. miRNA ifade düzeylerinin belirlenmesi

cDNA Sentezi

Aort dokularından izole edilen uygun kalite ve miktardaki RNA'lardan cDNA sentezlenmek üzere örnekler -80°C'den buz üzerine alındı. Her bir örneğin konsantrasyonu cDNA sentez reaksiyonda 50 ng/μl olacak şekilde hesaplanarak RNAzsız steril su ile sulandırıldı. TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher) kullanılarak total RNA örneklerinden tek sarmallı cDNA sentezlendi.

Elde edilen cDNA'larda ve kantitatif gerçek zamanlı PZR'de literatüre dayanarak ateroskleroz ve enflamasyonla ilgili gen regülasyonunda görev aldığı bilinen miR-21-5p ve miR-146a-5p miRNA'ların ifade düzeyleri ve endojen kontrol olarak nükleolar küçük RNA olan U6'nın ifade düzeyleri TaqMan primer-prob assay'leri (Tablo3-6) kullanılarak belirlendi.

Tablo 3-6: miRNA'lara özgü kullanılan TaqMan primer-prob assay'leri

Assay Adı	Assay Katalog Nosu	miRNA dizisi
rno-miR-21-5p	000397	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
rno-miR-146a-5p	4427975	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
U6 snRNA	001973	

Her bir miRNA assay'in içerikleri aşağıdaki gibidir;

- miRNA'ya spesifik RT primeri
- Aşağıdakilerin karışımı
- miRNA'ya spesifik ileri PZR primeri

- spesifik ters PZR primeri
- miRNA'ya spesifik prob

Tablo 3-7: miRNA'lar için cDNA Sentez prosedürü

10 mM dNTP mix: 0,075 µl

RT enz: 0,5 µl

10X RT Buffer: 0,75 µl

RNase inhibitor: 0,095 µl

RNazsız steril su: 2,08 µl

miRNA primer-probe mix (5X): 1,5 µl

RNA örneği: 2,5 µl

Toplam: 7,5 µl

RNA örneklerinin cDNA sentezi, Techne TC-412 Thermal Cyclers cihazında Tablo 3-6'daki koşullarda yapıldı ve sonrasında kantitasyon için kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

Tablo 3-8: cDNA sentezi için sıcaklık-zaman protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre
Enzim Aktivasyonu	16°C	30 dakika
Denatürasyon	42°C	30 dakika
Bağlanma / Uzama	85°C	5 dakika
Soğutma	4°C	∞

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (QRT-PZR)

Gen ifade düzeylerinin miktarlarını belirlemek için kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR (RT-PZR) yöntemi kullanıldı. Böylece araştırma grupları arasında karşılaştırma yapılabilmesi sağlandı. DNA çoğalmasını görüntüleyebilmek için iki ana floresan sistemden (SYBR Green ve hidroliz prob) biri olan ve sadece spesifik hedeflere bağlanan hidroliz prob teknolojileri kullanıldı. Bu teknolojiye floresan işaretli moleküller belirlenen oligonükleotitlere bağlanır ve tepkime sırasında oluşturdıkları ışımlar ile algılanır.

miRNA'ların LC480 cihazında kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile ifade düzeyleri belirlendi. Bunun için aşağıdaki prosedürler uygulandı:

cDNA örneklerinden 1'şer μ l ve Tablo 3-7'da gösterilen 9 μ l'lik reaksiyon karışımı ile pipetleme yapılarak 96 kuyucuklu standart plaka içerisinde kantitatif RT-PZR'ları yapıldı.

Tablo 3-9: Araştırılan miRNA'ların Gerçek-Zamanlı PZR içerikleri

probe master (LC 480): 5 μ l

miRNA primer-probe mix (20x): 0,5 μ l

RNazsız su: 3,5 μ l

cDNA: 1 μ l

Toplam: 10 μ l

Plaka, bir film ile kapatılıp karıştırmak için kısa süre santrifüjlendi. Gerçek-Zamanlı PCR cihazında (LightCycler480, Roche Diagnostics GmbH, Almanya) PZR yapıldı. Tablo 3-8'daki sıcaklık-zaman protokolü uygulandı.

Tablo 3-10: Araştırılan miRNA'ların Kantitatif Gerçek-Zamanlı PZR sıcaklık-zaman protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön-inkübasyon	98 °C	5 dakika	1
Amplifikasyon	95 °C	10 saniye	45
	60/58 °C	30 saniye	
	60 °C	30 saniye	
Erime Eğrisi	95 °C	7 dakika	1
	60 °C	1 dakika	
	95 °C	∞	
Soğuma	40 °C	10 saniye	1

Kantitatif RT-PZR'de cDNA örnekleri çift çalışıldı ve LC480 sisteminin programında master karışım için standart siklüs modu olan “Absolute Quantification w/2nd Derivative Maximum” metodu ile analiz edilerek Ct değerleri elde edildi.

Gerçek Zamanlı PZR (RT-PZR) ile Elde Edilen Ct değerlerinden Rölatif Kantitasyon Hesabı

PZR sırasında çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak real-time PZR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. PZR ürünü konsantrasyonu floresan ışığa miktarına göre değerlendirilir. Floresan değerlerinin eşik değerini geçtiği noktaya eşik döngüsü (Ct (cycle treshold), Cp) denir. Ct değeri, sistemin floresan miktarındaki artışı farketmeye başladığı ve PZR ürününün log-lineer fazda ekspanensiyal olarak artmaya başladığı zamandır.

Tüm örneklerin Ct verileri bir excel dosyasına aktarıldı. Real time PZR’da kantitatif analizlerde genellikle mutlak (absolute) kantitasyon ve bağıl (rölatif) kantitasyon olmak üzere iki metot kullanılır. Bu çalışmada, genellikle ifade analizlerinde kullanılmakta olan bağıl kantitasyon (rölatif) metodu ile analiz yapıldı. Bağıl kantitasyon analizlerinde referans kontrol veya kalibratörün ifade seviyeleri hedef genin ifade seviyesi ile karşılaştırılarak kantitatif analiz yapılır. Bu çalışmada, referans kontrol olarak dizisi bilinen snRNA U6 kullanılarak gruplar arasında miRNA ifadesindeki bağıl değişiklikler $\Delta\Delta Ct$ yöntemi (yaklaşım metodu) ile hesaplandı.

$$\Delta\Delta Ct: [(Ct_{MetS} - Ct_{housekeeping}) - (Ct_{normal} - Ct_{housekeeping})]$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (deney grubu (MetS))} - \Delta Ct \text{ (kontrol grubu)}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

3.2.6. İstatistiksel Analiz ve Sonuçların Yorumlanması

Araştırılan her miRNA’nın rölatif kantitasyon değerleri $\Delta\Delta Ct$ yöntemine göre hesaplandı ve gruplar arasında miRNA ifade düzey farklılıkları birbirleri ile kıyaslandı. İstatistiksel analizler için SPSS programı (21.0 versiyonu, Chicago, IL) kullanıldı. Gruplar arasında ifade düzeyleri ve antropometrik ölçümler ile kan glukozu gibi sürekli değişkenlerin normallliği Shapiro-Wilk testi kullanılarak test edildi. Normal dağılıma uyan parametrelerin karşılaştırmaları, ANOVA (Bonferroni’nin çoklu karşılaştırma testi ile) kullanılarak yapıldı. Normal dağılıma uymayan parametreler için 2’li gruplar arasında ANOVA (nonparametrik Dunnett T3 testi’nin çoklu karşılaştırmaları ile) ve 2’den fazla grup karşılaştırmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Ayrıca, sürekli değişkenler arasındaki ilişkiyi ölçmek için Spearman's rank-order korelasyonu kullanıldı. Korelasyon analizinde, korelasyon katsayısı (r) ve anlamlılık düzeyleri belirtildi. R değerleri, 0.00-0.25 (çok zayıf), 0.26-0.49 (zayıf), 0.50-0.69 (orta), 0.70-0.89 (yüksek), 0.90-1.00 (çok yüksek) olarak değerlendirildi. $p \leq 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

İstatistiksel analizlere MetS grubu hariç diğer üç gruptan birer sıçan demografik ve kan glukozu ölçüm sonuçlarındaki eksiklikler sebebi ile dahil edilmedi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada endotel hasarı ve erken evre ateroskleroz gelişimini oluşturmak için metabolik sendrom (MetS) modeli diyet ile sağlandı. Yüksek yağ-fruktoz diyeti ile beslenen sıçanlarda, oksidatif stres, bozulmuş glukoz toleransı, dislipidemiyle birlikte artan vücut ağırlığı, karın çevresinde yağ birikimi ve buna bağlı erken evre aterosklerozun başlangıcı olan endotel hasarında ilişkili olabilecek miR-21 ile miR-146a'nın ifade düzeyleri ile bunların hedef genleri ve VitD tedavisi arasındaki ilişki araştırıldı.

Bunun için, kontrol gruplarıyla birlikte MetS sıçanlar ve bunların VitD uygulaması yapılan gruplar olmak üzere toplam 4 grupta ilişkili olabilecek miRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldı.

Araştırma grubunun daha önceki bir tez çalışmasında, yüksek yağ/fruktoz diyeti ve STZ ile oluşturulmuş T2DM sıçan modelinde (Celebi G ve ark. 2022) aort dokularındaki endotelial hasara VitD'nin OPG/RANKL sinyal yolağındaki genlerin ifade düzeylerini etkilediği gösterildi (Celebi G ve ark. 2022). Bu projede ise, literatürdeki MetS hayvan modelleri değerlendirilmiş ve kimyasal yöntemler kullanılmadan (STZsiz) özel diyet ile oluşturulmuş bir model (Gancheva S ve ark. 2015) kullanılarak günlük hayata en yakın koşullar elde edildi. Bu amaçla, işlenmiş gıdalarda sıklıkla kullanılan yüksek hayvansal yağ-fruktoz ile diyabet ve santral obeziteye bağlı erken evre ateroskleroz oluşması sağlandı. Böylece yüksek yağ-fruktoz olan özel diyetle bağlı gelişen MetS grupları normal diyetle beslenen kontrol grupları ile karşılaştırılarak VitD ile ateroskleroz başlangıcında değişen gen ifadelerine etkisi araştırıldı.

Bu çalışmada, yüksek yağ-fruktoz diyeti ile oluşturulan MetS modelinde (Gancheva S ve ark. 2015), aterogenezin başlangıç patogenezi olan endotel hasarında, ilgili gen regülasyonunda görev aldığı bilinen miR-21-5p ve miR-146a-5p miRNA'ların aort dokularındaki ifade düzeylerine ve histolojik olarak doku morfolojisine VitD'nin etkisi araştırılmasıyla birlikte miR-21-5p'nin hedef gen ürünlerinden biri olan TIMP3'e ek olarak α -SMA, p16, AMPK aort dokularında immunohistokimyasal olarak araştırıldı. Dokuların morfolojileri Hematoksilen-Eosin, Masson üçlü boyası ve Von Kossa boyamaları ile incelendi. Elde edilen tüm sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. MetS'de Bu araştırmadan elde edilen bulgularımızın, ateroskleroz etiyopatogenezinin

daha iyi anlaşılıp hem bu patolojinin önlenmesine hem de yeni tedavi hedeflerinin belirlenmesine katkı sağlaması ve ileride yapılması planlanan daha kapsamlı araştırmalar için önbilgilerin elde edilmesi hedeflendi.

4.1. Açlık Kan Glukozu Seviyesi

Deneyin başlangıcında tüm grupların kan şekerleri ölçüldü ve deney grupları oluşturuldu. Kan şekeri sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü. ($p=0.985$). MetS grubuna ait kan glukozu değerlerinin deney sonunda diğer gruplara yüksek olduğu ve tüm gruplarla arasında istatistiksel olarak çok ileri derecede anlamlı olarak fark olduğu saptandı ($p=0.0001$). 3. haftadan itibaren VitD uygulanan MetSD grubunda (157.7 ± 34.7) kan glukozu değerlerinin düştüğü ve MetS grubuyla (198.7 ± 34.8) kıyaslandığında anlamlı fark olduğu bulundu ($p\leq0.05$).

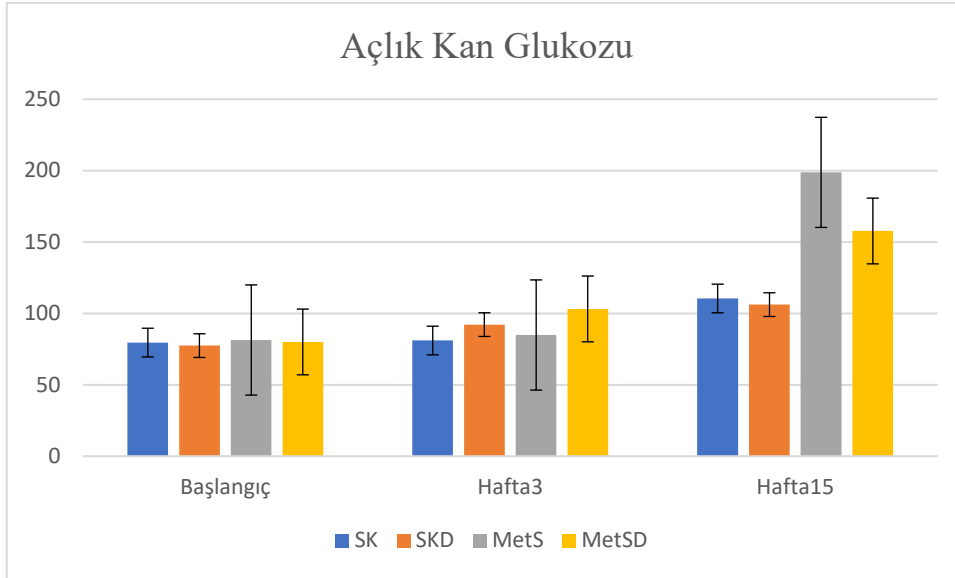
Açlık kan glukozu düzeyleri başlangıçta tüm gruplarda ortalama 79.6 ± 18.9 iken, 15. haftada ise (SK; 110.4 ± 26.8 , SKD; 106.1 ± 20.3 , MetS; 198.7 ± 34.8 , MetSD; 157.7 ± 34.7 , $p=0.0001$) bulundu.

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

Ölçüm zamanı/Gruplar	SK (n=7)	SKD (n=7)	MetS (n=8)	MetSD (n=7)	P değeri*
Başlangıç	79.6 ± 13.5	77.4 ± 23.6	81.4 ± 24.8	80.0 ± 14.5	0.985
3. Hafta	81.0 ± 11.9	92.1 ± 6.3	84.9 ± 19.7	103.1 ± 5.8	0.016
15. Hafta	110.4 ± 26.8	106.1 ± 20.3	198.7 ± 34.8	157.7 ± 34.7	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*ANOVA testi, $p\leq0.05$ anlamlılık değeri



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

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

4.2. İdrar verileri

Deney gruplarındaki sıçanların disseksiyon esnasında mesanesinden alınabilen idrar örneklerinde MetS gruplarında idrarda glukoz saptanırken (42.9 ± 53.4 mg/dl) diğer deney gruplarında idrarda glukoz görülmedi ($p < 0.026$).

Tablo 4-2: Tüm deney gruplarına ait idrar verileri

Parametreler/Gruplar	SK (n=7)	SKD (n=6)	MetS (n=7)	MetSD (n=7)	P değeri*
Protein (mg/dl)	242.9±97.6	219.2±128.1	185.7±106.9	300.0±0.0	0.170
pH	7.6±0.6	6.5±0.0	6.5±0.0	6.5±0.0	0.0001
Dansite	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	1.0±0.0	0.330
Keton (mg/dl)	6.4±3.8	5.0±0.0	7.9±4.9	5.0±0.0	0.294
Bilirubin (mg/dl)	0.3±0.5	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.114
Glukoz (mg/dl)	0.0±0.0	0.0±0.0	42.9±53.4	0.0±0.0	0.026

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

4.3. Vücut Ağırlığı Ölçümleri

Deney başlangıcından deney sonuna kadar deney gruplarındaki tüm deney hayvanlarının ağırlıkları haftalık olarak ölçüldü (Tablo 4-3). Deney sonunda MetS grubu (438.1 ± 40.8) ile SK (359.9 ± 33.2), SKD (397.0 ± 24.1), MetSD (349.9 ± 57.6) grupları arasında çok ileri derecede anlamlı fark bulundu ($p=0.001$). VitD tedavisi uygulanan MetS grubunda ise MetS grubu ile kıyaslandığında vücut ağırlıklarında azalma görüldü.

