

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA VİTAMİN D
DÜZEYİ VE MOLEKÜLER YOLAĞININ OKSİDATİF DNA
HASARI VE KLİNİK BULGULARI İLE İLİŞKİSİ**

NAZLI ECEM DAL BEKAR
ORCID: 0000-0003-4731-9265

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

İZMİR
HAZİRAN 2022
TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2016970136

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA VİTAMİN D
DÜZEYİ VE MOLEKÜLER YOLAĞININ OKSİDATİF DNA
HASARI VE KLİNİK BULGULARI İLE İLİŞKİSİ**

NAZLI ECEM DAL BEKAR
ORCID: 0000-0003-4731-9265
MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER TIP DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. G. Hüray İŞLEKEL

ORCID: 0000-0002-0416-1325

İkinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

ORCID: 0000-0002-7311-4020

**Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü
tarafından 2018.KB.SAG.109 sayı ile desteklenmiştir.**

İZMİR

HAZİRAN 2022

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum “**Sistemik Skleroz Hastalarında Vitamin D Düzeyi ve Moleküler Yolağının Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Bulguları ile İlişkisi**” başlıklı doktora tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Nazlı Ecem DAL BEKAR

20.05.2022

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca akademik ve özel hayatımda karşılaştığım her türlü zorlukta sonsuz desteğini her zaman hissettiğim, akademik gelişimimde yadsınamaz emeği ve katkısı olan, odasına her koştuğumda kapısını açan canım tez danışmanım **Prof. Dr. G. Hüray İŞLEKEL'e** sonsuz şükran ve teşekkürlerimle... Bundan sonraki akademik hayatımda da her zaman iyi gelen ve beni bir adım öteye taşıyan desteğinizi hissetmek dileğiyle...

Tezimin tüm klinik aşamalarını büyük bir titizlikle yürüten, kısıtlı zamanlarında bile bana destek olan, enerjimin düştüğü anları bir bakışıyla anlayarak enerjisiyle her zaman modumu yükselten, çok değerli hocam **Prof. Dr. Merih Birlik'e** en içten teşekkürlerimi sunarım.

Anabilim Dalı'mızın kurucularından, tez sürecimde fikirleri ve güler yüzü ile destek olan ve yürütücülüğünü üstlendiğim TÜBİTAK destekli ilk doktora sonrası projemde danışmanım olarak yer alan çok değerli **Prof. Dr. Gül AKDOĞAN'a** teşekkürlerimi sunmak isterim.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Müdürü **Prof. Dr. Zahide ÇAVDAR** başta olmak üzere tüm enstitü yönetimine ve her problemimizi iyi niyetle çözmeye çalışan idari personele; Moleküler Tıp Anabilim Dalı Başkanı **Prof. Dr. Oğuz ALTUNGÖZ'e**; ikinci tez danışmanım **Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA'ya** ve tüm Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında özellikle genetik analizlerime görüş ve yorumları ile destek sağlayan **Dr. Öğr. Üyesi Yavuz OKTAY'a** zamanı ve desteği için teşekkürü bir borç bilirim.

Resmi olarak bağlı bulunmasam da tüm süreç boyunca adeta ikinci ailem olan Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'na, Araştırma Laboratuvarları'nı tez çalışmalarına açan bölüm başkanı **Prof. Dr. Sezer UYSAL'a** ve her türlü problemimde koşarak yanımda olan, bir idari personelden çok öteye taşımış olduğum **Eda Nesrin OLUM'a** ve **Emin ÇAVUŞLU'ya** teşekkür ederim.

Tıp Fakóltesi Araştırma Laboratuvarları Koordinatörü, deneyimleri ile bize her zaman destek olan **Dr. Memduh BÜLBÜL'e**, yolun en başında karşılaştığım ve arkadaşlıkları baki kalan **Dr. Naz KANIT'a** ve **Öğr. Görevlisi Ufkay KARABAY'a**, zorlu süreçlerden geçerken enerjisiyle destek olan **Dr. Cemre URAL'a**, akışa bırak mottosu ile desteğini hep hissettiğim **Aysan AFAGH'a**, bana şimdiden doktora sonrası araştırmacı tecrübesi kazandıran canım junior'ım rengarenk **Yağmur YAVAŞ'a** ve son olarak belki de doktora sürecimin bana kazandırdığı ve bundan sonra da yanımda olacağını bildiğim en güzel dost olan **Dr. Ceren ERGÜDEN GÜRBÜZ'e** en içten teşekkürlerimle...

İzmir'de yürüttüğüm doktora eğitimim boyunca her zaman bir telefon ötemde bulunduğum, Hacettepe Üniversitesi'nin bana kattığı en güzel ailem, çok kıymetli dostlarımdan **Ali BİRDOĞAN'a** hem tezime sağladığı bilimsel katkılar hem de 12 yıldır bana katlandığı için; ayrıca **Derya ONAT ÇELİK'e**, **Selin IŞILDAK'a**, **Volkan SERİN'e**, **BAKRIYANIK** ailesine (Canım **Burcu** ve **Bora**) bu yolu benimle yürüdükleri için en güzel teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimi sabır gerektiren uzun ve zorlu bir yoldu benim için. Hayatım boyunca olduğu gibi bu süreçte de desteklerini hissettiğim her şeyden önemli, çok sevgili aile üyelerim annem **Neriman RAHAT ÇOĞAL'a**; babam **Ferruh DAL'a**; abilerim **Fikri** ve **Ferdi DAL'a** ve güzel ailelerine (**Lale**, **İdil**, **Asya** ve **Kuzey'e**); ikinci anne ve babam olan **Havva** ve **Ahmet BEKAR'a** ve adeta bir kız kardeş olan **Sena BEKAR'a**; beş yıl süren bu uzun yolda verdikleri destek için sonsuz teşekkür ederim.

Ve son olarak yol arkadaşım, en büyük destekçim, fikirlerine ve manevi desteğine ömrüm boyunca ihtiyaç duyacağım, kendisi de bir bilim insanı olduğundan belki de beni en iyi anlayan ve her türlü sıkıntımı eve dönüp bir gülümsemesini görerek unutacağımı bildiğim oyun arkadaşım **İsmail BEKAR'a** bir teşekkürün yetmeyeceğini bilerek, beş yıllık büyük emeklerimin bir sonucu olan doktora tezimi ithaf etmek isterim.

Nazlı Ecem DAL BEKAR / Haziran 2022, İzmir

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
TABLolar DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VII
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. D Vitamini: Metabolizması ve Moleküler Yolağı	5
2.1.1. D Vitamininin Sentez ve Yıkımı	5
2.1.2. D Vitamininin Moleküler Yolağı	7
2.2. Oksidatif Stres	10
2.2.1. ROT/RNT Kaynakları.....	11
2.2.2. Oksidatif Makromolekül Hasarı.....	14
2.3. D Vitamini: Oksidatif Stres ve İmmün Regülasyondaki Rolü.....	21
2.3.1. D vitamini ve Oksidatif Stres.....	21
2.3.2. D Vitamini ve İmmün Regülasyon.....	22
2.4. Sistemik Skleroz'a Genel Bakış.....	24
2.4.1. Sistemik Skleroz ve Oksidatif Stres	26
2.4.2. Sistemik Skleroz ve D Vitamini Eksikliği	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
3.1. Araştırmanın Tipi	31
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	31
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	31
3.4. Çalışma Materyali	34
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	35
3.6. Veri Toplama Araçları	36
3.6.1. Klinik Veriler.....	36
3.6.2. Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler	37
3.6.3. Oksidatif DNA Hasarı Ürünlerinin LC-MS/MS ile Ölçümü	42

3.6.4. Serum D Vitamini (25(OH)D3) Düzeyinin UPLC-HRMS ile Belirlenmesi	44
3.6.5. Genetik Analizler.....	47
3.7. Araştırma Planı ve Takvim	52
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	53
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	54
3.10. Etik Kurul Onayı.....	54
4. BULGULAR	55
4.1. Klinik Bulgular.....	55
4.2. Kütle Spektrometrik Bulgular	56
4.2.1. Oksidatif DNA Hasarı	56
4.2.2. D Vitamini Düzeyi	62
4.3. Genetik Bulgular	67
4.3.1. VDR Gen Ekspresyonu	67
4.3.2. VDR Geni Tek Nükleotid Polimorfizmleri.....	68
4.4. Klinik Prospektif Bölüm: D Vitamini Replasmanının Oksidatif DNA Hasarına Etkisi.....	71
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	88
KAYNAKLAR.....	90
EKLER	102
KATKI.....	121
ÖZGEÇMİŞ	122

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 1. Sistemik skleroz hastalığının tanısı için 2013 ACR/EULAR kriterleri	32
Tablo 2. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan biyolojik örnekler ve uygulanan ön işlemler	35
Tablo 3. Araştırmada kullanılan cihazlar	38
Tablo 4. Araştırmanın kütle spektrometrik analizlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	39
Tablo 5. Araştırmanın genetik analizlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler	41
Tablo 6. Ölçülen oksidatif DNA hasarı ürünlerinin ve ağır izotop işaretli internal standartların kütle geçişleri ve kromatografik alıkonma zamanları	44
Tablo 7. Gen ekspresyon analizinde ACTB geni için tasarlanmış olan primer ve problemler	51
Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen SS hastalarının klinik bulgu/skorları	55
Tablo 9. İdrar oksidatif DNA hasarı ürünlerinin SS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılması	58
Tablo 10. Skleroderma hastalarının klinik bulgularına göre oksidatif DNA hasarı ürünlerinin karşılaştırılması	61
Tablo 11. 25(OH)D3-Yöntem Verifikasyonu: Doğruluk Hesaplaması	63
Tablo 12. 25(OH)D3-Yöntem Verifikasyonu: Kesinlik Hesaplaması	64
Tablo 13. VDR geninde bulunan sekans polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılması	70

Tablo 14. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan oksidatif DNA hasar ürünleri	73
---	----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. D vitamini metabolizması: Aktiflenme-yıkım basamakları ve bu süreçlerin regülasyonu	7
Şekil 2. ROT/RNT kaynakları, antioksidan savunma mekanizmaları ve oksidatif stres ilişkili hastalıklar.....	11
Şekil 3. 8-OH-dG oluşum mekanizması.....	18
Şekil 4. 8,5-siklo-deoksiadenozinlerin oluşum mekanizması	20
Şekil 5. Araştırmanın olgu-kontrol bölümünün takvimi	52
Şekil 6. Araştırmanın klinik prospektif bölümünün takvimi.....	53
Şekil 7. Oksidatif DNA hasarı ürünlerinin idrar matriksinde temsili kromatogram görüntüsü	57
Şekil 8. İAH pozitif ve negatif olan skleroderma hastalarının idrar 8-OH-dG düzeyi.....	59
Şekil 9. Artrit pozitif ve negatif olan skleroderma hastalarının idrar R-cdA düzeyi.....	60
Şekil 10. 25(OH)D3 için UPLC-HRMS yöntemi ile çizilen kalibrasyon grafiği	62
Şekil 11. Serum D vitamini ölçümleri temsili kromatogram görüntüsü	65
Şekil 12. Skleroderma hastaları ve sağlıklı bireylerin serum 25(OH)D3 düzeylerinin karşılaştırılması	66
Şekil 13. Gen ekspresyon analizi: Çalışmada elde edilen temsili amplifikasyon eğrisi görüntüsü.....	67
Şekil 14. Skleroderma hastaları ve sağlıklı bireylerin VDR gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması	68

Şekil 15. VDR geni tek nükleotid polimorfizmlerinin erime eğrisi analizi sonucu elde edilen erime peakleri	69
Şekil 16. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülen serum 25(OH)D3 düzeyleri	72
Şekil 17. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülen idrar 8-OH-dG düzeyleri	73
Şekil 18. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında belirlenen VDR gen ekspresyon düzeyleri.....	74
Şekil 19. Bazal D vitamini düzeyi ve replasman sonrası D vitamini kat artışına göre gruplanan hastaların replasman sonrası 8-OH-dG düzeylerindeki değişim.....	75
Şekil 20. İAH ve artrit bulgusuna sahip olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan idrar 8-OH-dG düzeyleri	76
Şekil 21. Sadece GİS tutulumu olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan idrar 8-OH-dG düzeyleri	77
Şekil 22. GİS tutulumu olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan VDR gen ekspresyon düzeyleri	78
Şekil 23. D vitamini replasmanını tamamlayan hastaların replasman öncesi ve sonrası UCLA-GIT 2.0 anket skorları.....	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

1,25 D3 MARRS:	1,25 D3 membran ilişkili hızlı yanıt steroid bağlayan protein
1,25(OH)2D3:	1,25-dihidroksivitamin D3
24,25(OH)2D3:	24,25-dihidroksivitamin D3
25(OH)D3:	25-hidroksivitamin D3
8-OH-dG:	8-hidroksi-deoksiguanozin
ACR/EULAR:	American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism
ACTB:	Beta aktin geni
ADMA:	Asimetrik dimetil arjinin
AFA:	Anti-fibroblast antikor
ANA:	Anti-nükleer antikor
ATM:	Ataxia-telangiectasia mutated kinaz
ATP:	Adenozin trifosfat
BER:	Baz eksizyon onarım yolağı
CaMKII:	Ca ²⁺ /kalmoduline bağımlı protein kinaz II
CH ₃ :	Metil grubu
Cp:	Crossing point
CRP:	C reaktif protein
CV:	Coefficient of variation
CYP24A1:	Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1 geni
CYP27B1:	Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1 geni
DEPC:	Dietil pirokarbonat
DEÜ:	Dokuz Eylül Üniversitesi
DLCO:	Karbonmonoksit difüzyon kapasitesi
DNA:	Deoksiribonükleik asit
Duox:	Dual oksidaz
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESR:	Eritrosit sedimentasyon hızı
ETZ:	Elektron transfer zinciri

FDA:	U.S. Food and Drug Administration (Amerika Gıda ve İlaç Dairesi)
FGF:	Fibroblast büyüme faktörü
GC-MS:	Gaz kromatografi-kütle spektrometri
GGT:	Gama glutamil transpeptidaz
GİS:	Gastrointestinal sistem
GSH:	Glutasyon
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRMS:	High-resolution (yüksek çözünürlüklü) kütle spektrometri
IFN:	İnterferon
IL:	İnterlökin
İAH:	İnterstisyel akciğer hastalığı
Kal:	Kalibratör
Kr:	Kreatinin
LC-MS/MS:	Sıvı kromatografi-sıralı kütle spektrometri
LD:	Bağlantı dengesizliği
LOD:	Tespit limiti
LOQ:	Kantitasyon limiti
MAP kinaz:	Mitojen aktive edici protein kinaz
MDA:	Malondialdehit
MMP:	Matriks metalloproteinaz
mRNA:	Haberci RNA
mRSS:	Modifiye Rodnan deri skoru
mVDR:	Membran ilişkili vitamin D reseptörü
NER:	Nükleotid eksizyon onarım yolağı
NO:	Nitrik oksit
NOS:	Nitrik oksit sentaz
NOX:	NADPH oksidaz
Nrf-2:	Nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2
O ₂ ⁻ :	Süperoksit anyonu

ONOO-:	Peroksinitrit
OOH:	Hidroperoksil grubu
PAH:	Pulmoner arteriyel hipertansiyon
PBS:	Phosphate buffered saline
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI3K:	Fosfoinozitol 3-kinaz
PKC:	Protein kinaz C
PLA2:	Fosfolipaz A2
PTH:	Paratiroid hormon
R-cdA:	8,5-siklo-deoksiadenozin-R enantiyomeri
RNA:	Ribonükleik asit
RNT:	Reaktif nitrojen türleri
ROOH:	Hidroperoksit
ROT:	Reaktif oksijen türleri
RT-PCR:	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RXR:	Retinoid X reseptörü
S-cdA:	8,5-siklo-deoksiadenozin-S enantiyomeri
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi
SOD:	Sodyum dismutaz
SP:	Spesifite proteini
SRM:	Sertifikalı referans materyal
SS:	Sistemik skleroz
TGF-β:	Transforme edici büyüme faktörü-beta
TLR:	Toll-benzeri reseptör
TNF:	Tümör nekroz faktör
Trp:	Triptofan
Tyr:	Tirozin
UCLA-GIT 2.0:	University of California, Los Angeles Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract 2.0 (GİS Tutulum şiddeti anketi)
UPLC:	Ultra performanslı sıvı kromatografisi
UV:	Ultraviyole

VDBP:	D vitamini bağlayıcı protein
VDR:	Vitamin D reseptörü
VDRE:	Vitamin D yanıt elementleri



SİSTEMİK SKLEROZ HASTALARINDA VİTAMİN D DÜZEYİ VE MOLEKÜLER YOLAĞININ OKSİDATİF DNA HASARI VE KLİNİK BULGULARI İLE İLİŞKİSİ

Doktora Tezi

Nazlı Ecem DAL BEKAR

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Sistemik skleroz (skleroderma) deri ve iç organların progresif fibrozu ile karakterize nadir bir otoimmün hastalıktır. Sklerodermada, inflamasyon ve oksidatif stresin birbirini besleyen kısır döngüler olarak yer aldığı ve bunun sonucunda oksidatif makromolekül hasarının arttığı bildirilmiştir. Bu hasarlar arasında oksidatif DNA hasarı, mutajenik ve sitotoksik etkileri sebebiyle uzun vadede birçok probleme neden olabileceğinden önemli bir yere sahiptir. D vitamini eksikliği, sklerodermada yaygın bir problem olup, replasmanı tedaviye katkı sağlayan önemli uygulamalardan biridir. Son yıllarda, D vitamininin antioksidan potansiyelinin gösterilmesi ile birlikte, patogenezinde oksidatif hasarın önemli bir rol oynadığı sklerodermada, D vitamini ve oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişkinin aydınlatılmasına ihtiyaç doğmuştur.

Bu tez kapsamında, sklerodermada oksidatif DNA hasarı, idrarda üç stabil hasar ürününün (8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA) sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometri (LC-MS/MS) yöntemi kullanılarak ölçülmesiyle kapsamlı bir şekilde gösterilmiş; serum D vitamini düzeyleri ise ultra performanslı sıvı kromatografi yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri (UPLC-HRMS) ile belirlenmiş ve vitamin D reseptör (VDR) gen ekspresyonu ile bu gende bulunan dört polimorfizm (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) RT-PCR ile analiz edilerek sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmıştır. Çalışmanın klinik prospektif bölümünde ise, D vitamini replasmanı alan hastaların, replasman sonrası DNA hasarı ve VDR gen ekspresyonu yeniden değerlendirilmiştir.

Sklerodermada ölçülen üç DNA hasar ürünü de sağlıklı bireylere göre artmış olup; serum D vitamini düzeyi ve VDR gen ekspresyonu ise düşük tespit edilmiştir ($p<0.05$). D vitamini replasmanının ardından üç hasar ürünü de azalma yönünde eğilim göstermiştir. DNA hasarının altın belirteci olan 8-OH-dG'deki düşüş ve VDR ekspresyonundaki artış istatistiksel anlamlılığa ulaşmıştır ($p<0.05$). Akciğer, eklem ve gastrointestinal sistem tutulumu olan hastalarda replasman sonrası azalan 8-OH-dG düzeyi ile D vitamininin organ tutulumu olan skleroderma hastalarında oksidatif hasarı azaltma yönündeki etkinliği gösterilmiştir.

Bu alışma, sklerodermada DNA hasarının kapsamlıca incelendiği ve D vitamini replasmanın DNA hasarı üzerine etkilerinin klinik prospektif bir tasarım ile değerlendirildiği ilk araştırmadır.

Anahtar Sözcükler: D vitamini, kütle spektrometri, oksidatif DNA hasarı, sistemik skleroz, vitamin D reseptörü

Tez sayfa adedi: 145

Danışman: Prof. Dr. G. Hüray İŞLEKEL



ASSOCIATION OF VITAMIN D STATUS AND ITS MOLECULAR PATHWAY WITH OXIDATIVE DNA DAMAGE AND CLINICAL MANIFESTATIONS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC SCLEROSIS

PhD Thesis

Nazlı Ecem DAL BEKAR

DOKUZ EYLÜL UNIVERSITY INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

Systemic sclerosis (scleroderma) is a rare autoimmune disease characterized by the progressive fibrosis of the skin and internal organs. Increased oxidative macromolecule damage has been reported in scleroderma. Oxidative DNA damage is prominent due to its cytotoxic and mutagenic effects. Since vitamin D deficiency is a common problem in scleroderma, vitamin D replacement is an important contributor during treatment. Following the demonstration of vitamin D's antioxidant potential, the need to clarify the relationship between vitamin D and oxidative DNA damage in scleroderma has arisen.

Hereby, oxidative DNA damage in scleroderma was comprehensively evaluated by measuring three stable damage products (8-OH-dG, S-cdA, R-cdA) by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); serum vitamin D levels were determined by ultra-performance liquid chromatography high-resolution mass spectrometry (UPLC-HRMS) and vitamin D receptor (VDR) gene expression and four polymorphisms in this gene (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) were analyzed by RT-PCR and compared with healthy individuals. In the prospective part, post-replacement DNA damage and VDR expression of the patients receiving vitamin D were re-evaluated.

All DNA damage products were increased in scleroderma compared to healthy individuals; vitamin D and VDR expression were found to be low ($p<0.05$). All DNA damage products showed a trend towards reduction following the replacement. The decrease in 8-OH-dG, as a gold marker of DNA damage, and increment in VDR expression reached statistical significance ($p<0.05$). The effectiveness of vitamin D in scleroderma patients with organ involvement has been demonstrated by attenuated 8-OH-dG after replacement in patients with lung, joint, and gastrointestinal system involvement.

This is the first study to comprehensively examine DNA damage in scleroderma and evaluate the effects of vitamin D on DNA damage by a clinical prospective design.

Keywords: mass spectrometry, oxidative DNA damage, systemic sclerosis, vitamin D, vitamin D receptor

Total page number: 145

Advisor: Prof. G. Hüray İŞLEKEL, MD, PhD



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İlk kez 1849 yılında D vitamini açısından zengin bir kaynak olan balık yağının tüberküloz tedavisinde etkinliğinin gösterildiği bir çalışma ile başlayan süreç, D vitamininin doğal ve edinsel bağışıklık sistemlerinde önemli rollerinin açığa çıkarıldığı bir dizi araştırmaya öncülük etmiştir. Günümüzde D vitamininin nükleer reseptörü (VDR) aracılığıyla bir transkripsiyon faktörü gibi davranabildiği ve DNA sekansında spesifik dizilere bağlanarak immün sistem de dahil olmak üzere birçok yolak ile ilişkili yaklaşık 300 geni doğrudan kontrol ettiği bilinmektedir (1). D vitamini eksikliğinin veya D vitamini sinyal yolaklarında meydana gelen aksaklıkların osteoartrit, diyabet, kanser, tüberküloz, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalığın patogenezinde ve progresyonunda rol oynadığı bildirilmiştir (2). Son yıllarda, D vitamininin immün sistem üzerindeki etkilerinin yanı sıra oksidatif strese karşı bir antioksidan olarak savaşabildiği de gösterilmiştir. Tüm bu etkileri göz önüne alındığında D vitamini, özellikle inflamasyon ve oksidatif stresin birbirini besleyen döngüler olarak önemli bir yere sahip olduğu otoimmün ve inflamatuvar hastalıkların patogenezinde veya tedavi sürecine katkı sağlamada yadsınamaz bir öneme sahiptir.

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (ROT) başta olmak üzere, serbest radikallerde artış ile prooksidanları detoksifiye eden antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması sonucu ortaya çıkmaktadır. Oksidatif hasarın kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar ile birlikte inflamatuvar hastalıklarda da artış gösterdiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Hücresel aerobik metabolizma ve inflamasyon gibi endojen yollar ile veya kimyasal ajanlara, radyasyona ve yüksek oksijen basıncına maruziyet gibi ekzojen yollar sonucu ortaya çıkan ROT, hücre membranındaki lipitler, hücre içi proteinler veya DNA gibi makromolekülleri oksidatif hasara uğratmakta; birçok hastalık ile ilişkilendirilen hasarlı ürünlerin oluşumuna yol açmaktadır. Oksidatif DNA hasarı ise organizmadaki kümülatif oksidatif stresin duyarlı göstergesi olması nedeniyle ayrıca önem taşımaktadır. Oksidatif stres, DNA'da şeker modifikasyonlarına, tek ve çift zincir kırıklarına, baz radikallerinin oluşumuna, DNA-protein çapraz bağlanmasına ve nükleozid hasarına

neden olmaktadır. DNA hasarı sonucu ortaya çıkan ürünlerden 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OH-dG) ve 8,5-siklo-deoksiadenozinin S ve R enantiyomerleri (S-cdA, R-cdA) baz ve şeker kalıntılarının aynı zamanda hasar gördüğü ürünlerdir ve DNA nükleozid hasarının başlıca belirteçleridir. Bu hasar ürünleri, DNA onarım enzimleri tarafından kesilir, periferik dolaşıma geçer ve idrarla uzaklaştırılır. Kimyasal stabiliteleri ve özgün yapıları göz önünde bulundurulduğunda birçok hastalıkta oksidatif stres varlığının belirlenmesi için iyi birer biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir (3).

Sistemik skleroz (SS, skleroderma), deri ve iç organların yaygın fibrozu ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır. Kliniğe özgü en belirleyici özelliği cildin fibrozu olmakla birlikte, inflamatuvar, fibrotik ve vasküler değişikliklerin gastrointestinal sistem, akciğer, eklemler, böbrek ve kalp gibi iç organlarda da görülebilmesi nedeniyle hastalık sistemik skleroz olarak isimlendirilir. SS, sıklıkla genç kadınları tutması ve hastaların fizyonomisini etkilemesi nedeniyle önemli psikososyal sorunları da beraberinde getirir. Sklerodermik değişiklikler morbiditeyi, iç organ tutulumu ise morbiditenin yanı sıra mortaliteyi etkilemektedir (4). Sklerodermanın patogenezi ve progresyonuna katkı sağlayan faktörler henüz tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, bazı immün sistem hücrelerinin hiperaktivasyonu ve proinflamatuvar sitokinlerin artan salınımının inflamasyona sebep olduğu ve bu durumun oksidatif stresi tetiklediği bilinmektedir. Ancak artan oksidatif stresin sebep olabileceği ve uzun vadede genomik instabilite sebebiyle birçok istenmeyen sürece yol açabilen DNA hasarının sklerodermadaki yerini incelemiş olan oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bunun yanı sıra, sklerodermada D vitamini eksikliği yaygın bir problem olup, D vitamini düzeyi ile bazı klinik skorlar arasında negatif korelasyon olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, sklerodermada D vitamini replasmanı rutin tedavi stratejilerine katkı sağlayan önemli bir faktör olarak yer almaktadır. Tüm bu süreçler göz önüne alındığında, sklerodermada oksidatif DNA hasarının klinik bulgular ile ilişkisi kapsamlı bir şekilde araştırılmalı, D vitamini eksikliğinin yanı sıra D vitamini sinyal yolağı da incelenmeli ve D vitamini ile DNA hasarı arasındaki olası ilişki ortaya konulmalıdır.

Bu tez çalışmasında, SS hastalarında oksidatif DNA hasarı ile D vitamini düzeyi arasındaki olası korelasyonun belirlenmesi ve hastalığın mekanizmasında D vitamini sinyal yolağının rolünün araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca hasta grubunun sınırlı ve yaygın deri tutulumlu olmak üzere iki alt sınıfta ayrı ayrı incelenmesi, modifiye Rodnan deri skorlaması, akciğer ve eklem tutulumları ve GİS tutulumunun şiddeti açısından değerlendirilmesiyle, hastalığın farklı alt grupları ve skorları ile oksidatif DNA hasarı, D vitamini düzeyi ve sinyal yolağında meydana gelebilecek aksaklıklar arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmıştır. Çalışmanın klinik prospektif tasarımı ise, SS hastalarına rutin tedavide uygulanan D vitamini replasmanının etkinliğini sınamak amacıyla replasmandan altı ay sonraki kontrollerinde bu hastalardan yeniden idrar ve kan örneği alınarak, oksidatif DNA hasarı ve vitamin D reseptör ekspresyonu incelenmiş, bu prospektif çalışma SS hastalarına uygulanan D vitamini replasmanının uzun vadeli etkisi açısından önemli bir değerlendirme olarak bilimsel literatürde yerini almıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda çalışmanın başlıca hedefleri şunlardır:

- I. SS hastalarının, serum örneklerinde D vitamini (25(OH)D3), idrar örneklerinde 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeylerinin HPLC-MS/MS ile ölçülmesi; VDR geninde bulunan tek nükleotid polimorfizmlerinin (rs1544410, rs2228570, rs7975232 ve rs731236) genotip analizinin prob temelli RT-PCR yöntemi ile yapılması ve VDR gen ekspresyonunun RT-PCR tekniği ile kantite edilmesi; sonuçların yaş aralığı ve cinsiyet açısından eşleştirilmiş, otoimmün ve kronik herhangi bir hastalık tanısı bulunmayan sağlıklı bireyler ile karşılaştırılması,
- II. Uluslararası kriterler doğrultusunda tanı alan SS hastalarının, sınırlı ve yaygın deri tutulumlu SS alt tiplerine göre sınıflandırılması, modifiye Rodnan deri skorlamasının yapılması, akciğer, eklem tutulumları ve GİS tutulum şiddetinin belirlenmesi; serum D vitamini düzeyi, oksidatif DNA hasarı miktarı, VDR gen polimorfizmleri ve VDR gen ekspresyon seviyesinin birbiri ile ilişkisinin incelenmesi ve hastaların klinikopatolojik bulguları ile bu parametreler arasındaki olası korelasyonların belirlenmesi,

III. D vitamini replasmanının ardından altıncı aydaki rutin kontrollerinde hastalardan alınan idrar ve kan örnekleri ile serum D vitamini düzeyleri, oksidatif DNA hasarı ve vitamin D reseptör ekspresyon düzeylerinin yeniden değerlendirilmesidir.

Çalışmanın olgu-kontrol bölümünün hipotezleri:

- Serum D vitamini düzeyi, skleroderma hastalarında sağlıklı bireylere göre daha düşüktür.
- Serum D vitamini düzeyi, hastaların bazı klinik skorları ile negatif korelasyon göstermektedir.
- Serum D vitamini düzeyi düşük olan hastalarda oksidatif DNA hasarı daha yüksektir.
- Oksidatif DNA hasarı, otoimmün ve inflamatuvar bir hastalık olan sklerodermada sağlıklı bireylere göre daha fazladır.
- Oksidatif DNA hasarı, hastaların bazı klinik skorları ile pozitif korelasyon göstermektedir.
- Sistemik skleroz hastalarında, vitamin D reseptör ekspresyonu sağlıklı bireylere göre daha düşüktür.
- Vitamin D reseptör geninde bulunan dört polimorfizm (rs1544410, rs2228570, rs7975232 ve rs731236) sistemik skleroz hastalığının patogenezi ile ilişkilidir.

Çalışmanın klinik prospektif bölümünün hipotezleri:

- Hastalarda D vitamini replasmanından sonra oksidatif DNA hasarı azalmaktadır.
- Hastalarda replasman sonrası artan D vitamininin genomik fonksiyonları için elzem olan vitamin D reseptör ekspresyonu da artmaktadır.
- Organ tutulumu olan skleroderma hastalarının (akciğer, eklem ve GİS) D vitamini replasmanı ile oksidatif DNA hasarı, tutulumu olmayan hastalara göre daha etkin bir şekilde indirgenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamini: Metabolizması ve Moleküler Yolağı

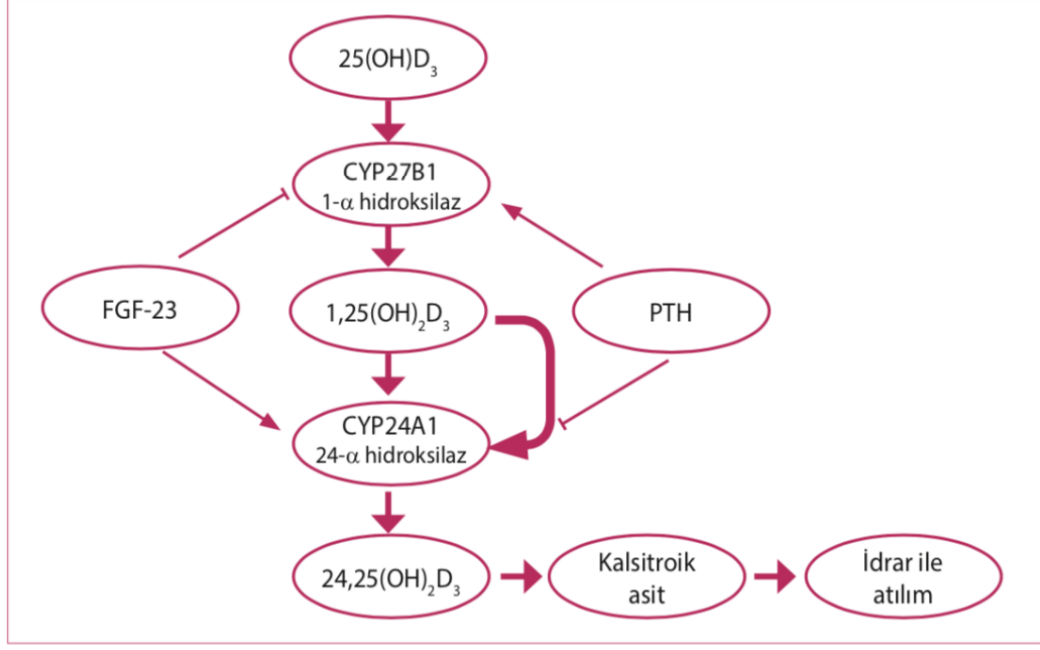
2.1.1. D Vitamininin Sentez ve Yıkımı

Steroid yapıda bir pro-hormon olarak tanımlanan D vitamininin D3 (kolekalsiferol) ve D2 (ergokalsiferol) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. Ergokalsiferol, bitkisel kaynaklı olmakla birlikte insan vücudunda nadiren ölçülebilir düzeylere ulaşmaktadır. Kolekalsiferol ise, hayvansal kökenli olup deride ultraviyole-B (UVB) ışınları ile 7-dehidrokolesterolün fotoliz reaksiyonu sonucu oluşmaktadır. Bu reaksiyonun ardından D vitamini bağlayıcı protein ile (*vitamin D binding protein*; VDBP) karaciğere taşınan D vitamininin metabolik olarak aktiflenmesi için ilk basamak, ekspresyonu CYP27A1 geni (*Cytochrome P450 Family 27 Subfamily A Member 1*) tarafından kontrol edilen vitamin-D-hidroksilaz enzimi ile 25. pozisyonundaki karbon atomuna bir hidroksil grubu eklenmesidir (5). Hidroksillenme sonucu oluşan reaksiyon ürünü 25-hidroksi vitamin D3 (25(OH)D3), yeniden VDBP'e bağlanarak böbreklere taşınır, proksimal tübüllerde bulunan endositik reseptör megalin aracılığıyla geri emilir (5). 25(OH)D3 ve VDBP kompleksi böbrek proksimal tübüllerinde bulunan lizozomlar aracılığıyla ayrılır ve serbestleşen 25(OH)D3'ün birinci pozisyonundaki karbon atomuna, ekspresyonu CYP27B1 (*Cytochrome P450 Family 27 Subfamily B Member 1*) geni tarafından kontrol edilen 25(OH)D3-1 α hidroksilaz enzimi ile bir hidroksil grubu daha eklenir (6). Bu hidroksillenme reaksiyonunun sonucunda, inaktif formdaki D vitamininin (25(OH)D3) metabolik olarak aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D3 (1,25(OH)2D3) oluşur (7). Önceleri sadece böbrek proksimal tübüllerinde ifade olduğu düşünülen CYP27B1 geninin, aktive olmuş makrofajlar gibi immün sistem hücrelerinde, deri epitel hücreleri, kolon hücreleri, kemik ve akciğerde mitokondriyal ekspresyonunun olduğunun gösterilmesi ile inaktif formdaki D vitamininin vücutta birçok hücre tipi tarafından aktiflenebildiği gösterilmiştir (6). Son yıllarda D vitamininin immün sistem regülasyonundaki rolünü açığa çıkarmayı hedefleyen çalışmalarda makrofajların interferon- γ (IFN- γ) veya toll-benzeri reseptör (*toll-like receptor*; TLR) ile aktivasyonu sonucu CYP27B1

geninin ifadesinin arttığı ve bu sayede hücre içi inaktif D vitamininin son aktiflenme basamağının daha etkin bir şekilde gerçekleştiği belirtilmiştir (6).

D vitamini, yağda eriyen vitaminler kategorisinde tanımlanmakta ve belirli bir dozun üzerinde toksik etkilerinin olduğu ifade edilmektedir (8). Bu nedenle normal koşullar altında, aktif D vitamininin belirli bir düzeye ulaşması katabolik süreci tetiklemekte ve CYP24A1 (*Cytochrome P450 Family 24 Subfamily A Member 1*) geni tarafından ifade edilen 24- α hidroksilaz enziminin ekspresyonunu arttırmaktadır. 24- α hidroksilaz enzimi, aktif D vitamini ile reaksiyona girerek metabolik olarak herhangi bir işlevi olmayan 24,25 dihidroksi vitamin D3'ün (24,25(OH)2D3) oluşmasını sağlamakta; bu işlevsiz form ise kalsitroik aside dönüştürülerek idrar ile atılmaktadır (6,9).

D vitamini sentez ve yıkım sürecini kontrol eden başlıca iki molekül fibroblast büyüme faktörü-23 (*fibroblast growth factor-23*; FGF-23) ve paratiroid hormondur (PTH) (5). FGF-23, vitamin D sentezini tetikleyen bir faktör olmakla birlikte bu işlevini D vitamininin metabolik olarak aktif form almasını sağlayan 25(OH)D3-1 α hidroksilaz enziminin ifadesinden sorumlu CYP27B1 geninin mRNA düzeyinde gen ekspresyonunu özellikle böbrek proksimal tübül hücrelerinde inhibe ederek gerçekleştirmektedir (10). Sentez yolağındaki inhibisyonunun yanı sıra, FGF-23'ün yıkımda görev alan 24- α hidroksilaz enziminin ekspresyonunu arttırarak aktif D vitamininin yıkım sürecini indüklediği de bilinmektedir (5). FGF-23'ün aksine PTH ise, D vitamininin aktif forma ulaşması için gereken 25(OH)D3-1 α hidroksilaz enziminin ekspresyonunu arttırmakta ve aktif D vitamininin yıkımına neden olan 24- α hidroksilaz enziminin ekspresyonunu inhibe ederek dolaşımda aktif formda D vitamini miktarını arttırmaktadır (5). D vitamininin aktiflenmesi, yıkımı ve tüm bu süreçlerin regülasyonu Şekil 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1. D vitamini metabolizması: Aktiflenme-yıkım basamakları ve bu süreçlerin regülasyonu (11).

2.1.2. D Vitamininin Moleküler Yolağı

D vitamininin işlevlerine aracılık eden moleküler yolakların aydınlatılması, bir pro-hormon olarak tanımlanan bu molekülün, önceleri sadece kemik ve mineral metabolizmasında görev aldığı yönündeki geleneksel bilginin yanı sıra birçok genin ekspresyonunu düzenleyerek farklı sistemlerde önemli rollere sahip olduğunu ortaya çıkarmıştır. D vitamini biyolojik fonksiyonlarını “genomik” ve “genomik olmayan (non-genomik)” olarak adlandırılan iki yolak üzerinden gerçekleştirmektedir.

Genomik olmayan yolak, başlıca ikincil haberciler aracılığıyla indüklenen bir sinyal kaskadı üzerinden ilerlemektedir. Bu yolakta D vitamini, membran ilişkili vitamin D reseptörüne (mVDR) veya 1,25 D₃ membran ilişkili hızlı yanıt steroid bağlayan proteine (1,25 D₃ membrane associated, rapid response steroid-binding protein; 1,25 D₃ MARRS) bağlanmakta; bu bağlanmayı takiben fosfoinozitol 3-kinaz (PI3K), fosfolipaz A₂ (PLA₂), protein kinaz C (PKC), Ca²⁺/kalmoduline bağımlı protein kinaz II (CaMKII) ve mitojen aktive edici protein kinaz (MAP kinaz) gibi ikincil haberciler aracılığıyla bir sinyal iletim kaskadı başlamaktadır (9,12).

Membranda tetiklenen bu süreç sonucunda, meydana gelebilecek iki alternatiften biri aktiflenen spesifikite proteini -1 ve -3 (SP-1, SP-3) ya da retinoid X reseptörü (RXR) gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin işleviyle vitamin D reseptörü (VDR) aracılı genomik yolağın tetiklenmesi; ikinci alternatif ise D vitamininin hızlı etkileri olarak bilinen Ca^{2+} ve Cl^- kanallarının açılmasıdır.

D vitamininin genomik yolağı ise VDR aracılı doğrudan gen ekspresyonunu aktive ya da inhibe etmeyi kapsamakta olup, D vitamininin bu yolak aracılığıyla yaklaşık 300 genin ifadesini kontrol edilebildiği belirtilmektedir (1). Bu yolak D vitamininin, hücre nükleusunda bulunan ve bu nedenle nükleer bir reseptör olarak adlandırılan VDR'ye bağlanması ile başlamaktadır. Aktif D vitamininin bağlandığı VDR, RXR ile heterodimerik bir yapı oluşturmakta ve bu yapı bir takım konformasyonel değişimler sonucu doğrudan DNA üzerinde bulunan spesifik dizilere bağlanmaktadır. VDR-RXR heterodimerik yapısının DNA üzerinde bağlandığı spesifik dizilere “vitamin D yanıt elementleri (*vitamin D response elements*; VDRE) denilmekte olup bu dizilerin D vitamininin kontrol ettiği hedef genin promotor bölgesinin “enhancer” ya da “süpresör” dizilerinde olduğu bilinmektedir. Bu sayede, D vitamini ilgili genin ekspresyonunu doğrudan aktive ya da inhibe edebilmektedir (13). D vitamini genomik yolak aracılığıyla ilgili genin aktivasyonunu VDR-RXR heterodimerik yapısının reseptörlerde bulunan helikslerin bir dizi iyonik ve hidrofobik etkileşimleriyle ilgili bölgedeki VDRE üzerinde stabilize olması ve birtakım koaktivatörlerin de yapıya katılmasıyla fonksiyonel sıkı bağlantılar içeren bir kompleks oluşturmaları ile gerçekleştirmektedir. Hedef genin genomik yolak aracılı inhibisyonunda ise, VDR-RXR heterodimerik yapısına katılan korepressörler aracılığıyla hedef gende epigenetik mekanizmaların rolüyle kromatin yapısı yeniden düzenlenmektedir. Bu süreçte, histon deasetilaz ve histon demetilaz enzimlerinin görev aldığı bilinmekle birlikte DNA metilasyon yolağının tetiklendiği de rapor edilmiştir (14). D vitamininin genomik yolak aracılığıyla hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü, kardiyovasküler sistemin regülasyonu, kanserli hücre çoğalmasının inhibisyonu, doğal ve edinsel bağışıklık sistemlerinin kontrolü ve oksidatif stresin indirgenmesi gibi birçok görev ile ilişkili geni doğrudan kontrol edebildiği bildirilmiştir (6,15).