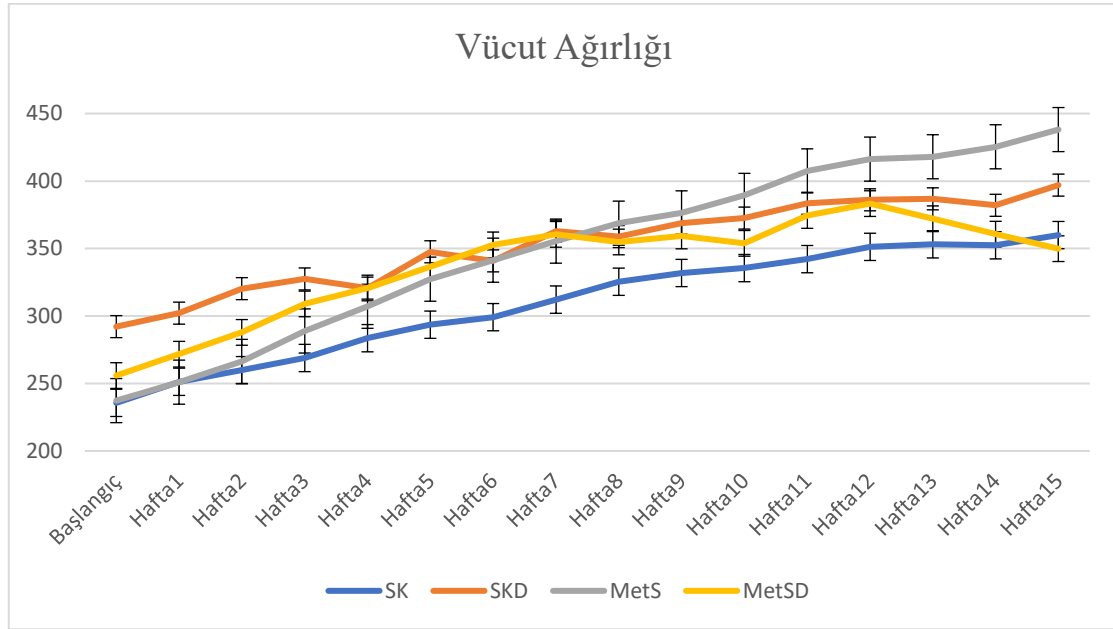
Vücut ağırlıkları başlangıçta tüm gruplarda ortalama 254.6 ± 36.8 . 15. haftada SK; 359.9 ± 33.2 , SKD; 397.0 ± 24.1 , MetS; 438.1 ± 40.8 , MetSD; 349.9 ± 57.6 , $p=0.001$ bulundu. 15. haftadaki ölçümlerin ikili grup karşılaştırmalarında (Bonferroni post hoc test), MetS-SK ($p=0.006$) ve MetS-MetSD ($p=0.002$) arasındaki farkların anlamlı olduğu belirlendi.

Tablo 4-3: Deney hayvanlarının vücut ağırlıklarının (gr) ortalaması

Ölçüm zamanı/Gruplar	SK (n=7)	SKD (n=7)	MetS (n=8)	MetSD (n=7)	P değeri*
Başlangıç	235.7 $\pm$ 22.2	292.1 $\pm$ 43.4	237.3 $\pm$ 26.3	255.9 $\pm$ 25.8	0.006
1. Hafta	251.3 $\pm$ 21.7	302.1 $\pm$ 43.3	251.0 $\pm$ 29.4	271.7 $\pm$ 24.6	0.013
2. Hafta	259.9 $\pm$ 23.1	320.3 $\pm$ 47.7	266.4 $\pm$ 29.8	287.9 $\pm$ 27.2	0.009
3. Hafta	268.9 $\pm$ 32.7	327.4 $\pm$ 38.0	288.9 $\pm$ 32.8	308.9 $\pm$ 22.3	0.013
4. Hafta	283.6 $\pm$ 22.3	320.7 $\pm$ 54.5	307.2 $\pm$ 34.5	320.8 $\pm$ 26.6	0.212
5. Hafta	293.6 $\pm$ 26.5	347.6 $\pm$ 35.3	327.3 $\pm$ 37.0	336.6 $\pm$ 28.1	0.026
6. Hafta	299.1 $\pm$ 26.9	340.8 $\pm$ 33.6	341.4 $\pm$ 36.3	352.7 $\pm$ 20.7	0.015
7. Hafta	312.1 $\pm$ 28.4	362.9 $\pm$ 33.3	355.5 $\pm$ 35.2	360.5 $\pm$ 17.5	0.011
8. Hafta	325.4 $\pm$ 29.1	358.8 $\pm$ 19.8	368.8 $\pm$ 33.0	354.9 $\pm$ 15.1	0.022
9. Hafta	331.9 $\pm$ 30.7	368.8 $\pm$ 22.1	376.4 $\pm$ 30.2	359.3 $\pm$ 19.4	0.019
10. Hafta	321.2 $\pm$ 35.3	372.6 $\pm$ 18.8	389.4 $\pm$ 33.5	353.9 $\pm$ 22.0	0.001
11. Hafta	342.1 $\pm$ 31.2	383.5 $\pm$ 29.3	407.5 $\pm$ 37.8	374.5 $\pm$ 28.0	0.006
12. Hafta	351.2 $\pm$ 33.2	386.1 $\pm$ 28.9	416.2 $\pm$ 38.8	383.3 $\pm$ 43.5	0.021
13. Hafta	353.1 $\pm$ 36.6	386.8 $\pm$ 29.1	417.9 $\pm$ 43.0	372.0 $\pm$ 44.8	0.025
14. Hafta	352.4 $\pm$ 36.3	382.0 $\pm$ 25.1	425.4 $\pm$ 38.9	360.7 $\pm$ 46.8	0.004
15. Hafta	359.9 $\pm$ 33.2	397.0 $\pm$ 24.1	438.1 $\pm$ 40.8	349.9 $\pm$ 57.6	0.001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*ANOVA testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-2: Vücut ağırlığı takibi (gr)

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

4.4. Bel çevresi Ölçümleri

MetS'in önemli bir semptomu olan santral obezite açısından yağlanmaya bağlı bel çevresinde anlamlı artış olduğu bulundu. Bel çevreleri başlangıçta tüm gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. 15. haftada ise bel çevrelerinin SK; 17.3 ± 0.6 , SKD; 18.2 ± 0.6 , MetS; 18.5 ± 1.0 , MetSD; 16.3 ± 1.4 olduğu ve MetS grubunun bel çevresinin diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek olduğu ($p=0.000$) bulundu. Tablo 4-4'de başlangıçtan deney sonuna kadar yapılan haftalık ölçümler verilmektedir.

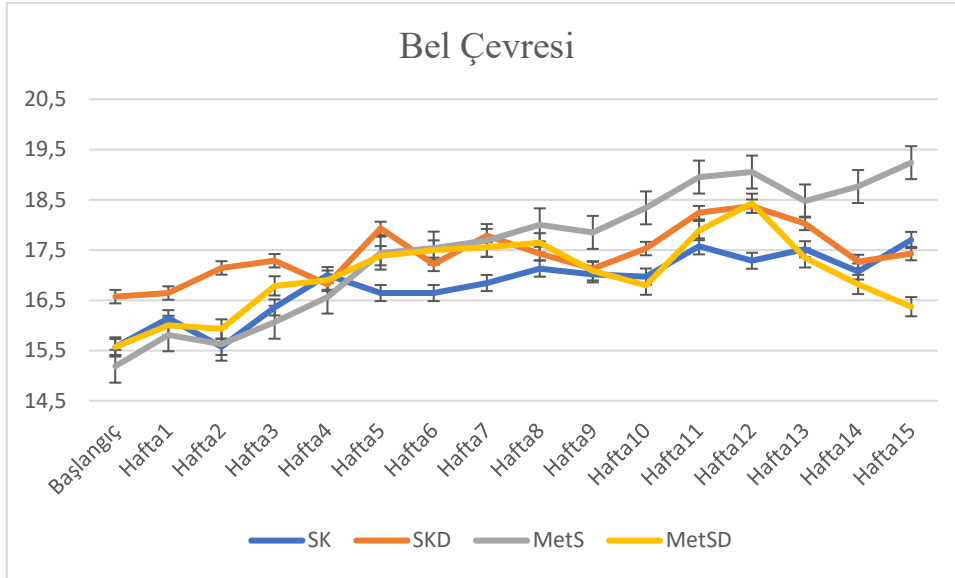
15. haftadaki ölçümlerin ikili grup karşılaştırmalarında (Bonferroni post hoc test) SK-MetS arasında anlamlı fark olmadığı ($p=0.078$), MetS-MetSD ($p=0.0001$) ve SKD-MetS ($p=0.025$) arasındaki farkların anlamlı olduğu belirlendi.

Tablo 4-4: Deney hayvanlarının bel çevrelerinin (cm) ortalaması

Ölçüm zamanı/Gruplar	SK (n=7)	SKD (n=7)	MetS (n=8)	MetSD (n=7)	P değeri*
Başlangıç	15.6±0.5	16.6±1.5	15.2±1.1	15.6±0.8	0.101
1. Hafta	16.1±0.8	16.6±1.2	15.8±1.1	16.0±0.6	0.430
2. Hafta	15.6±0.7	17.1±1.1	15.7±1.0	15.9±0.9	0.015
3. Hafta	16.3±0.6	17.3±1.3	16.1±0.4	16.8±0.7	0.038
4. Hafta	17.0±0.6	16.8±1.2	16.6±0.8	16.9±0.9	0.816
5. Hafta	16.6±0.9	17.9±0.6	17.4±0.9	17.4±0.7	0.047
6. Hafta	16.6±0.7	17.2±1.0	17.5±0.5	17.5±0.5	0.091
7. Hafta	16.8±0.7	17.8±0.7	17.7±0.9	17.6±0.7	0.106
8. Hafta	17.1±0.4	17.4±0.4	18.0±0.6	17.6±0.6	0.025
9. Hafta	17.0±0.6	17.1±0.6	17.8±0.4	17.1±0.4	0.012
10. Hafta	17.0±0.5	17.5±0.3	18.3±0.6	16.8±0.6	0.0001
11. Hafta	17.6±0.8	18.2±0.7	18.9±0.8	17.9±0.6	0.008
12. Hafta	17.3±0.8	18.4±0.9	19.0±0.7	18.4±1.1	0.007
13. Hafta	17.5±0.9	18.0±0.7	18.5±0.9	17.3±0.9	0.085
14. Hafta	17.1±0.9	17.3±0.6	18.8±0.7	16.8±1.2	0.001
15. Hafta	17.7±0.6	17.4±1.1	19.2±1.0	16.4±1.5	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*ANOVA testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-3: Bel çevresi takibi (cm)

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

4.5. Deri kalınlığı Ölçümleri

Deney gruplarına ait tüm deney hayvanlarının deri kalınlıkları haftalık olarak ölçülmüş ve istatistiksel sonuçlar Tablo 4-5'te verilmiştir. Deri kalınlıkları 15. haftada SK (0.3 ± 0.0), SKD (0.3 ± 0.0), MetS (0.4 ± 0.0), MetSD; (0.3 ± 0.0) ($p=0.0001$) bulundu. Haftalık olarak yakın değerler olduğu için kısmen artışlar bulunsa da 15. haftada MetS grubunda deri kalınlığının diğer deney grupları ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı olarak artmış olduğu saptanmıştır ($p<0.0001$).

15. haftadaki ölçümlerin ikili grup karşılaştırmalarında (Bonferroni post hoc test) SK-MetS ($p=0.007$), MetS-SKD ($p=0.001$) ve MetS-MetSD ($p=0.0001$) arasındaki farkların anlamlı olduğu belirlendi.

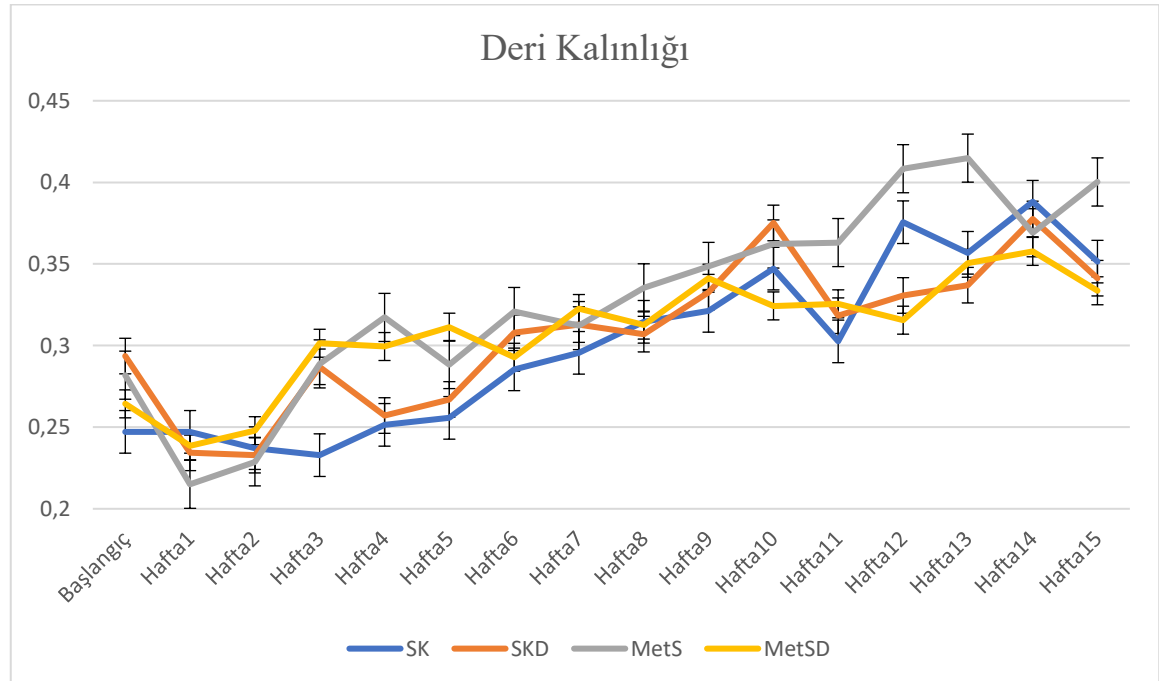
Tablo 4-5: Deney hayvanlarının deri kalınlıklarının (mm) ortalaması

Ölçüm zamanı/Gruplar	SK (n=7)	SKD (n=7)	MetS (n=8)	MetSD (n=7)	P değeri*
Başlangıç	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.036
1. Hafta	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.387
2. Hafta	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.768

3. Hafta	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.0001
4. Hafta	0.2±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.001
5. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.005
6. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.236
7. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.347
8. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.445
9. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.0	0.438
10. Hafta	0.3±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.050
11. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.024
12. Hafta	0.4±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.0001
13. Hafta	0.4±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.001
14. Hafta	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.4±0.0	0.538
15. Hafta	0.3±0.0	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.0	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*ANOVA testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-4: Deri kalınlığı takibi (mm)

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

4.6. Aort dokusunda miR-21 ve miR-146a ifade düzeyleri

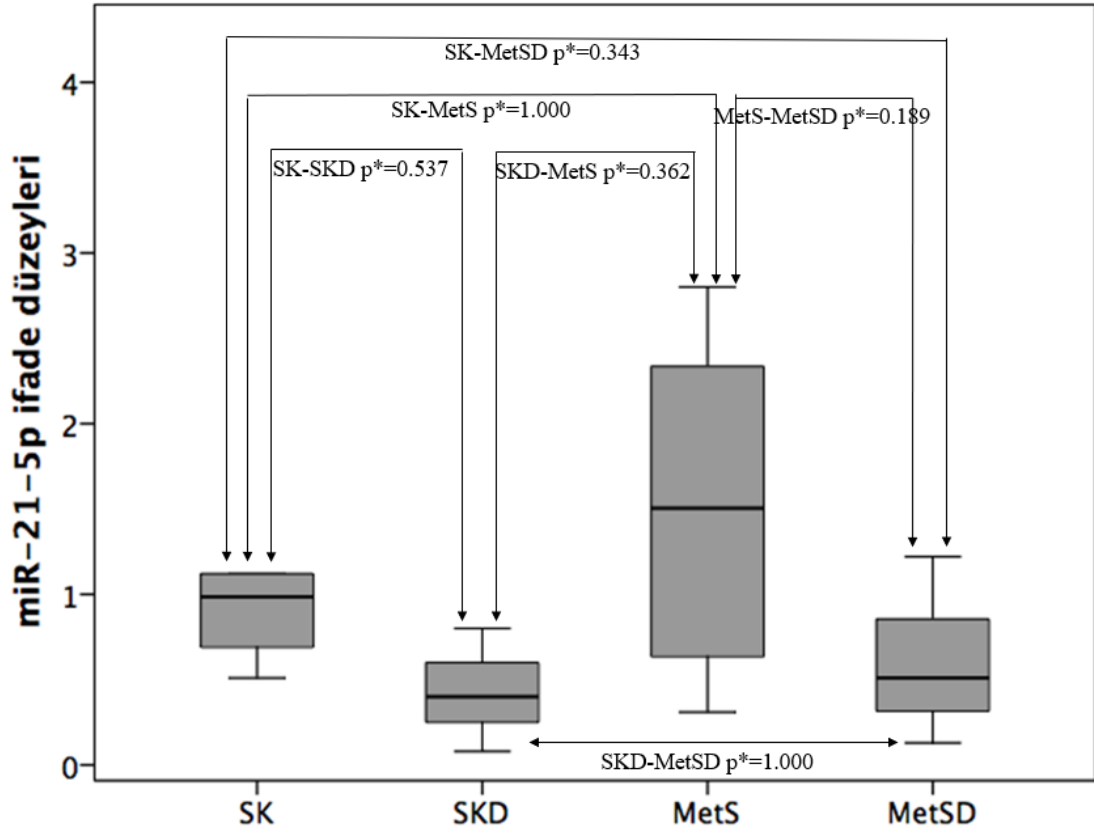
Aort dokusundaki ifade düzeyi analizlerine göre, miR-21 ifade düzeylerinin gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı (Tablo 4-6 ve Şekil 4-5). miR-146a ifadesi tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı (Tablo 4-6). miR-146a ifade düzeylerinin ikili grup karşılaştırmalarında, MetS grubu ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklı olmadığı saptansa da VitD kullanımı ile ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı gözlemlendi (Şekil 4-6).

Tablo 4-6: 15. hafta sonunda deney gruplarından alınan aort dokusunda miRNA'ların ifade düzeyleri

miRNA	SK (n=7)	SKD (n=7)	MetS (n=8)	MetSD (n=7)	P değeri*
miR-21	1.4±1.0	0.7±0.7	1.5±1.0	0.6±0.4	0.069
miR-146a	0.5±0.2	2.3±0.8	0.4±0.2	2.8±1.3	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

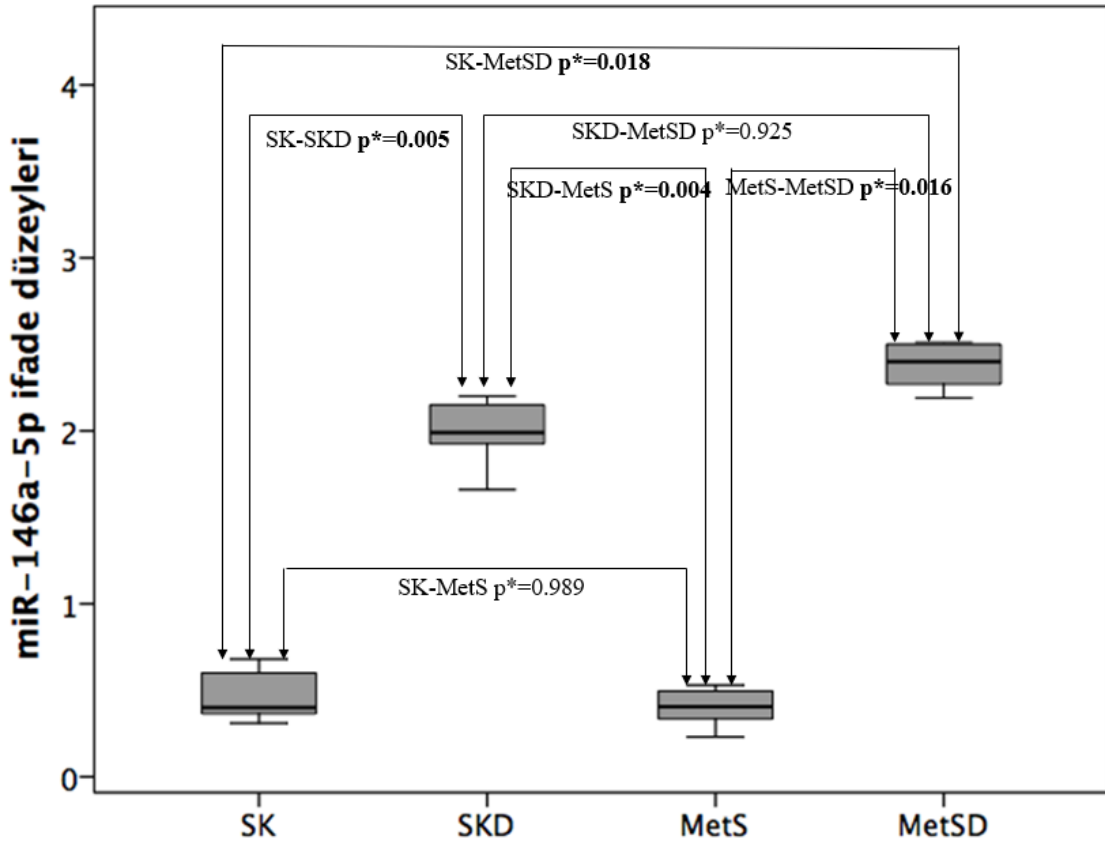
*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-5: Deney grupları arasında miR-21 ifade düzeyi değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.



Şekil 4-6: Deney grupları arasında miR-146a ifade düzeyi değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

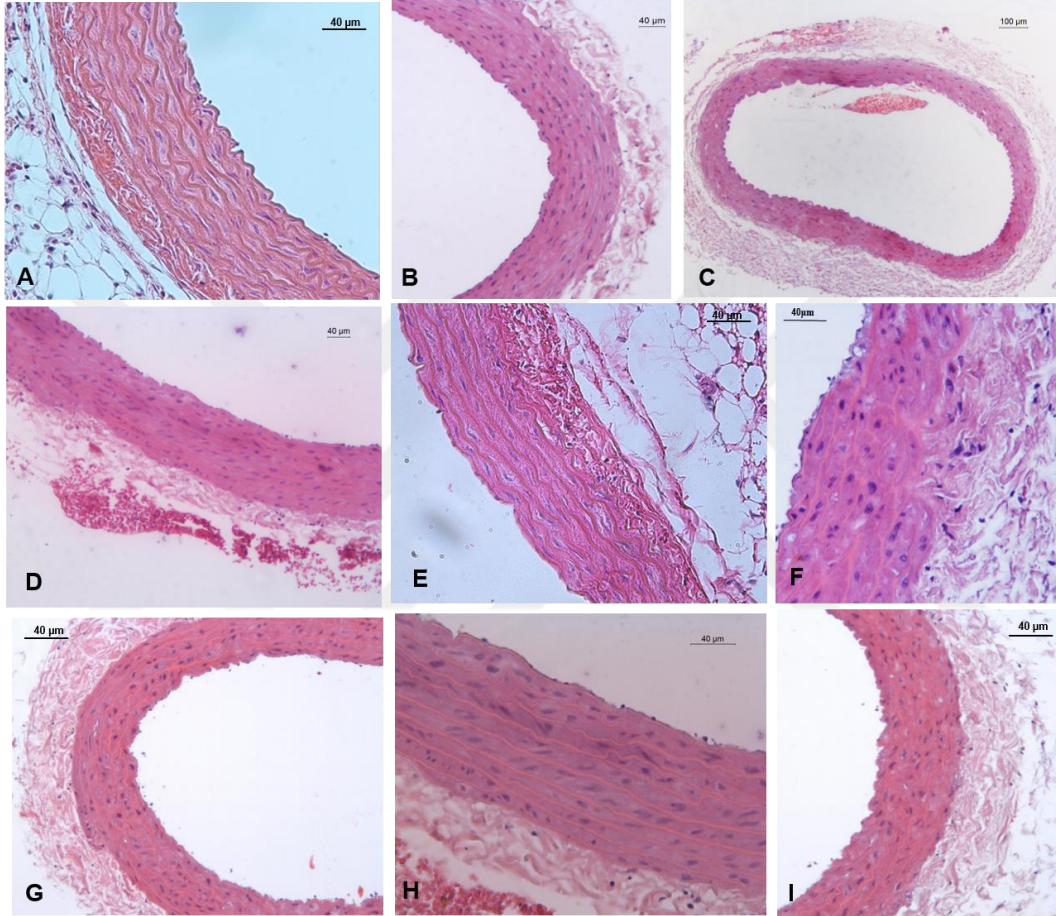
*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.

4.7. Morfolojik Bulgular

Hematoksilen-Eosin ve Masson üçlü boyaması ile aort dokularını genel morfolojik görünimleri değerlendirildi. Ayrıca Von Kossa histokimyasal boyaması ile aort doku kesitlerinde kalsiyum birikimleri gösterildi.

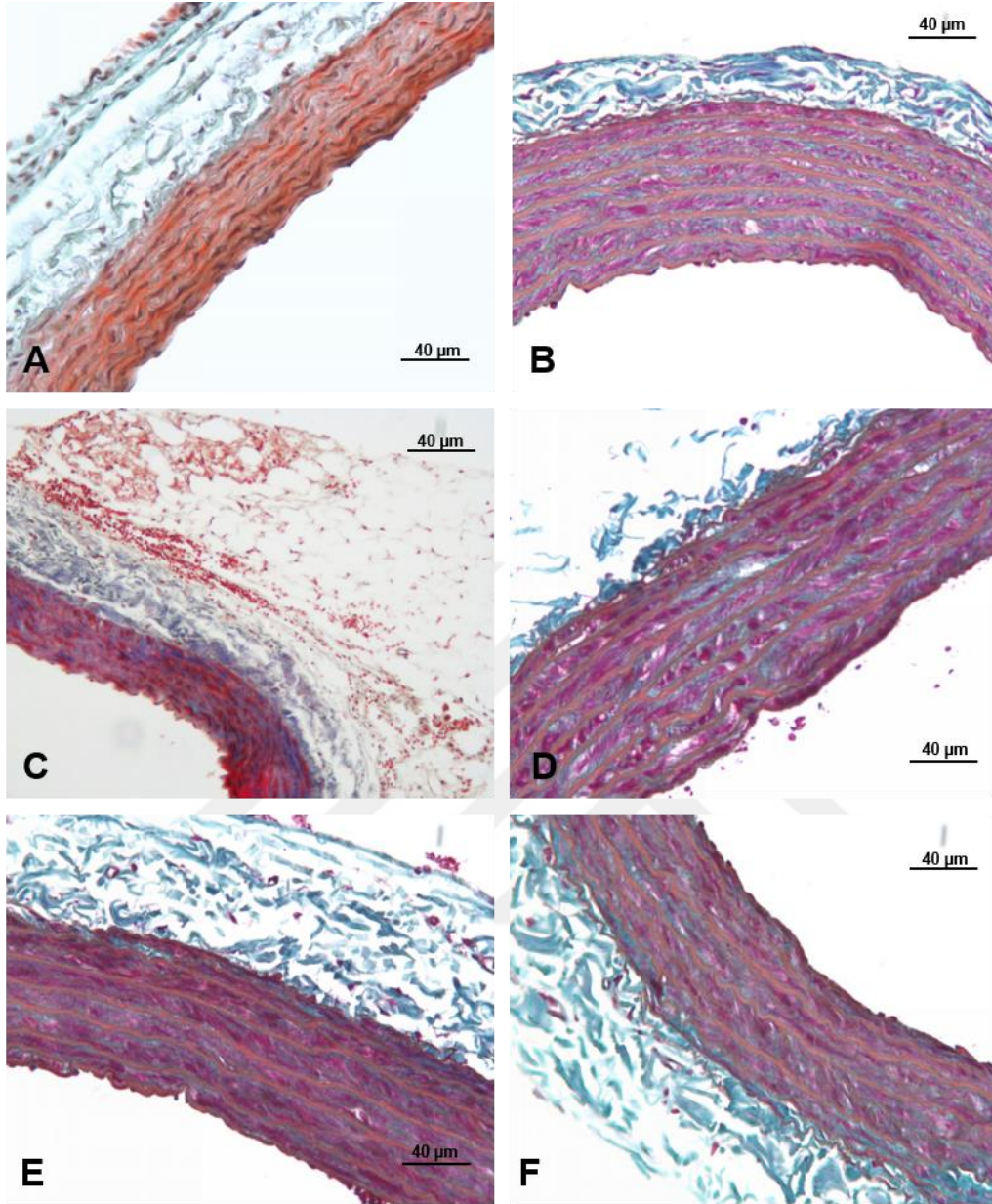
Kontrol gruba ait damar kesitlerinde elastik lifler kıvrıntılı, epitel intakt, tunika mediadaki kas hücreleri fusiform iç şeklini korumuş sağlıklı görünümde tespit edildi. MetS grubunda elastik liflerin ondüle özelliklerini kaybedip belirgin şekilde düzleştiği, bunların aralarındaki düz kas hücrelerinin bazı alanlarda vakuolize olduğu ve sağlıklı görünümünden uzaklaştığı saptandı. Bu grupta ayrıca yer yer epitel hücrelerinin arasında piknotik nüveler görüldü. Yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyetin endotel

hasarı oluşturmuş olabileceği düşünüldü. Von Kossa histokimyasal boyama ile değerlendirilmesinde MetS grupta aterom plaklarında kalsifiye alanlar saptandı (Şekil 4-9). Vitamin D uygulanan grupta ise yer yer düzleşmeler devam etse de damar morfolojisinin kontrol grubuna benzer özellikler gösterdiği tespit edildi.



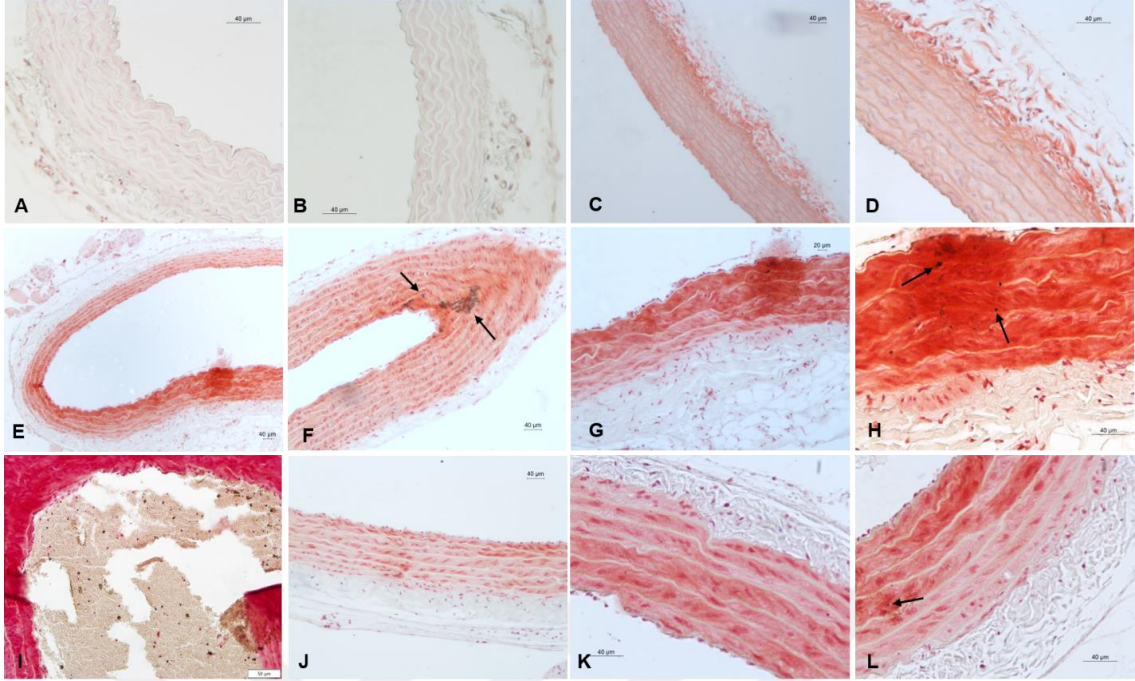
Şekil 4-7: Aort dokusunun Hematoksilen-Eosin boyanması

A: SK (Sağlıklı kontrol), B: SKD (Kontrol-vitaminD), C-F: MetS (Metabolik Sendrom), G-I: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD)



Şekil 4-8: Aort dokusunun Masson Trichrome boyanması.

A: SK (Sağlıklı kontrol), B: SKD (Kontrol-vitaminD), C-D: MetS (Metabolik Sendrom), E-F: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD).



Şekil 4-9: Aort dokusunda Von Kossa Boyama Yöntemi ile kalsiyum birikimlerinin (↑) gösterilmesi. A-B: SK (Sağlıklı kontrol), C-D: SKD (Kontrol-vitaminD), E-H: MetS (Metabolik Sendrom), I-L: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD)

4.8. İmmünohistokimya Bulguları

4.8.1. α -SMA:

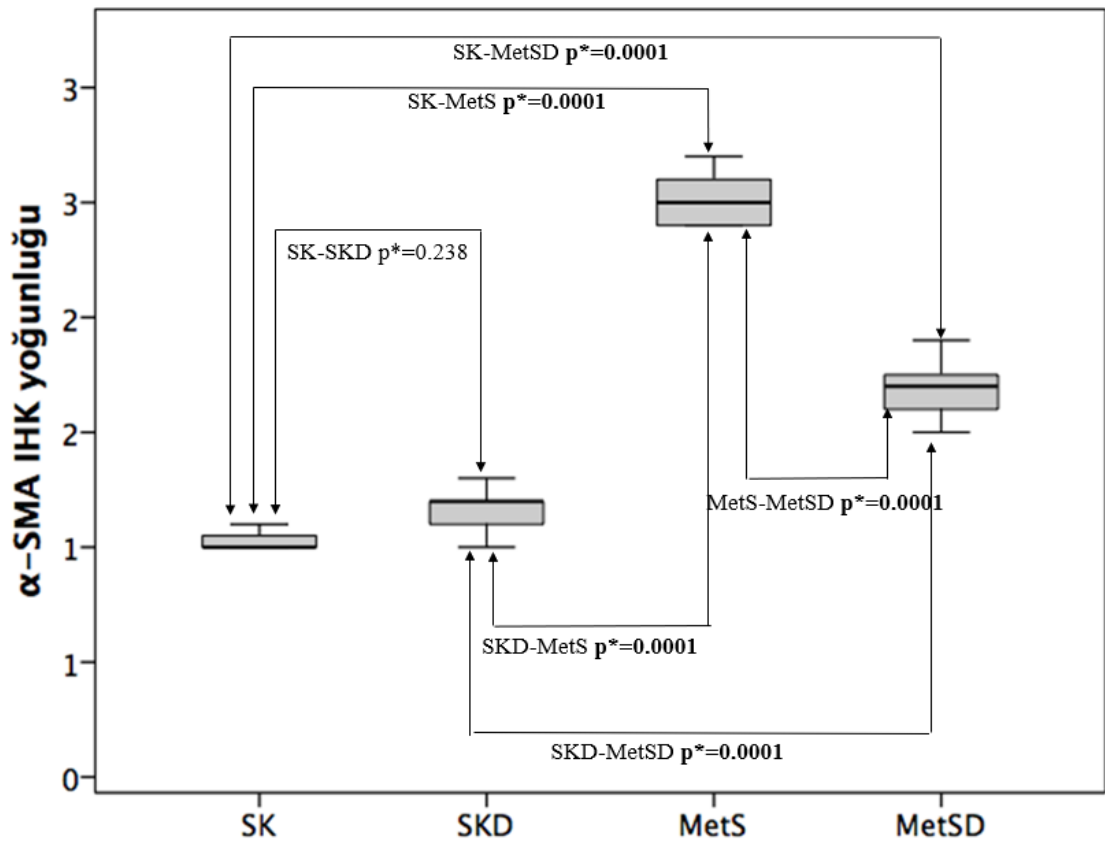
İmmünohistokimya yöntemi ile α -SMA antikorunu kullanılarak boyanan aort parafin doku kesitlerinde, sitoplazmaları boyanan hücreler α -SMA immün pozitif hücreler olarak kabul edildi (Şekil 4-11). α -SMA dağılımı açısından tüm gruplarda ortalama değerler; SK (1.0 ± 0.0), SKD (1.2 ± 0.1), MetS (2.5 ± 0.1), MetSD (1.7 ± 0.1) ($p=0.0001$) bulundu (Tablo 4-7). α -SMA pozitif hücrelerin boyanma şiddeti ve dağılımına göre değerlendirildiğinde MetS grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında çok ileri derecede anlamlı olarak yüksek saptandı ($p<0.0001$). MetSD grubunda α -SMA pozitifliğinin MetS grubuna göre azaldığı ($p<0.0001$) ama SK ve SKD gruplarına göre yüksek olduğu ($p<0.000$) görüldü. Kontrol grupları arasında α -SMA pozitifliği açısından farklılık saptanmadı (Şekil 4-10).