2.1.2.1. Vitamin D Reseptör (VDR) Geni

D vitamininin genomik yolağının ana elementi olan VDR, metabolizma başta olmak üzere (%43), hücre ve doku morfolojisi (%19), hücre çoğalması ve farklılaşması (%10), hücre bağlantıları (%10), anjiyogenez (%9) ve epitelyal mezenkimal transizyon (%5) ilişkili birçok genin ifadesini doğrudan kontrol edebilmektedir (14). Bu nedenle VDR'nin hem normal fizyolojik süreçlerin işleyişinde hem de bu moleküler yolda meydana gelebilecek aksaklıkların diyabet, romatoid artrit ve Behçet hastalığı gibi birçok kompleks hastalıkta önemli rolü olabileceği bildirilmiştir (11,14).

VDR geni 12. Kromozom üzerinde bulunmakta, 11 ekzonik bölge içermekte ve kodlanan ve kodlanmayan ekzonları başlıca dört promotor bölge tarafından kontrol edilmektedir. Primer VDR transkripti için başlatıcı ekzon olarak tanımlanan ekzon 1a, güçlü bir CpG adacığında bulunmakta; insan, fare ve sıçanlarda yüksek oranda korunarak aktarılmaktadır (16). Ekzon 1a, birçok transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi içermekte olup VDR gen ekspresyonunun, transkripsiyon faktörleri ve CpG adacıklarının metilasyonu/demetilasyonu ile epigenetik mekanizmaların sinerjik etkileşimleri ile kontrol edildiği öne sürülmektedir (17). Alternatif VDR'leri kodlayan ekzon 1c ve ekzon 1d'nin de benzer şekilde insan, fare ve sıçanlarda korunarak aktarıldığı gösterilmiştir.

VDR geninin ekzonik ve intronik bölgelerinde bugüne kadar tanımlanmış olan yaklaşık 27.292 adet tek nükleotid polimorfizmi (*single nucleotid polymorphism*; SNP) bulunmakla birlikte (18); rs2228570, rs1544410, rs7975232 ve rs731236 sıklıkla karşılaşılan ve otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu bağımsız birçok çalışmada gösterilmiş olan varyantlardır (19–21). Bu SNP'ler arasında rs2228570; translasyon başlatıcı kodonda yer almakta olup T/C alleli olarak ifade edilmektedir. Bu bölgede T yerine C allelinin yer alması, 427 amino asit içeren VDR yerine üç amino asit kesilmiş 424 amino asit içeren VDR sentezine neden olmaktadır. 424 amino asit içeren VDR'nin, 427 amino asit içeren VDR'ye göre yüksek oranda transaktivasyonel kapasiteye sahip olduğu ve bu nedenle VDR geninin otoregülasyonunda birtakım etkilere sahip olabileceği düşünülmektedir (22). Üretilen proteini doğrudan etkileme potansiyeline sahip olduğu için rs2228570 polimorfizminin rolü, tip II diyabet,

osteoporoz, enfeksiyöz hastalıklar, skleroderma ve Behçet hastalığı gibi birçok kompleks hastalıkta incelenmiş olup bu polimorfizmin VDR ekspresyonunu etkileyerek bu patolojiler için bir risk faktörü olabileceği öne sürülmüştür (21,23,24).

VDR geninin 3'UTR bölgesine yakın bir konumda bulunan rs1544410 (G/A), rs731236 (T/C) ve rs7975232 (C/A) polimorfizlerinin ise fonksiyonel etkileri henüz aydınlatılamamış olmakla birlikte, bulundukları bölge nedeniyle VDR mRNA stabilitesinde değişikliklere neden olabileceği ve VDR ekspresyon düzeyini etkileyebileceği belirtilmektedir. Kodlanmayan ve sessiz SNP'ler olarak tanımlanan bu polimorfizmlerin henüz tanımlanmamış fonksiyonel değişimlerle de bağlantı dengesizliği (*linkage disequilibrium*; LD) içinde olabileceği düşünülmektedir. Rs1544410, rs731236 ve rs7975232 polimorfizmlerinin fonksiyonel etkisini ortaya çıkarmak amacıyla sağlıklı bireylerin kan mononükleer hücreleri üzerinde yürütülen bir çalışmada, rs1544410 için homozigot AA ve rs731236 için homozigot CC genotipine sahip bireylerin VDR protein düzeyi diğer genotiplere göre daha düşük bulunmuştur (24). Rs1544410 polimorfizmi için G, rs731236 için T ve rs7975232 için C allellerini birlikte bulundurmanın sırasıyla A, C, A allellerini birlikte bulundurmaya göre daha yüksek VDR ekspresyonu ile sonuçlanacağı bildirilmiştir (24).

Sonuç olarak, translasyon başlatıcı bölgede bulunması ve ifade edilen VDR proteinini doğrudan etkilemesi sebebiyle rs2228570; VDR ekspresyon düzeyini mRNA stabilitesi aracılığıyla etkileyebileceği yönünde araştırmalar olan ve 3'UTR bölgesinde birbirine yakın konumlanan rs1544410, rs731236 ve rs7975232 polimorfizmlerinin, olası risk/koruyucu faktörler olarak rolü birçok farklı patolojide araştırılmaktadır.

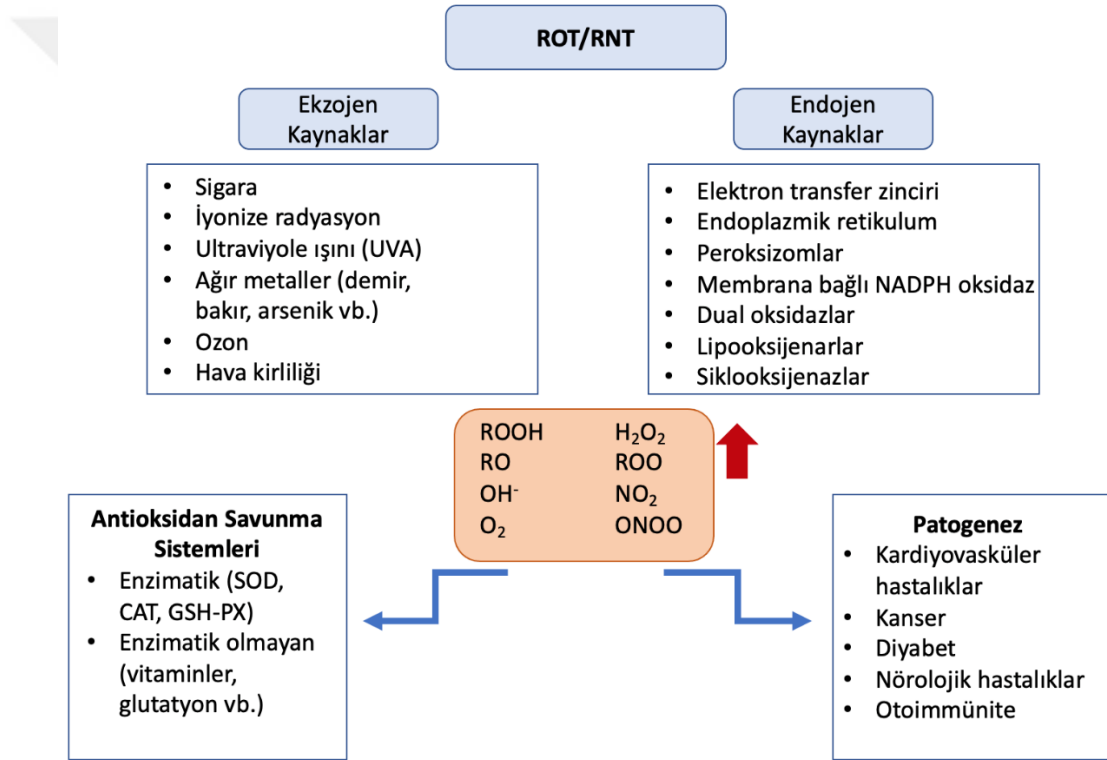
2.2. Oksidatif Stres

Fonksiyonel bir hücre ve mikroçevresi normal şartlar altında indirgenme/yükseltgenme (redüksiyon/oksidasyon; redoks) reaksiyonları açısından indirgenmiş bir formda bulunmaktadır. Ancak bazı durumlarda, hücrenin redükte formdan okside forma geçmesi bir diğer deyişle bu iki durum arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese neden olmaktadır (25). Oksidatif stres, reaktif oksijen ve

nitrojen türleri (ROT ve RNT) başta olmak üzere serbest radikallerde meydana gelen artış ile bu radikalleri detoksifiye etme görevine sahip antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile ortaya çıkmakta ve bu durum birçok hücrel süreçlerin fonksiyonunda aksaklık ile sonuçlanmaktadır (26).

2.2.1. ROT/RNT Kaynakları

ROT ve RNT'nin aşırı üretimi; hava kirliliği, sigara dumanı, iyonize radyasyon gibi ekzojen faktörlerin etkisiyle ve hücrel metabolizmanın doğal işleyişinde üretilen serbest radikallere antioksidan sistemlerin yetersiz kaldığı endojen süreçlerin bir sonucu olarak meydana gelmektedir (Şekil 2).



Şekil 2. ROT/RNT kaynakları, antioksidan savunma mekanizmaları ve oksidatif stres ilişkili hastalıklar (27).

2.2.1.1. Ekzojen ROT/RNT Üretimi

Hava kirliliği, sigara dumanı, iyonize ve ultraviyole (UV) radyasyon, ilaç veya toksinler, allerjenler, ozon, pestisit veya insektisit gibi bazı çevresel tetikleyicilerin hücrede ekzojen ROT/RNT üretimine sebep olduğu bilinmektedir (28,29).

Demir, bakır, kadmiyum, nikel, kurşun ve arsenik gibi ağır metallerin Fenton veya Haber-Weiss tipi reaksiyonlarla veya hücre içi metal iyonları ve benzer etkiye sahip hücresel bileşenlerle doğrudan reaksiyona girerek serbest radikal üretiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (30). Yapılan çalışmalarda, kurşunun beyin dokusunda lipid peroksidasyonunu tetiklediği; arseniğin ise nitrik oksit, süperoksit anyonu (O_2^-) gibi serbest radikallerin üretimini arttırırken glutatyon (GSH) peroksidaz, GSH redüktaz, GSH transferaz gibi antioksidan enzimleri sülfidril gruplarına bağlanarak inhibe ettiği gösterilmiştir.

Ekzojen ROT/RNT üretiminin temel sebeplerinden bir diğeri olan iyonize radyasyon, hidroksil radikali, O_2^- ve organik radikalleri hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik hidroperoksitlere dönüştürerek ROT/RNT üretimine katkı sağlamaktadır. Bu durumun bir sonucu olarak üretilen peroksit türevleri redoks reaksiyonları aracılığıyla hücresel demir ve bakır gibi metal iyonları ile reaksiyona girerek ikincil bir oksidatif aktivite sergilemektedir. Yapılan çalışmalarda, fibroblast hücrelerinin alfa parçacıklarına maruz kalması sonucu hücre içi oksijen konsantrasyonunun ve peroksit türevlerinin üretiminin arttığı gösterilmiştir (31). UV radyasyon (UV-A) ise, porfirinler, riboflavin ve NADPH oksidazı (NOX) indükleyerek oksidatif reaksiyonları tetiklemekte ve sonuç olarak hücre içi GSH düzeyinde azalma ve beraberinde oksidatif DNA hasarının temel belirteci olan 8-hidroksideoksi guanozin konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır (32).

2.2.1.2. Endojen ROT/RNT Üretimi

Mitokondriyal elektron transfer zinciri (ETZ) başta olmak üzere, endoplazmik retikulum (ER), peroksizomlar, membran NOX enzimleri (özellikle NOX-4), dual

oksidaz (duox) kompleksleri ve nitrik oksit sentazın (NOS 1-3) hücre içi ROT/RNT üretimine katkı sağlayan temel faktörler olduğu bilinmektedir.

Bu faktörler arasında özellikle oksijenli solunum ile ATP üretiminin önemli bir basamağı olan oksidatif fosforilasyon ile seyreden mitokondriyal ETZ, hücre içi ROT üretiminin temel kaynağı olarak tanımlanmaktadır. Bir ATP üretim döngüsünde, ETZ boyunca oksidatif fosforilasyona uğrayan elektronların yaklaşık %0.2-5'inin sızıntı sonucu moleküler oksijene aktarılaraq O_2^- üretimine sebep olduğu ve bu sızıntının özellikle kompleks I ve III'teki reaksiyonlar sırasında meydana geldiği gösterilmiştir (33). Mitokondrinin, hücre içi ROT üretiminin temel kaynağı olmasının yanı sıra bir ROT reseptörü olarak görev aldığı bildirilmiştir. Protein sentezi veya degradasyonu sırasında proteinlerde meydana gelen kovalent veya enzimatik değişikliklerin bir dizi hastalığı oksidatif hasar veya mitokondriyal disfonksiyon yoluyla tetiklediği bildirilmiştir (34). Protein post-translasyonel değişimlerinin mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesine serbest radikaller veya diğer bazı haberciler yoluyla katkı sağladığı da ifade edilmektedir (34).

Süperoksit radikalleri, mitokondrideki reaksiyonlar dışında başlıca NOX enzimleri, daha az miktarda ise siklooksijenazlar (COX1-2), ksantin oksidoredüktaz ve sitokrom p450 gibi birçok metabolik enzimin aktivitelerinin sonucu bir yan ürün olarak üretilmektedir (35). Üretilen O_2^- radikallerinin anyonik özellikleri sebebiyle lipid hücre membranından difüzyonu oldukça yetersizdir. Hücre içinde biriken O_2^- , sırasıyla H_2O_2 ve hidroksil radikaline indirgenir ve daha ileri reaksiyonlarla peroksil radikalleri ve hipoklorit iyonlarına dönüşür (36,37).

Hücre içi ROT/RNT üretiminin bir diğer kaynağı ise mikrozom ve lizozomlardır. Makrofajlar ve nötrofiller gibi bazı immün sistem hücreleri, NOX izoformlarının da görev aldığı bir dizi oksijen-bağımlı mekanizma aracılığıyla istilacı mikroorganizmalar ile savaşırken H_2O_2 başta olmak üzere ROT/RNT üretimine sebep olmaktadır (38). Ayrıca yabancı proteinlerin degrades edilmesi ya da bakteri/virüslerin ortadan kaldırılması sürecinde fagositik hücrelerde meydana gelen oksidatif patlama da hücre içi ROT/RNT konsantrasyonunu arttıran mekanizmalardan biridir.

Son olarak, başlıca hücre membranında meydana gelen bazı sinyalizasyon yollarının da hücre içi ROT/RNT artışına katkı sağladığı ifade edilmiştir. Hücre membranında, hormonlar, sitokinler veya büyüme faktörleri ile PI3K gibi bir dizi ikincil haberciler aktiflenmekte ve bu haberciler ile ilişkili reseptörler aracılığıyla NOX enzimleri aktive olmaktadır (25). NOX aktivasyonu, O_2^- üretimi ile sonuçlanmakta olup, O_2^- superoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla ile H_2O_2 üretimine neden olmaktadır. NOX enziminin aktiflenmesine neden olarak artan O_2^- ve H_2O_2 düzeylerine sebep olan bir diğer aracı ise ileri glikasyon son ürünlerinin reseptörüdür (receptor for advanced glycation end products; RAGE). Bu reseptörün artan ifadesi ve oksidatif stres ile ilişkisi diyabet, Alzheimer ve osteoartrit gibi hastalıklarda bildirilmiştir (39).

2.2.2. Oksidatif Makromolekül Hasarı

Metabolik aktiviteler gibi endojen süreçler ya da ekzojen tetikleyiciler sonucu artan ROT/RNT miktarına karşın antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalmasıyla meydana gelen oksidatif stres, protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi hücrenin tüm yaşamsal bileşenlerine hasar verebilmektedir (40,41). Oksidatif makromolekül hasarı olarak tanımlanan bu durumun, kanser, nörolojik, kardiyovasküler, otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklar, sepsis, hepatit, pankreatit, astım, osteoartrit gibi birçok patoloji ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (40,42). Oksidatif hasar, bazı patolojilerde hastalık ile ilişkili bir dizi mekanizmanın kaçınılmaz bir sonucu olarak ortaya çıkarken, diğer bazı durumlarda ise patolojiye doğrudan katkı sağlayan faktörler olarak rapor edilmektedir.

Biyolojik sistemlerin oldukça önemli bir bileşeni olan proteinlerin, ROT/RNT tarafından modifikasyona uğratılması; yapı, yük, katlanma, fonksiyon, hidrofobiklik/hidrofiliklik ve amino asit ve protein kompozisyonunda değişimlere sebep olmaktadır. Serbest radikaller ile proteinler arasındaki reaksiyonlar; C–H, S–H, N–H veya O–H bağlarından H atomunun çıkarılması, elektronca zengin bölgelerden elektron koparılması ya da aromatik halkalar ve sülfür grupları gibi elektronca zengin merkezlere ekleme yapılması olmak üzere başlıca üç yolla meydana gelmektedir (43).

Bu reaksiyonlar, karbon merkezli radikallerin, tiyl radikalının, triptofandan (Trp) oluşan indolil radikali gibi azot merkezli radikallerin ve tirozinden (Tyr) oluşan fenoksil radikalleri gibi oksijen merkezli türlerin oluşumu ile sonuçlanmaktadır. Oluşan bu radikallerin O₂ ile reaksiyonu sonucu disülfidler, Trp-Trp ve Tyr-Tyr gibi çapraz bağlanan ürünler ve Tyr-Trp gibi çapraz oluşan dimerler meydana gelmektedir. Proteinlerin ROT/RNT ile oksidasyonu sonucu yaygın olarak oluşan ve birçok patolojide incelenen bazı oksidatif hasar ürünleri; sistein kökenli sülfirik ve sülfonik asit, metiyonin kökenli sülfoksit ve sülfon, tirozin kökenli 3,4 dihidroksi fenilalanin (DOPA), triptofan kökenli 6-nitroTrp ve hidroksi-Trp ve histidin kökenli 2-okzohistidin ve 4-hidroksi-2-okzohistidindir (44).

Oksidatif stres, monosakkarit ve polisakkarit yapıdaki karbonhidratların da hasarına neden olmaktadır. Artan ROT/RNT, monosakkaritlerin degrade olarak karbon iskeletlerine fragmentasyonunu indüklemektedir. Aerobik koşullar altında karbon merkezli radikaller peroksil gruplarını aktarmak için üç farklı yol izlemektedir. Birinci yolla, peroksil radikali ile reaksiyona giren glukoz molekülü, hidroperoksil grubunun (OOH) kaybı ile reaktif bir karbonil bileşiği olan glukozona dönüşmektedir (45). İkinci yolla D-2-deoksiriboz gibi bir monosakkaritin hidroperoksit ile reaksiyona girmesinin akabinde halka genişlemesi ve ardından hidrolitik bölünme (Criegee yeniden düzenlemesi) yoluyla veya Fe²⁺ iyonu ile alkoksil radikaline indirgenip β fragmentasyona uğramasıyla oksidasyonu söz konusudur (46). Üçüncü yolla ise nadiren gerçekleştiğinden daha önemsiz sayılmakla birlikte hem homolitik hem de heterolitik yollarla ayrışabilen, oldukça reaktif türler olan tetroksitlerin oluştuğu dimerizasyon mekanizmalarını içermektedir (47). Hidroksil radikalının merkezde olduğu bu yolların yanı sıra süperoksit anyonu ve peroksinitrit gibi ROT/RNT'lerin de oksidasyon yoluyla monosakkarit degradasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Tüm bu mekanizmalar aracılığıyla meydana gelen bazı monosakkarit oksidasyon ürünleri; glioksilik asit, glioksal ve 3-deoksi glukozondur (47). Monosakkaritlerin yanı sıra, hiyaluronik asit gibi polisakkarit formundaki bazı karbonhidratlar da OH⁻ ve H₂O₂ aracılığıyla oksidasyona uğramakta ve hiyaluronik asidin yapı taşları olan N-asetilglukozamin ve glukuronik asidin oksidasyonu ile mezo-

tartarik asit, arabinarik asit ve glutarik asit gibi oksitlenme ürünleri meydana gelmektedir (48).

Artan ROT/RNT konsantrasyonu, fonksiyonel bir hücrenin önemli bileşenlerinden biri olan lipidlerin peroksidasyonuna neden olmaktadır. Lipit peroksidasyonu, başlıca $\text{OH}^\cdot$ ve OOH radikallerin karbon-karbon çift bağı içeren özellikle çoklu doymamış yağ asitleri gibi lipid molekülleri ile reaksiyona girerek bir karbondan hidrojen çıkarılmasını ve oksijen eklenmesini içeren, lipid peroksil radikalleri veya hidroperoksitlerin üretimi ile sonuçlanan bir süreçtir (49). Lipit peroksidasyonunun en iyi bilinen hedefleri; glikolipitler, fosfolipitler ve kolesterol olmakla birlikte onarım kapasitesini aşan lipid hasarının hücrenin apoptoz/nekroz gibi programlı ölümüne sebep olmakta ve moleküler hasar birçok patoloji ve hızlı yaşlanma ile ilişkilendirilmektedir (50). Ayrıca lipid peroksidasyonunun hücre membranı üzerine hücre bütünlüğünü bozacak yönde etkileri olduğu da bilinmektedir (51,52). Lipit peroksidasyonunun başlama basamağında; $\text{OH}^\cdot$ gibi bir prooksidan, allilik hidrojeni kopararak karbon merkezli lipid radikalini oluşturmaktadır. İlerleme basamağında ise, lipid radikali oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksi radikalini oluşturmakta ve bu radikal ileri reaksiyonlarda başka bir lipid molekülünden hidrojen kopararak zincirleme reaksiyon ile yeni bir lipid radikali ve lipid hidroperoksit meydana getirmektedir. Lipit peroksidasyonu bir kez başladığında, ortamda yeterince antioksidan molekül bulununcaya kadar zincirleme reaksiyon şeklinde devam etmektedir. Lipit peroksidasyonunun başlıca ürünleri lipid hidroperoksitlerdir. Lipit peroksidasyonu sırasında ikincil ürünler olarak ortaya çıkan aldehitler arasında malondialdehit (MDA), propanal, hekzanal ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) ise en iyi bilinen lipid peroksidasyon ürünlerindendir. Bu ürünlerin yanı sıra, araşidonik asidin serbest radikaller ile enzimatik olmayan reaksiyonları sonucu meydana gelen prostaglandin benzeri moleküller olarak tanımlanan izoprostanlar da lipid peroksidasyonunun özgün ve stabil belirteçleri olarak tanımlanmaktadır.

Oksidatif stresin, fonksiyonel bir hücrenin önemli bileşenleri olan proteinler, karbonhidratlar ve lipidlere verdiği hasarın yanı sıra, hücrenin genetik materyali olan

ve barındırdığı sitotoksik ve mutajenik potansiyel sebebiyle ayrıca önem arz eden DNA hasarına da neden olduğu bilinmektedir.

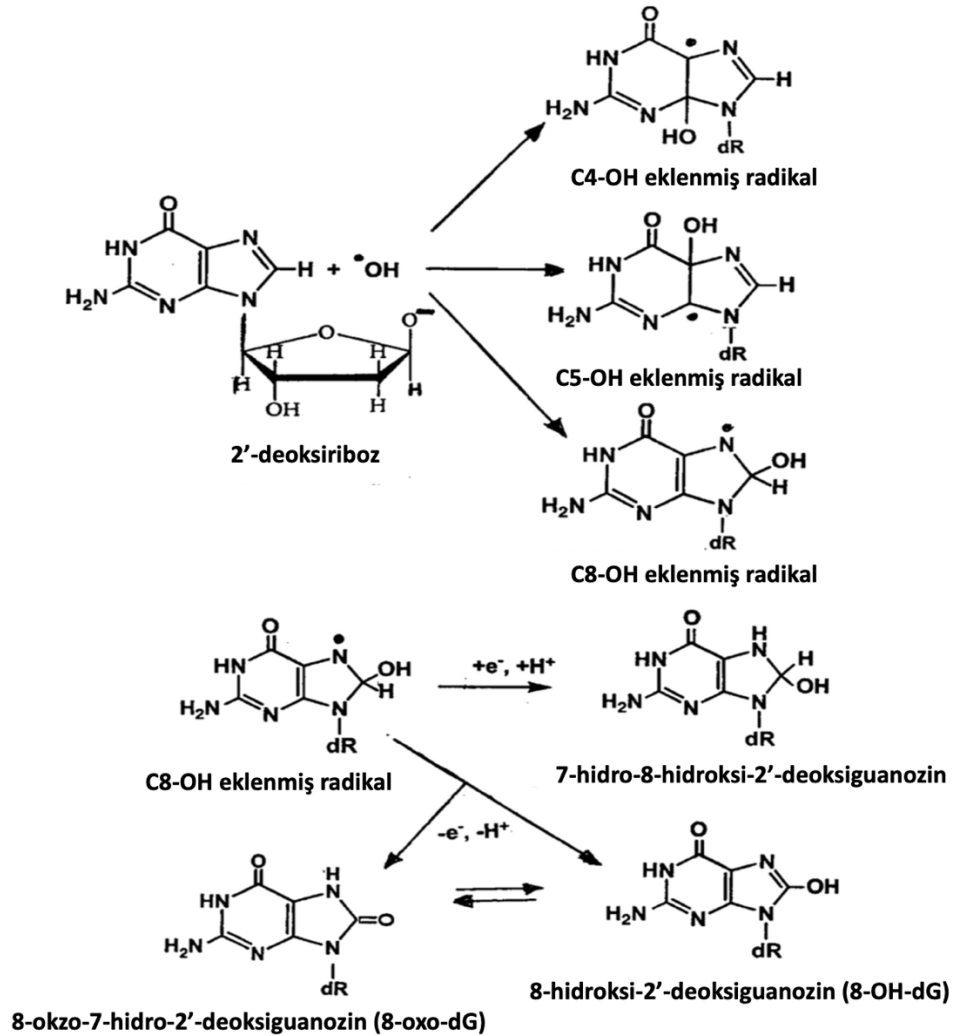
2.2.2.1. Oksidatif DNA Hasarı

DNA hasarı, endojen ve ekzojen olarak gruplandırılan birçok mekanizma sonucu meydana gelmektedir. Bu mekanizmalar arasında oksidatif DNA hasarı, endojen faktörlerin başında yer almakta ve birçok patolojide önemi olan hasarlı DNA ürünlerinin oluşumuna sebep olmaktadır (53,54). Oksidatif DNA hasarı, başlıca OH⁻ olmak üzere ROT/RNT'nin DNA yapısında yer alan deoksiriboz şekeri veya pürin ve pirimidin bazları ile reaksiyona girmesi ile meydana gelmektedir. Bu reaksiyonlar, yapıda bulunan metil grubundan (CH₃) ya da deoksiribozun C-H iskeletinden bir hidrojen grubunun koparılması veya yapıya çift bağların eklenmesi ile sonuçlanmaktadır. Serbest radikaller, sıklıkla elektron yoğunluğu yüksek olan bölgelere atak yapma eğiliminde olup guanin ve adenin bazları DNA'nın maruz kaldığı oksidatif reaksiyonlarda özellikle önem taşımaktadır. Oksidatif DNA hasarı; baz hasarı, şeker hasarı, nükleozid hasarı, tandem lezyonlar, DNA-protein çapraz bağlanmaları, abazik bölgelerin oluşması ve DNA tek ve çift zincir kırıkları gibi farklı mekanizmalarla oluşmaktadır (55). Oksidatif DNA hasarı ürünleri arasında 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), en sık meydana gelen ve kanser başta olmak üzere birçok patoloji ile ilişkilendirildiğinden altın standart olarak tanımlanan nükleozid hasarı ürünüdür. 8,5-siklo-2'-deoksiadenozinler ise DNA yapısındaki hem baz hem de şekerin aynı anda hasar gördüğü "tandem lezyonlar" olduğundan ayrıca önem taşımaktadır.

2.2.2.1.1. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG)

DNA yapısındaki guanin bazının sekizinci karbonu ile OH⁻ radikalinin reaksiyona girmesi sonucu C8-hidroksiguanin (8-OHGua) meydana gelmektedir. Daha ileri reaksiyonda, 8-OHGua'dan bir elektron koparılması ile deoksiriboz şekerinin de yapıda bulunduğu nükleozid formu olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG) oluşmaktadır (Şekil 3). 8-okso-7-hidro-2'-deoksiguanozin (8-oxo-dG) ise, 8-OH-dG'nin keto-enol tautomerizasyonu sonucu meydana gelmekte olup bu iki

molekül biyolojik sistemlerde hızlıca birbirine dönüşebilmekte ve bilimsel literatürde aynı bileşiğin sinonimi olarak kullanılmaktadır. DNA’da bulunan diğer bazların da OH⁻ radikali ile reaksiyonu sonucu bir takım hasar ürünleri oluşmaktadır. Ancak, 8-OH-dG en yaygın DNA hasarı lezyonu olması ve mutajenik etkileri nedeniyle kanser başta olmak üzere kardiyovasküler, metabolik, otoimmün ve otoinflamatuar hastalıklarla ilişkilendirilmiş olup DNA hasarının altın belirtici olarak tanımlanmaktadır (56). 8-OH-dG’nin mutajenik potansiyeli, baz eşleşmesi sürecinde spesifite kaybı, bitişik pirimidinlerin yanlış okunması veya bu lezyonun karşısına adenin eklenmesi olarak bildirilmektedir (57). 8-OH-dG lezyonu sebebiyle meydana gelen en yaygın mutasyon ise GC → TA transversiyonudur (58,59).



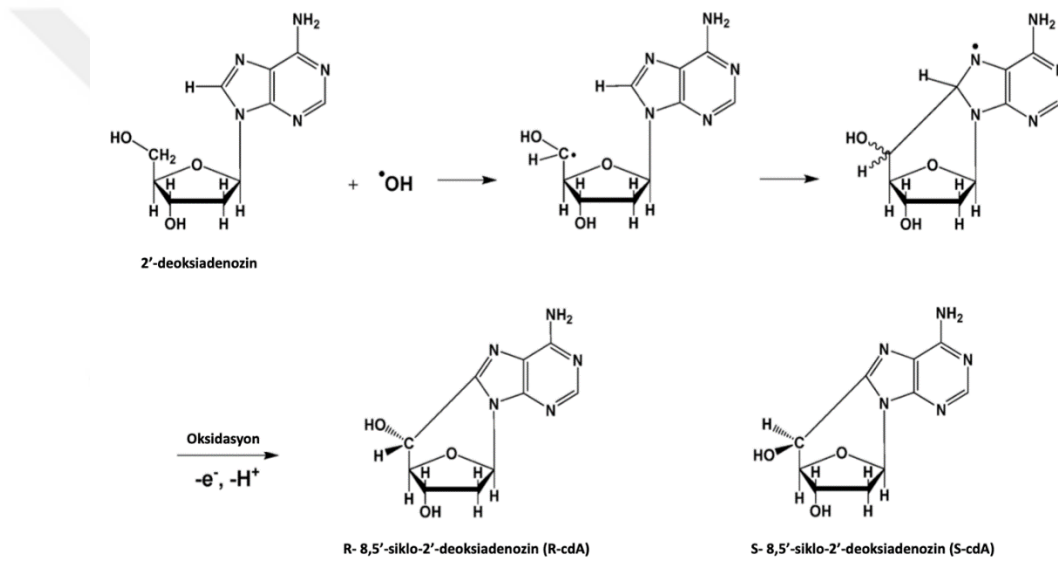
Şekil 3. 8-OH-dG oluşum mekanizması (60)

8-OH-dG lezyonu, doku örnekleri, idrar, lökosit DNA'sı gibi biyolojik materyallerden immünoassay tabanlı metotlar (ELISA veya immünohistokimya gibi), tek hücre jel elektroforezi (comet assay) veya kromatografi ve kütle spektrometri temelli yöntemler ile tespit edilebilmektedir (Valavanidis). Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (*European Standards Committee of Oxidative DNA Damage*; ESCODD) kromatografi ve kütle spektrometri temelli yöntemleri karşılaştırmış ve 8-OH-dG lezyonunun hassas kantitasyonu için sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometri (LC-MS/MS) yönteminin yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ve gaz kromatografi kütle spektrometri (GC-MS) yöntemlerine göre daha güvenilir olduğunu; hassasiyet ve kesinliğin optimal değerlere ulaştığını bildirerek, 8-OH-dG lezyonunun analizi için LC-MS/MS tekniğini referans metot olarak belirlemiştir (61).

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

DNA yapısında bulunan şekerin beşinci karbonu ile OH⁻ radikalinin reaksiyona girmesi ile oluşan C5' merkezli şeker radikali adenozinin pürin halkasının sekizinci pozisyonundaki karbon atomuna atak yapmakta ve bu atak sonucu meydana gelen N7 merkezli radikal oksidasyonu C5' ve C8 pozisyonları arasında bir kovalent bağ oluşumu ile siklizasyona yol açmaktadır (Şekil 4). Bu mekanizma, pürin halkasının C8 karbonunun radikal ataklara karşı oldukça reaktif olduğunun gösterilmesi, ayrıca poliadenilik asitte (poliA) 8,5-siklo-adenozinin (cA) oluşumu ve 2'-deoksiadenozinden 8,5-siklo-deoksiadenozinlerin (cdA) formasyonunun kanıtlanması ile doğrulanmıştır (62,63). Bu yolla DNA yapısında bulunan pürin bazının ve deoksiriboz şekerinin eş zamanlı hasarı söz konusu olduğundan bu hasarlar "tandem lezyonlar" olarak adlandırılmaktadır. C5'-C8 siklizasyonu stereospesifik bir doğada olup biyolojik sistemlerde cdA hasar ürünü R- veya S- enantiyomeri formunda bulunabilmektedir. Substrat, deneysel koşullar, DNA konformasyonu, nükleozidlerin supramoleküler organizasyonu gibi faktörlerin R- ve S- enantiyomerlerinin oranını etkilediği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, tek zincirli DNA'da (ss-DNA) R-enantiyomerinin S- formunu domine ettiği bildirilirken; çift zincirli DNA'da (ds-DNA) bu durumun S- enantiyomeri lehine tersine döndüğü ifade edilmektedir (64).

8,5-siklo-deoksiadenozinlerin, transkripsiyon faktörlerini bloklarak gen ekspresyonunu inhibe edebildiği ve DNA polimeraz δ da dahil olmak üzere DNA polimeraz enzimlerini de engelleyebildiği gösterilmiştir (65–67). Ayrıca, insan RNA polimeraz-II enziminin 8,5-siklo-deoksiadenozinler gibi heliks distorsiyonuna neden olan lezyonları by-pass etmesinin transkripsiyonel mutageneze yol açtığı bildirilmektedir. Bu durumun bir sonucu olarak özellikle S-cdA bir sonraki nükleotidin 5' ucundaki adenozin ile yanlış eşleşmekte ve çoklu nükleotid delesyonları meydana gelmektedir (68). Tüm bu biyolojik etkileri göz önüne alındığında, S-cdA ve R-cdA'nın kanser ve yaşlanma başta olmak üzere bazı kronik kompleks hastalıklarda önemli bir role sahip olduğu ifade edilmektedir (69).



Şekil 4. 8,5-siklo-deoksiadenozinlerin oluşum mekanizması (70)

8,5-siklo-deoksiadenozinlerin biyolojik materyallerden analizi GC-MS ve LC-MS/MS gibi kütle spektrometri temelli yöntemlerle mümkün olmaktadır. S- ve R-cdA, endonükleaz, ekzonükleaz ve alkalin fosfotaz enzimlerinin karışımı ile dinükleotid, oligonükleotid ve DNA'dan ayrılarak ve stabil izotop işaretli internal standartlar kullanılarak GC-MS ya da LC-MS/MS yöntemleri ile analiz edilebilmektedir. 8,5-siklo-deoksiadenozinlerin kromatografik ve kütle spektrometrik davranışlarının belirlenmesi ve analitik metotların geliştirilmesi bu lezyonların tanımlanması ve hassas kantitasyonunu mümkün kılmakla birlikte LC-MS/MS yönteminin DNA'da

bulunan S-cdA ve R-cdA'nın hem kalitatif hem de kantitatif analizi için güvenilir ve sağlam bir teknik olduğu vurgulanmaktadır (70).

2.3. D Vitamini: Oksidatif Stres ve İmmün Regülasyondaki Rolü

2.3.1. D vitamini ve Oksidatif Stres

Normal koşullar altında reaktif oksijen türlerinin oluşumuna sebebiyet veren reaksiyonlar geri dönüşümlü olup yükseltgenmiş aktif bir protein işlevini yerine getirdikten sonra yeniden indirgenerek inaktif formuna geri dönmektedir. D vitamininin bu süreçte, başlıca klotho ve nükleer faktör eritroid 2 ilişkili faktör 2 (nrf-2) gibi transkripsiyon faktörlerinin aracılığıyla antioksidan genlerin ifadesini düzenlemekte ve bu sayede ROT üretimine sebep olan sinyalizasyon süreçlerinde oluşan oksidatif değişiklikleri geri dönüştürerek ya da doğrudan ROT'ların detoksifikasyonunu sağlayarak oksidatif stresi indirgemede rol oynamaktadır (25). D vitamini, gama glutamil transpeptidaz (GGT) gen ekspresyonunu arttırarak başlıca redoks tamponu olarak tanımlanan güçlü bir antioksidan olan glutatyon (GSH) sentezini arttırmakta; artan GSH düzeyi ile dolaylı olarak ROT üretiminin temel kaynaklarından biri olan NOX ifadesini ise azaltmaktadır (71). Bunun yanı sıra, D vitamininin glutatyon redüktaz, glutamat sistein ligaz ve glikoz 6 fosfat dehidrojenaz gibi antioksidan enzimlerin sentezini genleri regüle ederek arttırmakta, ayrıca glutatyon peroksidaz enziminin ekspresyonunu arttırarak H_2O_2 'in suya dönüşümünü sağlamakta ve bu sayede güçlü bir ROT olan H_2O_2 'in detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır (15,72).

D vitamininin antioksidan olarak tanımlanmasını sağlayan bir diğer mekanizma ise hücre içi Ca^{2+} homeostazındaki rolüdür. Hücre içinde kontrolsüz bir şekilde artarak mitokondride de birikime neden olan Ca^{2+} mitokondriyel metabolizmayı etkilemekte ve sonuç olarak artan O_2^- ve H_2O_2 sentezine neden olmaktadır (25). Bunun sonucunda mitokondride artan O_2^- konsantrasyonu sebebiyle mitokondriyel permeabilite geçiş porları açılmakta ve bu durum mitokondriye daha fazla Ca^{2+} girişine sebep olarak kısır bir döngü başlatmaktadır. Artan hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu, ROT üretiminin yanı sıra RNT üretimini de tetiklemektedir. Artan

Ca^{2+} düzeyi, nitrik oksit (NO) konsantrasyonunun artışına sebep olurken, bu süreç peroksinitrit (ONOO^-) üretimi ile de sonuçlanabilmektedir. Hücre içinde Ca^{2+} konsantrasyonunun kronik artışına bağlı olan tüm bu süreçte D vitamini, Ca^{2+} konsantrasyonunu azaltmak amacıyla hücre dışına bu iyonu pompalamak ile görevli sodyum/kalsiyum değiştiricisi (NCX) ve plazma membranı Ca^{2+} ATPaz (PMCA) enzimlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır (73–76). Bunun yanı sıra D vitamini, hücre içine daha fazla Ca^{2+} girişini engellemek amacıyla L tipi Ca^{2+} kanallarının ifadesini ise azaltmaktadır. Ayrıca D vitamininin, hücre içinde artan Ca^{2+} konsantrasyonunu tamponlayabilen kalsiyum bağlayıcı proteinler olan parvalbümin, kalbindin D-9 k ve kalbindin D-28 k proteinlerinin de sentezini arttırdığı bilinmektedir (73–76).

2.3.2. D Vitamini ve İmmün Regülasyon

D vitamininin oksidatif stresin indirgenmesi sürecinde antioksidan bir molekül olarak önemli bir rol oynamasının yanı sıra hem doğal hem edinsel bağışıklığın düzenlenmesinde de görev aldığı bilinmektedir. Nötrofil, T lenfosit, makrofaj ve dendritik hücreler gibi immün sistem hücrelerinde VDR ifadesinin tespit edilmesi ve VDR ekspresyonunun aktive olmuş inflamatuvar hücrelerde artışının gösterilmesi, D vitamininin immün sistemin kontrolündeki önemini ortaya çıkarmıştır (77,78). Bunun yanı sıra, önceleri sadece böbrek proksimal tübül hücrelerinde eksprese olduğu düşünülen CYP27B1 geninin de birçok immün sistem hücresinde ifade olarak $25(\text{OH})\text{D}_3$ - 1α hidroksilaz enzim sentezini sağladığı; bu sayede inaktif formdaki D vitamininin ($25(\text{OH})\text{D}_3$) immün sistem hücrelerinde de aktif forma ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) dönüştürülebildiği gösterilmiştir (79–81).

D vitamininin immün sistem regülasyonundaki rolü doğal immün sistemin ve edinsel immün sistemin kontrolü olarak irdelenebilmektedir. D vitamininin doğal immün sistem üzerindeki etkisi ilk olarak 1849 yılında kolekalsiferol açısından zengin bir kaynak olan balık yağının kullanımı ile tüberküloz tedavisinin başarıya ulaştığının rapor edilmesi ile gösterilmiştir (82). Bu çalışma, *mycobacterium tuberculosis* ile enfekte edilmiş olan monosit hücre hattı kullanılarak gerçekleştirilmiş olan ve $25(\text{OH})\text{D}_3$ ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ arasındaki direkt ilişkiyi gösteren bir diğer çalışma ile desteklenmiştir (83). Monosit ve makrofajlar gibi doğal immünitede görevli hücrelerin

TLR eksprese ettiği ve doğal immün yanıtın TLR aracılı başladığı bilinmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda D vitamininin TLR'ler aracılığıyla makrofaj farklılaşmasını ve mikrosidal etkiyi arttırarak doğal immün yanıtı tetiklediği gösterilmiştir (14). İnsan keratinositlerinde tümör nekroz faktör (TNF) gibi sitokinlerin TLR'lere bağlanması ile CYP27B1 geninin ekspresyonunun arttığı ve bu sayede inaktif formdaki D vitamininin aktiflenerek işlev gördüğü bildirilmiştir. Ayrıca, monosit/makrofajlardaki TLR 2/1 heterodimer yapısının *mycobacterium tuberculosis* ile uyarımı, CYP27B1 geninin aktivasyonunun yanı sıra bu hücrelerde VDR gen ekspresyonunu da arttırmaktadır (14). D vitamininin TLR'lerin yanı sıra doğal immün sistemdeki rolünün bir diğer aracısı da katelisidinlerdir. Katelisidinler, polimorfonükleer lökositlerde, monosit/makrofajlarda özellikle lizozom organelinde ekspresyonu bulunan ve enfeksiyonlara karşı doğal savunmada önemli bir role sahip olan antimikrobiyal bir peptit ailesi olarak tanımlanmaktadır. Aktif D vitamininin VDR'ye bağlanması ile başlayan genomik yolak aracılığıyla, transkripsiyon faktörü gibi davranan bu ligand/reseptör kompleksinin katelisidinlerin sentezini arttığı gösterilmiştir (84–86).