Tablo 4-7: Deney hayvanlarının α -SMA immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	SK (n=4)	SKD (n=5)	MetS (n=6)	MetSD (n=7)	P değeri*
α -SMA	1.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

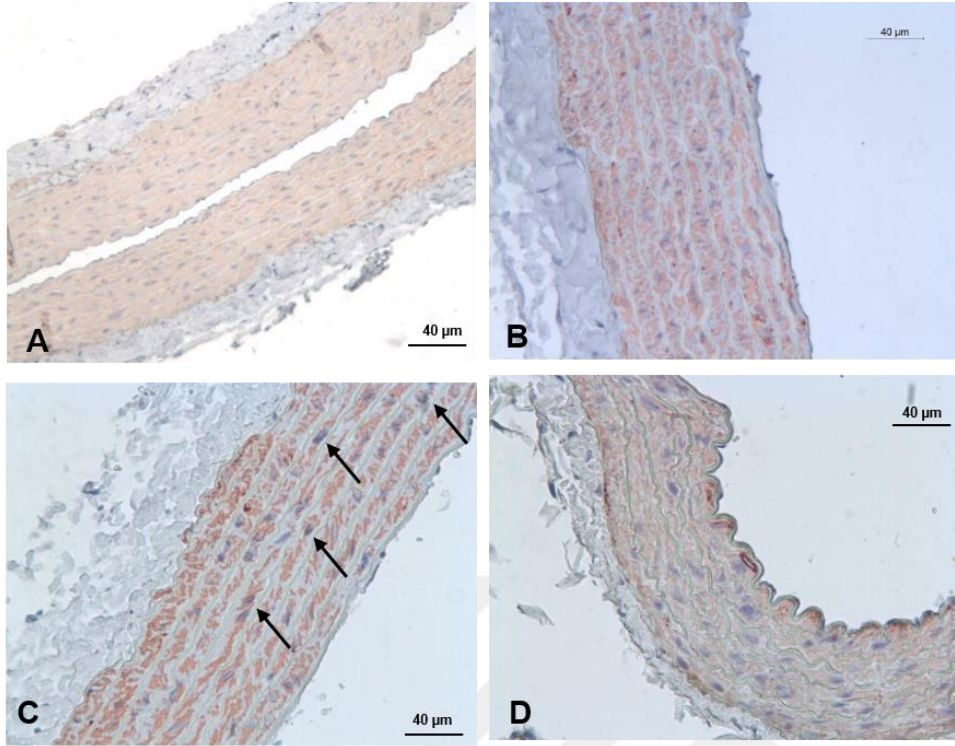
*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-10: α -SMA immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.



Şekil 4-11: α -SMA antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları. A: SK (Sağlıklı kontrol), B: SKD (Kontrol-vitaminD), C: MetS (Metabolik Sendrom), D: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD). Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi. A-D: X200.

4.8.2. p16:

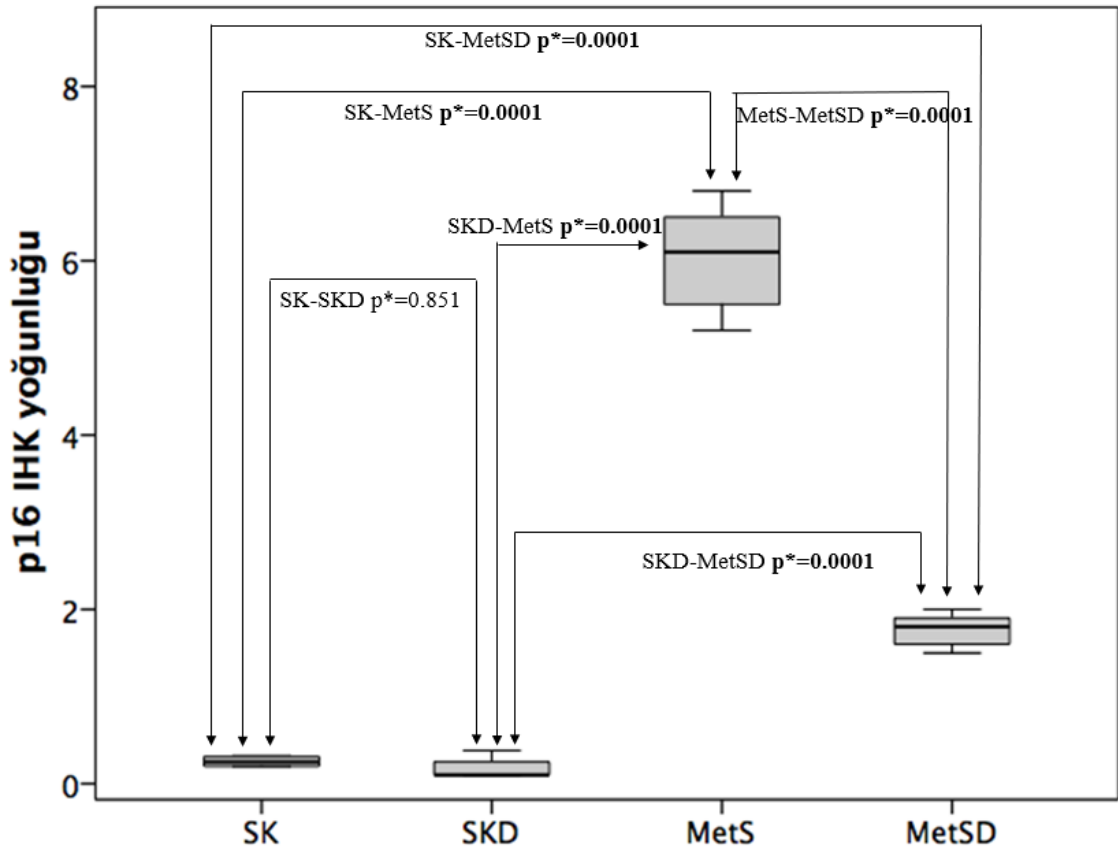
p16 antikoru ile immünohistokimya yöntemi kullanılarak boyanan doku kesitlerinde, nükleusları işaretlenen hücreler p16 immün pozitif hücreler olarak kabul edildi (Şekil 4-13). Aort dokularında p16 immünpozitif hücre sayılarının gruplara ait yüzdelik değerleri, SK (0.3 ± 0.1), SKD (0.2 ± 0.1), MetS (6.0 ± 0.6), MetSD (1.8 ± 0.2) olarak bulundu (Tablo 4-8). p16 immün pozitif hücre sayıları bakımında kıyaslandığında SK ve SKD grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, MetS grubunda p16 immün pozitif hücre sayısının diğer deney gruplarına göre istatistiksel olarak çok ileri anlamlı derece artmış olduğu saptandı ($p < 0.0001$). Ayrıca MetSD grubunda p16 pozitif hücre sayısının MetS grubuna göre anlamlı olarak düştüğü görüldü ($p < 0.0001$) (Şekil 4-12).

Tablo 4-8: Deney hayvanlarının p16 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	SK (n=4)	SKD (n=5)	MetS (n=6)	MetSD (n=7)	P değeri*
p16	0.3±0.1	0.2±0.1	6.0±0.6	1.8±0.2	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

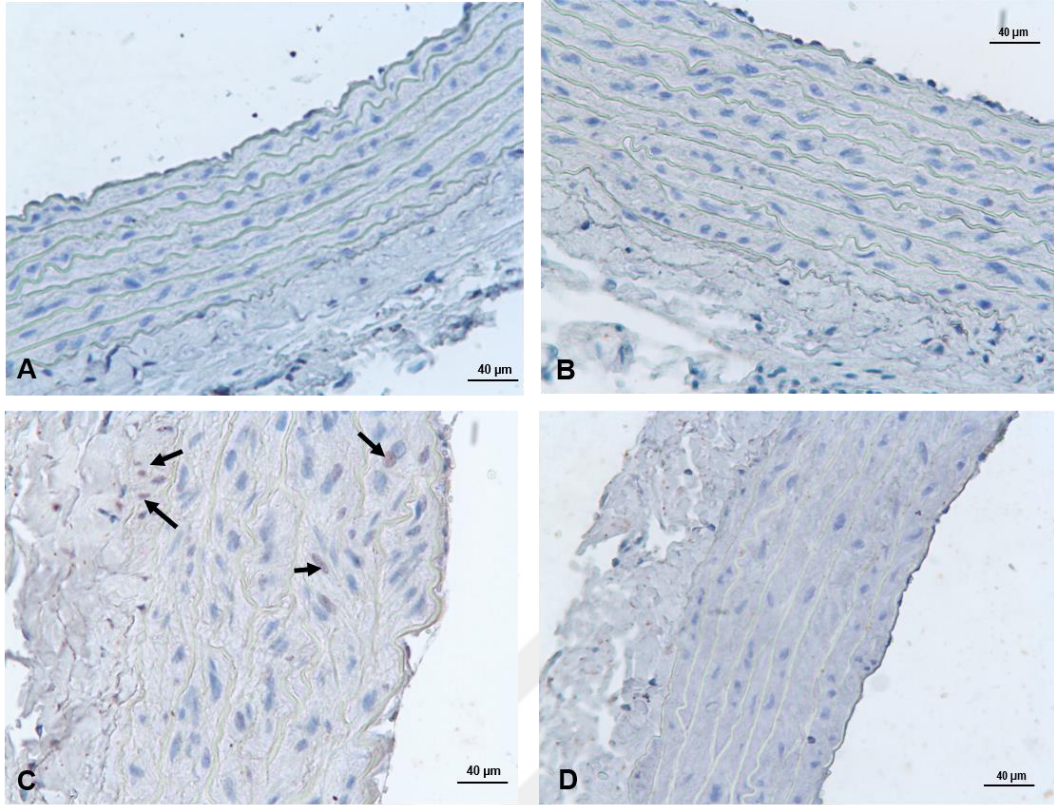
*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-12: p16 immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.



Şekil 4-13: p16 antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları.

A: SK (Sağlıklı kontrol), B: SKD (Kontrol-vitaminD), C: MetS (Metabolik Sendrom) grubuna ait doku kesitlerinde çok sayıda p16 immün pozitif hücreler görülmekte ($\uparrow$), D: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD). Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi. A-D: X200.

4.8.3. AMPK:

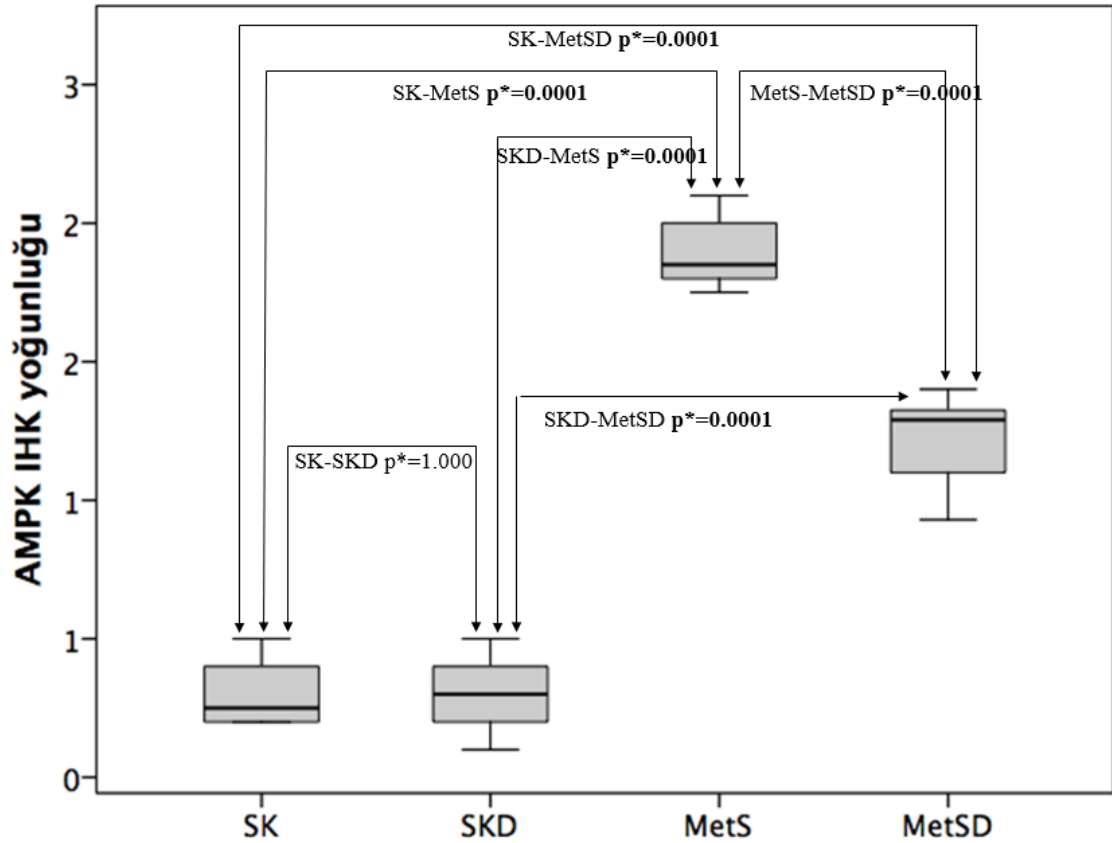
İmmünohistokimya yöntemi ile AMPK antikoru kullanılarak boyanan aort doku kesitlerinde, sitoplazmaları boyanan hücreler AMPK immün pozitif hücreler olarak kabul edildi (Şekil 4-15). AMPK dağılımı açısından tüm gruplarda ortalama değerler; SK (0.3 ± 0.1), SKD (0.3 ± 0.2), MetS (1.9 ± 0.1), MetSD (1.2 ± 0.2) olarak ve gruplar arasında anlamlı fark olduğu ($p=0.0001$) saptandı. MetS ve MetSD gruplarında aortu çevreleyen yağ dokularında AMPK immün pozitif hücrelerde kontrol gruplarına göre artış görülmüştür ($p=0.0001$). VitD uygulanan MetS grubunda tedavi uygulanmayan MetS grubuna göre AMPK immün pozitif hücre sayılarında azalma saptanmıştır ($p=0.0001$) (Şekil 4-14).

Tablo 4-9: Deney hayvanlarının AMPK immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	SK (n=4)	SKD (n=5)	MetS (n=6)	MetSD (n=7)	P değeri*
AMPK	0.3±0.1	0.3±0.2	1.9±0.1	1.2±0.2	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

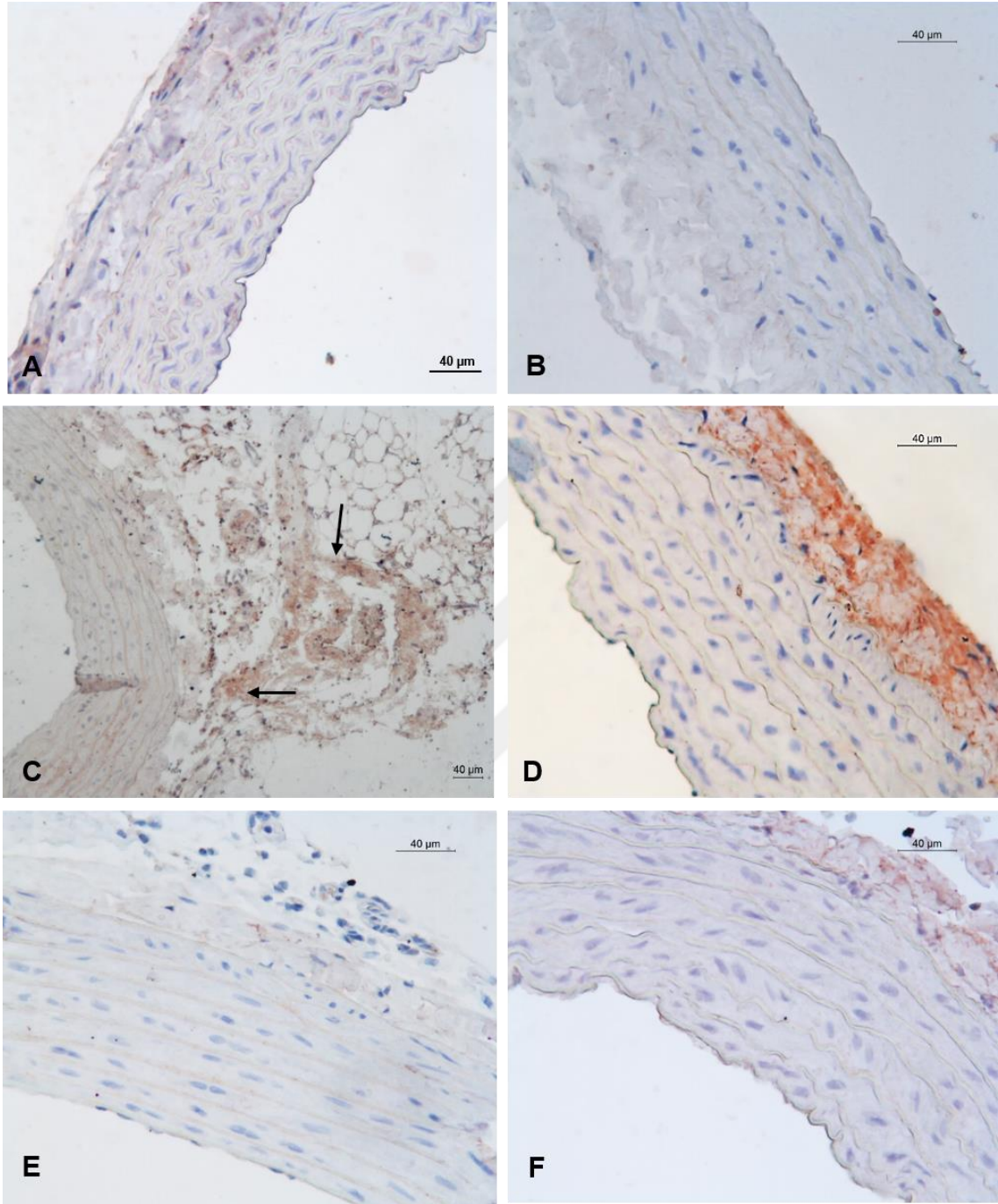
*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-14: AMPK immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.



Şekil 4-15: AMPK antikoruna ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları. A: SK (Sağlıklı kontrol), B: SKD (Kontrol-vitaminD), C-D: MetS (Metabolik Sendrom), E-F: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD). Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi. A-F: X200.

4.8.4. TIMP3:

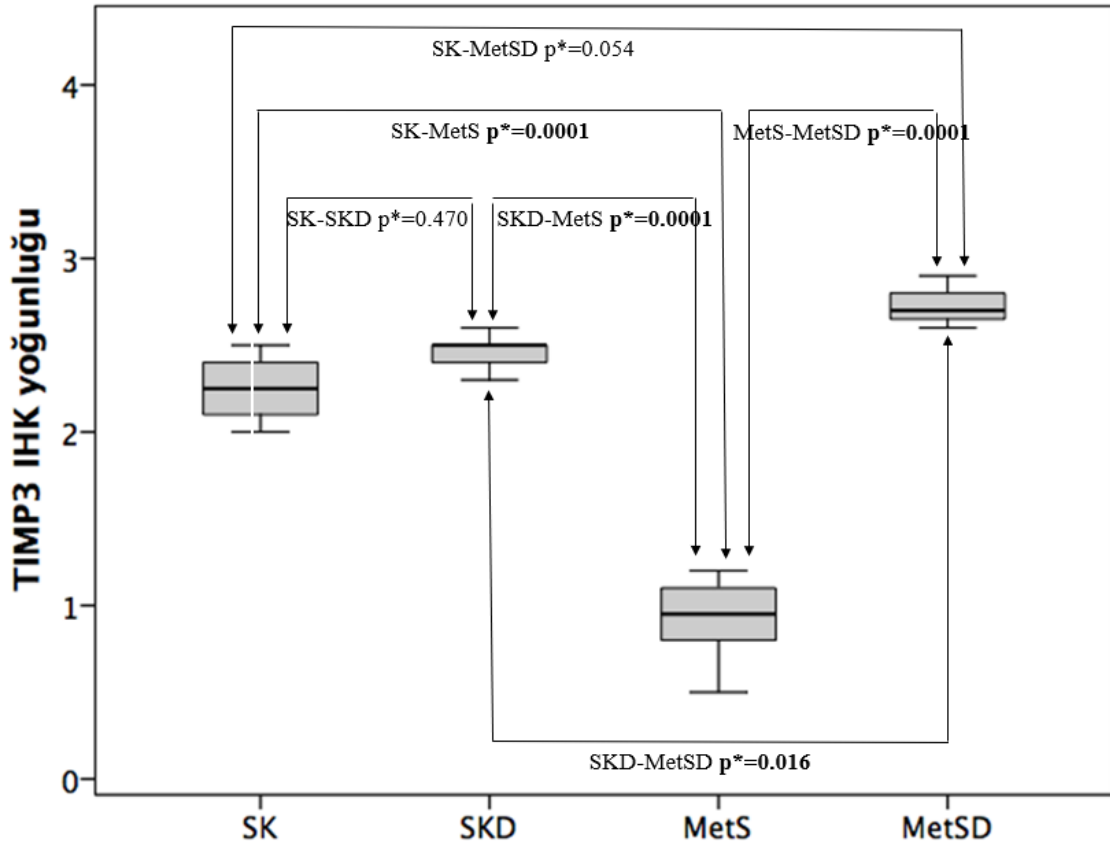
Aort doku kesitlerinde, TIMP3 antikoru kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile sitoplazmaları boyanan hücreler TIMP3 immün pozitif hücreler olarak kabul edildi (Şekil 4-17). TIMP3 dağılımı açısından tüm gruplarda ortalama değerler; SK (2.2 ± 0.2), SKD (2.5 ± 0.1), MetS (0.9 ± 0.2), MetSD (2.7 ± 0.1) olarak saptanırken gruplar arasında anlamlı fark olduğu ($p=0.0001$) bulundu. Tüm gruplarda endotelde ve adventisyada TIMP3 immün pozitif hücreler gözlenirken, MetS grubunda bu bölgelerdeki immün pozitif hücrelerin anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p<0.0001$) (Şekil 4-16).

Tablo 4-10: Deney hayvanlarının TIMP3 immün pozitif hücre yüzdesinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi

	SK (n=4)	SKD (n=5)	MetS (n=6)	MetSD (n=7)	P değeri*
TIMP3	2.2 ± 0.2	2.5 ± 0.1	0.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	0.0001

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

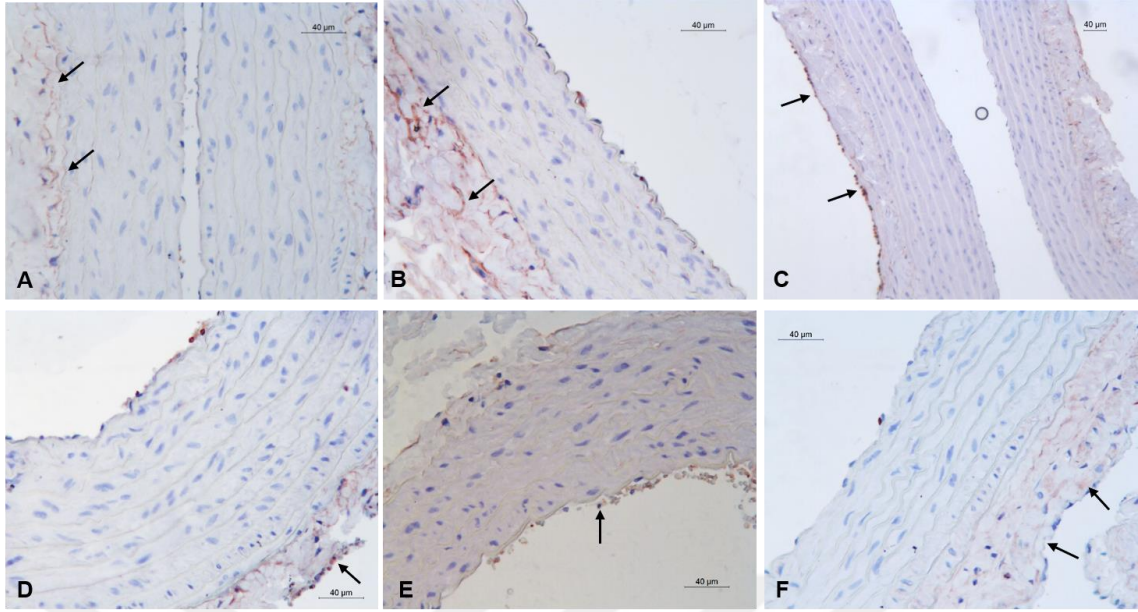
*Kruskal-Wallis testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri



Şekil 4-16: TIMP3 immün pozitif hücre yüzdesinin değişimi

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

*Dunnett T3 testi, şekil üzerinde gruplar arası karşılaştırmaları gösterilmiştir.



Şekil 4-17: TIMP3 antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretlenmiş aort dokuları. A-B: SK (Sağlıklı kontrol), C: SKD (Kontrol-vitaminD), D-E: MetS (Metabolik Sendrom), F: MetSD (Metabolik Sendrom-vitaminD). Streptavidin-biotin peroksidaz yöntemi. A-F: X200.

4.9. Korelasyon Analizleri

Gruplar arasında miRNA düzeyleri ile açlık kan glukozu düzeyleri ile immünohistokimyasal değerler arasındaki ilişkili bulunan korelasyon sonuçları Tablo 4-11 ve Tablo 4-12’de verildi.

Tablo 4-11: miR-21 ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar

	Korelasyon katsayısı, r	P
SKD grubunda başlangıç açlık kan glukozu	0.857	0.014
SKD grubunda 3. Hafta açlık kan glukozu	0.829	0.021
SK grubunda 15. Hafta açlık kan glukozu	-0.929	0.003
MSD grubunda 15. Hafta açlık kan glukozu	-0.857	0.014
SKD grubunda α-SMA	0.975	0.005

boyanma yoğunluğu		
SKD grubunda AMPK boyanma yoğunluğu	-0.900	0.037

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

Spearman's rho testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

Tablo 4-12: miR-146a ifade düzeyi ile diğer sürekli değişkenler arasındaki korelasyonlar

	Korelasyon katsayısı, r	P
SKD grubunda AMPK	0.900	0.037

(SK: Sağlıklı kontrol, SKD: Kontrol-vitaminD, MetS: Metabolik Sendrom, MetSD: Metabolik Sendrom-vitaminD)

Spearman's rho testi, $p \leq 0.05$ anlamlılık değeri

Sonuç olarak yüksek yağlı ve fruktozlu diyet ile oluşturulan MetS modelinde, aort yapısının bozulduğu ve vitamin D tedavisi ile bu hasarın büyük ölçüde düzeldiği saptandı.

5. TARTIŞMA

Ateroskleroz; metabolik sendrom (MetS) ve risk faktörleri olan obezite, tip 2 diyabet (T2DM) ve hipertansiyon sonucu kan damarlarında endotel hasarı ile başlayan süreçte uzun süre semptomsuz kalabilen ilerledikçe tıkanıklığa veya yırtılma ile koroner tromboza neden olan bir patalojidir (Base de Datos SA, 2001; Van der Wal AC ve ark. 1999; Libby P ve ark. 2019). MetS prevalansının son yıllarda ciddi artışı ateroskleroz ve diğer kardiyovasküler morbidite ve mortalite riskinin artmasına sebep olmuştur (Ritchie SA ve Connell JM 2007; Tune JD ve ark. 2017). Bu sebeple, günümüzde yüksek prevalans oranı ile ciddi hastalıklara sebep olabilen MetS için insan metabolizmasını taklit eden uygun deneysel hayvan modellerinin oluşturulması, hastalık patofizyolojisinin değerlendirilmesindeki zorlukların çözülmesi ve bilinmeyen faktörlerin ortaya çıkarılması için oldukça önemlidir (Wong SK ve ark. 2016). Gancheva S ve arkadaşları (2015), MetS'i yansıttığı düşünülen genetik olmayan ucuz, kolay ve tekrarlanabilir bir sıçan modeli geliştirmiştir. Modele göre, sıçanlara 8 hafta boyunca %10'luk fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren yem diyeti uygulanmıştır. Sıçanların haftalık vücut ağırlık verileri takip edilmiş, kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarında farklılık görülme de önemli ölçüde visceral yağlanma artışı görülmüştür. Çalışma sonunda yapılan insülin tolerans testi ile insülin duyarlılığında azalma görülmüştür. Bu model daha sonra birçok araştırmacıya da kaynak olmuştur (Wong SK ve ark. 2018; El-naggar A ve El-Dawy K. 2019; Uchendu NO ve ark. 2021). Bu tez çalışmasında, Gancheva S ve arkadaşlarının modeli modifiye edilerek sıçanlara 15 hafta boyunca %20'lik fruktozlu su ve %17 yağ ve %17 fruktoz içeren özel yem uygulanarak MetS'a bağlı ateroskleroz sürecinin başlatılması sağlandı.

Çalışmamızda VitD'nin aort dokusuna etkisini incelemek için 3. haftadan itibaren Kontrol ve MetS gruplarına VitD ile tedavi uygulamalarına başlandı. Buradaki amaç, yüksek fruktoz-yüksek yağlı diyetle beslenmenin neden olduğu damardaki hasarın VitD ile ne kadar geri döndürülebileceğini ve VitD etkisinin anlaşılmasını öngörmektir. Uygulanan vitamin D dozu (170 IU/hafta, oral) için daha önce yapılan çalışmalar referans alınmıştır (Elseweidy ve ark. 2017; Celebi ve ark. 2022). İnsanlarda 25(OH)D<30 ng/ml durumunda VitD eksikliği olarak tanımlanan VitD3 seviyeleri

santral (abdominal) obezite başlangıcının belirleyicisi olabilmekte ve santral obezite bel çevresinin ölçüm sınırı kadınlarda 80 cm, erkeklerde 94 cm yukarısı riskli olarak, kadınlarda 88 cm, erkeklerde 102 cm üzeri obez olarak kabul edilmektedir (Mansouri M ve ark. 2019; Sherling DH ve ark. 2017). Mansouri M ve arkadaşlarının çalışmasında (2019), VitD eksikliğinin abdominal obezite ile pozitif ilişkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda, sağlıklı kontrol grubuna göre MetS grubunda artan bel çevresinin VitD uygulandığında belirgin düzeyde azalttığı gösterildi. Bu çalışmada gruplar arasında, serum VitD seviyeleri ölçülemediği olsa da VitD'nin santral obeziteyi azaltıcı etkisi antropometrik olarak ölçülerek gösterilebilmiştir.

Bu çalışmada sıçanların açlık kan glukoz ölçümü deney başlangıcında, VitD başlangıcı olan 3. hafta ve 15. haftanın sonunda yapılmış ve MetS grubunda 15. haftanın sonunda ortalama 198,75 mg/dl bulunmuştur. Herhangi bir tedavi uygulanmayan kontrol grubunun (SK) açlık kan glukozu aynı haftada ortalama 110,43 mg/dl olarak tespit edilmiştir. Huang BW ve arkadaşlarının çalışmasında (2004), yüksek yağlı yüksek fruktozlu (%60 fruktoz, %20 yağ) diyetle indüklenmiş sıçanlarda kontrol grubuna göre açlık kan glukoz konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da MetS grubu açlık kan glukoz değerleri kontrol gruplarına göre yüksek olarak saptanmıştır. Obez fare modeli olan bir başka çalışmada (Marcotrichino J ve ark. 2014), 10 hafta boyunca VitD3 tedavisi ile glukoz homeostazının sağlandığı gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında da bu çalışma ile benzer şekilde, yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyetle beslenen MetS grubunda VitD uygulanılmaya başlanan 3. haftadan sonra kan glukoz değerlerinde düşme saptanarak başlangıçtakine göre 15 haftalık takip sonunda benzer bir etki gösterdiği belirlendi. Ek olarak, bu çalışmada, 15. haftanın sonunda disseksiyon sırasında sıçanların mesanelerinden alınan idrar örneklerinde glukoz değerlendirmesi yapıldığında diğer gruplarda idrarda glukoz hiç yokken, MetS gruplarından bazı örneklerde idrarda glukoz saptandı.

Kilo alımı, MetS'in tipik özelliklerinden olsa da literatürlerdeki sonuçlar oldukça değişkendir; deney hayvanları üzerinde diyet manipülasyonları her zaman vücut ağırlıklarında artışa yol açmamaktadır (Gancheva S ve ark. 2015). Sıçanlarda %25'lik fruktozlu su ve %20 yağ ve %17,5 fruktoz içeren özel yem ile yüksek yağlı yüksek fruktozlu diyetle yapılan bir MetS modeli çalışmasında (Panchal SK ve ark. 2011a), 16 hafta boyunca sıçanların vücut ağırlıklarında ilerleyici artışlar bulunmuşlardır. Bu tez

çalışmasında aynı süreli deney takibinde MetS grubunda özel diyet kaynaklı vücut ağırlıklarında artış tespit edilmiştir. Gancheva S ve arkadaşlarının çalışmasında (2015) ve ayrıca başka bazı çalışmalarda (Nagai Y ve ark. 2009; Ai J ve ark. 2005) ise vücut ağırlıklarında gruplar arası farklılık gösterilememiştir. Bu durumun da açıklaması olarak deney gruplarındaki hayvanların yüksek yağlı yüksek fruktozlu gıdaların tüketiminin daha az olmasından kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Bizde çalışma gözlemimizde, sert standart yem pelleti formatında olmayan nispeten daha yumuşak hayvansal yağ ve fruktoz ile hazırlanan katı yemleri nispeten daha az oranda tükettikleri dikkati çekmesine rağmen kilo alımları beklendiği gibi artmıştır. Sonuç olarak, yemlerin sıçanların beslenmesine uygun tipte hazırlanmasının önemi gözlenmiştir. Diğer yandan, Marcotorchino ve arkadaşlarının çalışmasında (2014) farelerde diyete bağlı obezitede VitD3 takviyesinin glukoz dengesinin iyileştirmesiyle beraber kilo alımının da sınırlandığı gösterilmiştir. Bu durum, lipid oksidasyonu ile artan enerji harcanmasından kaynaklanabileceği, buna bağlı olarak VitD ile bozulmuş enerji metabolizması olan MetS'in düzelebileceği öne sürülmüştür. Bu tez çalışmasında da bu bulgular ile benzer şekilde, VitD tedavisi uygulanan MetS grubunda haftalık takiplerde deney sonlanıncaya kadar vücut ağırlıklarında azalma tespit edildi.