D vitamini edinsel immün sistemin regülasyonunda ise T ve B lenfositlerin farklılaşma ve aktivasyon süreçlerine etki ederek görev almaktadır. Aktif D vitamininin sitotoksik T lenfositler olarak tanımlanan CD8+ T lenfositlerin aşırı aktivasyonunu önlemekte ve ayrıca bu hücrelerden de TNF-  ve IFN-  salınımını da azaltarak uyarımı kontrol altına almaktadır (87,88). Benzer şekilde, edinsel immün yanıtın alevlenmesine neden olan CD4+ pozitif yardımcı T lenfositlerin bir alt grubu olan Th17 hücrelerinde de IL-17F ve IL-17A gibi proinflamatuvar olarak tanımlanan sitokinlerin salınımını azaltmakta ve bu sayede Th17 hücre aktivasyonunu sınırlamaktadır (89,90). T lenfositlerin aktivasyon sürecindeki etkilerinin yanı sıra, aktif D vitamininin T lenfositlerin farklılaşma sürecinde de rol oynadığı gösterilmiştir. 1,25(OH)2D3' n, Th17 hücre farklılaşmasını indükleyen sitokinler, C-C motifli kemokin reseptörü-6 (CCR6) gibi transkripsiyon faktörlerini baskılayarak Th17 hücre profiline farklılaşma sürecini inhibe ettiği bildirilmiştir (91,92). Bunun yanı sıra aktif D vitamini, özellikle otoimmün hastalıkların patogenezinde önemli bir rola sahip olduğu bilinen Th1 hücre profiline farklılaşmayı azaltıp bu hücrelerden IFN-  salınımını inhibe ederken, Th2 hücre grubuna farklılaşmayı indükleyerek immün

yanıtın alevlenmesini engelleyen IL-4 salınımını tetiklediği gösterilmiştir (93,94). D vitamininin, edinsel immün sistemin regülasyonunda önemli bir role sahip olan regülatör T lenfositlere (Treg) farklılaşmayı indükleyerek alevlenen immün yanıtı baskılama yönünde bir etkiye sahip olduğu da bilinmektedir (6). Edinsel immün sistemin bir diğer önemli hücre grubu olan B lenfositlerin ise, D vitamini uygulaması ile proliferasyon süreçleri inhibe olurken apoptoz mekanizmaları tetiklenmektedir (95). Ayrıca, edinsel immün yanıtın başlaması için önemli bir role sahip olan dendritik hücrelerde TNF- α ve IL-12 gibi inflamasyonu tetikleyici sitokinlerin salınımını inhibe ederken, inflamasyonu baskılayan TGF- β ve IL-10 gibi sitokinlerin salınımını arttırmaktadır (6). Benzer şekilde makrofajlarda da bir dizi proinflamatuvar sitokinlerin (IL-6, IL-1 β , RANKL, TNF- α , COX-2) sentez ve salınımını inhibe ederken antiinflamatuvar sitokinlerin (IL-10) sentezini arttırdığı bildirilmiştir (6). Otoimmün hastalıklarda immün yanıtın alevlenmesi ile ilişkilendirilen M1 makrofaj hücre profiline farklılaşmanın D vitamini tarafından azaltılarak, M2 fenotipine farklılaşmanın indüklendiği de rapor edilen bulgular arasındadır (96–98). Otoimmün hastalıklar, inflamasyonu tetikleyen T hücre alt grupları ve otoantikor üreten B lenfositler ile karakterize olduğundan, bu hücrelerin aşırı aktivasyonunu engelleme ve alevlenen edinsel immün yanıtı baskılama etkileri bulunan D vitamininin otoimmün ve otoinflamatuvar olarak tanımlanan hastalık grupları için rutin tedaviye katkı sağlayan güçlü bir ajan olarak kullanım potansiyeli mevcuttur.

D vitamininin gerek immün sistem homeostazındaki yadsınamaz etkileri gerekse antioksidan etkilere sahip bir molekül olarak oksidatif stresi indirgeyici rolü düşünüldüğünde, patogeneezlerinde birbirini tetikleyen ve kısır döngü şeklinde devam eden inflamasyon ve oksidatif stresin oldukça önemli rollere sahip olduğu otoinflamatuvar ve otoimmün hastalık gruplarında D vitamininin ve ilişkili klinik uygulamaların ayrı bir öneme sahip olduğu bilinmektedir (99–101).

2.4. Sistemik Skleroz’a Genel Bakış

Sistemik skleroz (SS, skleroderma) derinin sınırlı veya yaygın fibrozu ile karakterize; daha ileri vakalarda kalp, akciğer, eklem, gastrointestinal sistem (GIS) gibi iç organların tutulumu ile seyreden kronik ve nadir bir otoimmün hastalıktır.

Sklerodermanın prevalans ve insidansını belirlemeye yönelik çalışmalar, hastalığın klinik heterojenite barındırması ve klinik tablonun değişkenlik göstermesi nedeniyle oldukça az sayıdadır (102). Ancak yapılan son çalışmalarda skleroderma prevalansı 30-300/milyon olarak belirlenirken; insidansı 0,2-2,2/milyon olarak ifade edilmiştir (103). Ülkemizden ise SS prevalansını belirlemeye yönelik sadece bir çalışma gerçekleştirilmiş olup, prevalans 220/milyon olarak rapor edilmiştir (104). Skleroderma sıklıkla kadınlarda görülmekte, genç kadınları da tutabilmekte ve birtakım fiziksel değişikliklere neden olduğundan psikolojik problemleri de beraberinde getirmektedir (4). Bunun yanı sıra, ciltte meydana gelen fibrozun morbiditeyi; hastalığın daha ileri süreçlerinde akciğer, kalp gibi önemli iç organların tutulumunun ise mortaliteyi etkilediği bilinmektedir (4).

Sklerodermanın patogenezi aydınlatmaya ve olası risk faktörlerini belirlemeye yönelik çok sayıda çalışma olup; hastalığın mekanizmalarının oldukça kompleks olması sebebiyle patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, başta fibroblastlar ve aşırı kollajen üretimi ile karakterize bir süreç olmak üzere, endotel hücreleri ve monosit/makrofajlar, B ve T lenfositler gibi immün hücrelerin de dahil olduğu anomali içeren mekanizmalar ortaya konulmuştur (105). Skleroderma patogenezi için yaygın olarak kabul gören üç basamaklı hipotez sırasıyla; endotel hücrelerinin fonksiyonlarında meydana gelen aksaklıklar, monosit, T ve B lenfosit gibi immün sistem hücrelerinin aktivasyonuna bağlı olarak bir dizi büyüme faktörü ve sitokinin aşırı üretimi ve son olarak deride ve daha ileri vakalarda çoklu iç organlarda meydana gelen progresif fibrotik süreci içermektedir (106). Bu sürecin ilk basamağı olarak kabul edilen endotel hücre fonksiyonunda meydana gelen aksaklıklar ve vasküler hasarın skleroderma hastalarında yüksekliği gösterilmiş olan anti-endotel hücre antikorunun (anti-endothelial cell antibody; AECA) etkileriyle başladığı ve trombin ve endotelin-1 gibi birtakım vazokonstriktörlerin salınımı ile fibroblast proliferasyonunda artış ve fibrotik sürecin temeli olan fibroblastların miyofibroblastlara farklılaşması ile sonuçlandığı bilinmektedir (107,108). Sürecin ikinci basamağı olarak tanımlanan immün hücrelerin aktivasyonu ise, makrofaj, B ve T lenfositleri içermekte olup özellikle M2 makrofaj ve Th2 hücre fenotiplerine farklılaşma ile karakterizedir. TGF- β , fibrotik süreci tetikleyen ana faktör olarak

tanımlanmakta olup, IL-8, IL-6, IL-5, IL-4, IL-13, monosit kemoatraktan protein-1 ve makrofaj inflamatuvar protein 1- α gibi proinflamatuvar ve profibrotik gibi bir dizi sitokin ve mediyatörlerin artan sentez ve salınımı gerçekleşmektedir (103,109,110). Tüm bu hücre farklılaşması ve sitokinler, fibroblast çoğalmasını ve fibroblast-miyofibroblast farklılaşmasını tetikleyerek fibrotik sürece katkı sağlamaktadır (103). Bu sürecin yanı sıra B lenfositler, AECA ve anti-fibroblast antikor (AFA) gibi otoantikorları üreterek endotel bozulması, vasküler disfonksiyon ve akciğer fibroblastlarının aktivasyonu ile IL-6, IL-1 α ve IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olmaktadır (111). Fibroblastların aktivasyonu ve miyofibroblastlara farklılaşması ile seyreden bu süreçler, miyofibroblastların başta kollajen olmak üzere bir dizi ekstrasellüler matriks proteinlerini aşırı üretmesi ile sonuçlanmaktadır (112,113). Bu durumun kaçınılmaz bir sonucu olarak ise deride ve daha ileri vakalarda iç organlarda progresif bir fibroz meydana gelmektedir.

2.4.1. Sistemik Skleroz ve Oksidatif Stres

Sistemik sklerozu da içeren fibrotik hastalıklarda inflamatuvar süreçlerin etkisiyle artan reaktif oksijen/nitrojen türleri ve yetersiz kalan antioksidanlar sonucunda oksidatif stresin meydana geldiği; bu durumun fibroproliferatif vaskülopati ve fibrozis mekanizmaları ilişkili olduğu gösterilmiştir (114,115). Hidroksil radikali, süperoksit anyonu, hipoklorik asit ve peroksinitrit gibi ROT ve RNT'lerin artışı birbirini destekleyen döğüler şeklinde profibrotik ve proinflamatuvar mediyatörlerin (TGF- β ve platelet kökenli büyüme faktörü; PDGF gibi) uyarılmasına ve fibroblastların aktivasyonu ve proliferasyonuna neden olmaktadır. Bu sürecin bir sonucu olarak tip 1 kollajen sentezinin artışıyla fibroz ve vasküler disfonksiyon indüklenmektedir (26). Güncel bir meta-analiz çalışmasında, skleroderma hastalarının biyolojik örnekleri ile gerçekleştirilmiş olan klinik çalışmaların sonucu derlenmiş ve sklerodermada nitrik oksit, hidroperoksit (ROOH), malondialdehit (MDA), asimetrik dimetilarjinin (ADMA) gibi oksidatif stres belirteçlerinin sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı oranda yüksek seyrettiği gösterilmiştir (116). Aynı meta-analiz çalışmasında, sklerodermada sodyum dismutaz (SOD) ve C vitamini gibi antioksidatif etkisi olan moleküllerin ise anlamlı oranda düşük olduğu belirtilmiştir (116). Sklerodermada

artan oksidatif stresin güçlü kanıtlarla gösterilmesi ile hastalığın patogenezinde oksidatif stresin rolünü irdeleyen çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar sonucu en kabul gören hipotez NADPH oksidaz-4 (NOX-4) aracılı yolak olup; NOX-4'ün dokuda fibrotik sürecin başlaması ve progresyonu için önemli bir role sahip olduğu gösterilmiştir (117). Birbirinden bağımsız çalışmalarda, sklerodermada TGF- β başta olmak üzere endotelin-1, anjiyotensin-2, PDGF gibi inflamasyonu ve fibrozu indükleyen mediyatörlerin oksidatif stresin en temel tetikleyicilerinden biri olan NOX ailesi NOX-4 üyesinin ifadesini etkilediği belirtilmiştir (118–121). NOX ailesi üyelerinden yalnızca NOX-4 aktive olma sürecinde herhangi bir kofaktöre ihtiyaç duymamakta olup, artan TGF- β konsantrasyonu ile NOX-4 ifadesindeki artışın doğrudan NOX-4 aracılı ROT ve RNT üretimine neden olduğu bilinmektedir (117). ROT ve RNT miktarındaki artış, fibrotik sürece ve bu sürecin progresyonuna neden olan otokrin ve parakrin ve bir kaskadı başlatmaktadır (117). Sklerodermada konsantrasyonu artan TGF- β , TGF- β ile ilişkili sinyalizasyon yolaklarını tetikleyerek, fibroblastların aktifleşmesine ve miyofibroblast fenotipine, endotel hücrelerinin ise mezenkim hücrelerine farklılaşmasına sebep olmaktadır (117). Bunun yanı sıra TGF- β , fosfataz ve tensin homoluğu (phosphatase and tensin homologue; PTEN), kaveolin-1 (cav-1) gibi moleküllerin ve matriks metalloproteinazlar (matrix metalloproteinases; MMPs) gibi hücre dışı matriksi degrade eden birtakım enzimlerin ekspresyonunu inhibe etmektedir (122). Bu moleküller arasında PTEN ve cav-1, fibrotik süreci indüklemesinin yanı sıra hücre yaşlanma mekanizmalarını da indüklemektedir (117). Hücre yaşlanma mekanizmalarının uyarılması, dokuda fibroza sebep olan ve ROT aracılı başlayıp sürdürülen en önemli yolaklardan biri olarak kabul görmektedir (117,123). Uyarılan bu yaşlanma yolaklarında, hücrede moleküler ve yapısal bir dizi değişiklik meydana gelmekte ve hücre “yaşlanma ilişkili salgı fenotipine (Senescence-associated secretory phenotype; SASP)” farklılaşmaktadır (123). Bu fenotipe geçen hücrelerde, IL-1 β , IL-1 α , IL-13, IL-8, IL-7, IL-6, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; GM-CSF) gibi sitokinler; CXCL-5, CCL-5 ve CXCL-6 gibi kemokinler; bazı MMP'ler (MMP-3, MMP-10, MMP-1) ve büyüme faktörleri (HGF, PLGF, IGFBP-2, IGFBP-5, IGFBP-4) gibi inflamasyonu ve fibrotik süreci tetikleyen mediyatörlerin normal bir hücre fenotipine göre sentez ve salınımı neredeyse iki kata kadar artmaktadır (123). Sentez ve salınımı

artan bu mediyatörlerin, monositler, endotel hücreleri ve fibroblastlar gibi hücreler üzerinde etkisi olduğundan skleroderma patogenezi ve fibrotik süreç ile ilişkilendirilmekte olup, fibroblast aktivasyonu ve miyofibroblast farklılaşmasına sebep olduğu bilinmektedir (117). Aktive olan miyofibroblast hücreleri ise, hücre dışı matriks bileşenlerinin sentezini arttırmakta ve MMPs ve hücre dışı matriksi degrade eden proteazların ifadesini azaltmaktadır (117). Mikrovasküler alanlarda, SASP fenotipine geçiş yapan hücrelere komşu olan endotel hücreleri de mezenkimal transdiferansiyasyon ile aktive miyofibroblast hücrelerine farklılaşmaktadır. SASP fenotipinde sentezi artan kemokin ve sitokinler monosit hücrelerini de etkileyerek makrofajların fibrotik süreci indükleyen M2 fenotipine farklılaşmasını tetiklemekte ve ilgili dokuda kronik inflamatuvar infiltrat oluşumuna neden olmaktadır (117). M2 fenotipindeki makrofaj kronik inflamatuvar süreçte, profibrotik sitokinlerin ve mediyatörlerin salınımına sebep olarak hücre dışı matriks üretimini, fibroblast-miyofibroblast farklılaşmasını arttırmakta olup, endotel hücrelerinin mezenkimal transdiferansiyasyonunu indüklemektedir. Ayrıca aktive olmuş makrofajlar artan TGF- β salınımı ile NOX-4 ve NOX-4 ilişkili ROT/RNT üretimini tetiklemekte; makrofajlardan salınan IFN ve IFN ilişkili peptitler ise hücrenin yaşlanma sürecini desteklemektedir. Bu sayede mevcut oksidatif stresin de katkısıyla artan TGF- β konsantrasyonunun bir dizi aracı ile hücrede SASP fenotipini tetiklemesi; bu fenotipte sentezi artan sitokin ve kemokinler ile fibrotik ve inflamatuvar süreçlerin indüklenmesi, oksidatif stresin artması ve bu süreçlerin yeniden hücre yaşlanmasına katkı sağlaması ile otokrin/parakrin yollar ile kendi sürekliliğini sağlayan kısır bir döngü oluşturmaktadır (117).

2.4.1.1. Sistemik Skleroz ve Oksidatif DNA Hasarı

Sklerodermanın patogenezinde artan oksidatif stresin önemli bir yere sahip olduğu bağımsız çalışmalarda gösterilmiş olmakla birlikte; oksidatif stresin kaçınılmaz bir sonucu olan ve oksidatif makromolekül hasarları arasında hassas ve kümülatif bir belirteç olarak rol alan oksidatif DNA hasarının sklerodermada ve fibrotik süreçlerde rolünü irdeleyen oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Skleroderma hastaları ile yürütülmüş olan klinik bir çalışmada oksidatif DNA hasarı

belirteçlerinden sadece 8-OH-dG ELISA yöntemi ile ölçülmüş olup, hastalarda sağlıklı bireylere göre artan DNA hasarı gösterilmiş ve DNA hasarının hastalığın akciğer bulguları ile ilişkisi olabileceği belirtilmiştir (124). Yapılan bir *in vitro* çalışmada ise, skleroderma hastalarından elde edilen fibroblast hücre kültüründe, DNA hasarı yanıtı yolağının (DNA damage response; DDR) temel belirteçlerinden biri olan fosforile ataxia-telangiectasia mutated kinaz (ATM) değerlendirilerek artan DNA hasarı incelenmiş ve ATM'nin inhibisyonu sonucu bir dizi ikincil yolaklar aracılığıyla tip 1 kollajen sentezinden sorumlu olan COL1A1 gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir (125). DNA hasarının uzun vadede dahi istenmeyen sonuçlar doğurma potansiyeline sahip mutajenik ve sitotoksik etkileri göz önünde bulundurulduğunda oksidatif stresin patogenezinde oldukça önemli bir role sahip olduğu sklerodermada, oksidatif DNA hasarının rolünün ve klinik bulgular ile olası ilişkilerin kapsamlı bir şekilde ve referans yöntemlerle inceleneceği çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.2. Sistemik Skleroz ve D Vitamini Eksikliği

D vitamininin, birçok immün sistem hücresinde CYP27B1 gen ifadesi aracılığıyla aktive olabilmesi ve genomik yolağının ana elemanı VDR ifadesinin dendritik hücreler, makrofajlar ve aktive olmuş lenfositler gibi birçok immün hücrede tespit edilmesi ile D vitamininin immün sistem regülasyonunda, dolayısıyla otoimmün hastalıklardaki rolüne odaklanılmasına neden olmuştur (95,126). Farklı otoimmün hastalıklarda D vitamininin rolünü inceleyen birçok bağımsız çalışmada, D vitamininin bu hastalıklara karşı koruyucu veya progresyonu yavaşlatıcı/iyileştirici bir yönü olduğu bildirilmiştir. Kollajen ile indüklenen artrit modeli, tip 1 diyabet, romatoid artrit, multiple skleroz ve sistemik lupus eritematozus gibi otoimmün patolojiler üzerine yapılan hayvan deneyleri ve klinik araştırmalar sonucunda aktif D vitamini uygulamasının bu hastalıklarda progresyonu yavaşlattığı, klinik bulguları hafiflettiği ve hastalık riskini azalttığı ortaya konulmuştur (100,127–135).

Sklerodermada D vitamininin rolünü ve klinik bulgular ve progresyon ile ilişkisini araştırmayı hedeflemiş olan birbirinden bağımsız birçok çalışmada, skleroderma hastalarının sağlıklı bireylere göre serum D vitamini düzeyinin anlamlı düşük olduğu ve düşük D vitamini miktarı ile ağırlaşan klinik tablo veya artan klinik

skorlar arasında negatif bir korelasyon bulunduğu gösterilmiştir (97,99,136,137). Skleroderma ile D vitamini ilişkisini derlemeyi amaçlamış olan güncel bir meta-analiz çalışmasında ise 554 skleroderma hastası ve 312 sağlıklı bireyin D vitamini sonuçları karşılaştırılmış ve hastalarda istatistiksel anlamlılık düzeyinde düşük D vitamini düzeyi kanıtlanmıştır (138). Bu hastalarda kanıtlanan düşük D vitamini düzeyi ve D vitamininin immün sistem regülasyonundaki önemli etkileri göz önüne alındığında, hastalara uygulanan D vitamini replasmanı rutin tedavi stratejilerine katkı sağlayan önemli bir uygulama olarak yerini almıştır. Ancak tüm bu gelişmelere rağmen D vitamininin sklerodermanın altında yatan mekanizmalara etkisi henüz aydınlatılamamıştır. Yapılan sınırlı sayıda çalışmada D vitamininin, kollajen-1, kollajen-3 ve TGF- β 1 ifadesini azaltarak ve anti-fibrotik sürece katkı sağlayan birdizi mediyatörün salınımını arttırarak fibrotik süreci; T hücre proliferasyonu ve IFN- γ sentezini azaltarak ise inflamatuvar süreci inhibe edici yönde bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (139,140). Sklerodermada yaygın D vitamini eksikliği ve D vitamini ile klinik bulgular arasındaki negatif korelasyon kanıtlanmış olmasına rağmen, D vitamininin sklerodermanın patofizyolojisindeki rolü ve patogeneizde oldukça önemli bir yere sahip olan oksidatif strese olası etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamış olup; sklerodermanın rutin tedavi sürecinde önemli bir katkı sağlayıcı olarak tanımlanan D vitamini replasmanının da oksidatif strese etkisi bilinmemektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Bu araştırma olgu-kontrol ve klinik prospektif olmak üzere iki bölüm içermektedir. Araştırmanın olgu-kontrol bölümünde SS hastalarının oksidatif DNA hasarı, D vitamini düzeyi ve vitamin D reseptörünün gen ekspresyonu ile dört farklı gen polimorfizmi sağlıklı bireylerle karşılaştırılmıştır. Araştırmanın klinik prospektif bölümünde ise, üç ay ara ile iki doz intramusküler (150.000 U/doz) ve devamında günlük oral (800 U/gün) olmak üzere yoğun D vitamini replasmanı alan SS hastalarının replasmanın altıncı ayında yeniden oksidatif DNA hasarı düzeyleri değerlendirilmiş olup D vitamininin oksidatif hasarı indirgemedeki rolünü açığa çıkarmak amaçlanmıştır. Ayrıca replasman sonrası vitamin D reseptör gen ekspresyonu da yeniden değerlendirilerek olası etkinin nükleer reseptör aracılı olup olmadığı analiz edilmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, Kasım 2017 – Kasım 2021 tarihleri arasında yürütülmüştür. Dahil edilen SS hastalarının ve sağlıklı gönüllülerin kan ve idrar örnekleri Kasım 2017 – Şubat 2021 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Romatoloji Bilim Dalı'nda toplanmıştır. Araştırmanın deneysel süreci Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı yürütücülüğünde, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarları'nda Mart 2021- Ağustos 2021 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Eylül 2021- Kasım 2021 tarihleri arasında araştırma verilerinin kapsamlı istatistiksel analizleri gerçekleştirilmiş olup; Aralık 2021 – Mart 2022 tarihleri arasında tezin yazım süreci tamamlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Bu çalışmaya, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği'ne başvuran, uluslararası ACR/EULAR (2013) kriterlerine göre (Tablo 1) hastalık tanısı konulmuş olan 50 kadın SS hastası ve Dokuz Eylül

Üniversitesi Tıp Fakültesi İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği'ne başvuran diz osteoartrozu (gonartroz) tanısı alan ancak herhangi bir romatolojik/otoimmün hastalığı ve hipertansiyon, diyabet gibi kronik bir hastalığı bulunmayan 40 kadın sağlıklı gönüllü dahil edilmiştir.

Tablo 1. Sistemik skleroz hastalığının tanısı için 2013 ACR/EULAR kriterleri (102)

BULGULAR	ALT-TİPLERİ	PUAN
Her iki elde parmaklar ve MKF eklemlerin proksimalinde deri kalınlaşması (Yeterli Kriter)	-	9
Parmaklarda deri kalınlaşması (Yalnızca yüksek olanı skorlayın)	Şiş parmaklar	2
	Sklerodaktili	4
Parmak ucu lezyonları (Yalnızca yüksek olanı skorlayın)	Dijital ülser	2
	Dijital ülser skarı	3
Telenjektazi	-	2
Anormal tırnak yatağı kapiller değişiklikleri	-	2
Pulmoner arteriyel hipertansiyon ve/veya interstisyel akciğer hastalığı (Maksimum skor 2)	Pulmoner arteriyel hipertansiyon	2
	İnterstisyel akciğer hastalığı	2
Raynaud's Fenomeni	-	3
SS ile ilişkili otoantikorlar (Maksimum skor 3)	Antisentromer Anti-topoizomeraz(anti-scl-70) Anti-RNA polimeraz III	3

Sistemik Skleroz kalsifikasyonu için toplam skor ≥ 9 olmalı (Duyarlılık %91, Seçicilik %92)

Uygun örneklem büyüklüğü, literatürde bulunan konu ile ilişkili (sklerodermada D vitamini ve DNA hasarını hedeflemiş olan) referans makaleler kullanılarak G Power Data Analysis yazılımı üzerinden Ki Kare ve t testi için 0.05 yanılma düzeyi ve %80 güç kriterleri baz alınarak hesaplanmıştır. Hasta ve sağlıklı bireylerin detaylı dahil edilme ve dışlama kriterleri aşağıda belirtildiği gibidir:

Araştırmaya Dahil Olma Kriterleri

Hasta grubu için;

- 18 yaşını doldurmuş olmak
- ACR/EULAR (2013) kriterlerine göre sistemik skleroz tanısı almış kadın hasta olmak
- UCLA-GIT 2.0 anketini doldurabilecek düzeyde okur-yazar olmak.

Kontrol grubu için;

- 18 yaşını doldurmuş olmak

Araştırmadan Dışlama Kriterleri

Hasta Grubu için;

- Sistemik skleroz dışında romatolojik/otoimmün veya kronik bir hastalık olması
- D vitamini replasman sürecinde tedavi planında herhangi bir değişiklik meydana gelmesi (Sadece D vitamini replasmanının etkisinin sınanabilmesi amacıyla D vitamini öncesi ve sonrası tedavi planının aynı olması hedeflenmiştir).

Kontrol Grubu için;

- Herhangi bir romatolojik/otoimmün veya kronik hastalık olması

Her İki Grup için (Hasta ve Kontrol);

- Cinsiyeti erkek olmak (Skleroderma hastalığının sıklıkla genç kadınları tutması ve bu çalışma kapsamındaki hastaların takip edilmiş olduğu merkezde de skleroderma hastalarının büyük bir kısmının kadın olması sebebiyle, cinsiyet faktörünü dışlamak adına erkek bireyler çalışmaya dahil edilmemiştir).
- Sigara kullanıyor olmak
- Demir replasmanı alıyor olmak

- Son bir yılda D vitamini veya D vitamini içeren multivitamin replasmanı almış olmak
- Kronik böbrek yetmezliği olması veya serum kreatinin düzeyinin $<1,3$ mg/dL olması veya hemodiyaliz hastası olması veya renal transplantasyon geçmişi bulunması
- Kronik karaciğer parankim hastalığı veya siroz tanısı
- Herhangi malignite olması ve/veya malignite sebebiyle kemoterapi alıyor olması
- Bireyin anemik olması (Hemoglobin düzeyinin <10 g/dL olması)
- Aktif enfeksiyonu bulunmak (diş absesi, pnömoni, deri enfeksiyonu gibi) ve son enfeksiyonun üzerinden en az bir ay geçmemiş olması
- Enfekte dijital ülsere sahip olmak

3.4. Çalışma Materyali

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği'ne başvuran SS hastaları ve aynı polikliniğe başvurup romatolojik/otoimmün ve kronik herhangi bir hastalık tanısı bulunmayan sağlıklı bireyler arasında Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu'nu imzalayarak gönüllü olmayı kabul edenlerden Kasım 2017 – Şubat 2021 tarihleri arasında rutin tetkikler için alınan serum, sabah ilk idrarı ve tam kan örnekleri sırasıyla; 25(OH)D3 analizi, oksidatif DNA hasarı ürünlerinin (8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA) ölçümü, VDR gen ekspresyonunun kantite edilmesi ve VDR tek nükleotid gen polimorfizmlerinin (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Hastalardan alınan biyolojik örneklerin kullanım amaçları ve örneklerle uygulanan ön işlemler Tablo 2'de özetlenmiştir. Ayrıca SS hastalarından D vitamini replasmanının altıncı ayında yeniden sabah ilk idrarı ve tam kan örnekleri alınmış olup serum D vitamini düzeyi, oksidatif DNA hasarı ürünleri ve VDR gen ekspresyonu yeniden değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan biyolojik örnekler ve uygulanan ön işlemler

Biyolojik Örnek	Ön İşlem	Alınma Sebebi
Sabah ilk idrarı (steril idrar toplama kabı)	Aliquotlanarak -80 °C’de muhafaza edilmiştir.	Oksidatif DNA hasarı ürünlerinin HPLC-MS/MS ile analizi
Kırmızı kapaklı (pıhtılaşma aktivatörü içeren) tüpe kan örneği	+4 °C’de 3000 rpm’de santrifüjlenerek aliquotlanmış ve -80 °C’de muhafaza edilmiştir.	Serum 25(OH)D3 düzeyinin UPLC-HRMS ile ölçümü
Mor kapaklı (K2EDTA içeren) hemogram tüpüne kan örneği	DNA ve RNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır.	VDR gen polimorfizmlerinin ve VDR gen ekspresyonunun belirlenmesi

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın bağımsız ve bağımlı değişkenleri, çalışmanın her iki bölümünü (olgu-kontrol ve klinik prospektif) ifade edecek şekilde ayrı ayrı belirtilmiştir.

Hasta-sağlıklı kontrol karşılaştırması için (Olgu-kontrol):

Bağımsız Değişkenler;

- Yaş
- ACR/EULAR (2013) kriterlerinde bulunan klinik semptomlar
- Sistemik skleroz hastalığının alt sınıfları (Yaygın SS ve Sınırlı SS)
- Modifiye Rodnan deri skoru
- UCLA-GIT 2.0 anket skoru
- Warrick skoru

Bağımlı Değişkenler;

- Bireyin 25(OH)D3 düzeyi

- Bireyin oksidatif DNA hasarı (8-OH-dG, S-cdA, R-cdA) düzeyi
- Bireyin VDR gen ekspresyon düzeyi
- Bireyin sahip olduğu VDR tek nükleotid gen polimorfizmleri (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236)

Hastalarda D vitamini replasmanının değerlendirilmesi için (Klinik Prospektif):

Bağımsız Değişkenler;

- Yaş
- ACR/EULAR (2013) kriterlerinde bulunan klinik semptomlar
- Sistemik skleroz hastalığının alt sınıfları (Yaygın SS ve Sınırlı SS)

Bağımlı Değişkenler;

- Hastanın D vitamini replasman sonrası oksidatif DNA hasarı düzeyindeki değişimi
- Hastanın D vitamini replasman sonrası VDR gen ekspresyon düzeyindeki değişimi
- Hastanın D vitamini replasman sonrası UCLA-GIT 2.0 anket skoru değişimi

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Klinik Veriler

SS tanısı, klinik bulgulara dayanarak yapılmakta, laboratuvar bulguları tanıyı destekleyici olarak kullanılmaktadır. Hastalar, SS için ilk bulgulardan biri olan Raynaud's fenomeni, cilt tutulumu, gastrointestinal sistem (GİS) tutulumu, pulmoner tutulum, pulmoner hipertansiyon, böbrek tutulumu ve kas-eklem-tendon tutulumuna göre incelenmekte ve American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism (ACR/EULAR) tarafından 2013 yılında güncellenen puanlama sistemine göre değerlendirilmektedir (102). Toplamda dokuz ve daha fazla puana sahip olan hasta SS tanısı almaktadır.

Hastaların yaş, hastalık alt tipi, hastalık süresi (non-Raynaud ilk semptom baz alınarak), kullandığı ilaçlar, modifiye rodnan deri skoru (modified rodnan skin score; mRSS), organ tutulumu varlığı (akciğer, eklem), UCLA-GIT 2.0 anket skorları, solunum fonksiyon testleri (%FVC ve %DLCO), eritrosit sedimentasyon hızı (erythrocyte sedimentation rate; ESR), C-reaktif protein (CRP) ve otoantikor pozitifliği (ANA, Scl-70, anti-sentromer) gibi demografik, klinik ve laboratuvar bulguları detaylı bir şekilde kaydedilmiştir. GİS tutulum şiddetini belirlemek amacıyla kullanılmış olan UCLA-GIT 2.0 anketinin örneği Türkçe'ye uyarlanmış ve valide edilmiş haliyle EK-1'de sunulmuştur.

Hastaların sınırlı ve yaygın skleroderma ayrımı LeRoy'un kriterlerine göre gerçekleştirilmiştir. Skleroderma ilişkili artrit tanısı aynı romatolog tarafından detaylı klinik muayene ile konulmuştur. Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tanısı sağ kalp kateterizasyonu yöntemi ile tespit edilmiştir (141). İnterstisyel akciğer hastalığı (İAH) yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi (high-resolution computed tomography; HRCT) bulguları (buzlu cam opasiteleri veya retiküler patern veya bal peteği görünümü) ve solunum fonksiyon testlerinde kısıtlayıcı paternlerle belgelenmiştir. İAH'nın şiddeti ve kapsamı aynı romatolog tarafından Warrick skoru ile değerlendirilmiştir (142).

D vitamini replasmanının altıncı ayında, D vitamininin kısa vadeli etki edebileceği parametre olarak gastrointestinal sistem tutulum şiddetini belirleyen UCLA-GIT 2.0 anketi hastalara yeniden uygulanmıştır.

3.6.2. Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmanın deneysel aşamalarında kullanılmış olan cihazlar Tablo 3'te; kimyasallar ve sarf malzemeler ise kütle spektrometrik ve genetik analizlerde kullanılanlar olmak üzere ayrı ayrı olarak Tablo 4 ve Tablo 5'te gösterilmiştir.

Tablo 3. Araştırmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Marka/Model	Kullanım Amacı
Sıralı Kütle Spektrometresi (MS/MS)	AB Sciex 4000 QTRAP	Hasarlı DNA nükleozid ürünlerinin ölçümü
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu LC-20 AD	Hasarlı DNA nükleozid ürünlerinin ölçümü
Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (HRMS)	Thermo Orbitrap Exactive Plus	Serum D vitamini düzeyinin belirlenmesi
Ultra Performanslı Sıvı Kromatografisi (UPLC)	Thermo Ultimate 3000	Serum D vitamini düzeyinin belirlenmesi
RT-PCR cihazı	Roche Lightcycler 480 II	Genetik analizler
Thermal cycler cihazı	Biorad, MyCycler	Genetik analizler, cDNA sentezi
Nanodrop spektrofotometre	Thermo, Nanodrop 2000	Genetik analizler, DNA ve RNA miktar ve kalite tayini
Vakumlu Konsantratör Sistemi	Thermo Speedvac Savant ISS110	Hasarlı DNA nükleozid ürünlerinin ölçümü – ön ekstraksiyon
Ekstraksiyon Manifoldu	Waters	Hasarlı DNA nükleozid ürünlerinin ölçümü – ön ekstraksiyon
-80 °C Derin Dondurucu	Thermo Forma 88000	Örneklerin saklanması
-20 °C Derin Dondurucu	Beko	Örneklerin saklanması
+4 °C Buzdolabı	Beko	Örneklerin saklanması
Distile Su Cihazı	Millipore Q-Gard	Genel kullanım
Salınımlı Santrifüj	Nüve NF 800R	Genel kullanım
Santrifüj	Hettich	Genel kullanım
Soğutmalı Santrifüj	Heraeus	Genel kullanım

Mikrosantrifüj	Eppendorf Minispın Plus	Genel kullanım
Minispın	Labnet	Genel kullanım
Isıtıcı Kuru Blok	WiseTherm	Genel kullanım
Manyetik Karıştırıcı	Stuart SB162	Genel kullanım
Analitik Terazı	Precisa XB 220A	Genel kullanım
pH metre	Selecta pH-2005	Genel kullanım
Sonikatör	Transsonic 660/H	Genel kullanım
Vorteks	Wisemix VM-10	Genel kullanım
Otomatik Pipet (1000, 200, 100, 20 ve 10 µL hacimlerde)	Eppendorf	Genel kullanım
Otomatik Pipet (1000, 100 ve 10 µL hacimlerde)	Thermo	Genel kullanım

Tablo 4. Araştırmanın kütle spektrometrik analizlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal/Sarf	Marka/Model	Kullanım Amacı
Filtreli santrifüj tüpü	Nanosep 3K Omega	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
Katı faz ekstraksiyon kartuşu	Waters Oasis 3cc (60 mg)	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
8-OH-dG ¹⁵N işaretli standart	NIST	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
S-cdA ¹⁵N işaretli standart	NIST	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
R-cdA ¹⁵N işaretli standart	NIST	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
Alkale fosfataz	Roche 1500 U/76 µL	Oksidatif DNA hasarı ölçümü

0.2 µm şırınga filtresi	Labsolute, 17 mm	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
C18 HPLC kolonu	Agilent Zorbax SB-Aq (2.1x150 mm 3.5 µm)	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
Tris-HCL	Sigma	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
Sodyum asetat	Sigma	Oksidatif DNA hasarı ölçümü
HPLC kolonu	Thermo Acclaim Polar Advantage II (3 µm 120 °A 3.0 x 50mm)	25(OH)D3 ölçümü
25(OH)D3 işaretli standart	Isosciences, LLC	25(OH)D3 ölçümü
25(OH)D3 döteryum işaretli standart	Isosciences, LLC	25(OH)D3 ölçümü
D vitamini içermeyen insan serumu	Golden West Biologicals	25(OH)D3 ölçümü
Sertifikalı Referans Materyal (SRM)-İnsan serumunda D vitamini metabolitleri	NIST 972a	25(OH)D3 ölçümü
Amonyum sülfat	Sigma	25(OH)D3 ölçümü
Metanol	Merck	Genel kullanım
Asetonitril	Merck	Genel kullanım
Formik Asit	Merck	Genel kullanım
MS-grade su	Merck	Genel kullanım
HPLC amber vial	Shimadzu	Genel kullanım
Insert vial (200 µL)	Shimadzu	Genel kullanım

Tablo 5. Araştırmanın genetik analizlerinde kullanılan kimyasallar ve sarf malzemeler

Kimyasal/Sarf	Marka/Model	Kullanım Amacı
DNA ekstraksiyon kiti	Roche, High Pure PCR Template	DNA ekstraksiyonu
İzopropanol	Merck	DNA ekstraksiyonu
Etanol (moleküler analizler için)	Sigma	DNA ve RNA ekstraksiyonu
RNA ekstraksiyon kiti	Roche, High Pure Total RNA	RNA ekstraksiyonu
Dietil pirokarbonat (DEPC)	Sigma	RNA ekstraksiyonu, sterilizasyon
Amonyum klorid	Sigma	RNA ekstraksiyonu, eritrosit lizis tamponu
Sodyum bikarbonat	Sigma	RNA ekstraksiyonu, eritrosit lizis tamponu
EDTA (bisodyum)	Sigma	RNA ekstraksiyonu, eritrosit lizis tamponu
cDNA sentez kiti	Roche, EvoScript Universal cDNA Master Kit	Total RNA'dan cDNA sentezi
VDR Catalog assay	Roche (Cat. No: 05532957001)	VDR gen ekspresyonunun değerlendirilmesi
PCR reaksiyon karışımı	Roche, Lightcycler Probe Master	VDR gen ekspresyonunun değerlendirilmesi

SNP assay (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236 için)	Roche, LightSNIP, TIB-MOLBIOL	VDR geninde tek nükleotid polimorfizmlerinin değerlendirilmesi
Hibridizasyon problemleri	Roche, Lightcycler DNA Hibridizasyon Probu	VDR geninde tek nükleotid polimorfizmlerinin değerlendirilmesi
96 kuyucuklu PCR plate'i	Roche, Lightcycler uyumlu	RT-PCR analizleri

3.6.3. Oksidatif DNA Hasarı Ürünlerinin LC-MS/MS ile Ölçümü

Hasarlı DNA nükleozidleri bireylerden alınan sabah ilk idrar örneklerinden ölçülmüştür. Örnekler DNA'nın eldesi amacıyla uygulanan katı faz ekstraksiyon işleminin ardından, nükleozidlerin eldesi için DNA hidrolizi basamakları uygulanmış ve analizler sıvı kromatografi sıralı kütle spektrometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm metodu ve koşulları bu çalışmadan önce aynı cihaz kullanılarak optimize edilmiş olup verifikasyonu da gerçekleştirilmiştir (143). İdrarda hasarlı DNA nükleozid ürünleri sonuçları kolorimetrik yöntem kullanılarak DEÜ Merkez Laboratuvarı'ndan hizmet alımı ile ölçülmüş olan idrar kreatinin düzeylerine oranlanarak verilmiştir.

3.6.3.1. Pre-analitik evre: Ekstraksiyon ve Hidroliz Basamakları

- 1.3 mL sabah ilk idrar örneğine belirli son konsantrasyonlarda işaretli standart materyaller eklenmiş (8-OH-dG-¹⁵N₅ (20 pmol), R-cdA-¹⁵N₅ (0.5 pmol), S-cdA-¹⁵N₅ (0.6 pmol)), örnekler vorteksledikten sonra oda sıcaklığında 1000 xg güçte 15 dk santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjün ardından örnekler tek kullanımlık steril enjektörler ve 0.2 µm cut-off değerli şırınga filtreleri kullanılarak filtrelenmiştir.

- Ekstraksiyon manifolduna katı faz ekstraksiyon kartuşları yerleştirilmiş, kartuşlar 1 mL metanol ile aktiflendikten sonra 15 dk kurumaya bırakılmış, ardından 2 mL su ile yıkanmıştır.
- Şırınga filtrelerinden geçirilmiş olan örnekler 1 mL olacak şekilde katı faz ekstraksiyon kartuşlarına yüklenmiştir.
- Örnekler kartuşlardan elüe olduktan sonra kartuşlar 2 mL su ile yıkanmıştır.
- Örnekler 1 mL %30 metanol ile temiz bir eppendorf tüpüne elüe edilmiştir.
- Örnekleri içeren eppendorflar tamamen uçması amacıyla bir gece boyunca vakum konsantratörde bırakılmıştır.
- Hidroliz basamağı için 10 mM Tris-HCL ve 1 M sodyum asetat içeren tampon çözelti hazırlanmış ve her örneğe 100 µL tampon çözelti ve 22 U alkalen fosfataz eklenmiştir.
- 37 °C’de 1 saat inkübe edilen örnekler, 14.000 xg’de 10 dk santrifügasyonun ardından 3 KDa cut-off değerli filtreli santrifüj tüplerine aktarılarak 5000 xg’de 50 dk santrifüj edilmiştir.
- Filtrasyonun ardından elüe olan örnekler HPLC viallerine aktarılarak cihaza yüklenmiştir.

3.6.3.2. Kromatografik ve Kütle Spektrometrik Koşullar

Hasarlı DNA nükleozidleri HPLC (Shimadzu, Japonya) ile eşleştirilmiş, triple quadrupole sıralı kütle spektrometri cihazı (AB Sciex, ABD) kullanılarak, çoklu reaksiyon izleme (multiple reaction monitoring; MRM) modunda, elektrospray iyonizasyon kaynağı ile pozitif iyonlar seçilerek analiz edilmiştir.

Kromatografik ayırım Agilent Zorbax SB-Aq (2.1x150 mm 3.5 µm) C18 kolonu ve analitik kolon kirliliğini minimize etmek amacıyla guard kolon (Inertsil ODS-4 3µm, 1.5x10mm) ile gerçekleştirilmiş olup mobil faz olarak her ikisi de % 0.1 formik asit içeren kromatografi için uygun saflıkta su (mobil faz A) ve asetronitril (mobil faz B) kullanılmıştır. Mobil fazların gradient akış programı %2 mobil faz B olarak başlatılıp, altıncı dakikaya kadar mobil faz B %60’a çıkarılmış, bu koşulda bir dakika boyunca devam ederek 10. dakikaya kadar yeniden %2’ye düşürülmüştür. Kolon

dengelemesi amacıyla %2 mobil faz B akışı 10 dakika boyunca devam ettirilmiştir. Akış hızı 0.3 mL/dk olarak ayarlanmış olup enjeksiyon hacmi 30 µL olarak belirlenmiştir.

Analizde hassas kantitasyonu sağlamak amacıyla hasarlı DNA nükleozidlerinin azot 15 (¹⁵N) içeren ağır izotop işaretli internal standartları (NIST, ABD) kullanılmıştır. İnternal standartlar, hedef moleküllerin kimyasal özelliklerini taşıyan, dolayısıyla kromatografik olarak aynı alıkonma zamanına sahip ancak ağır izotop içerdiğinden daha yüksek kütlesi olan standart materyallerdir. Pre-analitik evrenin ilk adımında biyolojik örnekler eklendiğinden, ekstraksiyon boyunca endojen olarak ölçümü hedeflenen hasar ürünü ile aynı işlemlere maruz kalmakta ve analiz sırasında meydana gelebilecek olan kayıpların normalize edilmesini de sağlamaktadır.

Hasarlı DNA nükleozidlerinin (endojen ve internal standart) moleküler ve iyon kütleleri ile kromatografik alıkonma zamanları Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. Ölçülen oksidatif DNA hasarı ürünlerinin ve ağır izotop işaretli internal standartların kütle geçişleri ve kromatografik alıkonma zamanları

	Kütle geçişleri (mass transitions; m/z)	Kromatografik alıkonma zamanı (dk)
8-OH-dG	284→168	4.24
8-OH-dG- ¹⁵ N ₅	289→173	4.24
S-cdA	250→164	3.83
S-cdA- ¹⁵ N ₅	255→169	3.83
R-cdA	250→164	2.14
R-cdA- ¹⁵ N ₅	255→169	2.14

3.6.4. Serum D Vitamini (25(OH)D3) Düzeyinin UPLC-HRMS ile Belirlenmesi

Serum 25(OH)D3 düzeyinin ultra performanslı sıvı kromatografi ile eşleştirilmiş yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri ile ölçümü için yöntem geliştirme ve

Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration; FDA) kılavuzunda belirlenen koşullara göre yöntem verifikasyonu işlemleri gerçekleştirilmiştir (144).

3.6.4.1. Yöntem Geliştirme ve Verifikasyon

Kromatografik ve Kütle Spektrometrik Koşulların Optimizasyonu

Kromatografik ayırım Thermo Acclaim Polar Advantage II (3µm 120 °A 3.0 x 50mm) analitik kolon kullanılarak ve kolon fırın sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanarak Thermo Ultimate 3000 UPLC (Thermo Scientific, Almanya) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar her ikisi de % 0.1 formik asit içeren kromatografi için uygun saflıkta su (mobil faz A) ve metanol (mobil faz B) olup fazların gradient akış programı şu şekildedir: Başlangıç koşulunda %20 mobil faz B verilmiş olup bu şekilde üç dakika devam ettikten sonra mobil faz B iki dakika içerisinde %100'e çıkarılmış ve bu koşulda yedinci dakikaya kadar devam etmiştir. Ardından mobil faz B, iki dakika içerisinde yeniden %60'a düşürülmüş olup kolon dengelemesi amacıyla 10. dakikaya kadar bu koşul devam ettirilmiştir. Akış hızı 0.6 mL/dk, enjeksiyon hacmi ise 100 µL olarak belirlenmiştir.

Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi olarak Thermo Orbitrap Exactive Plus cihazı kullanılmış olup, cihazın optimal parametreleri şu şekildedir: sheath gaz akış hızı; 60, koridor gazı akış hızı; 25, sprej voltajı (kV); 4, kapiller sıcaklık (°C); 320, S-lens RF düzeyi; 50, koridor gazı ısıtıcı sıcaklığı (°C); 250. İyonizasyon kaynağı olarak atmosferik basınç kimyasal iyonizasyon (atmospheric pressure chemical ionization; APCI) kullanılmış olup pozitif iyonlar seçilmiş ve 70.000 çözünürlükte tam tarama (full scan), 35.000 çözünürlükte tüm iyon fragmentasyon (all ion fragmentation; AIF) modlarında çalışılmıştır. Tarama filtreleri, tam tarama için 300-500 m/z, tüm iyon fragmentasyon için ise 100-400 m/z olarak ayarlanmıştır. Ağır izotop işaretli internal standart olarak döteryum işaretli 25(OH)D3 (25OHD3-d3) kullanılmıştır. Endojen 25(OH)D3 için ana ve ürün iyon kütleleri 401.3410>383.3306 ve internal standart için moleküler iyon kütleleri 404.3596 olarak belirlenmiş olup serum matrisinde kromatografik alıkonma zamanı 6.90 dk'dır.

3.6.4.1.1. Kalibrasyon Grafiği, LOD ve LOQ Değerlerinin Hesaplanması

Kalibrasyon eğrisi için, 4-200 ng/mL konsantrasyon aralığında altı seviye iercek şekilde 25(OH)D3 standardı ve 50 ng/mL internal standard (25(OH)D3-d3) D vitamini içermeyen insan serumu (Golden West Biologicals, ABD) içerisine eklenmiştir. Hazırlanan kalibratörler günde altı teknik tekrar olacak şekilde üç farklı günde okutulmuş ve kalibrasyon eğrisi ortalamalar baz alınarak çizilmiştir.

Tespit limiti (limit of detection; LOD) ve kantitasyon limiti (limit of quantification; LOQ), FDA kılavuzunda kabul gören yöntemlerden olan kalibrasyon eğrisi aracılığıyla hesaplanmıştır. LOD hesaplaması için $[(3.3 \times \text{intercept'in standart sapması}) / \text{eğim}]$; LOQ hesaplaması için ise $[10 \times \text{intercept'in standart sapması}) / \text{eğim}]$ formülleri kullanılmıştır.

3.6.4.1.2. Doğruluk ve Kesinliğin Belirlenmesi

Doğruluk tayininde D vitamini içermeyen insan serumuna düşük, orta ve yüksek olmak üzere üç farklı seviyede (4, 20 ve 100 ng/mL) 25(OH)D3 standardı eklenerek hazırlanan kalibratörler ve ek olarak ticari olarak satın alınmış olan ve içerisinde belirli konsantrasyonlarda 25(OH)D3 içeren sertifikalı referans materyal NIST SRM 972a (NIST, ABD) kullanılmıştır. Doğruluk hesaplaması $[(\text{ölçülen konsantrasyon} / \text{teorik konsantrasyon}) \times 100]$ formülü ile hesaplanmış olup sonuçlar % doğruluk olarak ifade edilmiştir.

Kesinlik alışmaları, gün içi ve günler arası olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Ölçümlerde doğruluk analizi için üç farklı seviyede hazırlanmış olan kalibratörler (4, 20 ve 100 ng/mL) kullanılmış; örnekler üç gün boyunca günde altı kez olmak üzere ölçülmüştür. Kesinlik hesaplaması $[(\text{ölçümlerin standart sapması} / \text{ortalaması}) \times 100]$ formülü ile hesaplanmış olup kesinlik % varyasyon katsayısı (coefficient of variation; %CV) olarak ifade edilmiştir.

3.6.4.1.3. Serum Örneklerinin Ekstraksiyonu

Serum 25(OH)D3 konsantrasyonunun belirlenmesi için sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. 500 µL serum örneği (veya verifikasyon çalışmaları için

standart örneği), 400 µL amonyum sülfat (500 mL distile su içerisinde 280 gram amonyum sülfat tartılarak hazırlanmıştır) ve 500 µL asetonitril ile karıştırılıp iyice vortekslendikten sonra son konsantrasyon 50 ng/mL olacak şekilde döteryum işaretli internal standart (25(OH)D3-d3) eklenmiştir. Karışım 14.500 rpm’de oda sıcaklığında 10 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant HPLC viallerine alınarak analiz edilmiştir.

3.6.5. Genetik Analizler

3.6.5.1. DNA ve RNA Ekstraksiyonu, cDNA Sentezi

Tam kan örneğinden DNA ekstraksiyonu Roche, High Pure Template PCR DNA ekstraksiyon kiti (Roche, Almanya) kullanılarak üreticinin önerdiği protokol ile gerçekleştirilmiştir.

Genomik DNA ekstraksiyonu için uygulanan basamaklar aşağıdaki gibidir:

- Kit içeriğindeki proteinaz K, 4.5 mL çift distile su ile tamamen çözüldükten sonra aliquotlanarak -20 °C’de muhafaza edilmiştir. Inhibitor removal solüsyonuna 20 mL, yıkama solüsyonuna ise 40 mL saf etanol eklenerek oda sıcaklığında saklanmıştır.
- 200 µL tam kan örneğine 200 µL binding tamponu, 40 µL ise proteinaz K eklenerek 70 °C’de 10 dk inkübe edilmiştir.
- Ardından örnekler 100 µL izopropanol eklenerek vortekslendikten sonra kit içerisinde bulunan filtrelere aktarılmış ve 8000 xg’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Ardından filtreye 500 µL inhibitor removal eklenerek 8000 xg’de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Yıkama basamağında filtreye 500 µL yıkama solüsyonu eklenerek 8000 xg’de 1 dk santrifüjlenmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.
- Filtreyi kurutmak amacıyla son yıkama işleminin ardından boş filtre 13.000 xg güçte 10 saniye santrifüj edilmiştir.
- Son basamakta, 200 µL, önceden 70 °C’de ısıtılmış elüsyon tamponu filtreye eklenerek 8000 xg’de 1 dk santrifüj ile genomik DNA örnekleri elde edilmiş Nanodrop 2000 spektrofotometresi ile (Thermo Scientific, Almanya) kalite

kontrolü ve kantitasyonu yapıldıktan sonra, ileri analize kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

Tam kandan total RNA ekstraksiyonu Roche, High Pure RNA İzolasyon Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RNA ekstraksiyonunda kullanılan tüm plastik malzemeler (15 mL hacimli falcon tüpleri, 2 mL ve 1.5 mL hacimli eppendorf tüpleri gibi) dietil pirokarbonat (DEPC) kullanılarak RNase içermeyen steril bir hale getirilmiştir.

DEPC ile sterilizasyon basamakları aşağıdaki gibidir:

- Steril ddH₂O’ya %0.1 oranında DEPC eklenmiştir.
- Tüm plastik materyal DEPC içeren su ile 37 °C’de ve karanlık bir ortamda gece boyu inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından DEPC içeren sudan arındırılan plastik materyal otoklavmıştır.

Kit içeriğinde bulunmayan kırmızı hücre lizis tamponu manuel olarak hazırlanmıştır. 10X konsantrasyonda kırmızı hücre lizis tamponu için 8.02 gr amonyum klorid, 0.84 gr sodyum bikarbonat ve 0.37 gram EDTA (disodyum) 100 mL distile su içerisinde çözülerek maksimum altı ay boyunca +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Ekstraksiyonun ilk adımında lizis tamponu 1/10 oranında dilüe edilerek kullanılmıştır.

Total RNA ekstraksiyonu için uygulama basamakları aşağıdaki gibidir:

- 2 mL tam kan örneği 15 mL hacimli falcon tüpüne alınarak tüp tamamen 1X konsantrasyonda kırmızı hücre lizis tamponu ile doldurulmuştur. Falcon tüpü ara ara alt üst yapılarak 10 dk, oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- İnkübasyon sonrası 500 xg’de 5 dk santrifüjlenip süpernatant dipteki hücre pelletinin zıt yönünden olacak şekilde dökülmüştür.
- Hücre pelletine yeniden 1X kırmızı hücre lizis tamponundan 1 mL eklenip hücrelerin çözülmesini sağlandıktan sonra 500 xg’de 3 dk santrifüjlenmiştir.

- Lökositleri içeren hücre pelletine 1 mL 1X PBS ve 400 µL kit içeriğinde bulunan lysis-binding tamponundan eklenerek köpürmemesine dikkat ederek pipetaj yapıldıktan sonra örnek filtreye aktarılmış ve 8000 xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- DNase uygulaması için 90 µL DNase inkübasyon tamponuna 10 µL DNase ekleyip (her bir örnek için) pipetaj yaptıktan sonra DNase filtrenin ortasına ancak filtreye temas etmeden pipetlenmiş ve örnek 15 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- Ardından birinci yıkama solüsyonundan 500 µL, ikinci yıkama solüsyonundan 500 µL olacak şekilde ardışık iki yıkama aşaması gerçekleştirilmiş olup, filtre her yıkamada 8000 xg'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
- Son yıkama aşamasında ise filtreye ikinci yıkama solüsyonundan 200 µL eklenmiş olup filtrenin tamamen arınması amacıyla 14.000 xg'de 2 dk santrifüjlenmiştir.
- Elüsyon aşamasında 50 µL elüsyon tampon filtrenin ortasına ancak filtreye temas etmeyecek şekilde pipetlenerek 12.000 xg'de 1 dk santrifüjlenmiş ve elde edilen RNA örneklerinin Nanodrop 2000 spektrofotometresi ile (Thermo Scientific, Almanya) kalite kontrolü ve kantitasyonu yapıldıktan sonra, RNA'lar ivedilikle cDNA'ya çevrilerek her iki materyal de sonraki analizlere kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir.

Total RNA örneklerinin cDNA çevrimi Roche Evoscript Universal cDNA Master Kit (Roche, Almanya) kullanılarak tamamlanmıştır. Bu kit ile cDNA sentez protokolü mRNA'nın Poli-A kuyruğuna bağlanan Poli-T grubunu içeren random hekzamer primerleri ile gerçekleştirilmektedir.

RNA örneklerinden cDNA sentez işlemleri aşağıdaki gibi yapılmıştır:

- Her bir örnek için yaklaşık 1000 ng RNA hesaplanarak steril bir PCR tüpüne alınmış, 4 µL kit içeriğinde bulunan reaksiyon tamponu ile karıştırılmıştır. Örneklerin toplam hacmi 18 µL olacak şekilde PCR için uygun saflıkta su ile tamamlanmıştır.

- Örnekler, primerlerin RNA örneklerine bağlanması için 5 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- Son aşamada 2 µL enzim karışımı eklenerek tüpler thermal cycler cihazına yerleştirilmiştir.
- Thermal cycler cihazının koşulları şu şekilde ayarlanmıştır: 15 dk 42 °C, 5 dk 85 °C, 15 dk 65 °C ve soğuma için sınırsız 4 °C.
- Elde edilen cDNA örnekleri sonraki analize kadar -80 °C’de muhafaza edilmiştir.

3.6.5.2. VDR Gen Ekspresyonunun Belirlenmesi

VDR gen ekspresyonu beta aktin geni (ACTB) housekeeping gen olarak kullanılarak göreceli kantitasyon metodu ile tespit edilmiş olup prob temelli gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) analizleri Roche Light Cycler 480 II (Roche, Almanya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prob bazlı RT-PCR analizinde primerlerin bağlanma bölgesi arasında yer alan hedef DNA dizisine komplementer olan tek zincirli prob kullanılmaktadır. Prob, 5’ ucunda raportör olarak adlandırılan florokrom özellikteki FAM boyası, 3’ uçta ise baskılayıcı olarak tanımlanan TAMRA florokrom boyası ile işaretlenmiştir. Amplifikasyon sırasında probun hedef DNA’ya bağlanmasını takiben Taq DNA polimeraz enziminin 5’-3’ nükleaz aktivitesi ile raportör boya (FAM) probtan ayrılarak sinyal oluşturmakta ve her döngüde floresan miktarı da artmaktadır. RT-PCR cihazı ile floresan ışımaya miktarı ölçülerek hedef gen ve housekeeping gen için logaritmik artışın başladığı siklus sayıları belirlenmektedir. VDR geni için primer ve prob içeren kullanıma hazır catalog assay (Roche, Cat. No: 05532957001) kullanılmış olup ACTB geni için tasarlanmış olan primer ve prob sekansları Tablo 7’de belirtilmiştir.

Tablo 7. Gen ekspresyon analizinde ACTB geni için tasarlanmış olan primer ve problar

ACTB Geni – Primer ve Prob Sekansları	
Forward Primer	5' CCCAGATCATGTTTGAGACCTT 3'
Reverse Primer	5' CCAGAGGCGTACAGGGAT 3'
Prob	5'-FAM-TGTACGTTGCTATCCAGGCTGTGC-TAMRA-3'

RT-PCR reaksiyonları VDR ve ACTB genleri için ayrı ayrı tüplerde olacak şekilde her bir örnek için 2 µL PCR uyumlu sterilize su, 0.5 µL primer+prob karışımı ve 5 µL enzim olacak şekilde hazırlanmış ve 96 kuyucuklu plate'e 7.5 µL reaksiyon karışımı pipetlenerek 2.5 µL cDNA örnekleri eklenmiştir. Amplifikasyon koşulları 45 tekrarlayan siklus olacak şekilde: 95 °C ,10 sn (denatürasyon), 60 °C 30 sn (primer bağlanması) ve 72 °C 1 sn (uzama)'dir. Örneklerin logaritmik amplifikasyona girdiği siklus sayısını belirten crossing point (Cp) değerleri için iki tekrarlı analizin ortalaması baz alınmıştır. Hedef genin (VDR) Cp değerinden housekeeping genin (ACTB) Cp değeri çıkarılarak Δ Cp değerleri hesaplanmış; bu değerlerden kontrol örneklerinin ortalama Δ Cp değeri çıkarılarak $\Delta\Delta$ Cp değerleri elde edilmiştir. Sonuçlar göreceli kantitasyon metodunda kat farkını ifade edecek şekilde $2^{-\Delta\Delta Cp}$ değeri hesaplanarak verilmiştir.

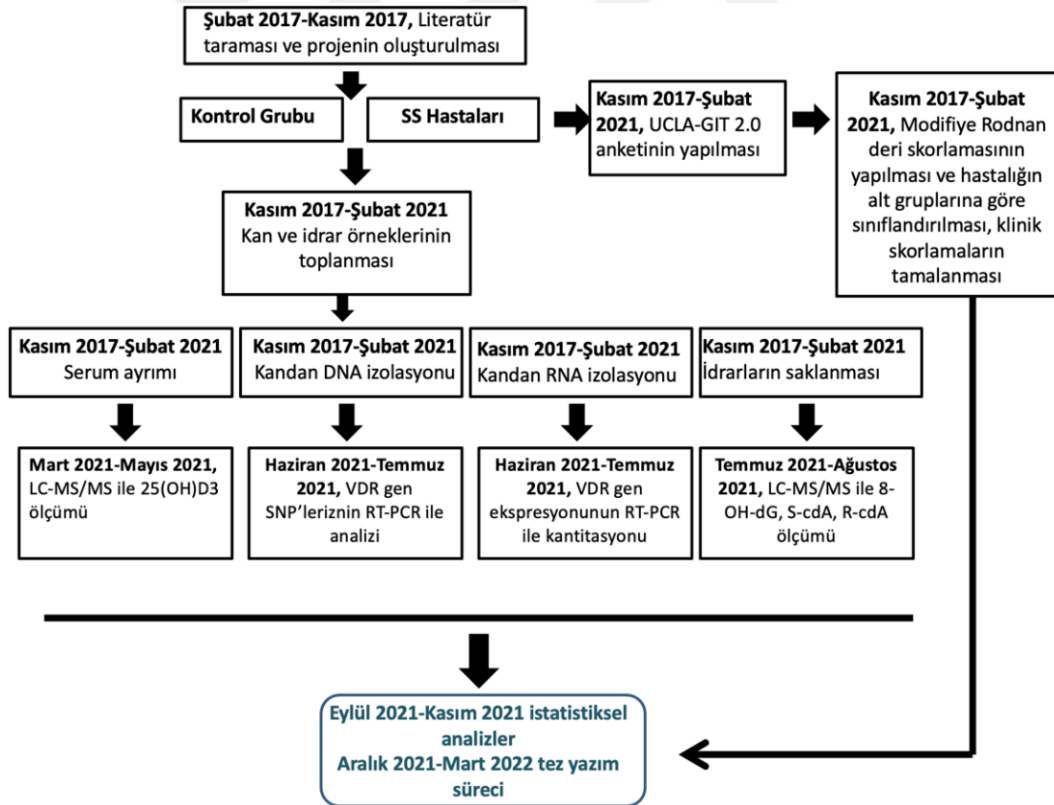
3.6.5.3. VDR Geni Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Analizi

VDR geninde dört farklı SNP (rs1544410, rs2228570, rs7975232, rs731236) genotiplerinin belirlenmesi, TIB-MolBiol (Almanya) firması tarafından tasarlanmış LightSNiP deney setleri (Roche, Almanya) kullanılarak ve erime eğrisi analizinden faydalanılarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi yöntemi ile SNP analizi, ilgili bölgenin uygun primerler ve floresan boya içeren problar eşliğinde çoğaltılması, ardından DNA fragmentlerinin yavaş bir şekilde artan sıcaklık dereceleri ile ısıtılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, bir DNA fragmenti spesifik erime sıcaklığına ulaştığında floresan ışımaya hızlı bir şekilde azalmaktadır. Bu sayede bir allelin spesifik

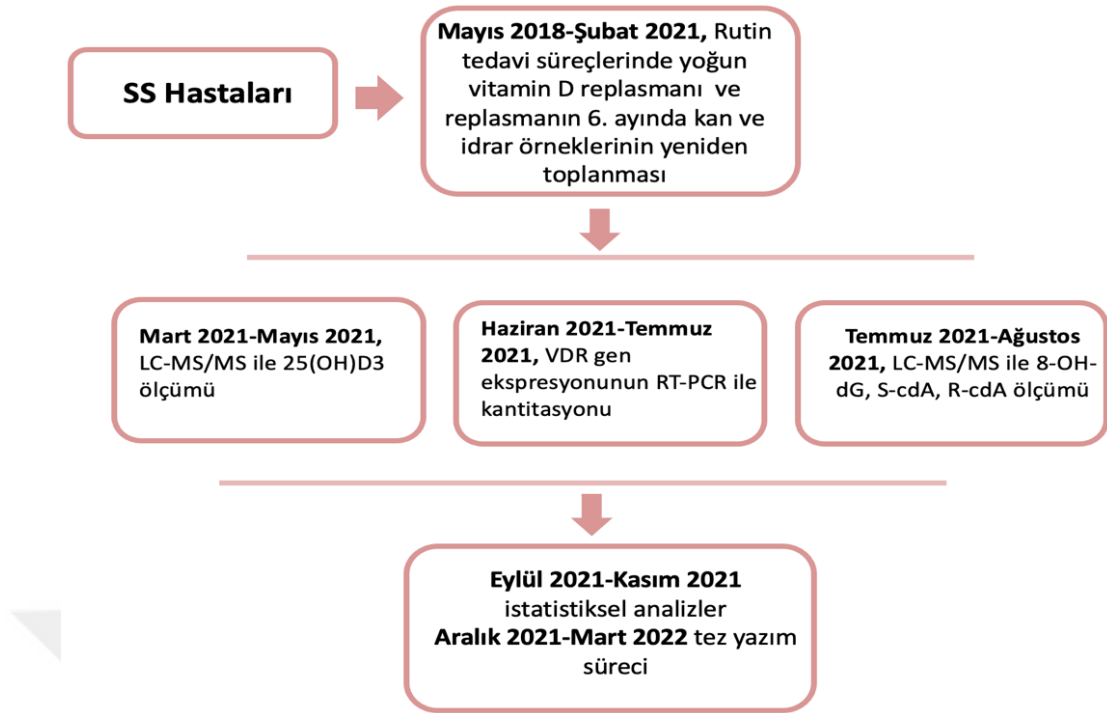
bir sıcaklıkta erime eğrisi elde edilmekte ve genotip analizi güvenilirliği yüksek bir şekilde yapılabilmektedir. VDR geninde bulunan dört farklı SNP'nin genotip analizi, reaksiyonlar her bir örnek için 5.2 µL PCR uyumlu sterilize su, 0.5 µL ilgili primer ve probu içeren karışım, 1 µL enzim vb. reaksiyon için gerekli bileşenleri içeren master karışımı ve 0.8 µL MgCl olacak şekilde hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. 96 kuyucuklu plate'in bir kuyucuğuna 7.5 µL reaksiyon karışımı pipetlenerek 2.5 µL genomik DNA örneği eklenmiştir. Thermal cycler koşulları amplifikasyon basamağı için 45 tekrarlayan siklus olacak şekilde: 95 °C ,10 sn (denatürasyon), 60 °C 10 sn (primer bağlanması) ve 72 °C 15 sn (uzama) ve erime basamağı için bir siklus olacak şekilde: 95 °C 30 sn, 40 °C 2 dk, ve süresiz 75 °C olarak ayarlanmıştır.

3.7. Araştırma Planı ve Takvim

Araştırmanın olgu-kontrol ve klinik prospektif bölümlerine ait olan plan ve takvimler Şekil 5 ve Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 5. Araştırmanın olgu-kontrol bölümünün takvimi



Şekil 6. Araştırmanın klinik prospektif bölümünün takvimi

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin dağılımını değerlendirmek amacıyla Shapiro-Wilk testi uygulanmıştır. İkili bağımsız grupların ortalamasını karşılaştırmak için parametrik ve parametrik olmayan verilen için sırasıyla Student's t testi ve Mann Whitney U testi uygulanmıştır. Bağımlı verilerin ortalamasını karşılaştırmak için ise parametrik ve parametrik olmayan veriler için sırasıyla eşleştirilmiş (paired) t testi ve Wilcoxon testi kullanılmıştır. Çoklu grupların ortalamasını karşılaştırmak için parametrik veriler için ANOVA, parametrik olmayan verilen için Kruskal Wallis analizleri yapılmıştır. Analiz edilen parametreler ile klinik skorlar arasındaki olası korelasyonları değerlendirmek amacıyla Spearman ve Pearson's korelasyon testleri uygulanmıştır. Tüm istatistiksel analizler SPSS v.26 yazılımı kullanılarak yapılmış olup şekil ve grafik tasarımları R program dili kullanılarak gerçekleştirilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Sistemik sklerozun nadir bir hastalık olması ve klinik olarak subjektif değerlendirmeye açık olması nedeniyle araştırmamız tek merkezli olarak yürütölmüştür. Bu nedenle DEÜ Araştırma Hastanesi İmmünoloji ve Romatoloji birimi Ege Bölgesi için bir skleroderma merkezi olarak tanımlanmış olsa da tüm Türkiye popölasyonundaki hastaları daha iyi yansıtabilecek şekilde geniş bir örneklem ile çalışmak mümkün olmamıştır. Ancak örneklem, gerekli güç analizleri yapılarak belirlenmiş olup istatistiksel anlamlılık için yeterli büyüklüktedir. Ek olarak, hastalara altı aylık yoğun D vitamini replasmanı uygulanan çalışmanın klinik prospektif bölümü nedeniyle hasta dışlama kriterleri oldukça fazla olup, birimde takip edilen ancak çalışmaya dahil edilememiş hastalar bulunmaktadır.

Tüm dünyayı olduğu gibi ölkemizi de etkisi altına alan Covid-19 küresel salgını sebebiyle D vitamini replasmanını tamamlayan 10 hastaya ulaşmak mümkün olmamıştır. Yine aynı süreç sebebiyle D vitamini ya da D vitamini içeren multivitamin almayan sağlıklı bireylere de ulaşmakta güçlük yaşanmış olup kontrol grubu 40 kişi ile sınırlı kalmıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Faköltesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 23.11.2017 tarihinde 2017/27-42 karar numarası ile onay alınmış olup, Etik Kurul onay belgesi EK-2’de belirtilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastaların bilgi ve onayına sunulmuş olan “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” örneği EK-3’tedir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Bulgular

Çalışmaya 50 SS hastası 40 sağlıklı kontrol dahil edilmiş olup tüm katılımcıların cinsiyeti kadındır. Yaş ortalamaları hasta ve sağlıklı kontrol grupları için sırasıyla 50.95 ± 8.70 ve 49.24 ± 6.58 olup iki grup arasında yaş açısından istatistiksel bir fark bulunmamaktadır ($p=0.283$). Sağlıklı kontrol grubuna dahil olan 10 kişiden sabah ilk idrarı örneği temin edilememesi sebebiyle sadece oksidatif DNA hasarı karşılaştırması 50 SS hastası ve 31 sağlıklı kontrol arasında yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen SS hastalarının detaylı klinik bulgu/skorları ve örneklerin alındığı gün bakılan otoantikor pozitifliği, CRP, ESR değeri gibi laboratuvar parametreleri Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 8. Çalışmaya dahil edilen SS hastalarının klinik bulgu/skorları

SS Hastaları (n=50)	
Yaş, ort (SD)	50.95 (8.70)
SS alt tipi, n (%)	
<i>Diffüz SS</i>	12 (24%)
<i>Sınırlı SS</i>	38 (76%)
Hastalık süresi* (yıl), ort (SD)	10.79 (9.67)
Otoantikor pozitifliği, n (%)	
<i>Antinükleer antikor (ANA)</i>	46 (92%)
<i>Anti-Scl-70</i>	26 (52%)
<i>Anti-sentromer antikor</i>	22 (44%)
Modifiye Rodnan Deri Skoru, ort (SD)	4.53 (5.91)
UCLA SCTC GIT 2.0 skoru, ort (SD)	0.31 (0.27)
	<i>İshal dışlanınca:</i> 0.29 (0.26)
Warrick skoru, ort (SD)	4.78 (6.23)
Klinik Bulgular, n (%)	
GİS Tutulumu	40 (80)

Artrit	22 (44)
İAH	24 (48)
PAH	7 (14)
CRP, ort (SD)	5.40 (6.37)
ESR, ort (SD)	23.46 (15.52)
Kullanılan ilaçlar, n (%)	
Kortikosteroid (<7.5 mg/gün), n (%)	12 (24%)
Proton pompa inhibitörü, n (%)	41 (82%)
Kalsiyum kanal blokerları, n (%)	37 (74%)
Hidroksiklorokin, n (%)	12 (24%)
İmmünsüpresifler, n (%)	8 (16%)

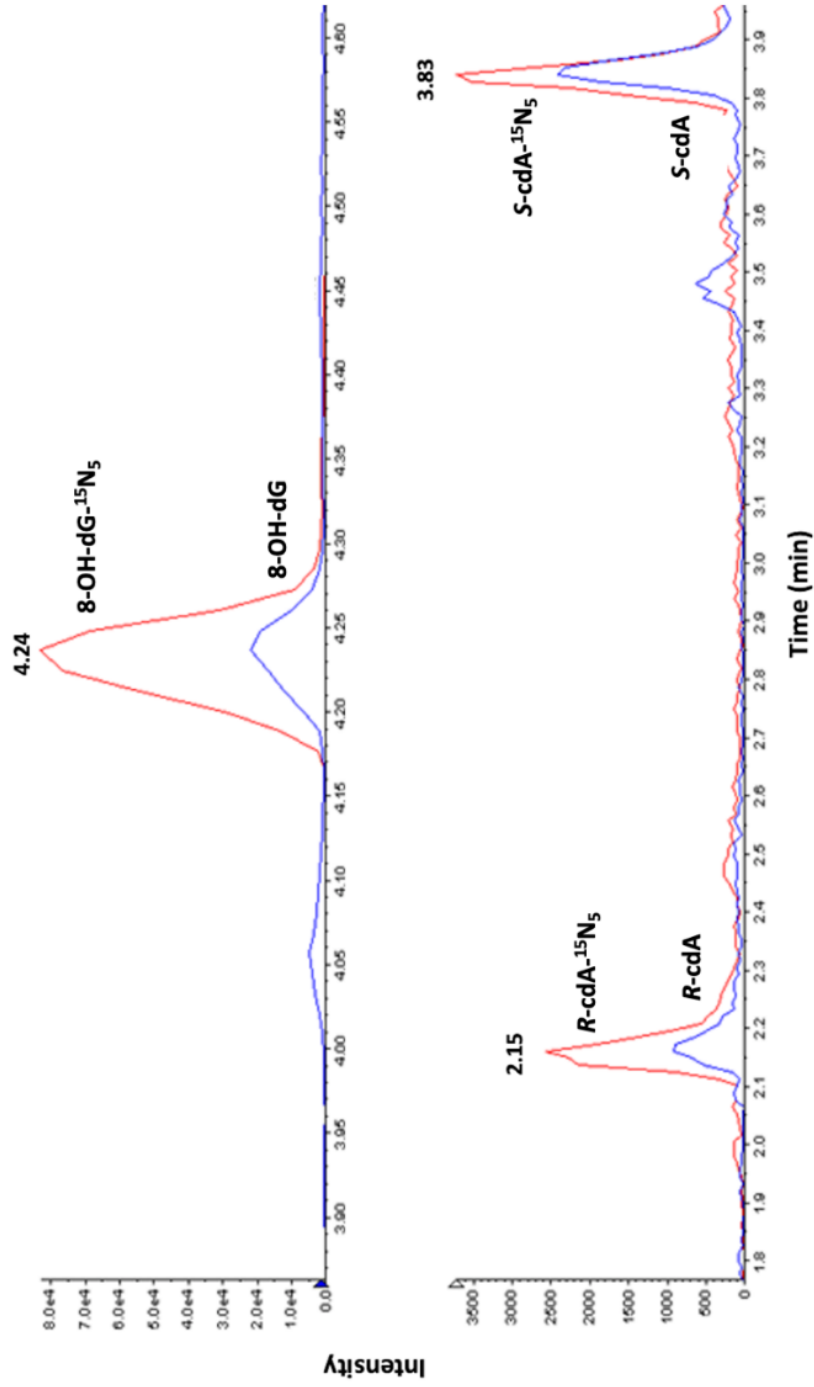
CRP: C-reaktif protein, **ESR:** Eritrosit sedimentasyon hızı, **GIS:** Gastrointestinal sistem, **IAH:** İnterstisyel akciğer hastalığı, **SS:** Sistemik skleroz, **UCLA SCTC GIT 2.0:** University of California, Los Angeles Scleroderma Clinical Trial Consortium Gastrointestinal Tract (UCLA SCTC GIT) 2.0 anketi, **Ort:** Ortalama, **SD:** Standart sapma

*Raynaud fenomeni dışında oluşan ilk klinik semptomdan (non-Raynaud semptom) itibaren hesaplanmıştır.

4.2. Kütle Spektrometrik Bulgular

4.2.1. Oksidatif DNA Hasarı

SS hastalarında oksidatif DNA hasarını kapsamlı olarak değerlendirmek amacıyla vücuttaki sistemik hasarı gösterecek şekilde idrar örneklerinden 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri referans metot olan LC-MS/MS yöntemi ile ölçülmüş ve sonuçlar sağlıklı bireylerle karşılaştırılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. Oksidatif DNA hasarı ürünlerinin idrar matrisinde temsili kromatogram görüntüsü (Kırmızı peakler ¹⁵N₅ ağır izotop işaretli internal standartları, mavi peakler hastadaki endojen hasar ürünlerini temsil etmektedir).

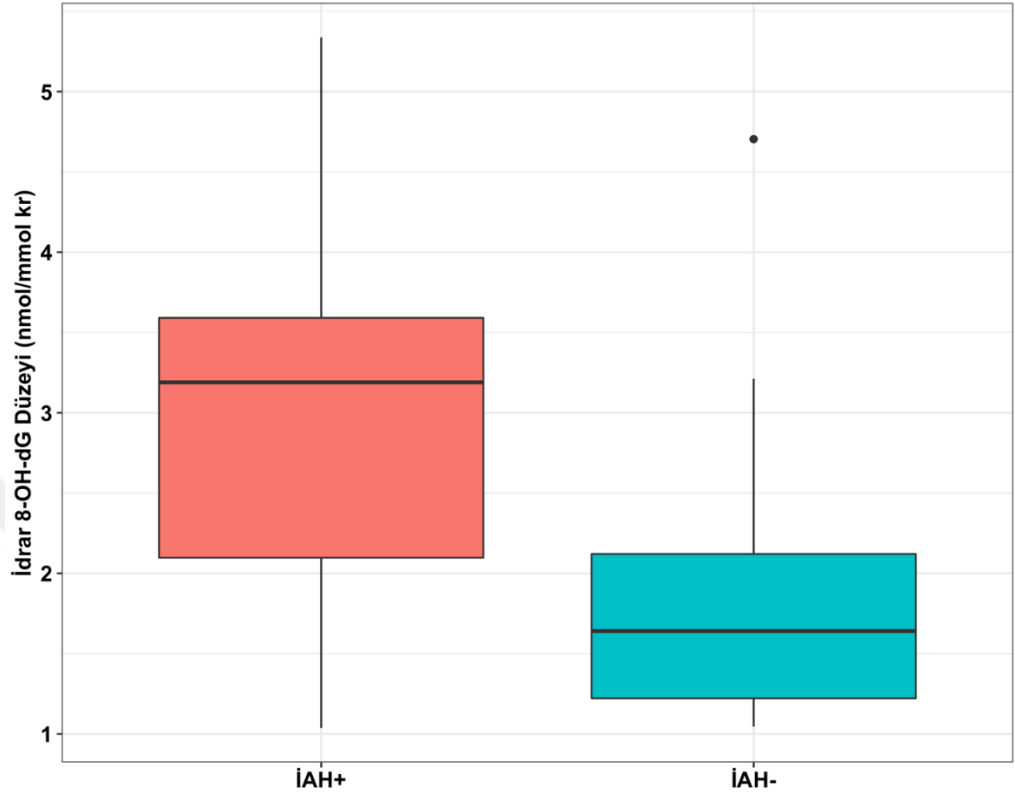
İstatistiksel analizlere göre, SS hastalarında üç DNA hasarı ürünü de sağlıklı bireylere göre anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0.04; p=0.006; p=0.004 sırasıyla; 8-oxo-dG, S-cdA, and R-cdA için) (Tablo 9).

Tablo 9. İdrar oksidatif DNA hasarı ürünlerinin SS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılması (*p<0.05)

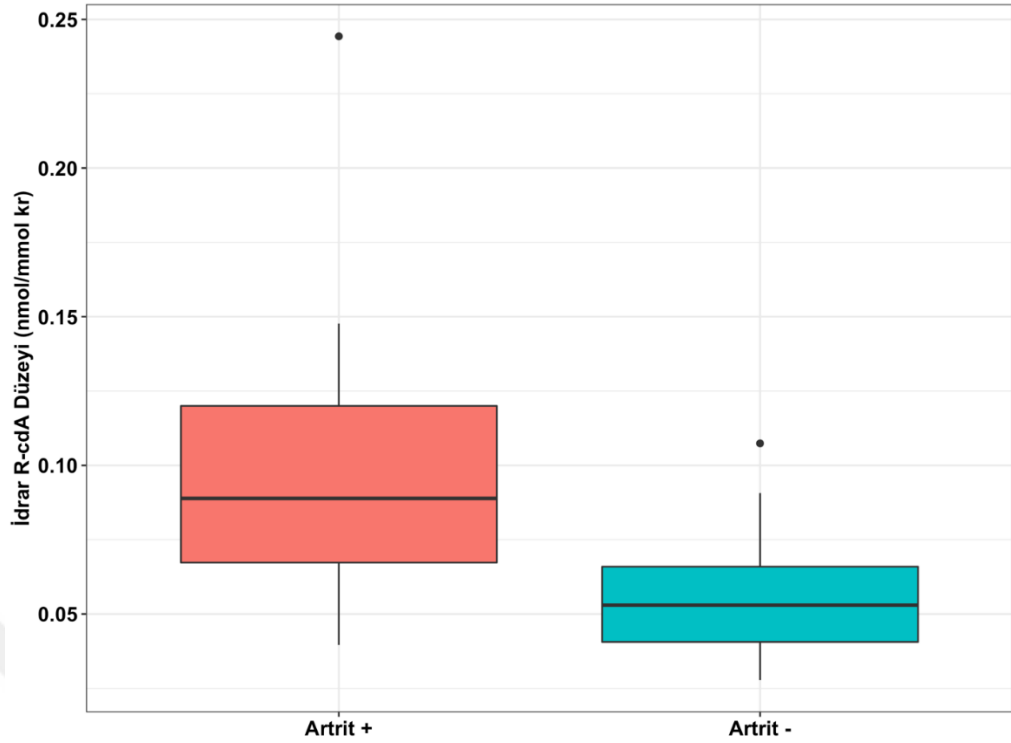
	8-OH-dG, nmol/mmol kr Ort±SD		S-cdA, nmol/mmol kr Ort±SD		R-cdA, nmol/mmol kr Ort±SD	
SS hastaları (n=50)	2.44±1.57	p=0.04*	0.044±0.028	p=0.006*	0.077±0.040	p=0.004*
Sağlıklı bireyler (n=31)	1.87±0.91		0.028±0.019		0.050±0.039	

Hastaların klinik bulgu/skorları ile oksidatif DNA hasarı ürünleri arasındaki olası korelasyonlar kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Yapılan analizler sonucunda, DNA hasarının altın belirteci olarak tanımlanan 8-OH-dG konsantrasyonunun akciğer tutulum şiddetini ifade eden Warrick skoru ile anlamlı bir pozitif korelasyona sahip olduğu gösterilmiştir (r=0.478, p=0.005). Bu bulguyu destekleyecek şekilde, İAH pozitif olan hastaların idrar 8-OH-dG düzeyi İAH negatif olan hastalara göre anlamlı düzeyde yüksek olarak tespit edilmiştir (İAH pozitif ve negatif hastalar için median (min-max) sırasıyla; 3.32 (1.04-5.15); 1.39 (1.05-4.70), p=0.014) (Şekil 8). Bu bulguların yanı sıra, hastalar %DLCO değeri 60'ın altında ve üstünde olacak şekilde iki gruba ayrılmış ve %DLCO değeri 60'ın altında olan hasta grubunun 8-OH-dG düzeyi diğer gruba göre anlamlı yüksek bulunmuştur (%DLCO<60 ve >60.1 grupları için sırasıyla; 2.95 (0.89-5.99); 1.88 (0.71-9.35), p=0.029). Ancak %DLCO değerini düşürecek en önemli faktörün PAH bulgusu olduğu göz önüne alınarak bu analizden PAH pozitif olan hastalar dışlandığında istatistiksel anlamlılık kaybolmuştur (%DLCO<60 ve >60 grupları için sırasıyla; 2.65 (0.89-5.15); 1.88 (0.71-9.35), p=0.114). PAH pozitif olan sadece yedi hasta bulunduğundan PAH pozitif-negatif gruplar arasında DNA hasarı ürünleri karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç bulunamamış olmasına rağmen %DLCO analizinden PAH hastaları dışlandığında anlamlılığın kaybedilmiş olması, PAH pozitifliğinin artan oksidatif DNA hasarı ile ilişkili olabileceğine işaret etmektedir. SS hastalarında akciğer hasarı ile artan oksidatif DNA hasarının gösterilmiş olmasının yanı sıra, artrit sahip olan hastaların artriti olmayan hastalara göre R-cdA düzeyinde

anamlı bir yükseliş sergilediği tespit edilmiştir (Artriti olan ve olmayan hastalar için sırasıyla; 0.089 (0.039-0.24); 0.053 (0.28-0.11), $p=0.005$) (şekil 9).