Uluslararası diyabet federasyonuna (IDF) göre visceral obezite ile birlikte yüksek trigliseritler, düşük HDL-kolesterol, hipertansiyon ve insülin direncinin bir sonucu olarak açlık hiperglisemisi gibi risk faktörlerinden en az ikisinin birlikte bulunması olarak tanımlanmakta (Gancheva S ve ark. 2015; Alberti KG ve ark. 2009) olan MetS ile ilgili bu tez çalışmasında, kan lipid düzeylerinin belirlenmesi ve tansiyon ölçümleri yapılamamış olsa da vücut ağırlığı, bel çevresi ve kan glukozu sonuçlarının anlamlılığı, çalışmamızda MetS modelinin oluşturulduğunun en önemli göstergeleridir. Ayrıca IDF tanımına göre, MetS tanısı için zorunlu olduğuna karar verilen bel çevresi ölçümü ile santral obezite değerlendirilmektedir (Desroches S ve Lamarche B, 2007). Santral obeziteyi değerlendirmek için basit ve pratik bir ölçüm sağlayan bel çevresi değerleri ile takip yapılmıştır. MetS'in önemli bir semptomu olan santral obezite açısından yağlanmaya bağlı bel çevresinde anlamlı artış olduğu çalışmamızda tespit edildi. Panchal SK ve arkadaşlarının (2011a) sıçanlarda yüksek yağlı yüksek fruktozlu diyete bağlı MetS çalışmasında da, 16 hafta boyunca karın çevresinde ilerleyici artışlar saptanmıştır. Böylelikle bu tip diyete bağlı gelişen insan MetS'inde gözlenen

değişikliklere benzer metabolik sonuçlar yarattığı söylenebilir. Sonuçta, kardiyovasküler hastalık ve T2DM için risk faktörlerinin kümelenmesi olarak MetS, kardiyovasküler mortaliteyi artırabilmektedir (Panchal SK ve ark. 2011a; Isomaa B ve ark. 2001). Bu tez çalışmasında tespit edilen haftalık bel çevresi ölçümlerindeki artışa rağmen, ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak SK-MetS arasında anlamlı fark olmadığı, MetS-MetSD ve SKD-MetS arasında farkların anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu bulgu, VitD tedavisinin etkisinin olumlu olduğunu düşündürmektedir. Marcotorchino J ve arkadaşlarının farelerde yaptığı (2014), 10 hafta boyunca VitD3 takviyesi ile obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların başlamasını önleyici beslenme stratejisini gösteren bir çalışmadır. Sonuçta, bu tez çalışmasında oluşturulan model hayvanlarda, yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyetle rağmen MetS'in iyileştirilmesinde VitD'nin olumlu etkilerinin olduğu gözlenmiştir.

Deri kalınlığı ölçümü, sıçanlarda obezitenin ilerlemesini değerlendirmek için yararlı ve düşük fiyatlı basit bir in vivo bir tekniktir. Deri altı yağı, beslenme durumlarıyla ilgili farklılıklar göstereceği hipoteziyle planlanmış bir çalışmada (Tekus E ve ark. 2018), sıçanlarda normal beslenme, kalori kısıtlaması ve yüksek yağlı diyetle beslenme olmak üzere 3 beslenme durumu oluşturulmuştur. Çalışmaya göre, deri kalınlıkları, Marshall M ve arkadaşlarının (1969) hala yaygın olarak kullanılan ve onaylanmış bir yöntemi olmasa da (Tekus E ve ark. 2018) STM ("skinfold thickness-based method") tekniği ile ölçülerek gruplar arası önemli farklar ile yüksek yağlı diyetle beslenen sıçanlarda deri kalınlığının daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Bu teknikte, deri kumpasıyla 5 bölge (sağ skapular, sağ karın, sağ triseps ve sağ bacak ve sağ iliak) ölçülürken, bu tez çalışmasında ise deri kalınlıkları haftalık olarak sadece sırt bölgesinden deri kumpası ile ölçülerek değerlendirildi. Çalışmamızda daha önceki bu çalışmadaki gibi farklı vücut bölgelerinden ölçüm yapılmamış olsa da, haftalık ölçümlerde MetS'da belirgin bir artış bulunmuş olup 15. hafta sonunda daha önceki çalışmadaki gibi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılar tespit edildi.

Bu çalışmanın bir kısıtlılığı olarak, her bir sıçanın günlük olarak yem ve su tüketimi metabolik kafeslerde büyütülmediği için kalori alımı hesaplanamamıştır. Özel diyet alan grupların yem ve fruktozlu su tüketimleri kontrol edilerek tüm deney süresince genel olarak toplamda yaklaşık 153.373 kcal aldıkları hesaplanmıştır. MetS grubu yaklaşık

16.735 gr özel yem ve 8.625 ml %20 fruktozlu su tüketerek toplamda 74.679 kcal alırken, MetSD grubu yaklaşık 17.998 gr özel yem ve 7,250 ml %20 fruktozlu su tüketimi ile 78.694 kcal aldıkları hesaplanmıştır (Gancheva S ve ark. 2015 çalışmasında, 100 gr özel yem 405 kcal, 100 ml %10 fruktozlu su 40 kcal olduğu belirtilmektedir). VitD takviyesi alan grubun daha fazla kalori almasına rağmen deney sonunda bel çevresi ölçümlerinin ve vücut ağırlıklarının VitD almayan MetS grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi.

Bu tez çalışmasında, literatürdeki bilgilere göre seçilen miR-21 ve miR146a'nın MetS için oluşturulan sıçan gruplarında aort örneklerindeki ifade düzeylerinin VitD ile değişimleri araştırıldı. Özellikle kanser çalışmalarında sık araştırılan miR-21, bazı çalışmalara göre (Wang N ve ark. 2013; Zhang A ve ark. 2011) kanser hücrelerinde ifadesinin azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, endotel hücrelerinin fonksiyonel düzenlemesinde rol alan miRNA'ların araştırıldığı bir çalışmada miR-21'in katkısı belirlenmiş (Voellenkle C ve ark. 2012), bir başka çalışmada (Hu J ve ark. 2016) ise miR-21'in endotel hücrelerinde yüksek oranda ifade edildiği gösterilmiştir. Feinberg MW ve arkadaşlarının vasküler yaralanma çalışmasına (2016) göre, düz kas hücresinin düzenlenmesinde rol alan miR-21'in düz kas hücresi proliferasyonunu artırıcı role sahip olduğu belirtilse de, aterosklerotik lezyon oluşumundaki görevinin net olmadığını ve aterosklerotik ilerlemeyi azaltıp azaltmadığını değerlendirebilmek için daha fazla çalışılması gerektiği belirtilmektedir. Ayrıca, miR-21'in azalmış ifadesinin obezitede artmış enflamatuar sitokin üretimi ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Ramos-Lopez O ve ark. 2020). Aortik, karotid ve femoral arterlerdeki aterosklerotik plaklarda yapılmış bir başka çalışmada 866 miRNA'dan miR-21, -34a, -146a, -146b, ve -210'un up-regüle oldukları bulunmuştur (Raitoharju E ve ark. 2011). Ayrıca ateroskleroz gelişiminde çeşitli basamaklar ile bağlantısı olduğu belirlenmiş olan miR-21 (Weber 2008, Gabriely 2008, Schmeier 2009, Hashimi 2009, Cardellini 2009) ile ilişkileri gösterilmiştir. Ancak, çalışma bulgularımıza göre, aort dokusunda miR-21 ifade düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Deneysel olarak oluşturulan MetS modeli ile aterogenezin ilk aşamasında meydana gelen endotel hasarı gelişiminde miR-21 düzeylerinin değişmediği bu çalışmada gösterilmiş olup daha önceki çalışmalarda artan miR-21 düzeylerinin ileri aterosklerotik plaklarda olduğu tespit edilmiştir (Raitoharju E ve ark. 2011). Çalışmamızda gruplar arasında demografik ölçümlerde ve aort doku

morfolojisinde değişimlerin endotel hasarını destekleyecek bulgular gösterilse de endotel hasarının belirlenmesi için daha ileri moleküler çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ramos-Lopez O ve arkadaşlarının çalışmasında (2020), anti-enflamatuar olan miR-146a obezitede yağ dokusunda ifadesinin azaldığı gözlenmiştir. Diğer yandan başka çalışmalarda, aort damarında insan ve kemirgenlerde aterosklerotik plaklarında artmış ifadeye sahip olduğu gösterilmiştir (Raitoharju E ve ark. 2011; Feinberg MW ve ark. 2016). Diyetle bağlı obez farelerde yapılan bir çalışmada (Karkeni E ve ark. 2018), yağ dokusunda miR-146a ifadesinin arttığı, VitD uygulanması ile miR-146a ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise, MetS grubu ve kontrol grubu arasında miR-146a ifade düzeyleri arasında fark olmadığı, fakat VitD kullanımının miR-146a ifadesini arttırdığı bulunmuştur. İleri aterosklerotik damarlarda ifadesi artan miR-146a'nın (Raitoharju E ve ark. 2011; Feinberg MW ve ark. 2016) çalışmamızda, MetS grubunda ifade düzeyinde değişiklik olmadığı saptansada, miR-146a'nın VitD uygulamasından etkilenmesi, ateroskleroza bağlı hastalıkların önlenmesine katkısı açısından önem taşıyabileceğini düşündürmektedir.

Yüksek yağlı diyetli sıçan modelinde yapılmış bir çalışmada (Zhang H ve ark. 2020), sağlıklı kontrol gruplarında aortların tunika intiması pürüzsüz ve az sayıda kollajen ve düz kas lifinin yanı sıra eşit olarak dağılmış elastik lifler içerirken; yüksek yağlı sıçanlarda, MetS modelimize benzer olarak hücre duvarının kalınlaşması, düz kasın belirgin hiperplazisi, hücre aderansı bozukluğu, kalsifikasyonlu fibröz dokunun hiperplazisi, endotel hücrelerinin pul pul dökülmesi ve intimanın kalınlaşması (intimal-medial kalınlık) gibi klasik patogenetik morfoloji hematoksilen-eosin boyama ile de gösterilmiştir. Bu çalışmada ise kontrol gruba ait damar kesitlerinde elastik lifler kıvrıntılı, epitel intakt, tunika mediadaki kas hücreleri fusiform iç şeklini korumuş sağlıklı görünümde tespit edildi. MetS grubunda elastik liflerin ondüle özelliklerini kaybedip belirgin şekilde düzleştiği, bunların aralarındaki düz kas hücrelerinin bazı alanlarda vakuolize olduğu ve sağlıklı görünümünden uzaklaştığı saptandı. Bu grupta ayrıca yer yer epitel hücrelerinin arasında piknotik nüveler görüldü. Bu sebeple, yüksek yağlı ve yüksek fruktozlu diyet ile oluşturulan modelimizde endotel hasarı oluşmuş olabileceği düşünöldü. VitD uygulanan grupta ise yer yer düzleşmeler devam etse de damar morfolojisinin kontrol grubuna benzer özellikler gösterdiği tespit edildi. Ayrıca,

dokularda kalsiyum birikimlerinin histolojik olarak göstermek için tasarlanmış von kossa boyama ile değerlendirilmesinde MetS grupta aort duvarında aterosklerotik alanlara işaret eden kalsifiye alanlar saptandı. Koroner arterlerdeki kalsifikasyonun genellikle ateroskleroz sebebiyle olduğu bilinmektedir (Falk E 2006) ve hayvan modelimizdeki histolojik bulgular, ateroskleroz sürecinin başlamış olduğunu desteklemektedir.

Alfa düz kas aktini, normalde vasküler düz kas hücreleri ile eksprese edilirler, miyofibroblastlar gibi bazı kas dışı hücrelerde de eksprese edilirler. *ACTA2* geni tarafından kodlanır ve fibrogenizde rol alır. Sağlıklı bir arterde de düz kas hücreleri bulunur ve mediyadaki tek hücrelerdir. Doku yeniden şekillenmesi ve kasılmasında yapısal bir proteindir ve aterogenez sırasında düz kas hücreleri damar duvarında çoğalarak birikir (Wang J ve ark. 2006; Milutinović A ve ark. 2020). Bu çalışmada, MetS grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında α -SMA immün pozitif hücrelerin sayısında artış olduğu görüldü. Fernandes CR ve arkadaşlarının (2017) çalışmasında bizim çalışmamıza benzer olarak yüksek yağlı diyetle beslenmiş sıçanlar ve kontrol sıçanların aortlarında α -SMA pozitif hücrelerinin olduğu ve yüksek yağlı diyetle beslenenlerde immün pozitif hücrelerin daha fazla olduğu gösterilmiştir.

p16, siklin-bağımlı kinaz inhibitörü olan ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde gerekli olan bir tümör baskılayıcı proteindir. Vasküler yaşlanma (*senesens*) ile ilişkili olan p16, *CDKN2A* geni tarafından kodlanır, bu gendeki bir delesyon ile hücre bölünmesi hızlanarak birçok kanser türüne neden olmaktadır (Nobori T ve ark. 1994; Stone S ve ark. 1995). Bu sebeple daha çok kanser çalışmalarında incelenmektedir. p16'nın DNA hasarı veya senesens yoluyla aktivasyonu dokularda p16 birikmesine yol açar ve hücrelerin yaşlanmasına neden olur (Rayess H ve ark. 2012). Yaşlanma MetS için de bir risk faktörüdür (Bonomini F ve ark. 2015) ve bu bir MetS çalışmasında (Meng Y ve ark. 2018) p16 yolunun MetS kaynaklı hücre yaşlanması olduğu gösterilmiştir. Hücresel yaşlanma, çevresel uyaranlardan veya yaşlanma gibi hasarlardan kaynaklanması (Meng Y ve ark. 2018) sebebiyle bir epigenetik faktör olarak yüksek yağlı-fruktozlu beslenme hücresel yaşlanmaya yol açmıştır. Obezite oluşturulan başka bir hayvan modeli çalışmasında (Chen J ve ark. 2007) ZDF (zucker diyabetik yağlı) sıçanların aort damarlarının p16 ile boyanmasıyla endotel hücrelerinin erken yaşlanmasının ortaya

çıkıldığı doğrulanmıştır. Aynı çalışmada ayrıca, fruktoz ile muamele edilen sıçanların, ZDF'ye benzer endotel hücrelerin erken yaşlanmasını geliştirdiğini gösterilmiştir (Chen J ve ark. 2007). Bu çalışmada ise, MetS grubunda diğer gruplar ile kıyaslandığında p16 immün pozitif hücrelerin sayısında artış olduğu görüldü ve bu sonuçlar mevcut literatür bilgilerine göre hücre yaşlılığın meydana geldiğini desteklemektedir.

AMPK, hücre büyüme ve proliferasyon, mitokondriyal fonksiyon ve biyogenez ve inflamasyon, oksidatif ve ER stresi ve otofaji dahil olmak üzere insülin direnci (IR) ile bağlantılı faktörler dahil olmak üzere çok çeşitli diğer fizyolojik olayları düzenler (Ruderman NB ve ark. 2013). AMPK obezite, enflamasyon, diyabet gibi metabolik hastalıklarda düzensiz olarak çalışır (Kismiroglu C ve ark. 2020). Aşırı beslenme ve obezite; insülin direnci, diyabet ve kanser gibi kronik hastalıklar için risk faktörlerindendir. Ana besin kaynaklarından olan glikoz, yağ asitleri ve amino asitlerin birikmesiyle AMPK baskılanır sonucunda insülin direncine neden olur (Coughlan KA ve ark. 2013; Kismiroglu C ve ark. 2020). AMPK aktivasyonunun aterosklerozun ana nedenlerinden biri olan enflamasyonu azalttığını ve ateroskleroz gelişimini belirgin şekilde azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Ou H ve ark. 2018; Ma A ve ark. 2017; Weng SY ve Schuppan D. 2013; Mounier R ve ark. 2013). Bunun yanında, yağda eriyen vitaminlerden VitD'nin AMPK'yi aktive ettiği bir çalışmada (Manna P ve ark. 2017), diyabetik farelerde 25 (OH)₂ D₃ ve kolekalsiferol takviyesinin oksidatif stresi azalttığı ve SIRT1'in ekspresyonunun artışına bağlı olarak AMPK'nin fosforilasyonunu arttırdığı görülmüştür. AMPK'nin aktivasyonunun artırılmasında, VitD'nin önemli bir etkisi olduğu bildirilmiş olsa da (Kismiroglu C ve ark. 2020), çalışmamızda sağlıklı sıçanlara VitD uygulaması AMPK'nin aktive olan alfa alt ünitesi pozitif immün hücre sayısı arasında fark olmadığı belirlendi. Ancak, MetS ve MetSD gruplarında aortu çevreleyen yağ dokularında AMPK immün pozitif hücrelerde artış görüldü. Kontrol gruplarına göre VitD uygulanan ve uygulanmayan MetS grubunda (MetSD) AMPK ekspresyonu yüksek bulunsada, MetS grubuna kıyasla MetSD grubunda AMPK ekspresyonunun daha az olduğu saptandı. İmmünohistokimyasal olarak yapılan bu değerlendirmelerin, endotel hasarı olan damar dokusunda hücre AMPK aktivasyonunu göstermek için yeterli olmasa da ileride yapılabilecek çalışmalar için ön bilgiler sağlamaktadır.