şekil 8. İAH pozitif ve negatif olan skleroderma hastalarının idrar 8-OH-dG düzeyi, Mann Whitney-U, $p=0.014$



Şekil 9. Artrit pozitif ve negatif olan skleroderma hastalarının idrar R-cdA düzeyi, Mann Whitney-U, p=0.005

Hastaların oksidatif DNA hasarı düzeyi, GİS tutulumu olan ve olmayan grup arasında karşılaştırıldığında hastaların neredeyse tamamının düşük seviyede de olsa GİS tutulumu olması sebebiyle anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak, iki grubun DNA hasarı ürünleri değerlendirildiğinde GİS tutulumu olan grupta üç DNA hasarı ürününün de GİS tutulumu olmayanlara göre yüksek seviyede seyrettiği gözlenmiştir (Tablo 10). Hastaların klinik bulgulara göre oksidatif DNA hasarı açısından karşılaştırmaları detaylı olarak Tablo 10'da verilmiştir. Tüm bu sonuçlara bakıldığında, SS hastalarında akciğer tutulumunun ve tutulum şiddetinin artan oksidatif DNA hasarı ile güçlü bir ilişkiye sahip olabileceği ve artrit de SS hastalarında oksidatif DNA hasarında bir artışa yol açabileceği gösterilmiştir.

Tablo 10. Skleroderma hastalarının klinik bulgularına göre oksidatif DNA hasarı ürünlerinin karşılaştırılması (*p<0.05)

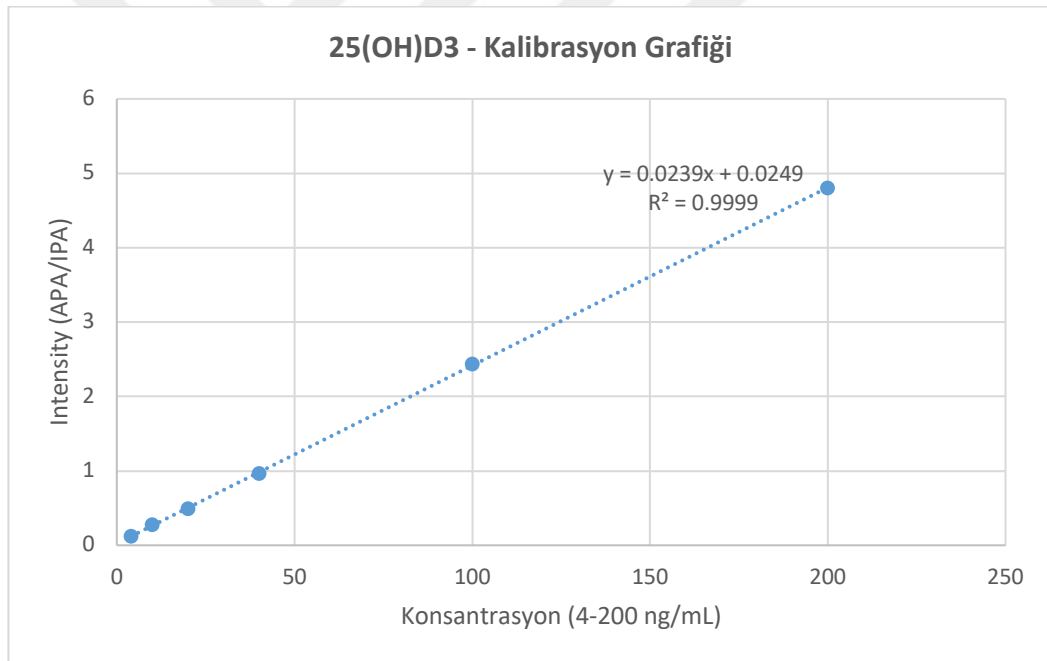
	8-OH-dG (nmol/mmol kr) Median (min-max)			S-cdA (nmol/mmol kr) Median (min-max)			R-cdA (nmol/mmol kr) Median (min-max)		
<i>IAH</i>	Poz (n=24)	3.32 (1.04-5.15)	p=0.014*	Poz (n=24)	0.026 (0.002-0.12)	p=0.41	Poz (n=24)	0.070 (0.04-0.24)	p=0.43
	Neg (n=26)	1.39 (1.05-4.70)		Neg (n=26)	0.033 (0.007-0.097)		Neg (n=26)	0.061 (0.03-0.11)	
<i>Artrit</i>	Poz (n=22)	3.08 (1.04-5.34)	p=0.39	Poz (n=22)	0.031 (0.019-0.14)	p=0.45	Poz (n=22)	0.088 (0.04-0.24)	p=0.005*
	Neg (n=28)	2.00 (1.05-3.92)		Neg (n=28)	0.033 (0.002-0.097)		Neg (n=28)	0.053 (0.028-0.11)	
<i>GIS Tutulum</i>	Poz (n=40)	2.00 (0.89-6.00)	p=0.40	Poz (n=40)	0.038 (0.002-0.12)	p=0.93	Poz (n=40)	0.067 (0.028-0.24)	p=0.15
	Neg (n=10)	1.95 (0.86-2.42)		Neg (n=10)	0.034 (0.021-0.096)		Neg (n=10)	0.053 (0.033-0.098)	
<i>PAH</i>	Poz (n=7)	3.30 (0.86-6.00)	p=0.51	Poz (n=7)	0.053 (0.007-0.070)	p=0.40	Poz (n=7)	0.13 (0.039-0.24)	p=0.26
	Neg (n=43)	2.10 (1.04-5.15)		Neg (n=43)	0.032 (0.002-0.14)		Neg (n=43)	0.066 (0.028-0.15)	

4.2.2. D Vitamini Düzeyi

4.2.2.1. Yöntem Geliştirme ve Verifikasyon Çalışmaları

4.2.2.1.1. Kalibrasyon Grafiği, LOD ve LOQ değerlerinin Hesaplanması

Kalibrasyon eğrisi, D vitamini içermeyen insan serumuna 4-200 ng/mL aralığında altı seri konsantrasyonda 25(OH)D3 standardı ve son konsantrasyon 50 ng/mL olacak şekilde döteryum işaretli 25(OH)D3-d3 internal standart eklenerek hazırlanmış olan kalibratörler ile çizilmiştir. Intensity değeri, UPLC-HRMS cihazının okuması sonucu elde edilen standart ve internal standartlara ait peak alanlarının birbirine oranlanması ile belirlenmiştir. Çizilen kalibrasyon eğrisinin eğim, intercept değerleri ve regresyon katsayısı sırasıyla; 0.0239, 0.0249 ve 0.9999 olarak tespit edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. 25(OH)D3 için UPLC-HRMS yöntemi ile çizilen kalibrasyon grafiği

LOD ve LOQ değerleri, FDA kılavuzunda onaylanan yöntemlerden biri olan kalibrasyon grafiği üzerinden belirlenmiştir. 25(OH)D3'ün optimize edilmiş yöntem ile analizi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla; 0.87 ve 2.63 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

4.2.2.1.2. Doğruluk ve Kesinliğin Belirlenmesi

Geliştirilmiş olan yöntemin doğruluğu iki farklı yöntemle belirlenmiştir. Birinci yöntemde D vitamini içermeyen insan serumuna standart ekleme yöntemiyle düşük (4 ng/mL), orta (20 ng/mL) ve yüksek (100 ng/mL) konsantrasyonda hazırlanmış olan kalibratörler (kal), ikinci yöntemde ise ticari olarak satın alınan NIST 972-a sertifikalı referans materyal (SRM) kullanılmıştır. Her iki yöntemde de hesaplanan doğruluk yüzdeleri %85.56-%105.66 arasında belirlenmiş olup FDA yöntem verifikasyonu kılavuzunda belirlenen alt ve üst sınırlar olan %85-%115'in arasında yer almıştır (Tablo 11).

Tablo 11. 25(OH)D3-Yöntem Verifikasyonu: Doğruluk Hesaplaması

25(OH)D3 – Doğruluk Analizi		
Teorik Konsantrasyon (ng/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (ng/mL)	Doğruluk (%)
4 (kal)	4,23	105,66
20 (kal)	19,58	97,91
100 (kal)	100,77	100,77
17,7 Level-2 (SRM)	15,15	85,56
19,8 Level-3 (SRM)	20,03	101,15
29,4 Level-4 (SRM)	30,89	105,08

*kal: kalibratör, SRM: sertifikalı referans materyal

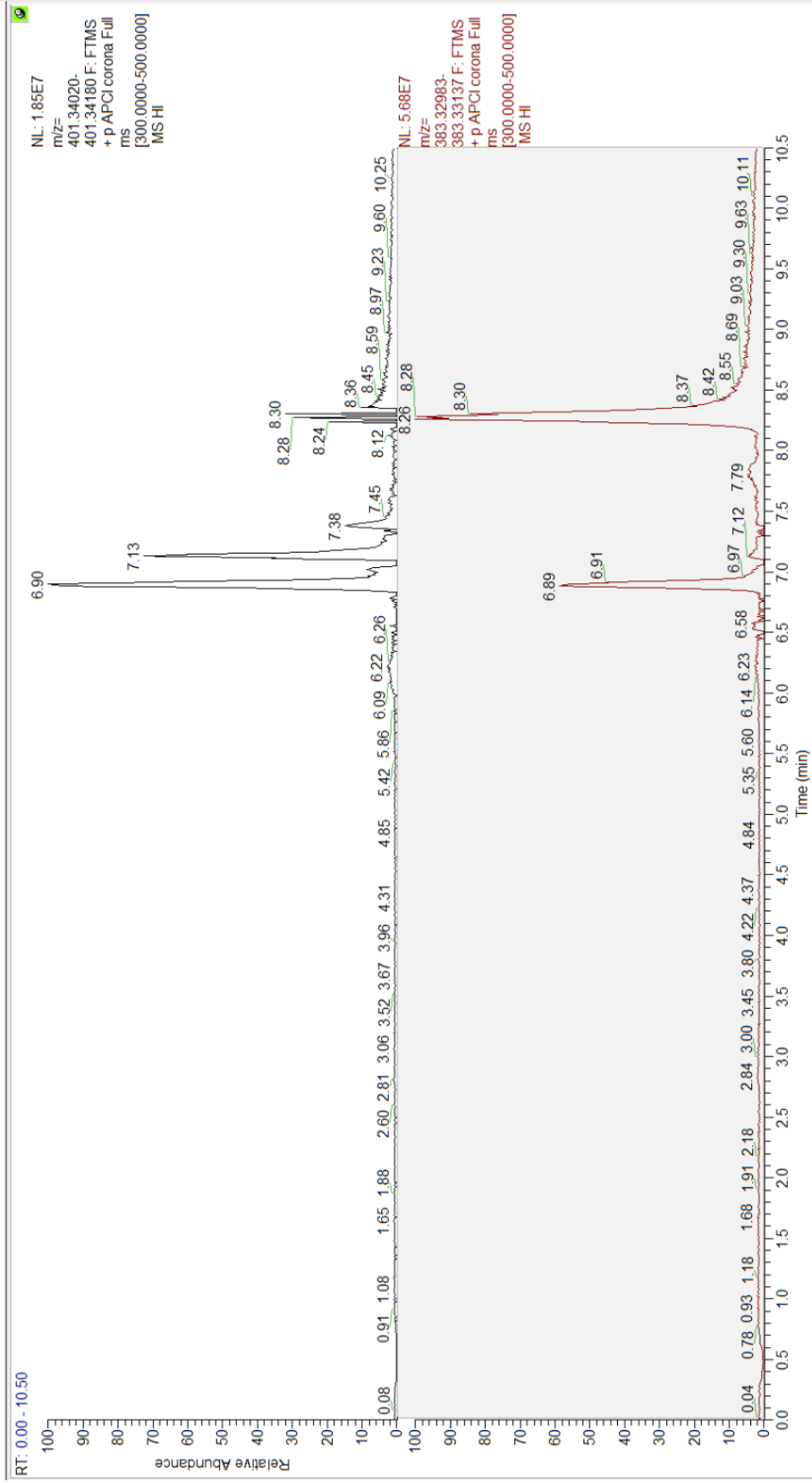
Aynı kalibratörlerin tekrarlı analizleri ile gün içi ve günler arası kesinlik değerleri ayrı ayrı hesaplanmış olup sonuçlar %CV değeri olarak ifade edilmiştir. 25(OH)D3 için gün içi ve günler arası kesinlik değerleri sırasıyla %4.42-%12.25 ve %2.33-11.99 değerleri arasında hesaplanarak kılavuz tarafından onaylanan maksimum değer olan %15'in altında belirlenmiştir (Tablo 12).

Tablo 12. 25(OH)D3-Yöntem Verifikasyonu: Kesinlik Hesaplaması

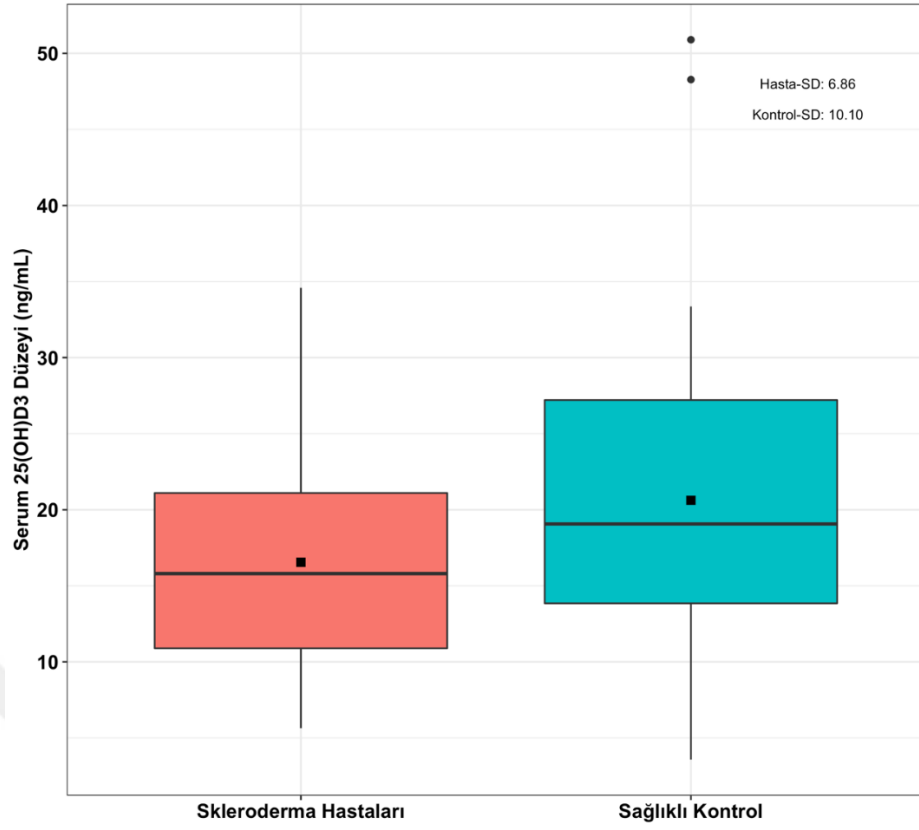
25(OH)D3 – Kesinlik Analizi		
Kalibratör (ng/mL)	Kesinlik, %CV (Gün içi)	Kesinlik, %CV (Günler arası)
4	11,10	11,99
20	12,25	3,47
100	4,42	2,33

4.2.2.2. Serum D Vitamini Düzeyleri

Metot geliştirme ve verifikasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hasta ve kontrol grubuna ait serum örneklerinin optimize edilmiş olan yöntem ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiş ve UPLC-HRMS cihazı kullanılarak serum 25(OH)D3 düzeyleri hassas bir şekilde analiz edilmiştir (Şekil 11). İstatistiksel analizlerde, SS hastalarının serum D vitamini düzeyi kontrol grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur (Hasta ve kontrol grubu için sırasıyla; 16.54 ± 6.86 ve 20.62 ± 10.10 , $p=0.028$) (Şekil 12). Ayrıca D vitamininin SS hastalığının klinik skorları ile ilişkisini değerlendirmek için yapılan analizlerde, D vitamini düzeyi ile mRSS ve Warrick skorları arasında anlamlı bir negatif korelasyon tespit edilmiştir (mRSS ve Warrick skoru için sırasıyla; $r=-0.324$, $p=0.025$ ve $r=-0.365$; $p=0.037$).



Şekil 11. Serum D vitamini ölçümleri temsili kromatogram görüntüsü (25(OH)D3 ana/ürün iyonlar, alıkonna zamanı: 6.90 dk)



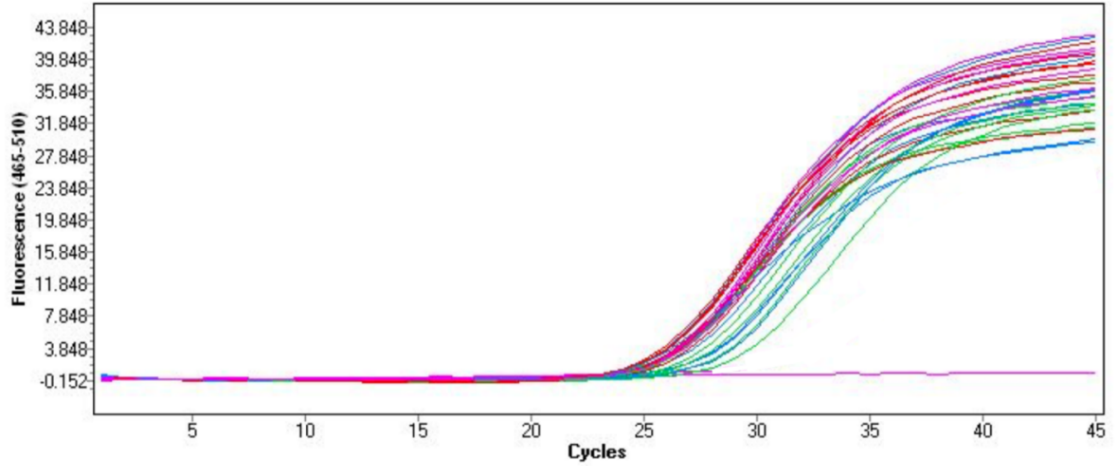
Şekil 12. Skleroderma hastaları ve sağlıklı bireylerin serum 25(OH)D3 düzeylerinin karşılaştırılması, Student's t testi, $p=0.028$. (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir)

Sklerodermada düşük D vitamini düzeyinin artan oksidatif DNA hasarı ile olası ilişkisini tespit etmek amacıyla hastalar başlangıç D vitamini düzeylerine göre iki gruba ayrılmış (Grup 1: <10 ng/mL; Grup 2: >10 ng/mL) ve gruplar arası oksidatif DNA hasarı değerleri karşılaştırılmıştır. Bu analiz sonucunda başlangıç D vitamini düzeyi 10 ng/mL'den düşük olan hastalarda idrar 8-OH-dG düzeyi anlamlı yüksek tespit edilmiştir (Median: min-max değerleri: Grup 1= 2.10: 1.54-5.15; Grup 2= 1.40: 0.70-4.70, $p=0.014$)

4.3. Genetik Bulgular

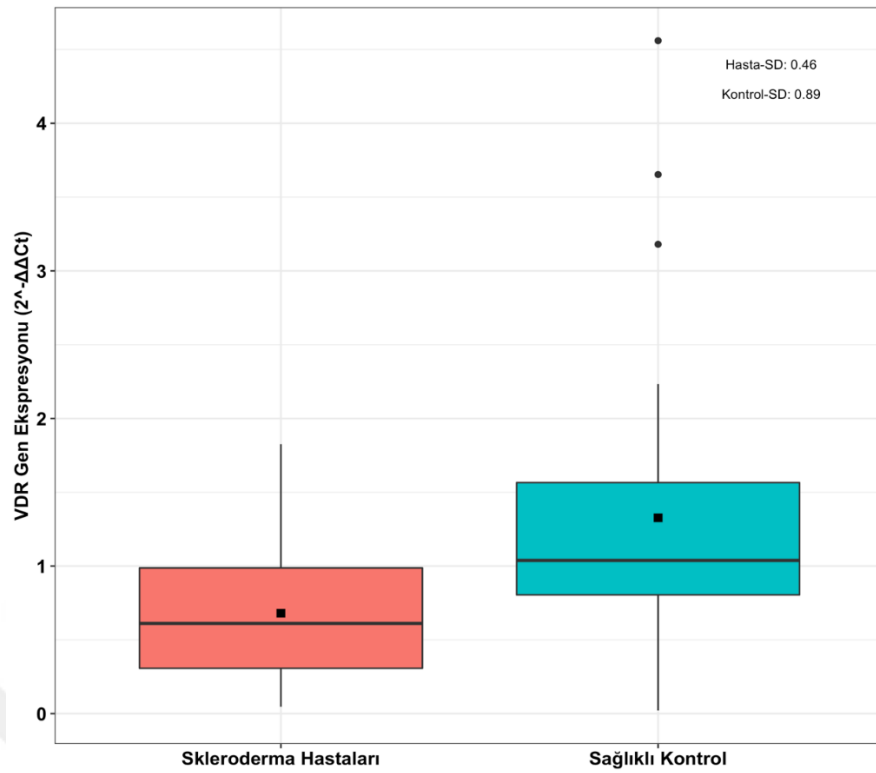
4.3.1. VDR Gen Ekspresyonu

Hastaların ve sağlıklı bireylerin tam kan örneklerinden ekstrakte edilmiş olan RNA örnekleri cDNA'lara çevrilmiş olup, VDR gen ekspresyonu cDNA örnekleri kullanılarak prob temelli RT-PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13. Gen ekspresyon analizi: Çalışmada elde edilen temsili amplifikasyon eğrisi görüntüsü

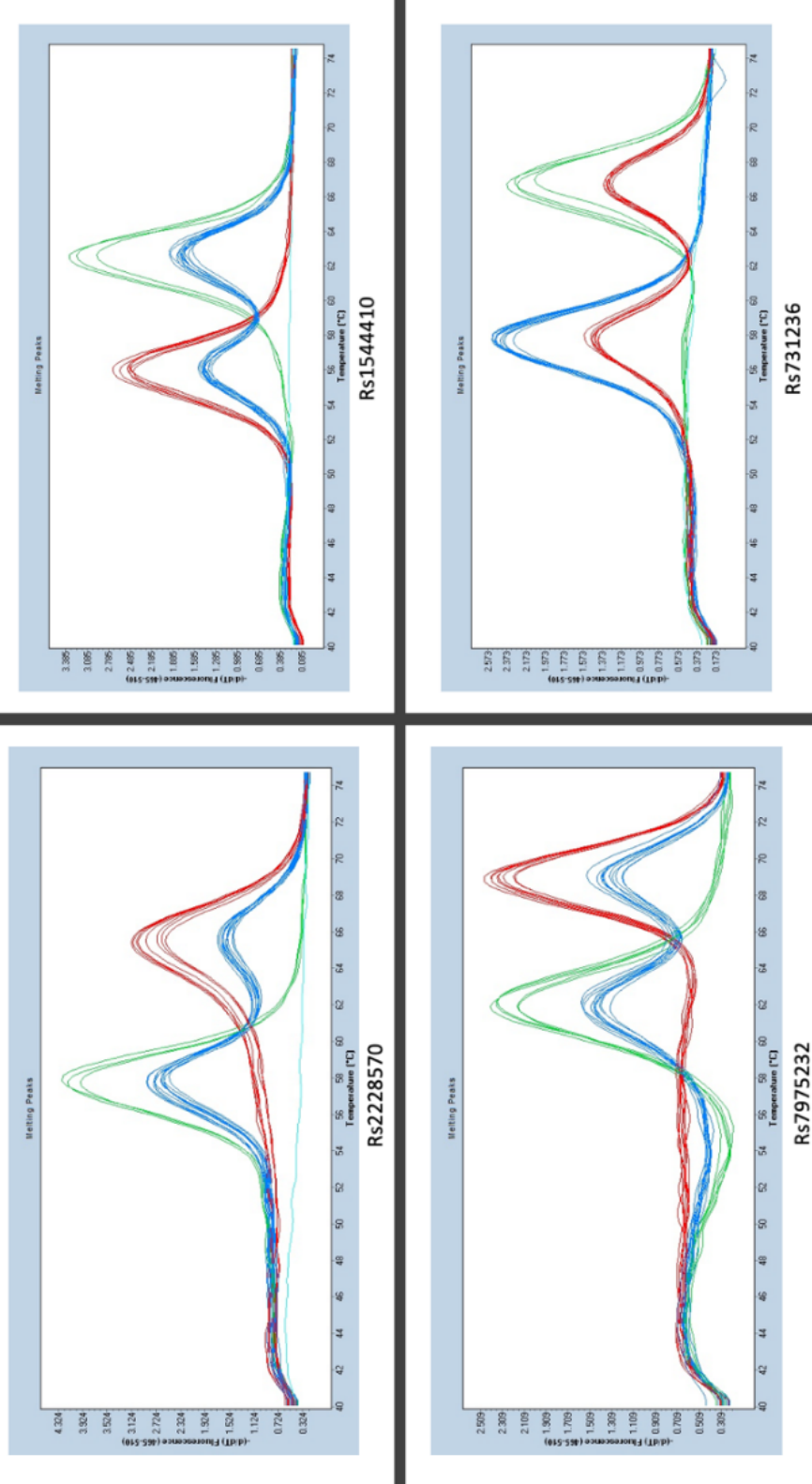
VDR gen ekspresyonu, ACTB geni housekeeping gen olarak kullanılarak göreceli kantitasyon metodu ile belirlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizlerde, hastalarda sağlıklı bireylere göre anlamlı düzeyde düşük VDR gen ekspresyonu tespit edilmiştir (Hasta ve kontrol için sırasıyla; 0.68 ± 0.46 ve 1.33 ± 0.89 , $p < 0.001$) (Şekil 14).



Şekil 14. Skleroderma hastaları ve sağlıklı bireylerin VDR gen ekspresyonu açısından karşılaştırılması, Student's t testi, $p < 0.001$. (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir)

4.3.2. VDR Geni Tek Nükleotid Polimorfizmleri

Hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınan kan örneklerinden ekstrakte edilmiş olan genomik DNA örnekleri kullanılarak VDR geninde bulunan dört sekans polimorfizmi (rs2228570, rs1544410, rs7975232 ve rs731236) prob temelli RT-PCR yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu yöntemde, amplifikasyonun ardından erime eğrisi analizi kullanılarak bireylerin genotipleri tespit edilmiştir (Şekil 15).



Şekil 15. VDR geni tek nükleotid polimorfizmlerinin erime eğrisi analizi sonucu elde edilen erime peakleri

Bu çalışma ile, Türk popülasyonundaki skleroderma hastalarında ilk kez VDR geninde bulunan rs2228570, rs1544410, rs7975232 ve rs731236 sekans

polimorfizmleri incelenmiş olup istatistiksel analizlerde hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir genotip farkı tespit edilememiştir (Tablo 13).

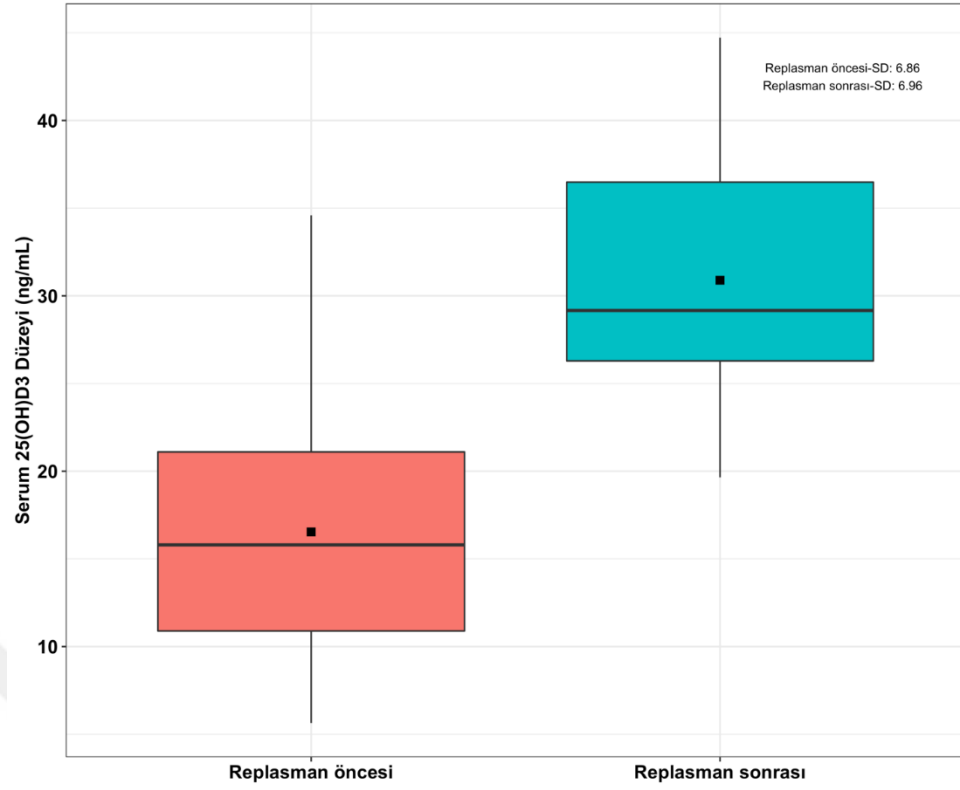
Tablo 13. VDR geninde bulunan sekans polimorfizmlerinin hasta ve kontrol grubu arasında karşılaştırılması

	rs2228570				rs1544410				rs7975232				rs731236			
	CC (%)	TT (%)	CT (%)		GG (%)	AA (%)	GA (%)		AA (%)	CC (%)	AC (%)		TT (%)	CC (%)	TC (%)	
SS hastaları (n=50)	42.9	4.8	52.3	$\chi^2=0.26$ $p=0.88$	42.9	19.1	38	$\chi^2=0.89$ $p=0.64$	33.3	16.7	50	$\chi^2=1.49$ $p=0.48$	47.6	19.1	33.3	$\chi^2=1.96$ $p=0.37$
Sağlıklı bireyler (n=40)	44.7	2.6	52.7		39.5	13.2	47.3		39.5	23.7	36.8		50	8.3	41.7	

4.4. Klinik Prospektif Bölüm: D Vitamini Replasmanının Oksidatif DNA Hasarına Etkisi

Çalışmaya dahil edilen skleroderma hastaları, çalışmaya dahil oldukları gün ve üç ay sonra olmak üzere iki doz 150.000 IU/doz olacak şekilde intramusküler D vitamini replasmanı almış olup ikinci dozdan üç ay sonra (altıncı ay) biyolojik örnekleri yeniden toplanmıştır. Ayrıca hastalar tüm süreç boyunca 800 IU/gün olacak şekilde oral D vitamini takviyesi almaya devam etmiştir. Hastaların çalışmanın başladığı günden itibaren devam eden tedavi planlarında herhangi bir değişiklik yapılmamıştır. Replasmanın altıncı ayında toplanan serum örneklerinden 25(OH)D3 miktarı ölçülerek D vitamini replasmanının etkisi kanıtlanmış ve idrar örneklerinden ise oksidatif DNA hasarı ürünleri (8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA) yeniden ölçülerek D vitamini replasmanının oksidatif DNA hasarına olası etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca hastaların replasman sonrası alınan tam kan örneklerinden RNA ekstraksiyonu ve cDNA sentezi de yapılarak VDR gen ekspresyonu da tekrar analiz edilmiştir. Covid-19 küresel salgını sebebiyle D vitamini replasmanı protokolüne dahil edilen 10 hastaya ulaşılamamış olup D vitamini replasmanının oksidatif DNA hasarına etkisini sınımayı hedeflemiş olan bağımlı analizler 40 hasta ile gerçekleştirilmiştir.

Yapılan analizlerde ilk olarak hastaların replasman sonrası serum D vitamini konsantrasyonunun istatistiksel anlamlılığa ulaşacak düzeyde arttığı ve D vitamini replasmanının tüm hastalar için etkin bir şekilde tamamlandığı gösterilmiştir (Replasman öncesi ve sonrası sırasıyla; 16.54 ± 6.86 ve 30.89 ± 6.96 , $p < 0.001$) (Şekil 16).

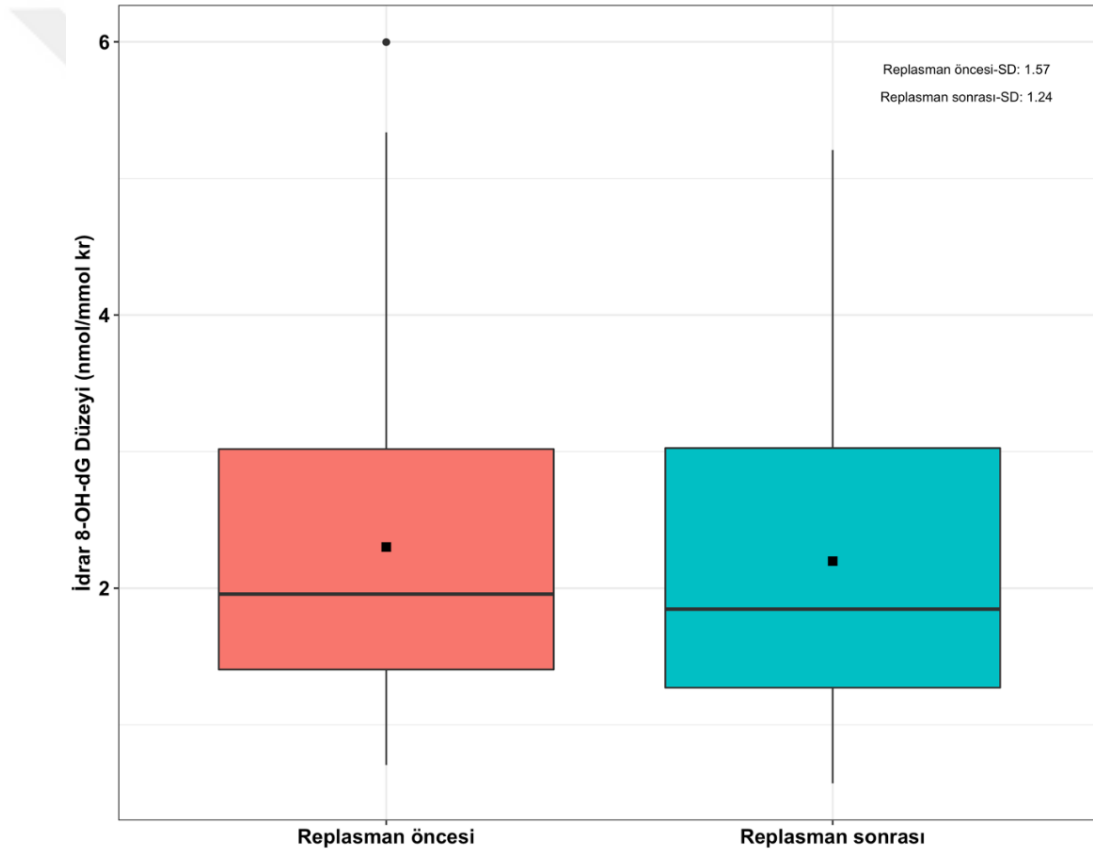


Şekil 16. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülen serum 25(OH)D3 düzeyleri, Bağımlı örneklem t testi, $p < 0.001$. (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir).

Hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA düzeyleri karşılaştırılmış olup üç DNA hasarı ürününün de replasman sonrası düşüş yönünde bir eğilime sahip olduğu tespit edilmiştir (Tablo 14). Bu hasar ürünlerinden DNA hasarı değerlendirmesi için altın standart olarak tanımlanan 8-OH-dG'de replasman sonrası düşüş istatistiksel anlamlılık göstermiştir (Replasman öncesi ve sonrası sırasıyla; 2.44 ± 1.57 ve 2.20 ± 1.24 , $p = 0.044$) (Şekil 17).

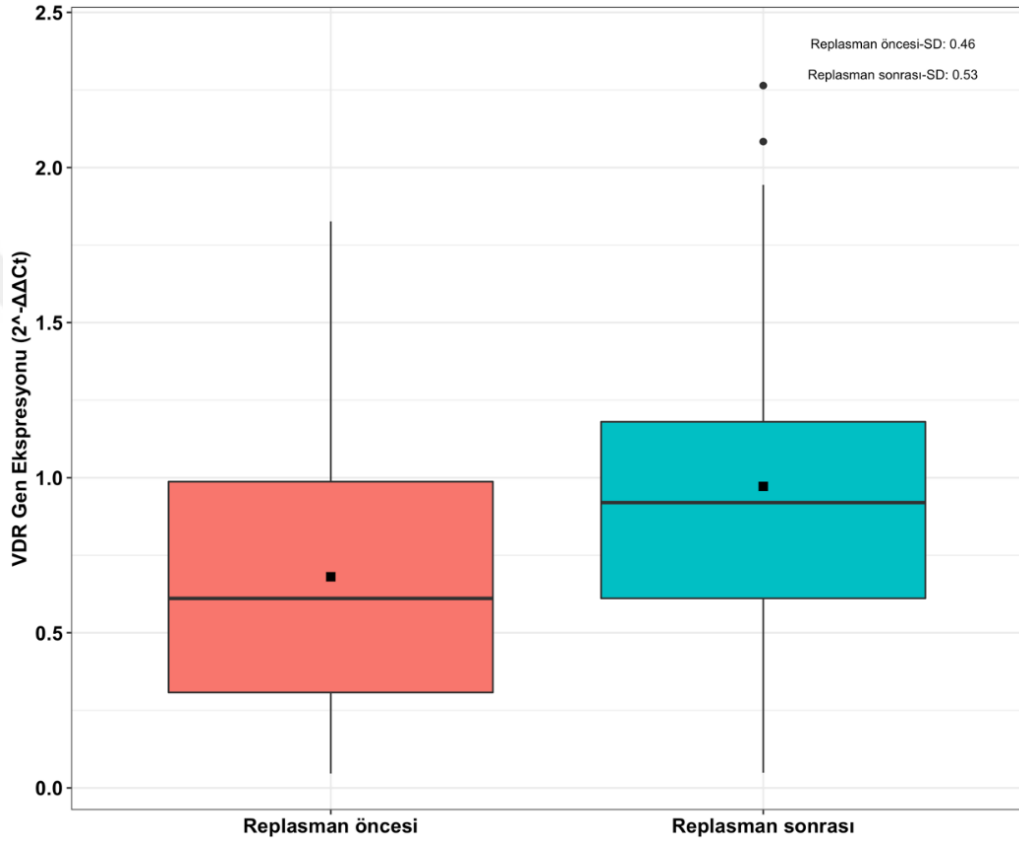
Tablo 14. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan oksidatif DNA hasar ürünleri (*p<0.05)

	8-OH-dG (nmol/mmol kr)		S-cdA (nmol/mmol kr)		R-cdA (nmol/mmol kr)	
	<i>Replasman Öncesi</i>	<i>Replasman Sonrası</i>	<i>Replasman Öncesi</i>	<i>Replasman Sonrası</i>	<i>Replasman Öncesi</i>	<i>Replasman Sonrası</i>
Mean±SD	2.44±1.57	2.20±1.24	0.044±0.028	0.042±0.022	0.077±0.040	0.066±0.034
	p=0.044*		p=0.627		p=0.097	



Şekil 17. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülen idrar 8-OH-dG düzeyleri, Bağımlı örneklem t testi, p=0.044. (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir).

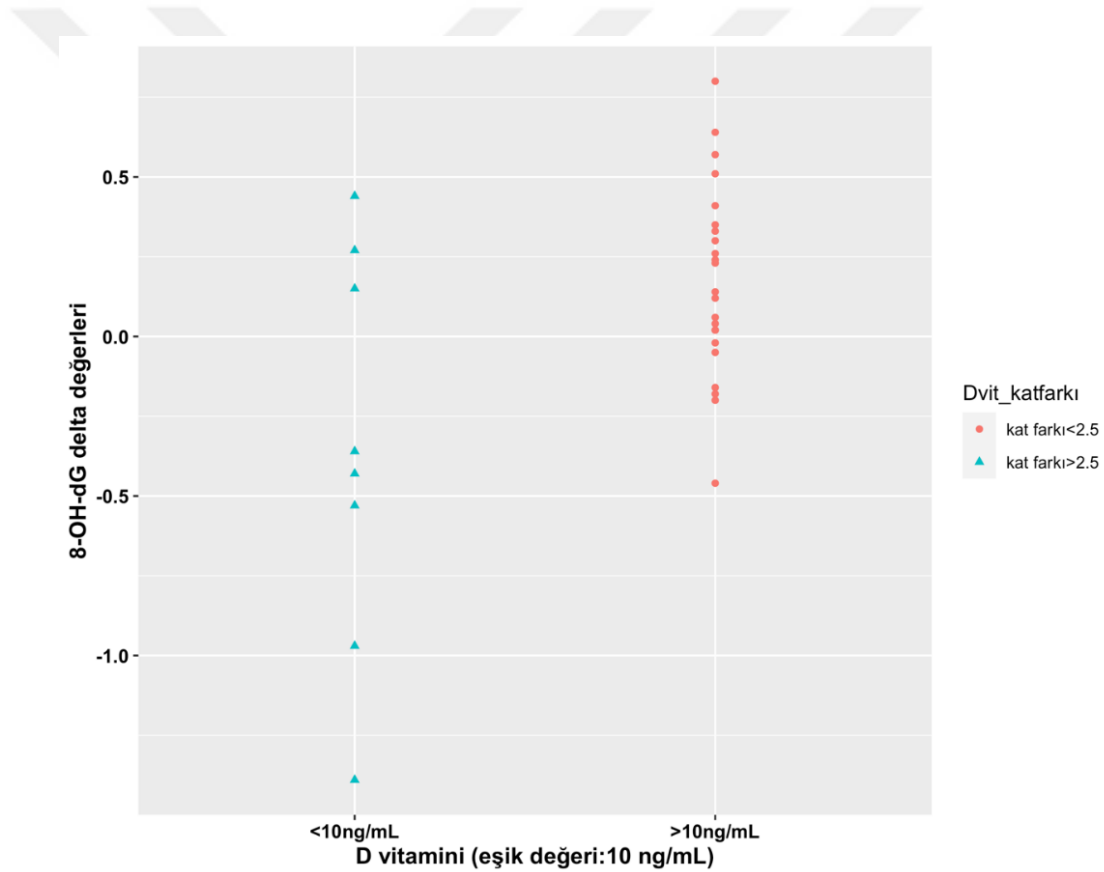
Bu süreçte, VDR'nin rolünü incelemek amacıyla VDR gen ekspresyonu da yeniden değerlendirilmiş olup VDR gen ekspresyonunun replasman sonrası anlamlı düzeyde bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (Replasman öncesi ve sonrası sırasıyla; 0.68 ± 0.46 ve 0.92 ± 0.53 , $p=0.006$) (Şekil 18). Bu bulgu, D vitamininin oksidatif DNA hasarı üzerindeki etkisini nükleer reseptörü olan VDR aracılığıyla gerçekleştirebiliyor olacağına işaret etmektedir.



Şekil 18. Skleroderma hastalarının D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında belirlenen VDR gen ekspresyon düzeyleri, Bağımlı örneklem t testi, $p=0.006$. (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir).

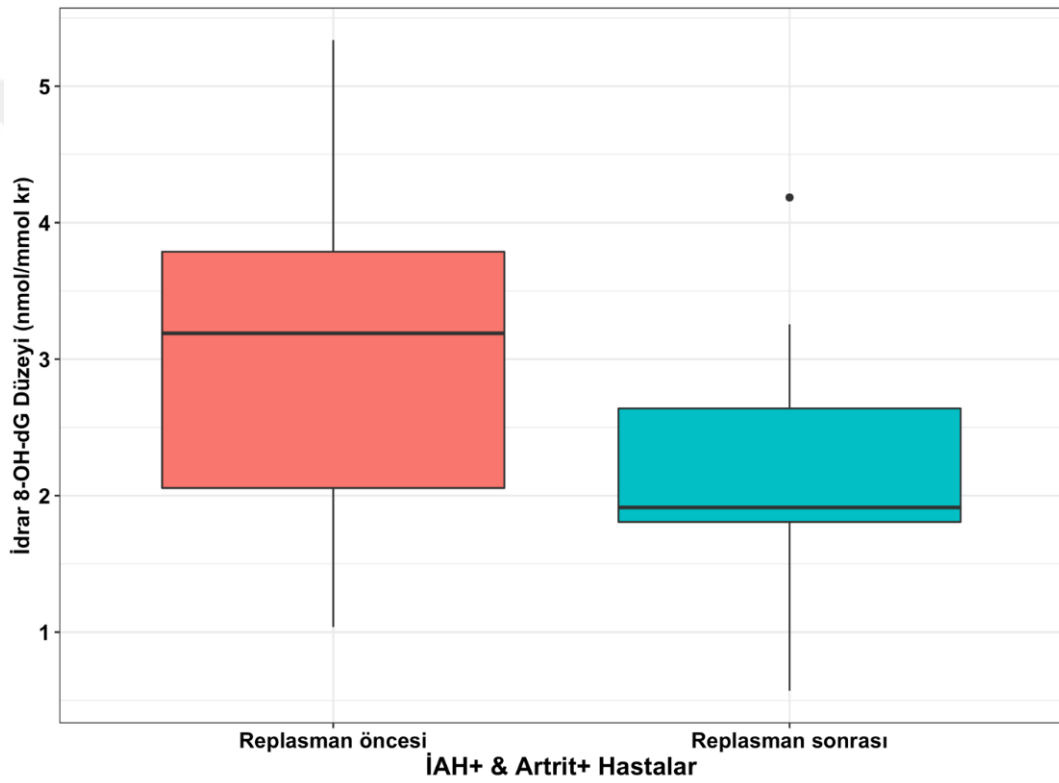
Replasman sonrasında D vitaminindeki artış miktarının DNA hasarındaki azalış düzeyi ile olası ilişkisini belirlemek amacıyla hastalar başlangıç D vitamini düzeyleri 10 ng/mL'den düşük olup replasman sonrası D vitamini iki buçuk kattan fazla artan ve başlangıç D vitamini düzeyleri 10 ng/mL'den yüksek olup replasman sonrası D vitamini iki buçuk kata kadar artan olmak üzere iki gruba ayrılmış (Grup 1: Bazal D

vitamini <10ng/mL ve D vitamini kat artışı >2.5, n=8; Grup 2: Bazal D vitamini >10ng/mL ve D vitamini kat artışı <2.5, n=24) ve bu grupların altıncı ayda ölçülen DNA hasarı düzeyinden başlangıçtaki DNA hasarı düzeyi çıkarılarak oksidatif DNA hasarının delta değerleri hesaplanmıştır. Bu iki grup arasında DNA hasarı değişimi açısından olası farkı belirlemek için yapılan analizde Grup 1’de DNA hasarı ürünlerinden 8-OH-dG’nin Grup 2’ye oranla daha etkin bir şekilde düşüş gösterdiği tespit edilmiştir (Median: min-max değerleri: Grup 1= (-0.40): (-1.39) -(+0.44); Grup 2= (0.14): (-0.46) -(0.80), p=0.046) (Şekil 19). Bu sonuç, başlangıçta D vitamini düzeyi düşük olan ve replasman ile etkin bir şekilde artış sağlanan bireylerde D vitamininin antioksidan etkileriyle oksidatif makromolekül hasarını indirmek için umut vaat ettiğini desteklemektedir.



Şekil 19. Bazal D vitamini düzeyi ve replasman sonrası D vitamini kat artışına göre gruplanan hastaların replasman sonrası 8-OH-dG düzeylerindeki değişim, p=0.046

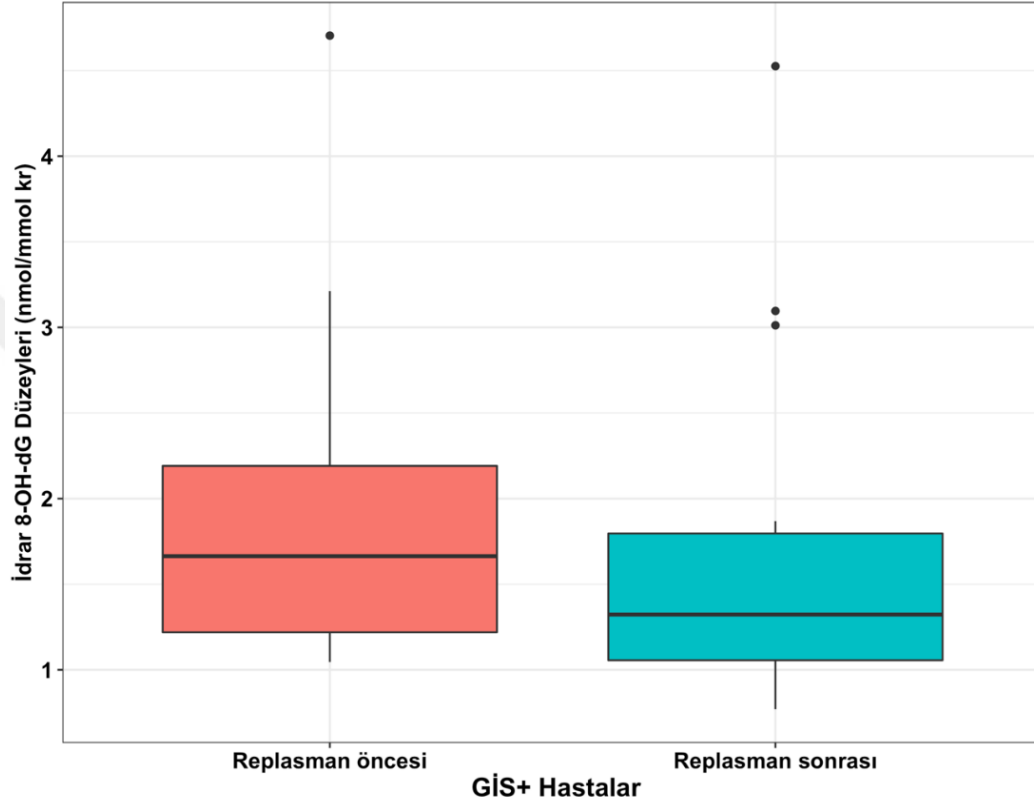
D vitamini replasmanının oksidatif DNA hasarına etkisi sklerodermada meydana gelen temel organ tutulumları bazında detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu kapsamda İAH, artrit ve PAH'ı olan ve D vitamini replasmanını tamamlayan hastalar ayrı ayrı gruplandırılmış ancak oksidatif DNA hasarı değişimi açısından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Ancak birden fazla bulguyu aynı anda taşıyan gruplar oluşturulduğunda, İAH ve artrite aynı anda sahip olan hastaların (n=12) D vitamini replasmanı sonrası 8-OH-dG düzeylerinde anlamlı bir düşüş tespit edilmiştir (D vitamini replasman öncesi ve sonrası 8-OH-dG med: min-max değerleri sırasıyla; 3.19: 1.04-5.34 ve 1.92: 0.57-4.18, p=0.037) (Şekil 20).



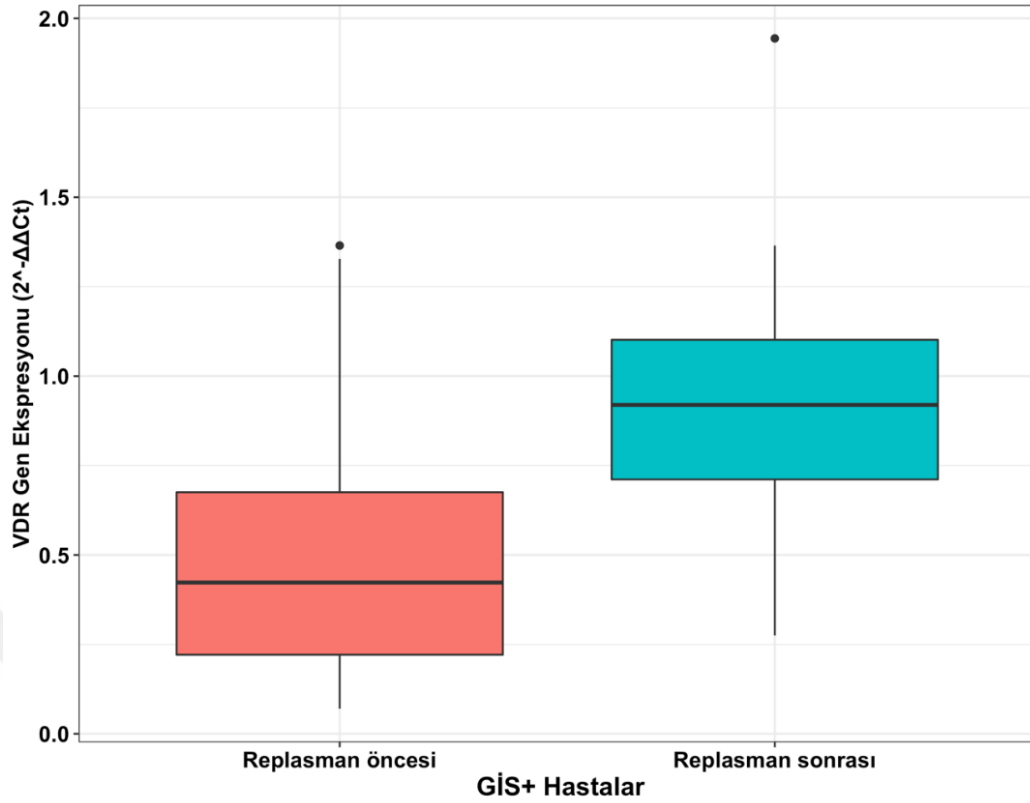
Şekil 20. İAH ve artrit bulgusuna sahip olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan idrar 8-OH-dG düzeyleri, Wilcoxon testi, p=0.037

Akciğer ve eklem tutulumuna ek olarak sadece GİS tutulumu olan hastalar da (n=22) replasman sonrası DNA hasarı düşüşü yönünden değerlendirilmiş ve bu hastaların 8-OH-dG düzeyi D vitamini replasmanı sonrası anlamlı oranda düşmüştür

(D vitamini replasman öncesi ve sonrası 8-OH-dG med: min-max değerleri sırasıyla; 1.76: 1.05-4.70 ve 1.38: 0.77-4.53, $p=0.025$) (Şekil 21). Ayrıca, GİS tutulumu olan hasta grubunda VDR gen ekspresyonu replasman sonrası anlamlı düzeyde artmıştır (D vitamini replasman öncesi ve sonrası VDR düzeyi med: min-max değerleri sırasıyla; 0.38: 0.07-1.36 and 0.90: 0.27-1.94, $p=0.032$) (Şekil 22).

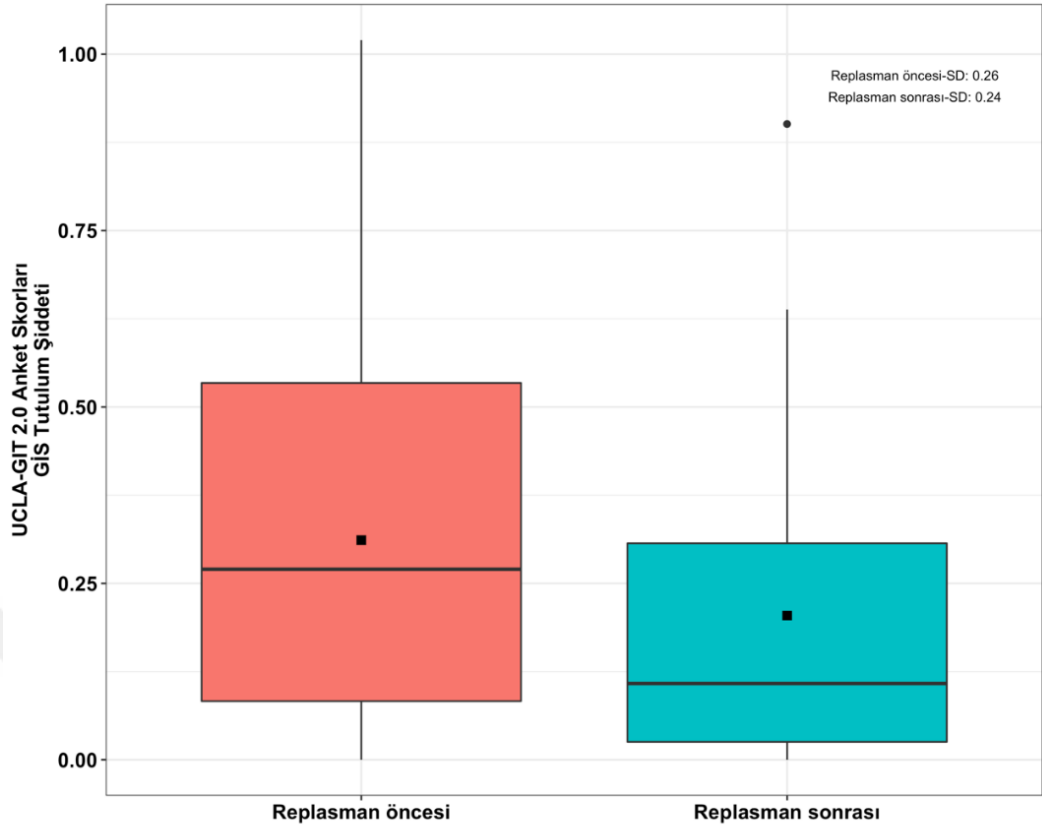


Şekil 21. Sadece GİS tutulumu olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan idrar 8-OH-dG düzeyleri, Wilcoxon testi, $p=0.025$



Şekil 22. GİS tutulumu olan hastaların D vitamini replasmanı öncesi ve sonrasında ölçülmüş olan VDR gen ekspresyon düzeyleri, Wilcoxon testi, $p=0.032$

GİS tutulumunun, akciğer veya eklem tutulumuna oranla altı ay gibi kısa bir süreçte D vitamini replasmanının etkisini yansıtmaya potansiyeline sahip olması nedeniyle hastalara replasman sonrası yeniden UCLA-GIT 2.0 anketi uygulanmıştır. D vitamini replasmanını tamamlamış olan tüm hastaların replasman öncesi ve sonrası anket skorları karşılaştırıldığında replasman sonrası skorların anlamlı düzeyde düştüğü dolayısıyla D vitamini ile GİS tutulum şiddetinin istatistiksel anlamlılığa ulaşacak oranda azaldığı gösterilmiştir (D vitamini replasman öncesi ve sonrası anket skorları; 0.30 ± 0.26 ve 0.21 ± 0.24 , $p=0.016$) (Şekil 23). Ayrıca, GİS tutulum şiddetinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla diğer birçok faktöre bağlı olarak ortaya çıkabilen “ishal” parametresi UCLA GIT 2.0 skorlarından dışlanarak analizler yeniden tekrarlanmış olup hem 8-OH-dG düzeyindeki hem de anket skorlarındaki düşüşler dışlamadan sonra dahi istatistiksel anlamlılıklarını kaybetmemiştir.



Şekil 23. D vitamini replasmanını tamamlayan hastaların replasman öncesi ve sonrası UCLA-GIT 2.0 anket skorları, Bağımlı örneklem t testi, $p=0.016$ (Boxplot'ın içerisindeki kareler ortalamaları ifade etmektedir).

Bu sonuçlar, akciğer, eklem, GİS gibi organ tutulumu olan skleroderma hastalarında etkin bir D vitamini replasmanının hastalığın patogenezinde oldukça önemli bir yere sahip olan oksidatif stresin hassas ve kümülatif göstergelerinden biri olan oksidatif DNA hasarını azaltma yönünde potansiyel bir antioksidan molekül olarak yer alabileceğine işaret etmektedir.

5. TARTIŞMA

Skleroderma, derinin ve daha ileri vakalarda akciğer, eklemler, GİS gibi organ/sistemlerin progresif fibrozu ile karakterize olan otoimmün bir hastalıktır. Sklerodermanın fibrotik sürecinde rol alan mekanizmalar üzerine çok sayıda çalışma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen hastalığın patogenezi ve progresyonu henüz aydınlatılamamıştır. Nadir bir hastalık olması, kronik süreç ve klinik heterojenite, skleroderma patogenezinin aydınlatılmasını zorlaştıran bazı sebepler olarak tanımlanmaktadır. Bu nedenle, günümüzde hala gerek hastalığın patogenezin ve progresyonuna katkı sağlayan faktörlerin araştırılmasına gerekse tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Skleroderma patogenezinde inflamasyon ve oksidatif stres birbirini besleyen kısır döngüler olarak yer almaktadır (145) Birçok inflamatuvar ve otoimmün hastalıkta olduğu gibi sklerodermada da oksidatif stres ve buna bağlı meydana gelen makromolekül hasarı oldukça önemli bir yere sahiptir. Yapılan son çalışmalarda, skleroderma hastalarında sağlıklı bireylere göre nitrik oksit, MDA, hidroperoksit, asimetrik dimetilarjinin gibi oksidatif stres belirteçlerinin anlamlı düzeyde arttığı ve süperoksit dismutaz ve C vitamini gibi önemli antioksidan moleküllerin ise azaldığı gösterilmiştir (116). Artan prooksidan moleküller ve buna karşın yetersiz kalan antioksidan savunma sistemleri sonucu meydana gelen oksidatif stres, fonksiyonel bir hücrenin karbonhidrat, lipid ve protein gibi makromoleküllerine hasar verebilmektedir. Makromolekül hasarları arasında oksidatif DNA hasarı genomik instabiliteye yol açması ve uzun vadede taşıdığı sitotoksik ve mutajenik etkiler sebebiyle ayrıca önem taşımaktadır. Sklerodermada, oksidatif DNA hasarı ve bu hasarın olası klinik korelasyonları üzerine yapılmış olan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. İlk olarak, Palomino ve ark., comet assay yöntemini kullanarak SS hastalarında DNA hasarının arttığını göstermiştir (125). Ardından Avouac ve ark. DNA hasarının altın belirteci olan 8-OH-dG'ni ELISA yöntemi ile değerlendirmiş ve SS hastalarında bu belirtecin anlamlı artışını bildirmiştir (124). Bu tez çalışmasında ise, SS hastalarında oksidatif DNA hasarını hassasiyeti yüksek bir şekilde yansıtabilecek üç hasar ürünü (8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA) eş zamanlı bir şekilde ve

referans yöntem olan LC-MS/MS kullanılarak ilk kez ölçülmüştür. Bu çalışma, sklerodermada oksidatif DNA hasarının rolünün bu denli kapsamlı bir şekilde incelendiği ilk araştırma olarak bilimsel literatürde yerini alacaktır. Analizler sonucunda, sklerodermada üç DNA hasar ürününün de anlamlı düzeyde artışının gösterilmiş olmasının yanı sıra, oksidatif DNA hasarının sklerodermadaki organ tutulumları ile güçlü bir ilişkisinin olabileceği de ortaya konulmuştur. Organ tutulumu analizlerinde, akciğer ve eklem tutulumu olan SS hastalarının, bu bulgulara sahip olmayan hasta gruplarına göre daha yüksek düzeyde DNA hasarına maruz kaldığı gösterilmiştir. İAH'a sahip olan SS hastalarında 8-OH-dG düzeyi anlamlı oranda yüksek seyrederken, bu bulgu akciğer fibroz şiddetini yansıtan Warrick skoru ile 8-OH-dG düzeyi arasındaki anlamlı pozitif korelasyon ile desteklenmiştir. Ayrıca, %DLCO değeri 60'ın altında olan SS hastalarının bu değerin üstünde olan hastalara göre daha yüksek 8-OH-dG düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak, %DLCO değerini düşüren en önemli faktörlerden biri olarak tanımlanan PAH bulgusu olan hastalar (n=7) bu analizden dışlandığında 8-OH-dG yüksekliği anlamlılığını kaybetmiştir. Bu bulgu, PAH'ı olan hastaların az sayıda olması sebebiyle PAH pozitif-negatif gruplar arasında oksidatif DNA hasarı açısından anlamlı bir sonuç gösterilememiş olmasına rağmen, PAH bulgusunun oksidatif DNA hasarında bir artışa yol açabileceği şeklinde yorumlanabilmektedir. Bu çalışmada gösterilmiş olan oksidatif DNA hasarı ve akciğer tutulumu ilişkisini destekleyecek şekilde Avouac ve ark. da 8-OH-dG düzeyi ile akciğer fibrozu ve azalan DLCO/alveolar hacim arasında bir ilişki olabileceğini bildirmiştir (124).

Akciğer tutulumunun yanı sıra, bu tez çalışmasında artriti olan SS hastalarının olmayan hastalara göre anlamlı oranda artmış R-cdA düzeyine sahip olduklarının gösterilmiş olması eklem tutulumu ile oksidatif DNA hasarı arasında doğrusal bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir. Bu sonuç, 8-OH-dG ölçümlerine ek olarak, DNA'daki tandem lezyonların (S- ve R-cdA) kütle spektrometri tabanlı bir yöntemle değerlendirilmesinin, önemli klinik korelasyonları yansıtmak için büyük bir potansiyele sahip olabileceğini desteklemektedir. Bu nedenle, DNA hasar ürünlerinin referans yöntemlerle kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi, DNA zincir kırıklarını analiz eden (comet assay) veya yalnızca 8-OH-dG ölçümüne izin veren (ELISA)

yöntemlere göre de üstünlük sağlayacaktır. Akciğer ve eklem tutulumlarıyla oksidatif DNA hasarı arasındaki klinik korelasyonların yanı sıra, GİS tutulumu olan hastaların üç DNA hasar ürünü de GİS tutulumu olmayan hastalara göre yüksek seyretmekte olup hastaların neredeyse tamamının GİS tutulumu olması ve grupların orantılı dağılmaması sebebiyle istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır (Bkz. Tablo 10). Özet olarak, bu tez çalışması SS hastalarında üç farklı oksidatif DNA hasar ürününü LC-MS/MS yöntemi ile ölçerek sklerodermada oksidatif DNA hasarının rolünü detaylı bir şekilde incelemiş ve oksidatif DNA hasarı ile organ tutulumları arasındaki olası korelasyonları kapsamlıca değerlendirmiş olan ilk araştırmadır. Sonuçlar, sklerodermada artan oksidatif DNA hasarının yanı sıra, akciğer ve eklem tutulumu ile artan DNA hasarı arasında güçlü bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir.

Sklerodermada D vitamini eksikliği yaygın bir problem olarak tanımlanmaktadır (139). Hastalarda meydana gelen deri fibrozunun, deride UVB aracılığıyla D vitamini sentezini engellenmesinin ve GİS tutulumu nedeniyle D vitamini emiliminin azalmasının bu probleme katkı sağladığı düşünülmektedir (137). Birbirinden bağımsız yapılmış olan birçok çalışmada, SS hastalarında sağlıklı bireylere göre düşük D vitamini düzeyleri tespit edilmiş olup, D vitamininin bazı klinik bulgular ve skorlar ile güçlü negatif korelasyonlara sahip olduğu da gösterilmiştir (136,139,146). 554 SS hastası ve 321 sağlıklı birey ile yapılmış olan güncel bir meta-analizde, SS hastalarının anlamlı oranda düşük serum D vitamini düzeyine sahip olduğu gösterilmiştir (138). Daha önce yayımlanmış bulgularla uyumlu olarak bu çalışmada da SS hastalarında D vitamini düzeyi sağlıklı bireylere göre anlamlı oranda düşük bulunmuştur. Ayrıca, deri tutulum skoru olan mRSS ve akciğer tutulumunun şiddetini gösteren Warrick skoru ile D vitamini düzeyi arasında anlamlı bir negatif korelasyon tespit edilmiştir. Benzer şekilde, daha önceki çalışmalarda da, kutanöz doku fibrozu (mRSS) ve pulmoner tutulumun şiddeti D vitamini konsantrasyonu ile ters orantılı bulunmuştur (99,136). Ek olarak bu çalışmada, D vitamini eksikliğin artan oksidatif DNA hasarı ile ilişkisini destekleyecek nitelikte bir bulgu olarak başlangıç D vitamini düzeyi 10 ng/mL'den düşük olan hastalarda 10 ng/mL'den yüksek olan hastalara göre idrar 8-OH-dG konsantrasyonu anlamlı düzeyde yüksek tespit edilmiştir. Bu çalışmada, sklerodermada serum D vitamini düzeyinin yüksek çözünürlüklü kütle spektrometri

gibi hassasiyeti yüksek bir yöntem ile belirlenmiş olmasının yanı sıra tüm bu süreçlerde vitamin D reseptörünün olası rolü de incelenmiştir. Sonuçlar, sklerodermada VDR gen ekspresyonunun sağlıklı bireylere göre oldukça düşük düzeyde seyrettiğini göstermektedir. Bugüne kadar sklerodermada VDR gen ekspresyonunu değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. İlk olarak Zerr ve ark., SS hastalarının deri fibroblastlarında azalmış VDR ekspresyonunu göstermiş ve VDR ekspresyonunun baskılandığı deney hayvanı modelinde fibroblastların TGF- β 'ya karşı hassasiyetlerinin arttığını bildirmiştir (147). Ardından Koçak, sadece diffüz skleroderma hastalarının kan örneklerinde VDR gen ekspresyonunun azaldığını rapor etmiştir (148). Son olarak, Ge ve ark. skleroderma fare modelinden elde edilen keratinositlerde VDR ekspresyonunun düşük olduğunu göstermiş ve keratinositlerde azalan VDR ekspresyonunun skleroderma progresyonu ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir (149). Bu tez çalışmasında, SS hastalarının tam kan örneklerinden ekstrakte edilmiş olan mRNA örnekleri kullanılarak VDR ekspresyonu sistemik bir şekilde ve önceki çalışmalara göre daha büyük bir örneklemde değerlendirilmiş ve daha önce yayımlanmış verilerle uyumlu olarak sklerodermada anlamlı oranda azalmış VDR gen ekspresyonu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, SS hastalarının tam kan örneklerinden elde edilmiş olan mRNA örneklerinin kullanılmış olması, sklerodermada VDR eksikliğinin sistemik düzeyde olabileceğine işaret etmektedir. Ayrıca, bu çalışmada SS hastalarında VDR geninde bulunan dört farklı SNP (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) analiz edilmiş olup bu polimorfizmler açısından hastalar ve sağlıklı bireyler arasında anlamlı bir fark yakalanamamıştır. Daha önce, Mısırlı SS hastalarında VDR geninde bulunan rs7975232 ve rs731236 polimorfizmleri değerlendirilmiş ve hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (150). Bu bulgunun aksine, başka bir çalışmada rs7975232 polimorfizminin Çin Han popülasyonunda skleroderma hastalığı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (151). Bu çalışmada ise, VDR geninde bulunan dört polimorfizm Türk popülasyonunda bulunan skleroderma hastalarında ilk kez değerlendirilmiş olup rs2228570, rs1544410, rs7975232 ve rs731236 genotipleri açısından SS hastaları ve sağlıklı bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir (Bkz. Tablo 13).

Sklerodermada D vitamini eksikliği ve bu durumun klinik skorlarla ilişkisi birbirinden bağımsız birçok çalışmada gösterilmiştir. Bu bağlamda, D vitamininin immün sistem üzerindeki etkileri de göz önünde bulundurulduğunda D vitamini, sklerodermada rutin tedavi stratejilerine katkı sağlayan önemli faktörlerden biri olarak belirlenmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen skleroderma hastalarının sağlıklı bireylere göre anlamlı oranda düşük serum D vitamini düzeyine sahip olduğu UPLC-HRMS yöntemi ile gösterilmiştir. Ayrıca, çalışmanın klinik prospektif tasarımında, skleroderma hastalarına altı ay boyunca yoğun D vitamini replasmanı uygulanmış ve replasmanın ardından D vitaminin skleroderma hastalarında antioksidan etkisi oksidatif DNA hasarı parametrelerinin LC-MS/MS ile yeniden değerlendirilmesiyle araştırılmıştır. Sonuçlar, SS hastalarında D vitamini replasmanı sonrası üç DNA hasarı ürününün de düşme yönünde bir eğilim gösterdiğine işaret etmektedir (Bkz. Tablo 14). Replasmanın ardından düşme eğiliminde olan bu hasar ürünlerinden DNA hasarı değerlendirmelerinde altın belirteç olarak tanımlanan 8-OH-dG düzeyindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Sklerodermada D vitamini eksikliği yaygın bir problem olmasına ve rutin tedavi sürecinde replasman uygulanmasına rağmen, bugüne kadar D vitamininin antioksidan olarak etkilerini ve özellikle oksidatif DNA hasarını indirgemedeki rolünü araştırmayı hedeflemiş olan bir çalışma yapılmamıştır. Ancak, sklerodermada D vitamini replasmanının biyoyararlanımını araştırmayı hedeflemiş olan oldukça sınırlı sayıda çalışmada hastalara oral D vitamini uygulanmış ve uygulama sonrası serum D vitamini düzeyleri yeniden değerlendirilmiştir (152,153). Bu çalışmalarda, oral D vitamini replasmanının hastaların serum D vitamini düzeyine etkisi açısından çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca bilimsel literatürde, sklerodermada D vitamininin oksidatif makromolekül hasarı veya özellikle DNA hasarı üzerine olası etkilerini değerlendirmeye yönelik bir çalışma da bulunmamaktadır. Bununla birlikte, gebeler ve kolit, diyabet, polikistik over sendromu olan hastalar ile yapılan bağımsız çalışmalarda, D vitamini replasmanının CRP ve malondialdehit gibi bazı inflamasyon ve oksidatif stres ilişkili parametreleri azaltıcı yönde bir etkisi olabileceği ifade edilmiştir (154–158). Ayrıca, skleroderma patogenezinin bağımsız olarak D vitamininin özellikle VDR aracılığıyla bazı antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırarak antioksidan bir molekül özelliği gösterdiği bilinmektedir (15,159). Oksidatif DNA hasarı, sitotoksik ve mutajenik

etkileri sebebiyle uzun vadede kanserleşmeye kadar birçok patolojik duruma yol açabileceğinden, sklerodermada D vitamininin oksidatif DNA hasarını indirgemedeki potansiyelini göstermek ayrıca önem taşımaktadır. Ayrıca, replasman sonrası skleroderma hastalarında gözlenen VDR gen ekspresyonundaki anlamlı artış da D vitamininin oksidatif DNA hasarı üzerindeki antioksidatif etkisinin nükleer reseptörü aracılığıyla gerçekleşebiliyor olacağına işaret etmektedir. VDR'nin DNA üzerindeki spesifik dizilere bağlanarak bir transkripsiyon faktörü gibi davranabildiği ve yaklaşık 300 genin ifadesini doğrudan kontrol edebildiği gösterilmiş olmakta birlikte, bazı çalışmalar kontrol edilebilen bu gen listesine bir dizi antioksidan enzim genlerinin de dahil olduğunu ifade etmektedir (1,6,159).

Bu çalışmada ayrıca başlangıç D vitamini düzeyi 10 ng/mL'nin altında olup replasman sonrası D vitamini düzeyi 2.5 kattan fazla artmış olan hastalarda başlangıç D vitamini düzeyi 10 ng/mL'den yüksek olan ve replasman sonrası D vitamini düzeyi 2.5 kata kadar artmış olan hastalara göre DNA hasarının altın belirteci olan 8-OH-dG düzeyinin daha etkin bir düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuç, bazal D vitamini düzeyi dramatik seviyelerde seyreden skleroderma hastalarının etkin bir D vitamini replasmanı uygulanabildiği takdirde inflamatuvar süreçlerle de tetiklenen ve hastalığın patogenezinde önemli bir rol oynayan oksidatif stres aracılı hasarın indirgenmesinde D vitamininin önemli katkılar sunabileceğini desteklemektedir. Bu çalışmada, D vitamini replasmanı sonrası 8-OH-dG düzeyindeki düşüşün istatistiksel olarak anlamlı tespit edilmesi ancak S-cdA ve R-cdA düzeylerindeki azalışın anlamlılığa ulaşamamasının bu hasar ürünlerinin onarım yollarındaki farklılık ile açıklanabileceği düşünülmektedir. Oksidatif DNA hasarı ürünlerinden 8-OH-dG, baz eksizyon onarım yolağı (base excision repair; BER) ile onarılırken S-cdA ve R-cdA onarımında nükleotid eksizyon onarım (nucleotid excision repair; NER) mekanizmaları rol almaktadır (160–163). Skleroderma hastalarında D vitamini replasmanı sonrası tespit edilen 8-OH-dG düzeyindeki anlamlı düşüş, VDR'nin BER onarım yolağındaki enzimleri daha etkin bir şekilde kontrol ediyor olabileceğini düşündürmektedir. Bir diğer açıklama ise, 8-OH-dG'nin sıklıkla meydana gelen ve DNA'da en bol bulunan hasar ürünlerinden birisi olması sebebiyle daha etkili bir düşüş gösterebilmiş olduğudur. Tüm bunlar göz önüne alındığında, D vitamininin oksidatif

DNA hasarını indirgemedeki olası rolünü derinlemesine anlayabilmek için VDR-aracılı DNA onarım yolları da kapsamlı bir şekilde araştırılmalıdır. Özetle bu çalışmanın güçlü bir yönü, D vitamini öncesi ve sonrasında, 8-OH-dG'ye ek olarak DNA'daki tandem lezyonların da kütle spektrometri tabanlı bir yöntemle eşzamanlı olarak değerlendirilmesi ve oksidatif DNA hasarı ile klinik bulgular arasındaki korelasyonların kapsamlı bir şekilde aydınlatılmasıdır.

Bu çalışmanın güçlü yönlerinden bir diğeri, D vitamini replasmanının klinik yararlılığının organ tutulumu olan skleroderma hastalarında kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiş olmasıdır. Sadece akciğer veya sadece eklem tutulumu olan hastalar değerlendirildiğinde replasman sonrası DNA hasarı düşüşü açısından anlamlı bir sonuç yakalanamamıştır. Ancak İAH (akciğer) ve artriti (eklem) birlikte bulunduran hastalarda bu bulguları taşımayan hastalara göre D vitamini replasmanı sonrası 8-OH-dG düzeyinin anlamlı oranda düştüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, sadece GİS tutulumu olan hastaların olmayanlara göre replasman sonrası 8-OH-dG düzeyinde anlamlı bir azalma gösterilmiştir. İAH ve artrit pozitif gruplarda tekli organ tutulumları değerlendirildiğinde anlamlı bir sonuç elde edilemezken GİS tutulumunda anlamlı bir düşüş gösterilmesinin hastaların büyük bir kısmının GİS tutulumu olması, dolayısıyla sadece GİS pozitif olan hastaların yalnızca İAH + veya yalnızca artrit + olan gruplara göre daha fazla sayıda olmasıyla açıklanabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, D vitamini replasmanına altı aylık kısa bir süreçte yanıt verebilme potansiyeli sebebiyle GİS tutulum şiddetini belirleyen UCLA-GIT 2.0 anketi replasmanın altıncı ayında hastalara yeniden uygulanmış ve replasman sonrası UCLA-GIT 2.0 skorlarında istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir. Bu tez çalışması ile ilk kez, D vitamini replasmanının sklerodermada GİS tutulumunu azaltma potansiyeline sahip olduğu gösterilmiştir. Daha önce, sklerodermada GİS tutulumu ve emilim bozukluğunun oral D vitamini replasmanının biyoyararlanımını etkileyebileceği öne sürülmüştür (137). Bu bağlamda, bu tez çalışmasında uygulandığı gibi oral takviyeye ek olarak D vitamininin intramusküler replasmanı ile bu sorunun üstesinden gelinebileceği ve bu sayede, GİS tutulumunda potansiyel bir iyileşme ile oral D vitamini replasmanının daha verimli olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu analizlere ek olarak, UCLA-GIT 2.0 anketindeki “ishal” parametresinin sklerodermaya bağlı GİS

tutulumu dışında diğer birçok faktör tarafından etkilenebiliyor olması sebebiyle GİS tutulumu ile ilgili analizler ishal parametresi dışlanarak yeniden yapılmış ve elde edilen tüm sonuçlar doğrulanmıştır. Bu bulgular ışığında, D vitamini replasmanının organ tutulumu olan skleroderma hastalarında oksidatif DNA hasarını indirgeyici bir parametre olarak umut vaat ettiği ve bu bulguların daha ileri çalışmalarla desteklenmesi ile D vitamini replasmanının klinik uygulamalara oldukça değerli katkılar sunabileceği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Öncelikle, skleroderma nadir ve çok sistemli bir hastalıktır ve Türkiye’den bildirilen tek çalışmada SS prevalansı 150/milyon olarak rapor edilmiştir. DEÜ Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İmmünoloji ve Romatoloji Polikliniği Ege Bölgesi’nde bir “Skleroderma Merkezi” olarak hizmet vermesine karşın, çalışmanın D vitamini replasmanı bölümü için son 12 ayda D vitamini kullanmış hastaları dahil etmemek gibi dışlama kriterleri de oldukça fazla olduğundan geniş bir hasta örneklemine ulaşmak zor olmuştur. Bu çalışma gerekli güç analizleri doğrultusunda 50 SS hastası ile gerçekleştirilmiş olsa da daha büyük bir örnekleme oksidatif DNA hasarı ile klinik korelasyonların ve D vitamini replasmanı sonrası organ tutulumu bazında DNA hasarı düşüşünün daha açık bir şekilde ortaya konulabileceği düşünülmektedir. Örneğin, bu çalışmada D vitamini replasmanı sonrası oksidatif DNA hasarındaki azalma, yalnızca artrit ya da yalnızca İAH bulunduran skleroderma hastalarında grupların az sayıda birey barındırması sebebiyle anlamlılığa ulaşamamışken aynı zamanda artrit ve İAH bulunduran hasta grubunda bu bulguları bulundurmayan hastalara göre replasman sonrası anlamlı bir DNA hasarı düşüşü tespit edilmiştir. Bu nedenle, daha büyük örneklerde, sadece bir organ tutulumuna odaklanarak yapılacak ileri çalışmalarla D vitamininin oksidatif DNA hasarına etkilerinin kapsamlı bir şekilde ve spesifik bir organ bazında değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca, tüm dünyayı olduğu gibi Türkiye’yi de etkisi altına alan Covid-19 küresel salgını sebebiyle hasta örneklerinin toplanma aşamaları sekteye uğramış ve D vitamini replasmanını tamamlayan 10 hastaya ulaşılamamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, sklerodermada artan oksidatif DNA hasarı ilk kez üç hassas DNA hasarı ürünü referans yöntem olan HPLC-MS/MS ile ölçülerek gösterilmiştir. Ayrıca, artan oksidatif DNA hasarı ile akciğer ve eklem tutulumları arasında güçlü klinik korelasyonlar tespit edilmiştir. Sklerodermada düşük serum D vitamini düzeyi UPLC-HRMS gibi güvenilirliği yüksek bir yöntem ile belirlenmiş ve bazal D vitamini düzeyi düşük seyreden hastalarda oksidatif DNA hasarının anlamlı yüksek olduğunu gösterilmiştir. Ayrıca, bu çalışmada D vitamininin genomik yolağının ana elementi olan VDR de irdelenmiş olup hastalarda sistemik düzeyde düşük VDR gen ekspresyonu gösterilmiştir. Ancak, Türk popülasyonunda bulunan skleroderma hastaları ile sağlıklı bireyler arasına VDR geninde bulunan rs2228570, rs1544410, rs7975232 ve rs731236 tek nükleotid polimorfizmleri açısından anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Tüm bunlara ek olarak bu çalışma bilimsel literatürde, sklerodermada D vitamininin antioksidatif etkisini göstermek amacıyla kurgulanmış ilk klinik prospektif çalışma olarak yer almaktadır. Bu çalışma ile sklerodermada D vitamini replasmanı sonrasında DNA hasarının altın belirtici olan 8-OH-dG düzeyinde anlamlı bir düşüş gösterilmiştir. Ayrıca, bazal D vitamini düzeyi düşük seyredip etkin bir D vitamini replasmanı uygulanan skleroderma hastalarında oksidatif DNA hasarının indirgenebileceği gösterilmiştir. Organ tutulumları baz alınarak yapılan analizlerde ise, İAH ve artrit bulgularını taşıyan skleroderma hastalarının bu bulguları olmayan hastalara göre D vitamini replasmanı sonrası 8-OH-dG düzeyindeki düşüşün anlamlı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde, sadece GİS tutulumu olan hastalar olmayan hastalara göre replasman sonrası anlamlı düzeyde azalan 8-OH-dG düzeyi sergilemiştir. D vitamini replasmanının kısa vadede yanıt verebileceği bir klinik bulgu olarak değerlendirilen GİS tutulum şiddeti ise (UCLA GIT 2.0 anket skorlarına göre) replasman sonrası anlamlı bir düşüş göstermiştir. Bu kapsamda gerçekleştirilmiş ilk araştırma olan bu tez çalışması, klinik prospektif tasarımı ile D vitamininin oksidatif DNA hasarı üzerindeki dramatik etkilerinin gösterilmesi ile ayrıca önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın sonuçlarının desteklenmesi, D vitamini replasmanının oksidatif hasara etkileri üzerine klinik yararlanım açısından daha ileri verilerin elde edilmesi amacıyla bir dizi öneri aşağıda belirtilmiştir:

- Standardize kurallar doğrultusunda çok merkezli çalışmalar kurgulanıp sklerodermada oksidatif DNA hasarı ve bu hasarın klinik bulgular ile olası korelasyonları daha geniş örneklemelerde kapsamlıca incelenebilir.
- D vitamini replasmanının klinik açıdan önemli noktalarını vurgulamak amacıyla daha geniş örneklemelerde başlangıç D vitamini düzeylerine ve D vitamini artış miktarlarına göre daha fazla sayıda gruplar oluşturulup sklerodermada D vitamini replasmanının klinik yararlanımı üzerine değerli bulgular elde edilebilir.
- Daha geniş örneklemelerde tekli organ tutulumlarına odaklanacak şekilde gruplar oluşturularak D vitamini replasmanının spesifik bir organ tutulumu bazında oksidatif DNA hasarına etkisi değerlendirilebilir.
- D vitamini replasmanının oksidatif DNA hasarının yanı sıra, DNA onarım yolları üzerine olası etkileri incelenebilir.
- D vitamininin oksidatif makromolekül hasarı üzerine etkileri oksidatif protein, karbonhidrat ve lipit hasarlarını da içerecek şekilde daha kapsamlı bir şekilde araştırılabilir.
- D vitamini replasmanı altı aydan daha uzun bir süreçte sürdürülerek replasmanın GİS tutulum şiddeti dışında akciğer ve eklem gibi diğer organ tutulumlarına olası etkileri uzun vadede kapsamlı bir şekilde sıranabilir.