Metalloproteinaz doku inhibitörü olan TIMP3 (Tissue inhibitors of Metalloproteinases 3), matriks metalloproteinazları (MMP) inhibe etme yeteneklerine göre sınıflandırılan bir protein ailesinin dört üyesinden biridir (TIMP1,2,3,4) (Qi J ve ark. 2003). TIMP3, güçlü bir anjiyogenez inhibitörünü kodlar ve TIMP3'ün vasküler endotel faktörü (VEGF) aracılı anjiyogenezi inhibe ettiğini gösteren çalışmalar (Qi J ve ark. 2003) mevcuttur. TIMP3, bu tezde çalışılan miR21'in de hedeflerinden biridir (Nagao Y ve ark. 2012; Hu J ve ark. 2016). miRNA'lar TIMP3'e bağlanır ve ekspresyonunu azaltır. Çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda TIMP3 düzeylerinin azaldığı ve TIMP3 artışının hastalığı iyileştirmesi ve kardiyovasküler hastalıklarda TIMP3 için terapötik bir potansiyel aday olabileceği çalışmalarda gösterilmiştir (Fan D ve ark. 2020; Takawale A ve ark. 2017). TIMP3'ün, T2DM'li hastaların karotis aterosklerotik plaklarında azaldığı gösterilmiştir (Cardellini M ve ark. 2009). TIMP3 eksikliği, ApoE-nakavt farelerinde enflamasyonu arttırmakta ve ateroskleroza ağırlaştırmaktadır (Stöhr R ve ark. 2014), TIMP3'ün makrofajlarda aşırı ifadesinde aterosklerozun azaldığı belirlenmiştir (Casagrande V ve ark. 2012). Ayrıca, başka bir çalışmada (Son D ve ark. 2017) TIMP3, endotel iltihabı, düz kas hücresi aktivasyonu ve ateroskleroz gelişimi üzerindeki inhibitör etkilerine aracılık ettiği bildirilmiştir. Bu da, kronik enflamatuvar bir durum olarak tanımlanan aterosklerozda TIMP3'ün anti-aterojenik etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir. Bu durumda, TIMP3 seviyelerinin aterosklerozu olan hastalarda azalması beklenir. Bu çalışmada da, MetS grubunda TIMP3 immün pozitif hücrelerin diğer gruplara oranla azaldığı immünohistokimya yöntemi ile gösterildi. Ayrıca, hamster aortlarında yapılan bir çalışmada (Faia KL ve ark. 2002) TIMP3 pozitif immünoreaktivitenin hem sağlıklı hem aterosklerotik plaklarda gözlenmesi, bu bulguları çalışmamızdaki hayvan modeli de desteklemektedir. Faia ve arkadaşlarının çalışmasında, TIMP3 immün pozitifliğin bölgesi aterosklerotik damarlarda ağırlıklı olarak endotel hücreler, köpük hücreleri ve tunika media ile ve TIMP2 ve TIMP4 tunika adventisya ile ilişkilendirilirken (Faia KL ve ark. 2002), bu tez çalışmasında aort damarlarında ileri aterom plakları saptanmamış olsa da TIMP3, endotel hücreler ve adventisyada pozitiflik saptandı. Yapılan çalışmalardaki TIMP3'ün ifade düzeylerindeki farklılıklar, aterosklerozun gelişim sürecine bağlı olabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada diyetle ilgili oluşturulan sıçan MetS modelinde aort dokusuna etkisi ve VitD uygulamasına verdiği yanıt araştırıldı. MetS modeli başarılı bir

şekilde 10-12 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanlarda oluşturularak 12 hafta boyunca oral VitD uygulandı. IDF'nin tanımına göre MetS tanısı için zorunlu olan bel çevresi ölçümü sonuçlarıyla santral obezite bu çalışmada gösterilmiştir. Trigliserit, kolesterol, hipertansiyon gibi diğer MetS bulguları, bu modelde ölçülememiş olsa da bel çevresi ve kan glukoz değerleriyle başarılı bir model olduğu varsayılmaktadır. Bu çalışmada, metabolik sendromun aortun damar yapısını bozduğu, VitD uygulamasının oluşan bu hasarın düzeltilmesine olumlu yönde etki ettiği, moleküler ve immünohistokimyasal olarak aday miRNA'ların ve hedef proteinlerin ifade düzeylerindeki değişimler ile gösterildi.



KAYNAKLAR

Abbasi F, Brown BW Jr, Lamendola C, McLaughlin T, Reaven GM. Relationship between obesity, insulin resistance, and coronary heart disease risk. *J Am Coll Cardiol*. 2002 Sep 4;40(5):937-43. doi: 10.1016/s0735-1097(02)02051-x.

Ai J, Wang N, Yang M, Du ZM, Zhang YC, Yang BF. Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World J Gastroenterol*. 2005 Jun 28;11(24):3675-9. doi: 10.3748/wjg.v11.i24.3675. PMID: 15968719; PMCID: PMC4316015.

Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WP, Loria CM, Smith SC Jr; International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; International Association for the Study of Obesity. Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009 Oct 20;120(16):1640-5. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192644.

Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*. 2006 May;23(5):469-80. doi: 10.1111/j.1464-5491.2006.01858.x.

Altınel R, Nizamoğlu E, Tunç-ata M ve Küçükata V. Yüksek fruktoz diyeti metabolik sendrom modelinde artmış kan glikozuna neuromedin U yanıtının araştırılması. *Pam Tıp Derg*. 2021; 14 (2), 482-493. DOI: 10.31362/patd.813095.

Arner P ve Kulyté A. MicroRNA regulatory networks in human adipose tissue and obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2015 May;11(5):276-88. doi: 10.1038/nrendo.2015.25.

Aydemir, S. (2019). Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi. Erzurum.

Balkau B, Valensi P, Eschwège E, Slama G. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes Metab.* 2007 Dec;33(6):405-13. doi: 10.1016/j.diabet.2007.08.001.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004 Jan 23;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5.

Base de Datos, SA. Kardiyovasküler Sistemin Patolojisi. Miniatlas- Kardiyoloji. 1.Baskı. 2001; ss: 116-136.

Bayoglu B, Arslan C, Gode S, Dagistanli FK, Arapi B, Deser SB, Dirican A, Cengiz M. The severity of Internal Carotid Artery Stenosis is Associated with the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A Gene Expression. *Journal Atheroscler Thromb*, 2014; 21:659-671.

Bee YT Jr, Haresh KK, Rajibans S. Prevalence of Metabolic Syndrome among Malaysians using the International Diabetes Federation, National Cholesterol Education Program and Modified World Health Organization Definitions. *Malays J Nutr.* 2008 Mar;14(1):65-77.

Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis.* 2015 Mar 10;6(2):109-20. doi: 10.14336/AD.2014.0305.

Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006 Jun;36(3):485-501. doi: 10.1677/jme.1.01909.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007 Apr;15(4):798-808. doi: 10.1038/oby.2007.608.

Bullón-Vela V, Abete I, Tur JA, Pintó X, Corbella E, Martínez-González MA, Toledo E, Corella D, Macías M, Tinahones F, Fitó M, Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, Daimiel L, Zulet MA, Martínez JA; PREDIMED Plus investigators. Influence of lifestyle factors and staple foods from the Mediterranean diet on non-alcoholic fatty liver disease among older individuals with metabolic syndrome features. *Nutrition*. 2020 Mar;71:110620. doi: 10.1016/j.nut.2019.110620.

Cardellini M, Menghini R, Martelli E, Casagrande V, Marino A, Rizza S, Porzio O, Mauriello A, Solini A, Ippoliti A, Lauro R, Folli F, Federici M. TIMP3 is reduced in atherosclerotic plaques from subjects with type 2 diabetes and increased by SirT1. *Diabetes*. 2009 Oct;58(10):2396-401. doi: 10.2337/db09-0280.

Casagrande V, Menghini R, Menini S, Marino A, Marchetti V, Cavallera M, Fabrizi M, Hribal ML, Pugliese G, Gentileschi P, Schillaci O, Porzio O, Lauro D, Sbraccia P, Lauro R, Federici M. Overexpression of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in macrophages reduces atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012 Jan;32(1):74-81. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.238402.

Castro MC, Massa ML, Del Zotto H, Gagliardino JJ, Francini F. Rat liver uncoupling protein 2: changes induced by a fructose-rich diet. *Life Sci*. 2011 Oct 24;89(17-18):609-14. doi: 10.1016/j.lfs.2011.07.024.

Celebi G, Anapali M, Dagistanli FK, Akdemir AS, Aydemir D, Ulusu NN, Ulutin T, Komurcu-Bayrak E. Effect of vitamin D supplementation on OPG/RANKL signalling activities in endothelial tissue damage in diet-induced diabetic rat model. *Pharmacological reports: PR*. 2022;74(1), 124–134. <https://doi.org/10.1007/s43440-021-00332-1>

Chen J, Park Hc, Patschan S, Brodsky Sv, Gealikman O, Kuo Mc, Li H, Addabbo F, Zhang F, Nasjletti A, Gross Ss, Goligorsky Ms. Premature Vascular Senescence In Metabolic Syndrome: Could It Be Prevented And Reversed By A Selenorganic

Antioxidant And Peroxynitrite Scavenger Ebselen? Drug Discov Today Ther Strateg. 2007;4(1):93-99. Doi: 10.1016/J.Ddstr.2007.10.006.

Cheng S, Massaro JM, Fox CS, Larson MG, Keyes MJ, McCabe EL, Robins SJ, O'Donnell CJ, Hoffmann U, Jacques PF, Booth SL, Vasan RS, Wolf M, Wang TJ. Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study. Diabetes. 2010 Jan;59(1):242-8. doi: 10.2337/db09-1011. Epub 2009 Oct 15.

Chow WS, Cheung BM, Tso AW, Xu A, Wat NM, Fong CH, Ong LH, Tam S, Tan KC, Janus ED, Lam TH, Lam KS. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. Hypertension. 2007 Jun;49(6):1455-61. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.086835.

Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. N Engl J Med. 1996 Feb 1;334(5):292-5. doi: 10.1056/NEJM199602013340503.

Coughlan KA, Valentine RJ, Ruderman NB, Saha AK. Nutrient Excess in AMPK Downregulation and Insulin Resistance. J Endocrinol Diabetes Obes. 2013 Jul-Sep;1(1):1008.

Couturier K, Batandier C, Awada M, Hininger-Favier I, Canini F, Anderson RA, Leverve X, Roussel AM. Cinnamon improves insulin sensitivity and alters the body composition in an animal model of the metabolic syndrome. Arch Biochem Biophys. 2010 Sep 1;501(1):158-61. doi: 10.1016/j.abb.2010.05.032.

De Castro UG, dos Santos RA, Silva ME, de Lima WG, Campagnole-Santos MJ, Alzamora AC. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. Lipids Health Dis. 2013 Sep 18;12:136. doi: 10.1186/1476-511X-12-136.

Desroches S ve Lamarche B. The evolving definitions and increasing prevalence of the metabolic syndrome. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2007 Feb;32(1):23-32. doi: 10.1139/h06-095.

Di Rosa M, Malaguarnera L, Nicolosi A, Sanfilippo C, Mazzarino C, Pavone P, Berretta M, Cosentino S, Cacopardo B, Pinzone MR, Nunnari G. Vitamin D3: an ever green molecule. *Front Biosci (Schol Ed).* 2013 Jan 1;5(1):247-60. doi: 10.2741/s370.

El-naggar A ve El-Dawy K. Role of micro RNAs and its associated genes in prediction of obesity and diabetes mellitus (type II). *Zag Vet J.* (2019) 47:57–67. doi: 10.21608/zvz.2019.6135.1010.

Elseweidy MM, Amin RS, Atteia HH, Ali MA. Vitamin D3 intake as regulator of insulin degrading enzyme and insulin receptor phosphorylation in diabetic rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 Jan;85:155-159. doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.116.

Fahed G, Aoun L, Bou Zerdan M, Allam S, Bou Zerdan M, Bouferraa Y, Assi HI. Metabolic Syndrome: Updates on Pathophysiology and Management in 2021. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 12;23(2):786. doi: 10.3390/ijms23020786.

Faia KL, Davis WP, Marone AJ, Foxall TL. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography. *Atherosclerosis.* 2002 Feb;160(2):325-37. doi: 10.1016/s0021-9150(01)00590-1.

Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Apr 18;47(8 Suppl):C7-12. doi: 10.1016/j.jacc.2005.09.068.

Fan D, Kassiri Z. Biology of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3 (TIMP3), and Its Therapeutic Implications in Cardiovascular Pathology. *Front Physiol.* 2020 Jun 16;11:661. doi: 10.3389/fphys.2020.00661.

Feinberg MW, Moore KJ. MicroRNA Regulation of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2016 Feb 19;118(4):703-20. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306300.

Fernandes CR, Kannen V, Mata KM, Frajacomo FT, Jordão Junior AA, Gasparotto B, Sakita JY, Elias Junior J, Leonardi DS, Mauad FM, Ramos SG, Uyemura SA, Garcia SB. High-Fat and Fat-Enriched Diets Impair the Benefits of Moderate Physical Training in the Aorta and the Heart in Rats. *Front Nutr.* 2017 May 18;4:21. doi: 10.3389/fnut.2017.00021.

Fryer LG, Parbu-Patel A, Carling D. The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002 Jul 12;277(28):25226-32. doi: 10.1074/jbc.M202489200.

Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau CC, Burchard J, Linsley PS, Krichevsky AM. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol.* 2008 Sep;28(17):5369-80. doi: 10.1128/MCB.00479-08.

Gancheva S, Zhelyazkova-Savova M, Galunska B et al. Experimental Models of Metabolic Syndrome in Rats. *Scr. Sci. Med.* Vol. 47, No 2, 2015, Pp. 14-21.

García ME, Marra CA, Rebolledo OR. Glycoxidative stress-induced damage on lipid profile in a fructose-enriched diet model of insulin resistance in rats. *Arch Physiol Biochem.* 2010 Feb;116(1):42-9. doi: 10.3109/13813450903527713.

Gelmez MY, Kasapoğlu P, Adaş ÇU, Tahralı İ, Gazioğlu SB., Çevik A., Deniz G. Metabolik Sendromda Deneysel Hayvan Modelleri. *DETAE Derg.* 2013; 2 (4), 15-21.

Geovanini GR ve Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates. *Clin Sci (Lond).* 2018 Jun 21;132(12):1243-1252. doi: 10.1042/CS20180306.

Goldberg RB ve Mather K. Targeting the consequences of the metabolic syndrome in the Diabetes Prevention Program. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Sep;32(9):2077-90. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241893.

Grundy SM. Metabolic syndrome update. *Trends Cardiovasc Med*. 2016 May;26(4):364-73. doi: 10.1016/j.tcm.2015.10.004.

Grundy SM. Adipose tissue and metabolic syndrome: too much, too little or neither. *Eur J Clin Invest*. 2015 Nov;45(11):1209-17. doi: 10.1111/eci.12519.

Ha M ve Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Aug;15(8):509-24. doi: 10.1038/nrm3838.

Han H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol*. 2018;1706:293-302. doi: 10.1007/978-1-4939-7471-9_16.

Hashimi ST, Fulcher JA, Chang MH, Gov L, Wang S, Lee B. MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*. 2009 Jul 9;114(2):404-14. doi: 10.1182/blood-2008-09-179150.

Hitit M, Kurar E, Guzeloglu A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg*. 2015; 10(3): 211-218.

Hotta K, Funahashi T, Arita Y, Takahashi M, Matsuda M, Okamoto Y, Iwahashi H, Kuriyama H, Ouchi N, Maeda K, et al. Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arter. Thromb. Vasc. Biol*. 2000;20:1595–1599. doi: 10.1161/01.ATV.20.6.1595.

Hu J, Ni S, Cao Y, Zhang T, Wu T, Yin X, Lang Y, Lu H. The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. *PLoS One*. 2016 Feb 12;11(2):e0149537. doi: 10.1371/journal.pone.0149537.

Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab*. 2004 Mar;6(2):120-6. doi: 10.1111/j.1462-8902.2004.00323.x.

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care*. 2001 Apr;24(4):683-9. doi: 10.2337/diacare.24.4.683.

Johnson RJ, Segal MS, Sautin Y, Nakagawa T, Feig DI, Kang DH, Gersch MS, Benner S, Sánchez-Lozada LG. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2007 Oct;86(4):899-906. doi: 10.1093/ajcn/86.4.899.

Junqpueira LC ve Carneiro J. Bölüm11. Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitabevleri. 2006. ss: 215-224.

Jürgens H, Haass W, Castañeda TR, Schürmann A, Koebnick C, Dombrowski F, Otto B, Nawrocki AR, Scherer PE, Spranger J, Ristow M, Joost HG, Havel PJ, Tschöp MH. Consuming fructose-sweetened beverages increases body adiposity in mice. *Obes Res*. 2005 Jul;13(7):1146-56. doi: 10.1038/oby.2005.136.

Karabulut S, Korkmaz Bayramov K, Gölgeli A. Belleğin Epigenetik Düzenlenmesi: Mikrorna'ların Rolü. *The Epigenetic Regulation Of Memory: The Role Of Micrnas. JOHS*. 2018 ; 27: 87-94.

Karkeni E, Bonnet L, Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Ye J, Landrier JF. Vitamin D limits inflammation-linked microRNA expression in adipocytes in vitro and in vivo: A new mechanism for the regulation of inflammation by vitamin D. *Epigenetics*. 2018;13(2):156-162. doi: 10.1080/15592294.2016.1276681.

Kassi E, Pervanidou P, Kaltsas G, Chrousos G. Metabolic syndrome: definitions and controversies. *BMC Med*. 2011 May 5;9:48. doi: 10.1186/1741-7015-9-48.

Kaur JA. comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162. doi: 10.1155/2014/943162.

Kismiroglu C, Cengiz S ve Yaman M. AMPK'nin Biyokimyası: Etki Mekanizmaları ve Diyabetin Tedavisindeki Önemi. *Avr. Bilim ve Tekn. Derg.* 2020;(18), 162-170.

Khan Y, Lalchandani A, Gupta AC, Khadanga S, Kumar S. Prevalence of metabolic syndrome crossing 40% in Northern India: Time to act fast before it runs out of proportions. *J Family Med Prim Care.* 2018 Jan-Feb;7(1):118-123. doi: 10.4103/jfmpc.jfmpc_10_17.

Kulda V. Metabolizmus vitaminu D [Vitamin D metabolism]. *Vnitr Lek.* 2012 May;58(5):400-4. Czech.

Laird E, Ward M, McSorley E, Strain JJ, Wallace J. Vitamin D and bone health: potential mechanisms. *Nutrients.* 2010 Jul;2(7):693-724. doi: 10.3390/nu2070693.

Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, Tuomilehto J, Salonen JT. The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA.* 2002 Dec 4;288(21):2709-16. doi: 10.1001/jama.288.21.2709.

LeBrasseur NK, Kelly M, Tsao TS, Farmer SR, Saha AK, Ruderman NB, Tomas E. Thiazolidinediones can rapidly activate AMP-activated protein kinase in mammalian tissues. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006 Jul;291(1):E175-81. doi: 10.1152/ajpendo.00453.2005.