KAYNAKLAR

1. Hossein-nezhad A, Spira A, Holick MF. Influence of Vitamin D Status and Vitamin D3 Supplementation on Genome Wide Expression of White Blood Cells: A Randomized Double-Blind Clinical Trial. *PLoS One*. 2013;8(3).
2. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JBJ, Pols HAP, Van Leeuwen JPTM. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*. 2004 Sep 1;338(2):143–56.
3. Jaruga P, Dizdaroglu M. Identification and quantification of (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;397(1):48–52.
4. Erten Ş, Turgay M. Sistemik Sklerozda Oksidatif Stres. *ADÜ Tıp Fakültesi Derg*. 2012;13(3):37–41.
5. Christakos S, Ajibade D V, Dhawan P, Fechner AJ, Mady LJ. Vitamin D: metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am* [Internet]. 2010 Jun;39(2):243–53, table of contents.
6. Gil Á, Plaza-Diaz J, Mesa MD. Vitamin D: Classic and Novel Actions. *Ann Nutr Metab*. 2018;72(2):87–95.
7. Henry HL. Regulation of vitamin D metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;25(4):531–41.
8. Marcinowska-Suchowierska E, Kupisz-Urbanska M, Lukaszkiwicz J, Pludowski P, Jones G. Vitamin D Toxicity a clinical perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(SEP):1–7.
9. Vuolo L, Di Somma C, Faggiano A, Colao A. Vitamin D and cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3(APR):58.
10. Perwad F, Portale AA. Vitamin D metabolism in the kidney: regulation by phosphorus and fibroblast growth factor 23. *Mol Cell Endocrinol*. 2011 Dec 5;347(1–2):17–24.
11. Dal NE, İşlekel H. İmmünomodülatör ve Antioksidan Bir Molekül Olarak D Vitamini: D Vitamini Eksikliği ve Sistemik Skleroz İlişkisi. *Turkish J Immunol*. 2019;7(1):57–68.
12. Hii CS, Ferrante A. The Non-Genomic Actions of Vitamin D. *Nutrients*. 2016 Mar 2;8(3):135.
13. Haussler MR, Jurutka PW, Mizwicki M, Norman AW. Vitamin D receptor (VDR)-mediated actions of 1 α ,25(OH) $_2$ vitamin D $_3$: genomic and non-genomic mechanisms. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011 Aug;25(4):543–59.
14. Dal NE. Behçet hastalarında vitamin D reseptör gen polimorfizmleri ve vitamin D reseptör düzeyi. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2016.
15. Jain SK, Micinski D. Vitamin D upregulates glutamate cysteine ligase and glutathione reductase, and GSH formation, and decreases ROS and MCP-1 and IL-8 secretion in high-glucose exposed U937 monocytes. *Biochem Biophys Res Commun*.

2013 Jul 19;437(1):7–11.

16. Halsall JA, Osborne JE, Hutchinson PE, Pringle JH. In silico analysis of the 5' region of the Vitamin D receptor gene: Functional implications of evolutionary conservation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3–5):352–6.
17. Haussler MR, Whitfield GK, Kaneko I, Haussler CA, Hsieh D, Hsieh JC, et al. Molecular mechanisms of vitamin D action. *Calcif Tissue Int*. 2013;92(2):77–98.
18. Gene: VDR [Internet]. 2022 [Erişim tarihi: 4 Haziran 2022]. Erişim adresi: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Variation_Gene/Table?g=ENSG00000111424;r=12:47841537-47943048
19. Kumar-Neala VS, Suryadevara NC, Shinde VG, Pydi SS, Jain S, Jonnalagada S, et al. Association of Taq I, Fok I and Apa I polymorphisms in Vitamin D Receptor (VDR) gene with leprosy. *Hum Immunol*. 2015;76(6):402–5.
20. Osman E, Al Anouti F, El ghazali G, Haq A, Mirgani R, Al Safar H. Frequency of rs731236 (TaqI), rs2228570 (FokI) of Vitamin-D Receptor (VDR) gene in Emirati healthy population. *Meta Gene*. 2015;6:49–52.
21. Dal NE, Cerci P, Olmez U, Keskin G. The role of vitamin D receptor gene polymorphisms in the pathogenesis of Behçet's disease: A case-control study in Turkish population. *Ann Hum Genet*. 2019;83(3):177–86.
22. Arai H, Miyamoto K, Taketani Y, Yamamoto H, Iemori Y, Morita K, et al. A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Min Res*. 1997;12(6):915–21.
23. Ogunkolade BW, Boucher BJ, Prah JM, Bustin S a, Burrin JM, Noonan K, et al. Vitamin D receptor (VDR) mRNA and VDR protein levels in relation to vitamin D status, insulin secretory capacity, and VDR genotype in Bangladeshi Asians. *Diabetes*. 2002;51(7):2294–300.
24. Selvaraj P, Prabhu Anand S, Harishankar M, Alagarasu K. Plasma 1,25 dihydroxy vitamin D3 level and expression of vitamin D receptor and cathelicidin in pulmonary tuberculosis. *J Clin Immunol*. 2009;29(4):470–8.
25. Berridge MJ. Vitamin D cell signalling in health and disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Apr 24;460(1):53–71.
26. Grygiel-Górniak B, Puszczewicz M. Oxidative damage and antioxidative therapy in systemic sclerosis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:389582.
27. Sharifi-Rad M, Anil Kumar N V., Zucca P, Varoni EM, Dini L, Panzarini E, et al. Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases. *Front Physiol*. 2020;11(July):1–21.
28. Mahajan L, Verma PK, Raina R, Pankaj NK, Sood S, Singh M. Alteration in thiols homeostasis, protein and lipid peroxidation in renal tissue following subacute oral exposure of imidacloprid and arsenic in Wistar rats. *Toxicol Reports*. 2018;5(August):1114–9.
29. Oke GO, Abiodun AA, Imafidon CE, Monsi BF. *Zingiber officinale*

(Roscoe)mitigates CCl₄-induced liver histopathology and biochemical derangements through antioxidant, membrane-stabilizing and tissue-regenerating potentials. *Toxicol Reports*. 2019;6(May):416–25.

30. Ściskalska M, Zalewska M, Grzelak A, Milnerowicz H. The influence of the occupational exposure to heavy metals and tobacco smoke on the selected oxidative stress markers in smelters. *Biol Trace Elem Res*. 2014;159(1–3):59–68.

31. Spitz DR, Azzam EI, Li JJ, Gius D. Metabolic oxidation/reduction reactions and cellular responses to ionizing radiation: A unifying concept in stress response biology. *Cancer Metastasis Rev*. 2004;23(3–4):311–22.

32. Marchitti SA, Chen Y, Thompson DC, Vasiliou V. Ultraviolet radiation: Cellular antioxidant response and the role of ocular aldehyde dehydrogenase enzymes. *Eye Contact Lens*. 2011;37(4):206–13.

33. Rodriguez R, Redman R. Balancing the generation and elimination of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(9):3175–6.

34. Hu N, Ren J. Reactive oxygen species regulate myocardial mitochondria through post-translational modification. *React Oxyg Species*. 2016;2(4):264–71.

35. Finkel T. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(2):247–54.

36. Bartosz G. Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem Pharmacol*. 2009;77(8):1303–15.

37. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(1):44–84.

38. Curi R, Newsholme P, Marzuca-Nassr GN, Takahashi HK, Hirabara SM, Cruzat V, et al. Regulatory principles in metabolism -Then and now. *Biochem J*. 2016;473(13):1845–57.

39. Daffu G, del Pozo CH, O'Shea KM, Ananthakrishnan R, Ramasamy R, Schmidt AM. Radical roles for RAGE in the pathogenesis of oxidative stress in cardiovascular diseases and beyond. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 1;14(10):19891–910.

40. Sies H. Oxidative stress: A concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180–3.

41. Davies MJ. Protein oxidation and peroxidation. *Biochem J*. 2016;473(7):805–25.

42. Butterfield DA, Perluigi M, Reed T, Muharib T, Hughes CP, Robinson RAS, et al. Redox proteomics in selected neurodegenerative disorders: From its infancy to future applications. *Antioxidants Redox Signal*. 2012;17(11):1610–55.

43. Hawkins CL, Davies MJ. Generation and propagation of radical reactions on proteins. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2001;1504(2–3):196–219.

44. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. *J Biol Chem*. 2019;294(51):19683–708.

45. Schuchmann MN, Scholes ML, Zegota H, Von Sonntag C. Reaction of hydroxyl radicals with alkyl phosphates and the oxidation of phosphatoalkyl radicals by nitro compounds. *Int J Radiat Biol.* 1995;68(2):121–31.
46. Von Sonntag C. Carbohydrate radicals: From ethylene glycol to DNA strand breakage. *Int J Radiat Biol.* 2014;90(6):416–22.
47. d'Ischia M, Manini P, Napolitano A. Oxidative damage to carbohydrates and amino acids. *Oxidative Stress Dis Cancer.* 2006;333–56.
48. Albrich JM, McCarthy CA, Hurst JK. Biological reactivity of hypochlorous acid: Implications for microbicidal mechanisms of leukocyte myeloperoxidase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(1 II):210–4.
49. Yin H, Xu L, Porter NA. Free radical lipid peroxidation: Mechanisms and analysis. *Chem Rev.* 2011;111(10):5944–72.
50. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:1–34.
51. Reis A, Spickett CM. Chemistry of phospholipid oxidation. *Biochim Biophys.* 2012;1818(10):2374–87.
52. Fruhwirth GO, Loidl A, Hermetter A. Oxidized phospholipids: From molecular properties to disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2007;1772(7):718–36.
53. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev.* 2005;31(8):603–17.
54. Broedbaek K, Weimann A, Stovgaard ES, Poulsen HE. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(8):1473–9.
55. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Lett.* 2012;327(1–2):26–47.
56. Kasai H, Hayami H, Yamaizumi Z, Saito H, Nishimura S. Detection and identification of mutagens and carcinogens as their adducts with guanosine derivatives. *Nucleic Acids Res.* 1984;12(4):2127–36.
57. Kasai H. Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: Formation, repair, and mutagenesis. *Free Radic Biol Med.* 2002;33(4):450–6.
58. Lunec J, Holloway K, Cooke M, Faux S, Griffiths H, Evans M. Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine: Redox regulation of DNA repair in vivo? *Science.* 2002;33(7):875–85.
59. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem.* 1992;267(1):166–72.
60. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci*

Heal - Part C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2009;27(2):120–39.

61. European Standards Committee on Oxidative DNA Damage. Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). *Free Radic Biol Med*. 2000;32(4):333–41.
62. Pullman B, Pullman A. Submolecular structure of the nucleic acids. *Nature*. 1961;189:725–7.
63. Fuciarelli AF, Mele FG, Raleigh JA. Interaction of nitroaromatic radiosensitizers with irradiated polyadenylic acid as measured by an indirect immunochemical assay with specificity for the 8,5'-cycloadenosine moiety. *Int J Radiat Biol*. 1987;51(4):629–39.
64. Dirksen ML, Blakely WF, Holwitt E, Dizdaroglu M. Effect of DNA conformation on the hydroxyl radical-induced formation of 8,5'-cyclopurine 2'-deoxyribonucleoside residues in DNA. *Int J Radiat Biol*. 1988;54(2):195–204.
65. Brooks PJ, Wise DS, Berry DA, Kosmoski J V., Smerdon MJ, Somers RL, et al. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *J Biol Chem*. 2000;275(29):22355–62.
66. Kuraoka I, Bender C, Romieu A, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):3832–7.
67. Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, et al. Oxygen free radical damage to DNA: Translesion synthesis by human DNA polymerase η and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *J Biol Chem*. 2001;276(52):49283–8.
68. Marietta C, Brooks PJ. Transcriptional bypass of bulky DNA lesions causes new mutant RNA transcripts in human cells. *EMBO Rep*. 2007;8(4):388–93.
69. Nospikel T, Hanawalt PC. When parsimony backfires: Neglecting DNA repair may doom neurons in Alzheimer's disease. *BioEssays*. 2003;25(2):168–73.
70. Jaruga P, Dizdaroglu M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair (Amst)*. 2008;7(9):1413–25.
71. Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, et al. Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J*. 2012 Dec;33(23):2980–90.
72. Briones TL, Darwish H. Decrease in age-related tau hyperphosphorylation and cognitive improvement following vitamin D supplementation are associated with modulation of brain energy metabolism and redox state. *Neuroscience*. 2014 Mar 14;262:143–55.
73. Wasserman RH. Vitamin D and the dual processes of intestinal calcium absorption. *J Nutr*. 2004 Nov;134(11):3137–9.

74. Pérez A V., Picotto G, Carpentieri AR, Rivoira MA, Peralta López ME, Tolosa De Talamoni NG. Minireview on regulation of intestinal calcium absorption: Emphasis on molecular mechanisms of transcellular pathway. *Digestion*. 2008;77(1):22–34.
75. Alexianu ME, Robbins E, Carswell S, Appel SH. 1 α , 25 dihydroxyvitamin D3-dependent up-regulation of calcium-binding proteins in motoneuron cells. *J Neurosci Res*. 1998 Jan 1;51(1):58–66.
76. de Viragh PA, Haglid KG, Celio MR. Parvalbumin increases in the caudate putamen of rats with vitamin D hypervitaminosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1989 May;86(10):3887–90.
77. Bhalla AK, Amento EP, Clemens TL, Holick MF, Krane SM. Specific high-affinity receptors for 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983;57(6):1308–10.
78. Morgan JW, Kouttab N, Ford D, Maizel AL. Vitamin D-mediated gene regulation in phenotypically defined human B cell subpopulations. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3225–34.
79. Kongsbak M, von Essen MR, Levring TB, Schjerling P, Woetmann A, Ødum N, et al. Vitamin D-binding protein controls T cell responses to vitamin D. *BMC Immunol*. 2014 Sep 18;15(35):1-13.
80. Jeffery LE, Wood AM, Qureshi OS, Hou TZ, Gardner D, Briggs Z, et al. Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses. *J Immunol*. 2012 Dec 1;189(11):5155–64.
81. Heine G, Niesner U, Chang H-D, Steinmeyer A, Zügel U, Zuberbier T, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) promotes IL-10 production in human B cells. *Eur J Immunol*. 2008 Aug;38(8):2210–8.
82. Williams CJB. On the Use and Administration of Cod-Liver Oil in Pulmonary Consumption. *Am J Med Sci*. 1849;2(1):1–2.
83. Rook G. Vitamin D and tuberculosis. *Tubercle*. 1986;67(1986):155–8.
84. Andress D. Nonclassical aspects of differential vitamin D receptor activation: Implications for survival in patients with chronic kidney disease. *Drugs*. 2007;67(14):1999–2012.
85. Gordon YJ, Huang LC, Romanowski EG, Yates KA, Proske RJ, McDermott AM. Human cathelicidin (LL-37), a multifunctional peptide, is expressed by ocular surface epithelia and has potent antibacterial and antiviral activity. *Curr Eye Res*. 2005;30(5):385–94.
86. Wang T-T, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting Edge: 1,25-Dihydroxyvitamin D 3 Is a Direct Inducer of Antimicrobial Peptide Gene Expression . *J Immunol*. 2004;173(5):2909–12.
87. Chen J, Bruce D, Cantorna MT. Vitamin D receptor expression controls proliferation of naïve CD8⁺ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal

inflammation. *BMC Immunol.* 2014 Feb 7;15(6):1-11.

88. Lysandropoulos AP, Jaquiéry E, Jilek S, Pantaleo G, Schlupe M, Du Pasquier RA. Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *J Neuroimmunol.* 2011 Apr;233(1-2):240-4.

89. Joshi S, Pantaleo L-C, Liu XK, Gaffen SL, Liu H, Rohowsky-Kochan C, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D(3) ameliorates Th17 autoimmunity via transcriptional modulation of interleukin-17A. *Mol Cell Biol.* 2011 Sep;31(17):3653-69.

90. van Hamburg JP, Asmawidjaja PS, Davelaar N, Mus AMC, Cornelissen F, van Leeuwen JPTM, et al. TNF blockade requires 1,25(OH)2D3 to control human Th17-mediated synovial inflammation. *Ann Rheum Dis.* 2012 Apr;71(4):606-12.

91. Palmer MT, Lee YK, Maynard CL, Oliver JR, Bikle DD, Jetten AM, et al. Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells. *J Biol Chem.* 2011 Jan 14;286(2):997-1004.

92. Tian Y, Wang C, Ye Z, Xiao X, Kijlstra A, Yang P. Effect of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th17 and Th1 response in patients with Behçet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 Sep 21;53(10):6434-41.

93. Pichler J, Gerstmayr M, Szépfalusi Z, Urbanek R, Peterlik M, Willheim M. 1 alpha,25(OH)2D3 inhibits not only Th1 but also Th2 differentiation in human cord blood T cells. *Pediatr Res.* 2002 Jul;52(1):12-8.

94. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol.* 2001 Nov 1;167(9):4974-80.

95. Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE. Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol.* 2007 Aug 1;179(3):1634-47.

96. Neve A, Corrado A, Cantatore FP. Immunomodulatory effects of vitamin D in peripheral blood monocyte-derived macrophages from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Med.* 2014 Aug;14(3):275-83.

97. Zhang X, Zhou M, Guo Y, Song Z, Liu B. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ Promotes High Glucose-Induced M1 Macrophage Switching to M2 via the VDR-PPAR γ Signaling Pathway. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1-14.

98. Dankers W, Colin EM, van Hamburg JP, Lubberts E. Vitamin D in Autoimmunity: Molecular Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol.* 2017;7:1-26.

99. Arnson Y, Amital H, Agmon-Levin N, Alon D, Sánchez-Castañón M, López-Hoyos M, et al. Serum 25-OH vitamin D concentrations are linked with various clinical aspects in patients with systemic sclerosis: a retrospective cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev.* 2011;10(8):490-4.

100. Dong J-Y, Zhang W-G, Chen JJ, Zhang Z-L, Han S-F, Qin L-Q. Vitamin D intake and risk of type 1 diabetes: a meta-analysis of observational studies. *Nutrients.* 2013; 5(9):3551-62.

101. Shen L, Zhuang Q-S, Ji H-F. Assessment of vitamin D levels in type 1 and type 2 diabetes patients: Results from metaanalysis. *Mol Nutr Food Res*. 2016;60(5):1059–67.
102. Van Den Hoogen F, Khanna D, Fransen J, Johnson SR, Baron M, Tyndall A, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: An american college of rheumatology/European league against rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2013;65(11):2737–47.
103. Hua-Huy T, Dinh-Xuan AT. Cellular and molecular mechanisms in the pathophysiology of systemic sclerosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2015;63(2):61–8.
104. PAMUK ÖN. Sistemik Sklerozun Epidemiyolojisi. *Türkiye Klin J Rheumatol Spec Top*. 2015;8(2):7–13.
105. Eckes B, Moinzadeh P, Sengle G, Hunzelmann N, Krieg T. Molecular and cellular basis of scleroderma. *J Mol Med (Berl)* [Internet]. 2014 Sep;92(9):913–24.
106. Jimenez S a, Derk CT. Following the molecular pathways toward an understanding of the pathogenesis of systemic sclerosis. *Ann Intern Med*. 2004 Jan 6;140(1):37–50.
107. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, Southcott AM, Black CM, du Bois RM, et al. Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1994 Oct;11(4):439–45.
108. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, Holmes AM, Bou-Gharios G, Pearson JD, et al. Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol*. 2001 Mar;116(3):417–25.
109. Geyer M, Müller-Ladner U. The pathogenesis of systemic sclerosis revisited. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2011 Apr;40(2):92–103.
110. Higashi-Kuwata N, Jinnin M, Makino T, Fukushima S, Inoue Y, Muchemwa FC, et al. Characterization of monocyte/macrophage subsets in the skin and peripheral blood derived from patients with systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*. 2010;12(4):1–10.
111. Ronda N, Raschi E, Testoni C, Borghi MO, Gatti R, Dayer JM, et al. Anti-fibroblast antibodies in systemic sclerosis. *Isr Med Assoc J*. 2002;4(11 Suppl):858–64.
112. Kawakami T, Ihn H, Xu W, Smith E, LeRoy C, Trojanowska M. Increased expression of TGF-beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signaling to scleroderma phenotype. *J Invest Dermatol*. 1998;110(1):47–51.
113. Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, et al. Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res*. 2000;259(1):213–24.
114. Murrell DF. A radical proposal for the pathogenesis of scleroderma. *J Am Acad Dermatol*. 1993;28(1):78–85.

115. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Amico D. New insights into the role of oxidative stress in scleroderma fibrosis. *Open Rheumatol J*. 2012;6(1):87–95.
116. Luo J-Y, Liu X, Jiang M, Zhao H-P, Zhao J-J. Oxidative stress markers in blood in systemic sclerosis: A meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2017;27(2):306–14.
117. Piera-Velazquez S, Jimenez SA. Role of cellular senescence and NOX4-mediated oxidative stress in systemic sclerosis pathogenesis. *Curr Rheumatol Rep*. 2015;17(1):473.
118. Hecker L, Vittal R, Jones T, Jagirdar R, Luckhardt TR, Horowitz JC, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury. *Nat Med*. 2009;15(9):1077–81.
119. Datla SR, Peshavariya H, Disting GJ, Mahadev K, Goldstein BJ, Jiang F. Important role of Nox4 type NADPH oxidase in angiogenic responses in human microvascular endothelial cells in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27(11):2319–24.
120. An SJ, Boyd R, Zhu M, Chapman A, Pimentel DR, Wang H Di. NADPH oxidase mediates angiotensin II-induced endothelin-1 expression in vascular adventitial fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75(4):702–9.
121. Duerschmidt N, Wippich N, Goettsch W, Broemme HJ, Morawietz H. Endothelin-1 induces NAD(P)H oxidase in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269(3):713–7.
122. Distler A, Ziemer C, Beyer C, Lin N-Y, Chen C-W, Palumbo-Zerr K, et al. Inactivation of evenness interrupted (EVI) reduces experimental fibrosis by combined inhibition of canonical and non-canonical Wnt signalling. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):624–7.
123. Freund A, Orjalo A V, Desprez P-Y, Campisi J. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med*. 2010;16(5):238–46.
124. Avouac J, Borderie D, Ekindjian OG, Kahan A, Allanore Y. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis. *J Rheumatol*. 2010;37(12):2540–7.
125. Martelli Palomino G, Bassi CL, Wastowski IJ, Xavier DJ, Lucisano-Valim YM, Crispim JCO, et al. Patients with systemic sclerosis present increased DNA damage differentially associated with DNA repair gene polymorphisms. *J Rheumatol*. 2014;41(3):458–65.
126. Penna G, Roncari A, Amuchastegui S, Daniel KC, Berti E, Colonna M, et al. Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Blood*. 2005;106(10):3490–7.
127. Lemire JM, Archer DC. 1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 1991;87(3):1103–7.
128. Simpson S, Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2011;82(10):1132–41.

129. Zipitis CS, Akobeng AK. Vitamin D supplementation in early childhood and risk of type 1 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child*. 2008;93(6):512–7.
130. Duan S, Lv Z, Fan X, Wang L, Han F, Wang H, et al. Vitamin D status and the risk of multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Lett*. 2014;570:108–13.
131. Lin J, Liu J, Davies ML, Chen W. Serum Vitamin D Level and Rheumatoid Arthritis Disease Activity: Review and Meta-Analysis. Jiang Y, editor. *PLoS One*. 2016;11(1):1-17.
132. Del Pinto R, Pietropaoli D, Chandar AK, Ferri C, Cominelli F. Association Between Inflammatory Bowel Disease and Vitamin D Deficiency: A Systematic Review and Meta-analysis. *Inflamm Bowel Dis*. 2015;21(11):2708–17.
133. Lu C, Yang J, Yu W, Li D, Xiang Z, Lin Y, et al. Association between 25(OH)D Level, Ultraviolet Exposure, Geographical Location, and Inflammatory Bowel Disease Activity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015;10(7):1-16.
134. Sadeghian M, Saneei P, Siassi F, Esmailzadeh A. Vitamin D status in relation to Crohn's disease: Meta-analysis of observational studies. *Nutrition*. 2016;32(5):505–14.
135. Hiraki LT, Arkema E V., Cui J, Malspeis S, Costenbader KH, Karlson EW. Circulating 25-hydroxyvitamin D level and risk of developing rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2014;53(12):2243–8.
136. Groseanu L, Bojinca V, Gudu T, Saulescu I, Predeteanu D, Balanescu A, et al. Low vitamin D status in systemic sclerosis and the impact on disease phenotype. *Eur J Rheumatol*. 2016;3(2):50–5.
137. Sampaio-Barros MM, Takayama L, Sampaio-Barros PD, Bonfá E, Pereira RMR. Low vitamin D serum levels in diffuse systemic sclerosis: a correlation with worst quality of life and severe capillaroscopic findings. *Rev Bras Reumatol*. 2016;56(4):337–44.
138. An L, Sun M-H, Chen F, Li J-R. Vitamin D levels in systemic sclerosis patients: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther*. 2017;11:3119–25.
139. Vacca A, Cormier C, Mathieu A, Kahan A, Allanore Y. Vitamin D levels and potential impact in systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2011;29(6):1024–31.
140. Artaza JN, Norris KC. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol*. 2009;200(2):207–21.
141. Galiè N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2015;46(4):903–75.
142. JH Warrick, M Bhalla, SI Schabel RS. High resolution computed tomography in early scleroderma lung disease. *J Rheumatol*. 1991;18(10):1520–8.

143. Kant M, Akış M, Çalan M, Arkan T, Bayraktar F, Dizdaroglu M, et al. Elevated urinary levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, (5'R)- and (5'S)-8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines, and 8-iso-prostaglandin F_{2α} as potential biomarkers of oxidative stress in patients with prediabetes. *DNA Repair (Amst)*. 2016;48:1–7.
144. FDA Office of Regulatory Affairs. Methods, Method Verification and Validation. *ORA Lab Man*. 2020;II:1–19.
145. Gabrielli A, Svegliati S, Moroncini G, Pomponio G, Santillo M, Avvedimento E V. Oxidative stress and the pathogenesis of scleroderma: the Murrell's hypothesis revisited. *Semin Immunopathol*. 2008;30(3):329–37.
146. Zhang L, Duan Y, Zhang T-P, Huang X-L, Li B-Z, Ye D-Q, et al. Association between the serum level of vitamin D and systemic sclerosis in a Chinese population: a case control study. *Int J Rheum Dis*. 2017;20(8):1002–8.
147. Zerr P, Vollath S, Palumbo-Zerr K, Tomcik M, Huang J, Distler A, et al. Vitamin D receptor regulates TGF-β signalling in systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis*. 2014;74:1–8.
148. Kocak A. Vitamin D and Vitamin D Receptor in Scleroderma Subtypes. *J Adv Med Med Res*. 2020;32(20):19–24.
149. Ge Y, Luo J, Li D, Li C, Huang J, Yu H, et al. Deficiency of vitamin D receptor in keratinocytes augments dermal fibrosis and inflammation in a mouse model of HOCl-induced scleroderma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;591:1–6.
150. Kamal A, Gamal SM, Elgengehy FT, Alkema AK, Siam I. Association of VDR ApaI and TaqI Gene Polymorphisms with the Risk of Scleroderma and Behçet's Disease. *Immunol Invest*. 2016;45(6):531–42.
151. Li J, Chen SY, Liu HH, Yin XD, Cao LT, Xu JH, et al. Associations of Vitamin D Receptor Single Nucleotide Polymorphisms with Susceptibility to Systemic Sclerosis. *Arch Med Res*. 2019;50(6):368–76.
152. Giuggioli D, Colaci M, Cassone G, Fallahi P, Lumetti F, Spinella A, et al. Serum 25-OH vitamin D levels in systemic sclerosis: analysis of 140 patients and review of the literature. *Clin Rheumatol*. 2017;36(3):583–90.
153. Trombetta AC, Smith V, Gotelli E, Ghio M, Paolino S, Pizzorni C, et al. Vitamin D deficiency and clinical correlations in systemic sclerosis patients: A retrospective analysis for possible future developments. *PLoS One*. 2017;12(6):1–13.
154. Mansournia MA, Ostadmohammadi V, Doosti-Irani A, Ghayour-Mobarhan M, Ferns G, Akbari H, et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018;50(50):429–40.
155. Akbari M, Ostadmohammadi V, Lankarani KB, Tabrizi R, Kolahdooz F, Heydari ST, et al. The Effects of Vitamin D Supplementation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress among Women with Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Horm Metab Res*. 2018;50(4):271–9.

156. Garcia PM, Moore J, Kahan D, Hong MY. Effects of Vitamin D supplementation on inflammation, colonic cell kinetics, and microbiota in colitis: A review. *Molecules*. 2020;25(10):1–24.
157. Cojic M, Kocic R, Klisic A, Kocic G. The Effects of Vitamin D Supplementation on Metabolic and Oxidative Stress Markers in Patients With Type 2 Diabetes: A 6-Month Follow Up Randomized Controlled Study. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12(August):1–10.
158. Jamilian M, Mirhosseini N, Eslahi M, Bahmani F, Shokrpour M, Chamani M, et al. The effects of magnesium-zinc-calcium-vitamin D co-supplementation on biomarkers of inflammation, oxidative stress and pregnancy outcomes in gestational diabetes. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2019;19(1):1–8.
159. Bao BY, Ting HJ, Hsu JW, Lee YF. Protective role of 1α , 25-dihydroxyvitamin D3 against oxidative stress in nonmalignant human prostate epithelial cells. *Int J Cancer*. 2008;122(12):2699–706.
160. Liu D, Croteau DL, Souza-Pinto N, Pitta M, Tian J, Wu C, et al. Evidence that OGG1 glycosylase protects neurons against oxidative DNA damage and cell death under ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011;31(2):680–92.
161. Shimizu Y, Uchimura Y, Dohmae N, Saitoh H, Hanaoka F, Sugasawa K. Stimulation of DNA glycosylase activities by XPC protein complex: Roles of protein-protein interactions. *J Nucleic Acids*. 2010;2010:1–10.
162. Lee TH, Kang TH. DNA oxidation and excision repair pathways. *Int J Mol Sci*. 2019;20(23):1–13.
163. Pulzová LB, Ward TA, Chovanec M. XPA: DNA repair protein of significant clinical importance. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):1–29.

EKLER

EK-1: UCLA-GIT 2.0 anket örneği (Türkçe'ye uyarlanmış ve valide edilmiş versiyondur.)

UCLA SCTC GIT 2.0
ANKETİ

CORRESPONDENCE TO:
Dinesh Khanna, MD, MSc
Professor of Medicine
Frederick G. I. Huetwell Professor of Rheumatology
Director, University of Michigan Scleroderma Program
Division of Rheumatology/Dept. of Internal Medicine
Suite 7C27

© Dinesh Khanna, MD, MSc
Turkish for Turkey
UCLA SCTC GIT 2.0

KİMLİK BİLGİSİ

Tarih:

Aşağıdaki sorular sindirim sistemi (bağırsak, sindirim yolu) belirtileriniz ve bu belirtilerin yaşamınızı geçen 7 gün içerisinde nasıl etkilediği ile ilgilidir. Her soruyu, verilen cevap şıklarından uygun olanı işaretleyerek cevaplayın. Bir soruyu nasıl cevaplayacağınızdan emin değilseniz, lütfen verebileceğiniz en iyi cevabı verin.

Geçen 1 hafta içinde, hangi sıklıkla ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)				1/8= 0.125 2/8= 0.25 3/8= 0.375 4/8= 0.5 5/8= 0.625 6/8= 0.75 7/8= 0.875 8/8= 1.0 9/8= 1.125 10/8= 1.25 11/8= 1.375 12/8= 1.5 13/8= 1.625 14/8= 1.75 15/8= 1.875 16/8= 2.0 17/8= 2.125 18/8= 2.25 19/8= 2.375 20/8= 2.5 21/8= 2.625 22/8= 2.75 23/8= 2.875 24/8= 3.0
		Hiç ⁰	1-2 Gün ¹	3-4 Gün ²	5-7 Gün ³	
REFLÜ	1. ... katı yiyecekleri yutmakta zorluk çektiniz?	☐	☐	☐	☒	
	2. ... göğsünüzde hoş olmayan batma veya yanma hissi (mide ekşimesi) yaşadınız?	☐	☐	☒	☐	
	3. ... midenizden ağzınıza doğru acı veya ekşi su (reflü) geldiğini hissettiniz?	☐	☐	☐	☒	
	4. ... turşu ve portakal gibi "asitli" yiyeceklerden sonra mide ekşimeniz oldu?	☒	☐	☐	☐	
	5. ... yedikleriniz geri geldi (önceden yenen bir miktar yiyeceği istifra ettiniz veya geri çıkardınız)?	☐	☐	☐	☒	
	6. ... başınız ve omuzlarınız dik durumda veya ayakları öne uzatmış oturur pozisyonda uyudunuz?	☒	☐	☐	☐	
	7. ... kusacak veya istifra edecek gibi hissettiniz?	☒	☐	☐	☐	
	8. ... kustunuz veya istifra ettiniz?	☒	☐	☐	☐	
ŞİŞKİNLİK	9. ... şişkinlik (midede gaz veya hava hissi) hissettiniz?	☐	☒	☐	☐	
	10. ... göbeğinizde, zaman zaman kemerinizi, pantolonunuzu veya gömleğinizi gevşetmenizi gerektiren bir büyüme fark ettiniz?	☐	☒	☐	☐	
	11. ... az miktarda yemek yedikten sonra doyduğunuzu hissettiniz?	☒	☐	☐	☐	
	12. ... barsaklardan aşırı gaz çıkardınız?	☐	☐	☐	☒	
ALTINA DIŞKI KAÇIRMAK	13. ... tuvalete yetişmeden kazara iç çamaşırlarınızı (dışkı ile) kirlettiniz?	☒	☐	☐	☐	1/1= 1.0 2/1= 2.0 3/1= 3.0 SCORE S=

© Dinesh Khanna, MD, MSc

2

Turkish for Turkey

UCLA SCTC GIT 2.0

Geçen 1 hafta içinde, hangi sıklıkla ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)			
		Hiç ⁰	1-2 Gün ¹	3-4 Gün ²	5-7 Gün ³
14.	... amel (ishal) oldunuz?	☒	☐	☐	☐
Geçen 1 hafta içinde, dışkınızın ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)			
		Evet ¹	Hayır ⁰		
15.	... sulu olduğunu fark ettiniz mi?	☐	☒		

1/2= 0.5
2/2= 1.0
3/2= 1.5
4/2= 2.0
SCORE D=

Aşağıdakiler son 1 hafta içerisinde hangi sıklıkla sosyal faaliyetlerinize engel oldu (arkadaşlarınızı veya akrabalarınızı ziyaret etmek gibi)?		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)			
		Hiç ⁰	1-2 Gün ¹	3-4 Gün ²	5-7 Gün ³
16.	... Bulantı	☒	☐	☐	☐
17.	... Kusma	☒	☐	☐	☐
18.	... Mide veya karın ağrısı	☒	☐	☐	☐
19.	... İshal	☒	☐	☐	☐
20.	... Kazara iç çamaşırınızı kirletme endişesi	☒	☐	☐	☐
21.	... Şişkinlik hissi	☒	☐	☐	☐

1/6= 0.16
2/6= 0.33
3/6= 0.5
4/6= 0.66
5/6= 0.83
6/6= 1.0
7/6= 1.16
8/6= 1.33
9/6= 1.5
10/6= 1.66
11/6= 1.83
12/6= 2.0
13/6= 2.16
14/6= 2.33
15/6= 2.5
16/6= 2.66
17/6= 2.83
18/6= 3.0
SCORE SF=

Geçen 1 hafta içinde, hangi sıklıkla ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)				1/9= 0.11 2/9= 0.22 3/9= 0.33 4/9= 0.44 5/9= 0.55 6/9= 0.66 7/9= 0.77 8/9= 0.88 9/9= 1.0 10/9= 1.11 11/9= 1.22 12/9= 1.33 13/9= 1.44 14/9= 1.55 15/9= 1.66 16/9= 1.77 17/9= 1.88 18/9= 2.00 19/9= 2.11 20/9= 2.22 21/9= 2.33 22/9= 2.44 23/9= 2.55 24/9= 2.66 25/9= 2.77 26/9= 2.88 27/9= 3.0
		Hiç ⁰	1-2 Gün ¹	3-4 Gün ²	5-7 Gün ³	
DUYGUSAL SAĞLIK DURUMU	22. ... kendinizi bağırsak sorunlarınızla ilgili endişeli veya gergin hissettiniz?	☐	☐	☒	☐	
	23. ... bağırsak belirtilerinizden dolayı kendinizi mahcup hissettiniz?	☒	☐	☐	☐	
	24. ... cinsel ilişkilerinizde bağırsak belirtilerinizden dolayı sorun yaşadınız?	☒	☐	☐	☐	
	25. ... tuvalet bulamamaktan korktunuz?	☒	☐	☐	☐	
	26. ... bağırsak belirtilerinizden dolayı kendinizi, depresyonda ya da cesaretiniz kırılmış hissettiniz?	☐	☐	☒	☐	
	27. ... bağırsak belirtilerinizden dolayı seyahat etmekten kaçındınız veya seyahatinizi ertelediniz?	☒	☐	☐	☐	
	28. ... bağırsak belirtilerinizden dolayı kendinizi kızgın veya sıkıntılı/ümidi kırılmış hissettiniz?	☒	☐	☐	☐	
	29. ... bağırsak belirtilerinizin sonucunda uyku sorunları yaşadınız?	☐	☐	☐	☐	
30. ... "stres" veya üzgün ruh halinin bağırsak belirtilerinizi kötüleştirdiğini hissettiniz?	☐	☐	☒	☐		

SCORE
EWB=

266

Geçen 1 hafta içinde, dışkınızın ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)	
		Evet ¹	Hayır ⁰
31.	... daha katı olduğunu fark ettiniz mi?	☒	☐

Geçen 1 hafta içinde, hangi sıklıkla ...		(HER BİR SORU İÇİN BİR CEVAP İŞARETLEYİN)				SCORE C=
		Hiç ⁰	1-2 Gün ¹	3-4 Gün ²	5-7 Gün ³	
32.	... kabızlık çektiniz veya bağırsaklarınızı boşaltamadınız?	☐	☐	☒	☐	1/4= 0.25 2/4= 0.50 3/4= 0.75 4/4= 1.0 5/4= 1.25 6/4= 1.50 7/4= 1.75 8/4= 2.0 9/4= 2.25 10/4= 2.5 SCORE C=
33.	... dışkınız katıydı?	☐	☐	☐	☒	
34.	... dışkınızı yaparken ağrı hissettiniz?	☐	☐	☒	☐	

Anketi tamamladığınız için teşekkür ederiz

To be completed by the physician

TOTAL SCORE=	Reflux	_____
	+ Distention /Bloating	_____
	+ Fecal Soilage	_____
	+ Diarrhea	_____
	+ Social functioning	_____
	+ Emotional well-being	_____
TOTAL SCORE=	() /6=	_____

0.547
(5.285)

REMEMBER: CONSTIPATION SCORE IS NOT INCLUDED IN CALCULATION OF TOTAL SCORE

C=Constipation; D=Diarrhea; D/B=Distention/Bloating; EWB=Emotional well-being; R=Reflux; SF=Social functioning; S=Fecal soilage

EK-2: Etik Kurul Onayı

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2017/27-42	Tarih:23.11.2017			
	Prof.Dr.Hüseyin İŞLEKEL'in sorumlusu olduğu "Sistemik Skleroz Hastalarında Vitamin D Düzeyi ve Moleküler Yolağının, Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Bulguları ile İlişkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.				
ETİK KURUL BİLGİLERİ					
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu				
ETİK KURUL ÜYELERİ					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?	İmza
	Tıbbi Biyokimya	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
	Halk Sağlığı	DEÜ Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
	Kalp Damar Cerrahisi	DEÜ Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
	Endokrinoloji	DEÜ Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
	Fizyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
	Anesteziyoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
	Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐ H ☒	
	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEÜ Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐ H ☒	
	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEÜ Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐ H ☒	
	Tıbbi Farmakoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐ H ☒	
	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEÜ Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐ H ☒	
	Hukuk	DEÜ Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐ H ☒	
	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐ H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

EK-3: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu Örneği

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ

OLUR FORMU

(Hekimin Açıklaması)

Sayın gönüllü,

“Sistemik Skleroz Hastalarında Vitamin D Düzeyi ve Moleküler Yolağının, Oksidatif DNA Hasarı ve Klinik Bulguları ile İlişkisi” başlıklı araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

Bu çalışma ile sistemik skleroz hastalığının mekanizmasının anlaşılması ve çalışmanın sistemik skleroz hastalığı için geliştirilecek tedavi yöntemlerine ışık tutması amaçlanmaktadır. Katılımınız ile sistemik skleroz hastalığının nedenlerini ortaya çıkaracak bir çalışma gerçekleştirilecektir. Birçok hasta grubunda oksidatif DNA hasarı sonucu oluşan ölçülebilir ürünlerin arttığı, serum vitamin D düzeylerinin düşük olduğu ve vitamin D reseptör geninde bulunan polimorfizmlerin daha fazla bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca polimorfizmlerle ilişkilendirilerek veya bağımsız olarak vitamin D reseptör düzeyinin azaldığı da bilinmektedir. Bu çalışmada, rutin kontrolleriniz sırasında alınan kan örneklerinizden, serum vitamin D ölçümü yapılacak, kandan ayrılan genetik materyalinizden vitamin D reseptör gen polimorfizmlerinizi analiz edilecektir. Ayrıca rutin kontrolünüzde alınacak idrar örneğinizden oksidatif DNA hasar ürünleri olan 8-OH-dG, S-cdA ve R-cdA ölçümü yapılacaktır.

Çalışmaya katılmakla parasal bir yük altına girmeyeceksiniz ve bu çalışma bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumuna da ek bir mali yükümlülük getirmeyecektir. Tüm çalışma masrafları, araştırma bütçesinden karşılanacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu çalışmada sizin için beklenen bir rahatsızlık ya da risk söz konusu değildir. Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak, kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda size ait sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Bu bilgiyi sizin dışınızda biriyle paylaşmamız da ancak sizin izninizle olacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahipsiniz. Reddettiğiniz takdirde de hastalık takibiniz olağan şekilde devam edecektir. Eğer çalışmaya katılmaya karar vererseniz imzalamanız için size bu “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda, mazeret belirtmeksizin ayrılmakta özgürsünüz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Kendi başıma belirli bir düşünme süresinden sonra, tıbbi amaç ile gerçekleştirilecek olan bu araştırmaya “katılımcı” olarak katılma kararı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Aynı şekilde araştırmacı da beni çalışma dışı bırakabilir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmadım. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye bir zarar getirmeyeceğini biliyorum.

Araştırmanın rutin alınmış olan kan ve idrar örneklerinden ilave parametrelerin çalışılması ile ilgili olduğu tarafıma ifade edildi. Aklıma takılan herhangi bir soru olur ise numarasından Uzm. Dr.'e ulaşabilirim.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Bu çalışma için alınan kan ve idrar örneklerinin daha sonra farklı bir bilimsel araştırma amacıyla kullanılmasına

() izin veriyorum

() izin vermiyorum

EK-4: Tez ile ilişkili yayınlar

1- SCI-e kapsamında bir dergi olan “Clinical Immunology”de yayımlanmış tez sahibinin ilk isim olduğu tez ile ilişkili makale

Clinical Immunology 239 (2022) 108997



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yclim



Global hypomethylation pattern in systemic sclerosis: An application for absolute quantification of epigenetic DNA modification products by 2D-UPLC-MS/MS

Nazlı Ecem Dal-Bekar^{a,*}, Agnieszka Siomek-Gorecka^b, Daniel Gackowski^b,
Aydan Köken-Avşar^{c,d}, Handan Yarkan-Tuğsal^{c,e}, Merih Birlik^{a,c}, Hüray İşlekel^{a,f}

^a Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular Medicine, İzmir, Turkey

^b Nicolaus Copernicus University, Faculty of Pharmacy, Department of Clinical Biochemistry, Bydgoszcz, Poland

^c Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Immunology and Rheumatology, İzmir, Turkey

^d Kocaeli State Hospital, Department of Rheumatology, İzmit, Turkey

^e Ankara Training and Research Hospital, Department of Rheumatology, Ankara, Turkey

^f Dokuz Eylül University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, İzmir, Turkey

ARTICLE INFO

Keywords:

DNA methylation
DNA demethylation
Epigenetics
Systemic sclerosis
2D-UPLC-MS/MS

ABSTRACT

Background: Systemic sclerosis (SSc) is a rare autoimmune disease characterized by progressive fibrosis of the skin and internal organs. Besides genetics risk factors, understanding the epigenetic modifications in SSc has been gaining acceleration in recent years. Epigenetic modifications are reversible and defined as druggable targets. In this context, it is highly important to present a systemic perspective to epigenetic modifications of SSc in terms of both pathogenesis and clinical utility.

Material and methods: DNA samples from the whole blood specimens of the 41 SSc patients and 27 healthy controls (HCs) were obtained. Absolute quantification of 5-mC, 5-hmdC, 5-cadC, 5-fdC, and 5-hmdU as the DNA methylation and demethylation products were performed using 2D-UPLC-MS/MS. Demographic data and clinical scores were recorded in detail.

Results: 5-hmdU was significantly higher in SSc patients while 5-hmdC was lower compared to the HCs ($p < 0.01$, $p = 0.012$ respectively). 5-cadC and 5-fdC had upward trend in SSc ($p = 0.064$; $p = 0.066$). These results support that SSc patients tend to have a global hypomethylation pattern. Clinical analyzes revealed that lung, gastrointestinal, joint, and vascular involvement of SSc is also associated with increased demethylation or decreased methylation profile.

Conclusion: We performed absolute quantification of epigenetic DNA modification products in SSc for the first time. We demonstrated an upward trend in global hypomethylation in SSc. Furthermore, as a result of detailed clinical analyzes, the relationship between lung, GIS, and vascular involvement with epigenetic changes was shown. We believe that absolute quantification of DNA methylation and demethylation products with novel technologies can provide a deep understanding of disease pathogenesis and has the potential to mark an era for developing new therapeutic strategies.



Already have a manuscript?

Use our Manuscript Matcher to find the best relevant journals!

[Find a Match](#)

Filters

[Clear All](#)

Web of Science Coverage 

Open Access  

Category 

Country / Region 

Language 

Refine Your Search Results

[Search](#)

Sort By: [Relevancy](#)

Search Results

Found 4,288 results (Page 1)

[Share These Results](#)

Exact Match Found

CLINICAL IMMUNOLOGY

Publisher: **ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE , 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, USA, CA, 92101-4495**

ISSN / eISSN: **1521-6616 / 1521-7035**

Web of Science Core Collection: **Science Citation Index Expanded**

Additional Web of Science Indexes: **Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Clinical Medicine | Current Contents Life Sciences | Essential Science Indicators**

2- SCI-e kapsamında bir dergi olan “Reproductive Toxicology”de yayımlanmış tez ile ilişkili makale

Reproductive Toxicology 103 (2021) 171–180



Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox



Association between early oxidative DNA damage and iron status in women with gestational diabetes mellitus

Mehmet Oğuz Erbağcı^{a,2}, Gamze Tuna^{b,2,*}, Semir Köse^c, Nazlı Ecem Dal-Bekar^b, Merve Akış^d, Melis Kant^{c,1}, Sabahattin Altunyurt^c, Gül Hüray İşlekel^{b,e}

^a Department of Medical Biochemistry, Sanliurfa Suruc State Hospital, Sanliurfa, Turkey

^b Department of Molecular Medicine, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

^c Division of Perinatology, Department of Obstetrics and Gynecology, Dokuz Eylül University School of Medicine, Izmir, Turkey

^d Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Balikesir University, Balikesir, Turkey

^e Department of Medical Biochemistry, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr. Pistollato Francesca

Keywords:

Gestational diabetes mellitus

Oxidative stress

Oxidative DNA damage

8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

8,5'-cyclic-2'-deoxyadenosines

Iron

Ferritin

ABSTRACT

This study aims to assess the relationship between oxidative DNA damage and iron status in women with gestational diabetes mellitus (GDM) compared to those with normal glucose tolerance in the first and the second trimesters of pregnancy. Maternal serum and urine samples were collected in the 11th–14th weeks and the 24th–28th weeks of gestation. In addition to oral glucose tolerance test in the second trimester, fasting blood glucose, HbA1c, ferritin and hemoglobin levels were measured in blood samples. Urinary levels of oxidative DNA damage products 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) and 8,5'-cyclic-2'-deoxyadenosines (S-cdA, R-cdA) were determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope-dilution. In the first trimester, urinary 8-OH-dG levels were found higher in the GDM group ($n = 33$) than in the control group ($n = 84$) ($p = 0.006$). R-cdA and S-cdA levels were not significantly different between the two groups ($p = 0.794$ and $p = 0.792$ respectively). When the cases were stratified according to their first trimester ferritin levels, women with ≥ 50 th centile (≥ 130 ng/mL) demonstrated higher levels of 8-OH-dG and R-cdA than those under <50 th centile ($p = 0.034$, $p = 0.009$). In the GDM group, there was a positive correlation between the second trimester 8-OH-dG and ferritin and 1st-hour glucose levels ($p = 0.014$, $p = 0.020$). This is the first study where oxidative DNA damage is evaluated in both early and late periods of pregnancy. Our findings reveal an association between GDM and iron status and oxidative DNA damage.

1. Introduction

Gestational diabetes mellitus (GDM) refers to varying levels of glucose intolerance not becoming overt before gestation and diagnosed in the second or third trimester of pregnancy [1]. GDM affects about 7 % of all pregnancies and its prevalence varies between 1 % and 14 % depending on the population examined and the diagnostic test utilized [2]. It creates a high risk of developing type 2 diabetes, metabolic syndrome and cardiovascular disease [2–4]. Furthermore, GDM accounts for 35 % of complications in all labors [3]. Fetal macrosomia, neonatal hypoglycemia, hyperbilirubinemia, shoulder dystocia and operative delivery frequently appear in pregnant women with GDM [5]. At

present, the diagnosis of GDM is made in the second and third trimesters mostly with oral glucose tolerance test (OGTT). Nevertheless, adverse metabolic dysfunctions might have already produced negative effects on the mother and the fetus [6]. In addition, there is not a complete consensus on whether a single or two-stage OGTT should be used to diagnose GDM, whether screening and diagnostic methods should be utilized in all pregnant women or only in pregnant women at risk and what diagnostic threshold values should be adopted [7]. According to data from Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) study published in 2008, International Association of Diabetes in Pregnancy Study Group (IADPSG) recommended that two-stage screening and diagnostic methods should be abandoned and that two-hour OGTT

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2021.05.009>

Received 5 December 2020; Received in revised form 17 May 2021; Accepted 21 May 2021

Available online 26 May 2021

0890-6238/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Association between early oxidative DNA damage and iron status in women with diabetes mellitus

By: Erbagci, MO (Erbagci, Mehmet Oguz) ^[1]; Tuna, G (Tuna, Gamze) ^[2]; Kose, S (Kose, Semir) ^[3]; Dal-Bekar, NE (Dal-Bekar, Nazli Ecem) ^[2]; Akis, M (Akis, Merve) ^[4]; Kant, M (Kant, Melis) ^[5]; Altunyurt, S (Altunyurt, Sabahattin) ^[3]; Islek, GH (Islek, Gul Huray) ^[2]; [5]
View Web of Science ResearcherID and ORCID (provided by Clarivate)

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

Volume: 103 Page: 171-180
DOI: 10.1016/j.reprotox.2021.05.009

Published: AUG 2021
Early Access: JUN 2021
Indexed: 2021-07-11
Document Type: Article

Abstract

This study aims to assess the relationship between oxidative DNA damage and iron status in women with gestational diabetes mellitus (GDM) compared to those with normal glucose tolerance in the first and the second trimesters of pregnancy. Maternal serum and urine samples were collected in the 11th-14th weeks and the 24th-28th weeks of gestation. In addition to oral glucose tolerance test in the second trimester, fasting blood glucose, HbA1c, ferritin and hemoglobin levels were measured in blood samples. Urinary levels of oxidative DNA damage products 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OH-dG) and 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines (S-cdA, R-cdA) were determined using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with isotope-dilution. In the first trimester, urinary 8-OH-dG levels were found higher in the GDM group (n = 33) than in the control group (n = 84) (p = 0.006). R-cdA and S-cdA levels were not significantly different between the two groups (p = 0.794 and p = 0.792 respectively). When the cases were stratified according to their first trimester ferritin levels, women with 50th centile (>130 ng/mL) demonstrated higher levels of 8-OH-dG and R-cdA than those under <50th centile (p = 0.034, p = 0.009). In the GDM group, there was a positive correlation between the second trimester 8-OH-dG and ferritin and 1st-hour glucose levels (p = 0.014, p = 0.020). This is the first study where oxidative DNA damage is evaluated in both early and late periods of pregnancy. Our findings reveal an association between GDM and iron status and oxidative DNA damage.

Keywords

Author Keywords: Gestational diabetes mellitus; Oxidative stress; Oxidative DNA damage; Iron; Ferritin; 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines

Keywords Plus: RADICAL-INDUCED DAMAGE; EARLY-PREGNANCY; POTENTIAL BIOMARKERS; SERUM FERRITIN; HUMAN URINE; STRESS; RISK; HYPERGLYCEMIA; GLUCOSE; (5'S)-8,5'-CYCLO-2'-DEOXYADENOSINES

Author Information

Corresponding Address: Tuna, Gamze (corresponding author)

▼ Dokuz Eylul Univ, Inst Hlth Sci, Dept Mol Med, Izmir, Turkey

Addresses:

1 Sanliurfa Suruc State Hosp, Dept Med Biochem, Sanliurfa, Turkey

▼ 2 Dokuz Eylul Univ, Inst Hlth Sci, Dept Mol Med, Izmir, Turkey

▼ 3 Dokuz Eylul Univ, Sch Med, Dept Obstet & Gynecol, Div Perinatal, Izmir, Turkey

▼ 4 Balikesir Univ, Fac Med, Dept Med Biochem, Balikesir, Turkey

▼ 5 Dokuz Eylul Univ, Fac Med, Dept Med Biochem, Izmir, Turkey

Citation Network

In Web of Science Core Collection

1

Citation

▲ Create citation alert

1

Times Cited in All Databases

+ See more times cited

61

Cited References

View Related Records

You may also like...

Maghsoodi, N; Shaw, N; Vincent, RP; et al. Bile acid metabolism is altered in those with insulin resistance after gestational diabetes mellitus

CLINICAL BIOCHEMISTRY

Song, L; Zheng, JB; Zhu, ZL; et al. Prenatal Stress Causes Oxidative Damage to Mitochondrial DNA in Hippocampus of Offspring Rats

NEUROCHEMICAL RESEARCH

Song, SN; Zhang, YM; Zhao, WG; et al. ALT/AST as an Independent Risk Factor of Gestational Diabetes Mellitus Compared with TG/HDL-C

INTERNATIONAL JOURNAL OF GENERAL MEDICINE

Wang, W; Cao, YM; Zhang, P; et al. Influence of one-day diabetes mellitus clinic management on blood glucose control and prognosis in patients with gestational diabetes mellitus

GYNECOLOGICAL ENDOCRINOLOGY



Full text at publisher



Export

Add To Marked List

< 2 of 2 >

Concept Code	From BIOSIS Citation Index	▼
Taxonomic Data	From BIOSIS Citation Index	▼
Disease Data	From BIOSIS Citation Index	▼
Miscellaneous Descriptors	From BIOSIS Citation Index	▼

Funding

Funding agency	Grant number	Show All Details
Dokuz Eylul University	KB.SAG.013	Show details

Funding Table

View funding text

+ See more data fields

Journal information

REPRODUCTIVE TOXICOLOGY

ISSN: 0890-6238

eISSN: 1873-1708

Current Publisher: PERGAMON-ELSEVIER SCIENCE LTD, THE BOULEVARD, LANGFORD LANE, KIDLINGTON, OXFORD OX5 1GB, ENGLAND

Table of Contents: Current Contents Connect

Journal Impact Factor: Journal Citation Report™

Research Areas: Reproductive Biology; Toxicology

Web of Science Categories: Reproductive Biology; Toxicology

3.143

Journal Impact Factor™ (2020)

Use in Web of Science

Web of Science Usage Count

1

Last 180 Days

Learn more

4

Since 2013

This record is from:

Web of Science Core Collection

- Science Citation Index Expanded (SCI-EXPANDED)

Suggest a correction

If you would like to improve the quality of the data in this record, please Suggest a correction

3- e-SCI ve TR Dizin’de yer alan “Turkish Journal of Immunology”de yayımlanmış tez sahibinin ilk isim olduğu tez ile ilişkili makale

REVIEW / DERLEME

Turkish Journal of Immunology - Open Access
www.turkishimmunology.org

Turk J Immunol 2019; 7(1):57–68

İmmünomodülatör ve Antioksidan Bir Molekül Olarak D Vitamini: D Vitamini Eksikliği ve Sistemik Skleroz İlişkisi

Vitamin D as an Immunomodulatory and Antioxidant Molecule: Association Between Vitamin D Deficiency and Systemic Sclerosis

Nazlı Ecem DAL¹, Hüray İŞLEKEL^{1,2}

Öz

D vitamini memelilerde güneş ışığı ile deride sentezlenir veya eser miktarda diyet ile alınır. İnaktif formdaki D vitamini, karaciğerde hidroksillenir ve böbrek tübüllerinde son aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D₃'e dönüştürülür. Bu yeni form prohormon adını alır ve D vitamini reseptörü (VDR) ile ilişkilidir. D vitamininin VDR'ye bağlanması ile başlayan biyolojik fonksiyonları arasında, mineral ve kemik metabolizması, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonun regülasyonu gibi birçok sürecin yanı sıra, immün yanıtın düzenlenmesi ve oksidatif stresin kontrolü de yer almaktadır. Sistemik skleroz (SS), deri ve bazı alt tiplerinde iç organ tutulumu ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Hastalığın etiyolojisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır ancak oksidatif stres, patogenezin önemli mekanizmalarından biri olarak kabul edilmektedir. Bu derleme kapsamında, D vitamini metabolizması ve moleküler yolu, D vitamininin immünomodülatör ve antioksidan bir molekül olarak etkileri, nadir bir otoimmün hastalık olan SS patogenezini için ileri sürülen güncel hipotezler ve SS hastalarında oksidatif stresin ve D vitamini eksikliğinin önemi ve dünya literatüründeki güncel durumu özetlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, sistemik skleroz, D vitamini

Abstract

Vitamin D is activated in skin of mammals through sun light or a small amount of vitamin D is taken in with diet. Biologically inactive form of vitamin D is hydroxylated in liver and is converted to its active form, 1-25 dihydroxyvitamin D₃ in renal tubule. Active form of vitamin D is known as a prohormone and associated with vitamin D receptor (VDR). Biological functions that initiate with binding of Vitamin D to VDR are related to many processes such as mineral metabolism, regulation of cell proliferation and differentiation, as well as its association with regulation of immune response and control of oxidative stress. Systemic sclerosis (SS) is an autoimmune disease characterized by skin and internal organ involvement. Its etiology is still unclear however it is accepted that oxidative stress is one of the most important mechanisms of pathogenesis. This review summarizes the current worldwide literature on vitamin D metabolism and its molecular pathway, effects of vitamin D as an immunomodulatory and antioxidant molecule, current hypotheses for SS pathogenesis as a rare autoimmune disease and the importance of oxidative stress and vitamin D deficiency in SS patients.

Keywords: Oxidative stress, systemic sclerosis, vitamin D

Giriş

Steroid yapıda bir prohormon olan D vitamini, D₃ ve D₂ olmak üzere iki formda bulunur.^[1] D₃ formunun büyük bir kısmı ultraviyole-B (UVB) ışınları ile deride sentezlenirken çok az bir kısmı diyetle alınmaktadır.^[1,2] D₂ formu ise bitkisel kaynaklı besinlerden sağlanmaktadır.^[1] D vitamini eksikliği dünya genelinde yaygın bir problem halini almaktadır.^[3] Referans değerleri için net bir fikir birliği bulunmamakla birlikte, dolaşımdaki 25-hidroksi vitamin D (25-OH-D) düzeyinin ≥ 30 ng/mL olması normal olarak kabul edilmekte; 21–29 ng/mL arasında bulunması D vitamini yetersizliği, 20 ng/mL'nin altındaki değerler ise D vitamini eksikliği olarak tanımlanmaktadır.^[4-6] D vitamini yetersizliği ve vitamin D sinyalizasyonunda meydana gelen aksaklıklar, osteoartrit, diyabet, kanser, tüberküloz, kardiyovasküler ve otoimmün hastalıklar gibi birçok hastalık ile ilişkilendirilmiştir.^[2] Son yıllarda D vitamininin

¹Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340, İzmir, Turkey

²Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 35340, İzmir, Turkey

Correspondence:
Nazlı Ecem DAL

Received: Oct 05, 2018

Accepted: Nov 10, 2018

<https://doi.org/10.25002/tji.2019.945>

©2018 Turkish Journal of Immunology.
All rights reserved.

ETH Get it

Free Full Text from Publisher

Export

Add To Marked List

4 of 5

Vitamin D as an Immunomodulatory and Antioxidant Molecule: Association Between Vitamin D Deficiency and Systemic Sclerosis

By: Dal, NE ([Dal, Nazli Ecem](#))^[1]; Islekel, H (Islekel, Huray)^[1], [2]

TURKISH JOURNAL OF IMMUNOLOGY

Volume: 7 Issue: 1 Page: 57-68

DOI: 10.25002/tji.2019.945

Published: 2019

Indexed: 2019-05-08

Document Type: Review

Abstract

Vitamin D is activated in skin of mammals through sun light or a small amount of vitamin D is taken in with diet. Biologically inactive form of vitamin D is hydroxylated in liver and is converted to its active form, 1-25 dihydroxyvitamin D3 in renal tubule. Active form of vitamin D is known as a pro hormone and associated with vitamin D receptor (VDR). Biological functions that initiate with binding of Vitamin D to VDR are related to many processes such as mineral metabolism, regulation of cell proliferation and differentiation, as well as its association with regulation of immune response and control of oxidative stress. Systemic sclerosis (SS) is an autoimmune disease characterized by skin and internal organ involvement. Its etiology is still unclear however it is accepted that oxidative stress is one of the most important mechanisms of pathogenesis. This review summarizes the current worldwide literature on vitamin D metabolism and its molecular pathway, effects of vitamin D as an immunomodulatory and antioxidant molecule, current hypotheses for SS pathogenesis as a rare autoimmune disease and the importance of oxidative stress and vitamin D deficiency in SS patients.

Keywords

Author Keywords: Oxidative stress; systemic sclerosis; vitamin D

Keywords Plus: GROWTH-FACTOR-BETA; 1,25-DIHYDROXYVITAMIN D-3; OXIDATIVE STRESS; SCLERODERMA FIBROBLASTS; INCREASED EXPRESSION; MULTIPLE-SCLEROSIS; D SUPPLEMENTATION; GENE-EXPRESSION; NADPH OXIDASE; T-CELLS

Author Information

Corresponding Address: [Dal, Nazli Ecem](#) (corresponding author)

▼ ¹ Dokuz Eylul Univ, Tip Fak, Saglik Bilimleri Enstitüsü, Multidisipliner Anabilim Dali, Z064 Arastirma Gorevlisi, TR-35340 Izmir, Turkey

Addresses:

▼ ¹ Dokuz Eylul Univ, Saglik Bilimleri Enstitüsü, Mol Tip Anabilim Dali, TR-35340 Izmir, Turkey

▼ ² Dokuz Eylul Univ, Tip Fak, Tibbi Biyokimya Anabilim Dali, TR-35340 Izmir, Turkey

E-mail Addresses:

Categories/Classification

Research Areas: Immunology

E-mail Addresses:

Categories/Classification

Research Areas: Immunology

[+ See more data fields](#)

Journal information

[TURKISH JOURNAL OF IMMUNOLOGY](#)

ISSN: 1301-109X

eISSN: 2147-8325

Current Publisher: TURKISH SOC IMMUNOLOGY, YILDIZ CAS NO 55-1-2, BESIKTAS, ISTANBUL 34353, TURKEY

Research Areas: Immunology

Web of Science Categories: Immunology

[View category quartiles](#)

Citation Network

In Web of Science Core Collection

1
Citation

[Create citation alert](#)

1
Times Cited in All Databases

97
Cited References

[View Related Records](#)

[+ See more times cited](#)

You may also like...

Tuncel, G; Temel, SG; Ergoren, MC;
[Strong association between VDR FokI \(rs2228570\) gene variant and serum vitamin D levels in Turkish Cypriots](#)
MOLECULAR BIOLOGY REPORTS

Babbi, G; Martelli, PL; Casadio, R;
[PhenPath: a tool for characterizing biological functions underlying different phenotypes](#)
BMC GENOMICS

Lu, R; Wu, SP; Sun, J; et al.
[The Vitamin D Receptor, Inflammatory Bowel Diseases, and Colon Cancer](#)
CURRENT COLORECTAL CANCER REPORTS

Cunningham, J; Zehnder, D;
[New Vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms](#)
KIDNEY INTERNATIONAL

Cunningham, J; Zehnder, D;
[New Vitamin D analogs and changing therapeutic paradigms](#)
KIDNEY INTERNATIONAL

Miao, D; Goltzman, D;
[Probing the Scope and Mechanisms of Calcitriol Actions Using Genetically Modified Mouse Models](#)
JBMR PLUS

[See all](#)

Most Recently Cited by

Oktem, C; Aslan, F;
[Vitamin D Levels in Young Adult Cataract Patients: A Case-Control Study](#)
OPHTHALMIC RESEARCH

Use in Web of Science

Web of Science Usage Count

2
Last 180 Days

5
Since 2013

[Learn more](#)

This record is from:

Web of Science Core Collection

- Emerging Sources Citation Index (ESCI)

**4- SCI-e kapsamında bir dergi olan “Annals of the Rheumatic Diseases”
dergisine submit edilmiş olan tez sahibinin ilk isim olduğu tez ile ilişkili makale**

**Vitamin D attenuates elevated oxidative DNA damage in scleroderma patients with
organ involvement: A prospective study**

**Nazlı Ecem Dal-Bekar^{1*}, Hüray İşlekel^{1,2}, Aydan Köken-Avşar^{3,4}, Handan Yarkan-
Tuğsal^{3,5}, Gamze Tuna¹, Berrin Zengin^{3,6}, Merih Birlik^{1,3}**

**1- Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department of Molecular
Medicine, Izmir, Turkey**

**2- Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Medical Biochemistry,
Izmir, Turkey**

**3- Dokuz Eylül University, School of Medicine, Department of Immunology and
Rheumatology, Izmir, Turkey**

4- Kocaeli State Hospital, Department of Rheumatology, Izmit, Turkey

**5- Ankara Training and Research Hospital, Department of Rheumatology, Ankara,
Turkey**

**6- Izmir Bozyaka Training and Research Hospital, Department of Rheumatology,
Izmir, Turkey**

***Corresponding author: Nazlı Ecem Dal-Bekar**

Conflicts of interest: The authors declare that they have no known competing financial
interests or personal relationships.

ABSTRACT

Objectives: Scleroderma is a rare autoimmune disease characterized by progressive fibrosis of the skin and internal organs. Increased oxidative macromolecule damage has been reported in scleroderma. Oxidative DNA damage is prominent due to its cytotoxic and mutagenic effects. Since vitamin D deficiency is a common problem in scleroderma, vitamin D replacement is an important contributor during treatment. Moreover, antioxidative role of vitamin D has been revealed. The aim of this study was to comprehensively investigate oxidative DNA damage in SSc at the baseline and the possible contributions of vitamin D replacement in terms of DNA damage attenuation with a prospectively designed study.

Methods: Oxidative DNA damage in scleroderma was comprehensively evaluated by measuring three stable damage products (8-oxo-dG, S-cdA, R-cdA) in urine by LC-MS/MS; serum vitamin D levels were determined by high-resolution MS; VDR gene expression and four polymorphisms in this gene (rs2228570, rs1544410, rs7975232, rs731236) were analyzed by RT-PCR and compared to healthy individuals. In the prospective part, post-replacement DNA damage and VDR expression of the patients receiving vitamin D were re-evaluated.

Results: In scleroderma, all DNA damage products were increased whereas vitamin D and VDR expression were found to be lower ($p < 0.05$). All damage products showed a trend towards reduction following the replacement. The decrease in 8-oxo-dG, as a gold marker of DNA damage, and increment in VDR expression reached statistical significance ($p < 0.05$). The effectiveness of vitamin D in scleroderma patients with organ involvement has been demonstrated by attenuated 8-oxo-dG after replacement in patients with lung, joints, and gastrointestinal system involvement.

03-Jun-2022

Dear Dr. Dal-Bekar:

Your manuscript entitled "Vitamin D attenuates elevated oxidative DNA damage in scleroderma patients with organ involvement: A prospective study" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Annals of the Rheumatic Diseases.

Your manuscript ID is annrheumdis-2022-222886.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ard> and edit your user information as appropriate.

Author names will be taken directly from the information held in ScholarOne and not from the article file. Please check that all names are correctly entered as this will be the name displayed on the final published article and in any indexes affiliated with the journal.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ard>.

Any individuals listed as co-authors on this manuscript are copied into this submission confirmation email. If you believe that you have received this email in error, please contact the Editorial Office.

Thank you for submitting your manuscript to Annals of the Rheumatic Diseases.

Kind regards,

Editor in Chief, Annals of the Rheumatic Diseases

ScholarOne Manuscripts™

Nazli Ecem Dal-Bekar ▾Instructions & FormsHelpLog Out

Annals of the
RHEUMATIC DISEASES
The Euler Journal

[Home](#) [Author](#) [Review](#)

Author Dashboard

Author Dashboard

[1 Submitted Manuscripts](#) >

[Start New Submission](#) >

[5 Most Recent E-mails](#) >

[English Language Editing Service](#) >

Submitted Manuscripts

STATUS	ID	TITLE	CREATED	SUBMITTED
EPA: Janssen-Seijkens, Christine	annrheumdis-2022-222886	Vitamin D attenuates elevated oxidative DNA damage in scleroderma patients with organ involvement: A prospective study View Submission Cover Letter	03-Jun-2022	03-Jun-2022
• Awaiting Editorial Production Assistant Processing				

[Contact Journal](#)

ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES

Publisher: **BMJ PUBLISHING GROUP , BRITISH MED ASSOC HOUSE, TAVISTOCK SQUARE, LONDON, ENGLAND, WC1H 9JR**

ISSN / eISSN: **0003-4967 / 1468-2060**

Web of Science Core Collection: **Science Citation Index Expanded**

Additional Web of Science Indexes: **Biological Abstracts | BIOSIS Previews | Current Contents Clinical Medicine | Current Contents Life Sciences | Essential Science Indicators**

[Share This Journal](#)

[View profile page](#)

* Requires free login.

KATKI

Bu tez çalışmasını yürütmüş olan doktora adayı, **YÖK 100/2000 Öncelikli Alanlarda Akademik Personel Yetiştirme Programı** ve **TÜBİTAK 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı** tarafından desteklenmiştir.

Tez projesinin deneysel aşamaları için gereken bütçe **DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi** tarafından sağlanmıştır. (Proje no: 2018.KB.SAG.109-Münferit proje)



ÖZGEÇMİŞ



NAZLI ECEM DAL BEKAR

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

İletişim Adresi
Telefon
E-posta
İnternet Sayfası

Öğrenim Bilgileri

01 Şubat 2017 - Şu Anda (5 yıl 4 ay)
Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (DR)
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.79 / 4.0

01 Ekim 2014 - 01 Aralık 2016 (2 yıl 3 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, ANKARA ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, DİAGNOSTİK İMMÜNOLOJİ (YL) (TEZLİ)
Tez Başlığı: Behçet Hastalarında Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizmleri Ve Vitamin D Reseptör Düzeyi
Tez Konusu: İmmün sistemin regülasyonunda önemli bir role sahip olduğu bilinen D vitamininin biyolojik fonksiyonları için elzem olan vitamin D reseptörünü kodlayan gendeki (VDR) dört sekans polimorfizmi (SNP) Türk behçet hastalarında incelenmiş ve polimorfizmler vitamin D reseptör düzeyi ile birlikte değerlendirilmiştir.
Tarih: 2016
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.76 / 4.0

01 Ekim 2010 - 01 Haziran 2014 (3 yıl 9 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.68 / 4.0

01 Eylül 2006 - 01 Haziran 2010 (3 yıl 10 ay)
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI İL MİLLÎ EĞİTİM MÜDÜRLÜKLERİ VE OKULLAR
İSTANBUL İLİNDEKİ OKULLAR BEŞİKTAŞ İLÇESİNDEKİ OKULLAR BEŞİKTAŞ
ANADOLU LİSESİ, TÜRKİYE

Yabancı Dil Bilgileri

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

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanları

Bilimsel Teknolojik Faaliyet Alanı Bilgileri

Sağlık Bilimleri -- Tıp -- Dahili Tıp Bilimleri -- İç Hastalıkları -- İmmünoloji ve Romatoloji

Temel Bilimler -- Kimya -- Analitik Kimya -- Kütle Spektroskopisi

Temel Bilimler -- Yaşam Bilimleri -- Moleküler Biyoloji ve Genetik -- Genetik Bozuklukların Moleküler Biyolojisi

Anahtar Kelimeler

Otoimmün Hastalıklar

Moleküler Biyoloji

Kütle Spektrometri

Ar-Ge Yetkinlik

Makaleler

N. E. DAL-BEKAR, A. SİOMEK-GORECKA, D. GACKOWSKI, A. KÖKEN AVŞAR, H. YARKAN TUĞSAL, A. M. BİRLİK & G. H. İŞLEKEL, Global hypomethylation pattern in systemic sclerosis: An application for absolute quantification of epigenetic DNA modification products by 2D-UPLC-MS/MS, Clinical Immunology, 2022, 1521-6616, 239, June 2022, 1-10.

G. TUNA, N. E. DAL BEKAR, A. AKAY, M. RÜKŞEN, S. İŞLEKEL & G. H. İŞLEKEL, Minimally Invasive Detection of IDH1 Mutation With Cell-Free Circulating Tumor DNA and D-2-Hydroxyglutarate, D/L-2-Hydroxyglutarate Ratio in Gliomas, Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2022, 0022-3069, 81, 6, 1-10.

M. O. ERBAĞCI, G. TUNA, S. KÖSE, N. E. DAL BEKAR, M. AKIŞ, M. KANT, S. ALTUNYURT & G. H. İŞLEKEL, Association between early oxidative DNA damage and iron status in women with gestational diabetes mellitus, REPRODUCTIVE TOXICOLOGY, 2021, 0890-6238, 103, August 2021, 171-180.

N. KANIT, N. E. DAL BEKAR, U. KARABAY, E. ÖZER, G. TUNA & G. H. İŞLEKEL, CURRENT STATUS OF CoHE 100/2000 SCHOLARSHIP HOLDERS: EXPERIENCE OF PHD STUDENTS AT DOKUZ EYLUL UNIVERSITY GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES, Journal of basic and clinical health sciences, 2021, 2564-7288, 5, 2, 148-155.

N. E. DAL BEKAR, N. KANIT, A. AFAGH & H. M. SAİD, TGF-β1 promotes cell migration in hepatocellular carcinoma by suppressing REELIN expression, GENE, 2020, 0378-1119, 724, 2020, 1-2.

N. E. DAL BEKAR & G. H. İŞLEKEL, İmmünomodülatör Ve Antioksidan Bir Molekül Olarak D Vitamini: D Vitamini Eksikliği Ve Sistemik Skleroz İlişkisi, Turkish Journal of Immunology, 2019, 2147-832, 7, 1, 57-68.

N. E. DAL BEKAR, P. ÇERÇİ, Ü. ÖLMEZ & G. KESKİN, The Role Of Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms In The Pathogenesis Of Behçet's Disease: A Case Control Study In Turkish Population, Annals of Human Genetics, 2019, 1469-1809, 2019, 1, 1-10.

N. E. DAL BEKAR, Sialik Asit Ve İmmün Regülasyondaki Rolü, Turkish Journal of Immunology, 2018, 2147-8325, 6, 2, 75-83.

Bildiriler

Y. YAVAŞ, G. TUNA, N. E. DAL BEKAR, G. H. İŞLEKEL, A. KÖKEN AVŞAR, Y. EREZ, S. B. KOCAER, F. ÖNEN, G. CAN & A. M. BİRLİK, Prospective investigation of the relationship between lipid peroxidation levels and clinical findings in patients with rheumatoid arthritis. , Sözlü Sunum, VIII. International Congress of Molecular Medicine, 09 Kasım 2021, 12 Kasım 2021.

N. E. DAL BEKAR, A. S. GORECKA, D. GACKOWSKI, A. KÖKEN AVŞAR, A. BİRDOĞAN, H. YARKAN TUĞSAL, B. ZENGİN, A. M. BİRLİK & G. H. İŞLEKEL, Absolute quantification of epigenetic DNA modification products in patients with systemic sclerosis by 2D-UPLC-MS/MS system., Poster Sunumu, 6th European Congress of Immunology, 01 Eylül 2021, 04 Eylül 2021, 1521-4141.

H. ŞAHİN, G. TUNA, A. S. YENER, S. C. ADIYAMAN, B. ÖZGEN SAYDAM, N. E. DAL BEKAR, Y. YAVAŞ & G. H. İŞLEKEL, Comparison of immunoassay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for measuring salivary cortisol. , Poster Sunumu, 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, 18 Aralık 2020, 20 Aralık 2020.

N. E. DAL BEKAR, G. TUNA, S. İŞLEKEL & G. H. İŞLEKEL, Development and validation of a selective mass spectrometric method for simultaneous measurement of D- and L-2-hydroxyglutaric acid in biological fluids and application to a glioma study, Sözlü Sunum, 31. Ulusal Biyokimya Kongresi, 18 Aralık 2020, 20 Aralık 2020, 1303-829X.

N. E. DAL BEKAR, G. TUNA, M. KANT, M. AKIŞ, B. ZENGİN, A. KÖKEN AVŞAR, A. M. BİRLİK & G. H. İŞLEKEL, Evaluation of Oxidative DNA Damage in Systemic Sclerosis by Tandem Mass Spectrometry and Investigation the Effect of Vitamin D Replacement on Damage Parameters: A Pilot Study, Sözlü Sunum, 11th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2019), 27 Eylül 2019, 30 Eylül 2019.

N. E. DAL BEKAR, G. TUNA, M. KANT, M. AKIŞ, B. ZENGİN, A. KÖKEN AVŞAR, A. M. BİRLİK & G. H. İŞLEKEL, Sistemik Sklerozda Oksidatif Dna Hasarının Tandem Kütle Spektrometri İle Değerlendirilmesi Ve Vitamin D Replasmanının Hasar Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi: Pilot Bir Çalışma., Poster Sunumu, İmmünolojide Moleküller Sempozyumu, 18 Ekim 2018, 21 Ekim 2018.

M. KANT, G. TUNA, M. AKIŞ, N. E. DAL BEKAR, N. KANIT, U. KARABAY & G. H. İŞLEKEL, Evaluation Of The Theoretical And Practical Course On Dna Damage, Repair And Its Measurement By Tandem Mass Spectrometry., Poster Sunumu, Febs Workshop On Molecular Life Sciences: Training Tomorrow's Scientists, 05 Eylül 2018, 08 Eylül 2018, 1303-829X, 43, Suppl 4, 19 - 20.

N. E. DAL BEKAR, G. KESKİN, P. ÇERÇİ & Ü. ÖLMEZ, Does Vitamin D Receptor Play A Role In The Pathogenesis Of Behçet's Disease, Poster Sunumu, 43rd Febs Congress, 07 Temmuz 2018, 12 Temmuz 2018, 2211-5463, Supplement 8, 208 - 208.

N. KANIT, N. E. DAL BEKAR, U. KARABAY, G. H. İŞLEKEL & E. ÖZER, Harmonisation Of Orpheus Phd Programme, Cohe 100/2000 Scholarship And Institutional Regulations In Dokuz Eylül University: The Student Perspective., Poster Sunumu, Workshop On Phd Supervision In Biomedicine And Health Sciences: Orpheus Perspective, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018, 1303-829X, 43, 3, 20 - 20.

G. TUNA, N. E. DAL BEKAR, N. KANIT, U. KARABAY & G. H. İŞLEKEL, Molecular Medicine Orpheus-phd Program In Dokuz Eylül University Graduate School Of Health Sciences., Poster Sunumu, Workshop On Phd Supervision In Biomedicine And Health Sciences: Orpheus Perspective, 21 Haziran 2018, 22 Haziran 2018, 1303-829X, 43, 3, 20 - 20.

Projeler

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Bipolar Bozukluk Tanılı Bireylerin Birinci Derece Akrabalarında Oksidatif DNA Hasarı ve Baz Çıkarma Onarımı, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Sistemik Skleroz Hastalarında Vitamin D Düzeyi Ve Moleküler Yolağının, Oksidatif Dna Hasarı Ve Klinik Bulguları İle İlişkisi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Temel ve Klinik Araştırmalara Yönelik Yenilikçi Teknolojilerin Geliştirilmesi Amaçlı Eğitim-Araştırma Laboratuvar Altyapısı Kurma ve YÖK 100/2000 Doktora Burs Programı Odaklı Nitelikli İnsan

Kaynağı Yetiştirme Projesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) (Devam ediyor) .

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Glial Tümörlerde Vücut Sıvılarında Idh1 Gen Mutasyonu Ve D-2-hidroksişglutaratın Klinik Korelasyonlarının İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Eylül 2018, 01 Eylül 2021.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Romatoid Artrit Hastalarında Oksidatif DNA Hasarı ve Lipit Peroksidasyon Düzeylerinin Prospektif Olarak İncelenmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Ocak 2021, 01 Temmuz 2021.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Hiperkortizoleminin Dışlanması Gereken Hastalarda Immunoassay Ve Tandem Kütle Spektrometri Yöntemleri İle Ölçülen Tükürük Kortizolünün Tanısal Değeri Ve Diürenal Ritmi Ortaya Koymadaki Başarısının Değerlendirilmesi, Yürütülen Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, Destek Alınan Kuruluş: DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Eylül 2018, 01 Eylül 2020.

TÜBİTAK İKİLİ İŞBİRLİĞİ (DİĞER), PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ, Evaluation of vitamin D status and epigenetic markers in systemic sclerosis by mass spectrometry-based novel technologies, Yürütülen Kuruluş: NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY, 01 Eylül 2019, 01 Aralık 2019.

KURUMSAL (BAP V.B.), ARAŞTIRMACI, Behçet Hastalarında Vitamin D Reseptör Gen Polimorfizmleri Ve Vitamin D Reseptör Düzeyi, Yürütülen Kuruluş: TIP FAKÜLTESİ, Destek Alınan Kuruluş: ANKARA ÜNİVERSİTESİ (Yurt İçi) , 01 Şubat 2016, 01 Temmuz 2016.

Ödüller

Diğer, Ulusal, En İyi Sözlü Sunum Birincilik Ödülü , Development and validation of a selective and robust LC-MS/MS method for simultaneous measurement of D- and L-2- hydroxyglutaric acid in CSF, urine and plasma: Application to a glioma study, Ödül Alınan Kurum: Kongre Bilimsel Komitesi (31. Ulusal Biyokimya Kongresi) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 20 Aralık 2020.

Diğer, Uluslararası, Katılım, Yol ve Konaklama Ödülü, 11th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEIS2019) , Ödül Alınan Kurum: European Federation of Immunological Societies (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), ALMANYA, 27 Eylül 2019.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Doktora Bursu, TÜBİTAK 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Programı, Ödül Alınan Kurum: BİLİM İNSANI DESTEKLEME DAİRE BAŞKANLIĞI - BİDEB , TÜRKİYE, 01 Mart 2019.

Diğer, Ulusal, Genç Araştırmacı Ödülü, Poster sunumuna istinaden kongre kayıt, konaklama ödülü, Ödül Alınan Kurum: Türk İmmünoloji Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 18 Ekim 2018.

Diğer, Uluslararası, Poster Ödülü, Sunulan Posterin Ödüle Layık Görülmesi, Ödül Alınan Kurum: Federation of European Biochemistry Society (FEBS) (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 08 Eylül 2018.

Diğer, Uluslararası, Katılım ve Konaklama Ödülü, XXIV. IFB Biotechnology Summer School: Responsible Research and Innovation in Biosciences, Ödül Alınan Kurum: GDANSK UNIVERSITY OF TECHNOLOGY, POLONYA, 04 Eylül 2018.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Uluslararası, Young Scientists' Forum Ödülü, 43. FEBS Kongresi, Young Scientists' Forum'a katılımcı olmaya hak kazanma, Ödül Alınan Kurum: FEDERATION OF BIOCHEM. SOC., ÇEK CUMHURİYETİ, 07 Temmuz 2018.

Diğer, Ulusal, Poster Ödülü, Sunulan Posterin İkincilik Ödülüne Layık Görülmesi, Ödül Alınan Kurum: Türk Biyokimya Derneği (Sistemde kayıtlı olmayan kuruluş), TÜRKİYE, 22 Haziran 2018.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Doktora Bursu, YÖK tarafından verilen 100/2000 bursu (4 yıl süreyle), Ödül Alınan Kurum: YÜKSEKÖĞRETİM KURULU BAŞKANLIĞI , TÜRKİYE, 01 Şubat 2017.

Üniversite, Kurum veya Kuruluşların Verdiği Ödüller, Ulusal, Lisans Mezuniyeti Yüksek Şeref Ödülü, Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölüm İkinciliği, Fakülte Dördüncülüğü, Ödül Alınan Kurum: HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 01 Temmuz 2014.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

BİDEB Destekleri

NAZLI ECEM DAL BEKAR, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2218-Yurt İçi Doktora Sonrası Araştırma Burs Programı, Burs Almaya Hak Kazandı, 2021 - 2. NAZLI ECEM DAL BEKAR, Etkinlik Destekleri ve Eğitim Bursları Müdürlüğü, 2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı, Destekleniyor, 2019 - 1, 01.03.2019 - 28.02.2023.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0