Lewis SJ. Cardiovascular disease in postmenopausal women: myths and reality. *Am J Cardiol.* 2002 Jun 20;89(12A):5E-10E; discussion 10E-11E. doi: 10.1016/s0002-9149(02)02403-7.

Li L, Liao G, Yang G, Lu Y, Du X, Liu J, Li L, Wang C, Li L, Ren Y, Zhong Z, Cheng J, Chen Y. High-fat diet combined with low-dose streptozotocin injections induces metabolic syndrome in *Macaca mulatta*. *Endocrine.* 2015 Aug;49(3):659-68. doi: 10.1007/s12020-015-0542-9.

Li Y, Xiao L, Li J, Sun P, Shang L, Zhang J, Zhao Q, Ouyang Y, Li L, Gong K. MicroRNA profiling of diabetic atherosclerosis in a rat model. *Eur J Med Res.* 2018; 3;23(1):55.

Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420, 868–874, <https://doi.org/10.1038/nature01323>.

Libby P, Ridker PM and Hansson GK. Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009; 54, 2129–2138, Review, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2009.09.009>.

Libby P. History of discovery: inflammation in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2012;32, 2045–2051, <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.179705>.

Libby P, Buring JE, Badimon L. et al. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 5, 56 (2019).

Ma A, Wang J, Yang L, An Y, Zhu H. AMPK activation enhances the anti-atherogenic effects of high density lipoproteins in apoE^{-/-} mice. *J Lipid Res.* 2017 Aug;58(8):1536-1547. doi: 10.1194/jlr.M073270.

Maiztegui B, Borelli MI, Raschia MA, Del Zotto H, Gagliardino JJ. Islet adaptive changes to fructose-induced insulin resistance: beta-cell mass, glucokinase, glucose metabolism, and insulin secretion. *J Endocrinol.* 2009 Feb;200(2):139-49. doi: 10.1677/JOE-08-0386.

Manna P, Achari AE, Jain SK. Vitamin D supplementation inhibits oxidative stress and upregulate SIRT1/AMPK/GLUT4 cascade in high glucose-treated 3T3L1 adipocytes and in adipose tissue of high fat diet-fed diabetic mice. *Arch Biochem Biophys.* 2017 Feb 1;615:22-34. doi: 10.1016/j.abb.2017.01.002.

Mansouri M, Miri A, Varmaghani M, Abbasi R, Taha P, Ramezani S, Rahmani E, Armaghan R, Sadeghi O. Vitamin D deficiency in relation to general and abdominal

obesity among high educated adults. *Eat Weight Disord.* 2019 Feb;24(1):83-90. doi: 10.1007/s40519-018-0511-4.

Marcotorchino J, Tourniaire F, Astier J, Karkeni E, Canault M, Amiot MJ, Bendahan D, Bernard M, Martin JC, Giannesini B, Landrier JF. Vitamin D protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation. *J Nutr Biochem.* 2014 Oct;25(10):1077-83. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.05.010.

Marshall MW, Smith BP, Munson AW, Lehmann RP. Prediction of carcass fat from body measurements made on live rats differing in age, sex and strain. *Br J Nutr.* 1969 Jun;23(2):353-69. doi: 10.1079/bjn19690042.

Meng Y, Eirin A, Zhu XY, Tang H, Hickson LJ, Lerman A, van Wijnen AJ, Lerman LO. Micro-RNAs Regulate Metabolic Syndrome-induced Senescence in Porcine Adipose Tissue-derived Mesenchymal Stem Cells through the P16/MAPK Pathway. *Cell Transplant.* 2018 Oct;27(10):1495-1503.

Milutinović A, Šuput D, Zorc-Plesković R. Pathogenesis of atherosclerosis in the tunica intima, media, and adventitia of coronary arteries: An updated review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2020 Feb 5;20(1):21-30. doi: 10.17305/bjbms.2019.4320.

Mounier R, Théret M, Arnold L, Cuvellier S, Bultot L, Göransson O, Sanz N, Ferry A, Sakamoto K, Foretz M, Viollet B, Chazaud B. AMPK α 1 regulates macrophage skewing at the time of resolution of inflammation during skeletal muscle regeneration. *Cell Metab.* 2013 Aug 6;18(2):251-64. doi: 10.1016/j.cmet.2013.06.017.

Nagai Y, Yonemitsu S, Erion DM, Iwasaki T, Stark R, Weismann D, et al. The Role of Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Coactivator 1 beta (PGC-1 β) in the Pathogenesis of Fructose-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab.* 2009; 9(3): 252–264.

Nagao Y, Hisaoka M, Matsuyama A. et al. Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Mod Pathol* 25, 112–121 (2012). <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.142>.

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368 (6473): 753–6.

O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018 Aug 3;9:402. doi: 10.3389/fendo.2018.00402.

Orchard TJ, Temprosa M, Goldberg R, Haffner S, Ratner R, Marcovina S, et al. The effect of metformin and intensive lifestyle intervention on the metabolic syndrome: the Diabetes Prevention Program randomized trial. *Ann Intern Med* 2005;142:611–9.

Ortega FJ, Mercader JM, Catalán V, Moreno-Navarrete JM, Pueyo N, Sabater M, Gómez-Ambrosi J, Anglada R, Fernández-Formoso JA, Ricart W, Frühbeck G, Fernández-Real JM. Targeting the circulating microRNA signature of obesity. *Clin Chem*. 2013 May;59(5):781-92. doi: 10.1373/clinchem.2012.195776.

Ou H, Liu C, Feng W, Xiao X, Tang S, Mo Z. Role of AMPK in atherosclerosis via autophagy regulation. *Sci China Life Sci*. 2018 Oct;61(10):1212-1221. doi: 10.1007/s11427-017-9240-2.

Ouchi N, Kihara S, Arita Y, Maeda K, Kuriyama H, Okamoto Y, Hotta K, Nishida M, Takahashi M, Nakamura T, Yamashita S, Funahashi T, Matsuzawa Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*. 1999 Dec 21-28;100(25):2473-6. doi: 10.1161/01.cir.100.25.2473.

Palomer X, González-Clemente JM, Blanco-Vaca F, Mauricio D. Role of vitamin D in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab*. 2008 Mar;10(3):185-97. doi: 10.1111/j.1463-1326.2007.00710.x.

Panchal SK ve Brown L. Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:351982. doi: 10.1155/2011/351982.

Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, Nazer R, Alam A, Diwan V, et al. High-carbohydrate high-fat diet–induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2011a;57(5):611-624. doi:10.1097/fjc.0b013e3181feb90a

Panchal SK, Poudyal H, Arumugam TV, Brown L. Rutin attenuates metabolic changes, nonalcoholic steatohepatitis, and cardiovascular remodeling in high-carbohydrate, high-fat diet-fed rats. *J Nutr*. 2011 Jun;141(6):1062-9. doi: 10.3945/jn.111.137877.

Pischon T, Girman CJ, Hotamisligil GS, Rifai N, Hu FB, Rimm EB. Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *JAMA*. 2004 Apr 14;291(14):1730-7. doi: 10.1001/jama.291.14.1730.

Qi J, Ebrahim Q, Moore N. et al. A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat Med* 9, 407–415 (2003). <https://doi.org/10.1038/nm846>

Raitoharju E, Lyytikäinen LP, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis*. 2011 Nov;219(1):211-7. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2011.07.020.

Ramos-Lopez O, Milagro FI, Riezu-Boj JI, Martinez JA. Epigenetic signatures underlying inflammation: An interplay of nutrition, physical activity, metabolic diseases, and environmental factors for personalized nutrition. *Inflamm. Res*. 2020;1:1.

Ramzan F, Vickers MH, Mithen RF. Epigenetics, microRNA and Metabolic Syndrome: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. 2021 May 10;22(9):5047. doi: 10.3390/ijms22095047.

Rayess H, Wang MB, Srivatsan ES. Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *Int J Cancer*. 2012 Apr 15;130(8):1715-25. doi: 10.1002/ijc.27316.

Reaven GM. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes*. 1988 Dec;37(12):1595-607. doi: 10.2337/diab.37.12.1595.

Ritchie SA ve Connell JM. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007 May;17(4):319-26. doi: 10.1016/j.numecd.2006.07.005.

Ross MH ve Pawlina W. Bölüm 13. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Palme Yayıncılık. 2014. ss:400-417.

Ruderman NB, Carling D, Prentki M, Cacicedo JM. AMPK, insulin resistance, and the metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2013 Jul;123(7):2764-72. doi: 10.1172/JCI67227.

Saha AK, Avilucea PR, Ye JM, Assifi MM, Kraegen EW, Ruderman NB. Pioglitazone treatment activates AMP-activated protein kinase in rat liver and adipose tissue in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Feb 6;314(2):580-5. doi: 10.1016/j.bbrc.2003.12.120.

Savaş Bayar, L. (2020). Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi. Ankara.

Schmeier S, MacPherson CR, Essack M, Kaur M, Schaefer U, Suzuki H, Hayashizaki Y, Bajic VB. Deciphering the transcriptional circuitry of microRNA genes expressed during human monocytic differentiation. *BMC Genomics*. 2009 Dec 10;10:595. doi: 10.1186/1471-2164-10-595.

Schober A, Maleki SS, Nazari-Jahantigh M. Regulatory Non-coding RNAs in Atherosclerosis. *Handb Exp Pharmacol*. 2022;270:463-492. doi: 10.1007/164_2020_423.

Sherling DH, Perumareddi P, Hennekens CH. Metabolic Syndrome. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2017 Jul;22(4):365-367. doi: 10.1177/1074248416686187.

Silveira A, Gomes J, Roque F, Fernandes T, de Oliveira EM. MicroRNAs in Obesity-Associated Disorders: The Role of Exercise Training. *Obes Facts.* 2022;15(2):105-117. doi: 10.1159/000517849.

Son DJ, Jung YY, Seo YS, Park H, Lee DH, Kim S, Roh YS, Han SB, Yoon DY, Hong JT. Interleukin-32 α Inhibits Endothelial Inflammation, Vascular Smooth Muscle Cell Activation, and Atherosclerosis by Upregulating Timp3 and Reck through suppressing microRNA-205 Biogenesis. *Theranostics.* 2017 Jun 1;7(8):2186-2203. doi: 10.7150/thno.18407.

Sperling LS, Mechanick JL, Neeland IJ, Herrick CJ, Després JP, Ndumele CE, Vijayaraghavan K, Handelsman Y, Puckrein GA, Araneta MR, Blum QK, Collins KK, Cook S, Dhurandhar NV, Dixon DL, Egan BM, Ferdinand DP, Herman LM, Hessen SE, Jacobson TA, Pate RR, Ratner RE, Brinton EA, Forker AD, Ritzenthaler LL, Grundy SM. The CardioMetabolic Health Alliance: Working Toward a New Care Model for the Metabolic Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2015 Sep 1;66(9):1050-67. doi: 10.1016/j.jacc.2015.06.1328.

Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995 Sep 1;92(5):1355-74. doi: 10.1161/01.cir.92.5.1355.

Stöhr R, Cavalera M, Menini S, Mavilio M, Casagrande V, Rossi C, Urbani A, Cardellini M, Pugliese G, Menghini R, Federici M. Loss of TIMP3 exacerbates atherosclerosis in ApoE null mice. *Atherosclerosis.* 2014 Aug;235(2):438-43. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.05.946.

Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res.* 1995 Jul 15;55(14):2988-94.

Takawale A, Zhang P, Azad A, Wang W, Wang X, Murray AG, Kassiri Z. Myocardial overexpression of TIMP3 after myocardial infarction exerts beneficial effects by promoting angiogenesis and suppressing early proteolysis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2017 Aug 1;313(2):H224-H236. doi: 10.1152/ajpheart.00108.2017.

Tanrıverdi B, Savaş Tetik Ş. Aterosklerozun Patofizyolojisi ve Risk Faktörleri. *Marmara Pharm J* 21: 1-9, 2017. DOI: 10.12991/marupj.259875.

Tekus E, Miko A, Furedi N, Rostas I, Tenk J, Kiss T, Szitter I, Balasko M, Helyes Z, Wilhelm M, and Petervari E. Body fat of rats of different age groups and nutritional states: assessment by micro-CT and skinfold thickness. *J Appl Physiol.* 124: 268–275, 2018. doi:10.1152/jappphysiol.00884.2016.

Tokgözoğlu L. Dislipidemi, ateroskleroz ve hassas plaklar: Atorvastatinin ateroskleroz ve plak yapısına etkisi. *Türk Kardiyol Dern Arş - Arch Turk Soc Cardiol* 2009;37 Suppl 2:11-16.

Tune JD, Goodwill AG, Sassoon DJ, Mather KJ. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. *Transl Res.* 2017 May;183:57-70. doi: 10.1016/j.trsl.2017.01.001.

Uchendu NO, Nkwocha CC, Anaduaka EG ve Ezeanyika LU. Metabolic syndrome in adult male rats induced by feeding beef tallow-enriched homemade diet with fructose-containing drinking water. *Comp Clin Path.* 2021;30, 541-547.

Ulusan Bağcı Ö ve Caner A. MikroRNA'ların Parazitolojideki Yeri. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2020;44(2):102-8.

Van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture--pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Res.* 1999 Feb;41(2):334-44. doi: 10.1016/s0008-6363(98)00276-4.

Vidigal JA, Ventura A. The biological functions of miRNAs: lessons from in vivo studies. *Trends Cell Biol.* 2015 Mar;25(3):137-47. doi: 10.1016/j.tcb.2014.11.004.

Voellenkle C, Rooij Jv, Guffanti A, Brini E, Fasanaro P, Isaia E, Croft L, David M, Capogrossi MC, Moles A, Felsani A, Martelli F. Deep-sequencing of endothelial cells exposed to hypoxia reveals the complexity of known and novel microRNAs. *RNA.* 2012 Mar;18(3):472-84. doi: 10.1261/rna.027615.111.

Wang D, Wang Z, Zhang L, Wang Y. Roles of Cells from the Arterial Vessel Wall in Atherosclerosis. *Mediators Inflamm.* 2017;2017:8135934. doi:10.1155/2017/8135934.

Wang N, Zhang CQ, He JH, Duan XF, Wang YY, Ji X, Zang WQ, Li M, Ma YY, Wang T, Zhao GQ. MiR-21 down-regulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci.* 2013 Jul;58(7):1863-70. doi: 10.1007/s10620-013-2612-2.

Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res.* 2006;1;312(3):205-14. doi: 10.1016/j.yexcr.2005.11.004.

Weber M, Baker MB, Moore JP, Searles CD. MiR-21 is induced in endothelial cells by shear stress and modulates apoptosis and eNOS activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Mar 19;393(4):643-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.02.045.

Weng SY ve Schuppan D. 2013. AMPK regulates macrophage polarization in adipose tissue inflammation and NASH. *J. Hepatol.* 58: 619–621.

Wieder-Huszla S, Jurczak A, Szkup M, Barczak K, Dołęgowska B, Schneider-Matyka D, Owsianowska J, Grochans E. Relationships between Vitamin D3 and Metabolic

Syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2019 Jan 9;16(2):175. doi: 10.3390/ijerph16020175.

Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. *Nutr Metab (Lond)*. 2016 Oct 4;13:65. doi: 10.1186/s12986-016-0123-9.

Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Ahmad F, Ima-Nirwana S. The Effects of a Modified High-carbohydrate High-fat Diet on Metabolic Syndrome Parameters in Male Rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2018 Apr;126(4):205-212. doi: 10.1055/s-0043-119352.

Zainuddin LR, Isa N, Muda WM, Mohamed HJ. The prevalence of metabolic syndrome according to various definitions and hypertriglyceridemic-waist in malaysian adults. *Int J Prev Med*. 2011 Oct;2(4):229-37.

Zengin H. Pathogenesis of atherosclerosis. *J. Exp. Clin. Med*. 2012; 29:S101-S106. doi: 10.5835/jecm.omu.29.s3.002.

Zhang A, Liu Y, Shen Y, Xu Y, Li X. miR-21 modulates cell apoptosis by targeting multiple genes in renal cell carcinoma. *Urology*. 2011;78(2):474 e13-9. doi: 10.1016/j.urology.2011.03.030.

Zhang H, Wang L, Peng F, Wang X, Gong H. L-Arginine Ameliorates High-Fat Diet-Induced Atherosclerosis by Downregulating miR-221. *Biomed Res Int*. 2020 Feb 7;2020:4291327. doi: 10.1155/2020/4291327.

Zhou X, Han D, Xu R, Li S, Wu H, Qu C, Wang F, Wang X, Zhao Y. A model of metabolic syndrome and related diseases with intestinal endotoxemia in rats fed a high fat and high sucrose diet. *PLoS One*. 2014 Dec 11;9(12):e115148. doi: 10.1371/journal.pone.0115148.

Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? *Br J Nutr*. 2003 May;89(5):552-72. doi: 10.1079/BJN2003837.

Zuk A, Fitzpatrick T, Rosella LC. Effect of Vitamin D3 Supplementation on Inflammatory Markers and Glycemic Measures among Overweight or Obese Adults: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. PLoS One. 2016 Apr 26;11(4):e0154215. doi: 10.1371/journal.pone.0154215.



HAM VERİLER

FORMLAR

PATENT HAKKI İZNİ

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

METABOLİK SENDROMLU SIÇANLARDA VİTAMİN D'NİN ATEROGENEZLE İLİŞKİLİ ADAY GENLERİN İFADE DÜZEYİNE ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

% 9	% 8	% 2	% 3
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	pdfs.semanticscholar.org İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	TUTAR, Esen, KÖKSALAN, Elif and AKYOL, İsmail. "Gıdalarda Bulunan Mikrobiyal Patojenlerin Karakterizasyonunda ", Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, 2015. Yayın	<% 1
6	tel.archives-ouvertes.fr İnternet Kaynağı	<% 1
7	mafiadoc.com İnternet Kaynağı	<% 1