



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POSTMENOPAZAL KADINLARDA D VİTAMİNİ İLE LÖKOSİT
TELOMER UZUNLUĞU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MİNENUR KALYONCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Deniz Ağırbaşı

İSTANBUL – 2019



T.C.

ACIBADEM MEHMET ALİ AYDINLAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**POSTMENOPUZAL KADINLARDA D VİTAMİNİ İLE LÖKOSİT
TELOMER UZUNLUĞU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

MİNENUR KALYONCU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA VE MOLEKÜLER BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Deniz Ağırbaşı

İSTANBUL – 2019

Anabilim Dalı: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Program: Biyokimya ve Moleküler Biyoloji
Tez Başlığı: Postmenopozal Kadınlarda D Vitamini ile Lökosit Telomer Uzunluğu Arasındaki İlişkinin Araştırılması
Öğrencinin Adı-Soyadı: Minenur Kalyoncu
Savunma Sınavı Tarihi: 24/05/2019

Bu tez çalışması jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı Prof. Dr. Fehime Aksungar
Acıbadem Mehmet Ali
Aydınlar Üniversitesi

Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Deniz Ağırbaşı
Acıbadem Mehmet Ali
Aydınlar Üniversitesi

Üye Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu
Acıbadem Mehmet Ali
Aydınlar Üniversitesi

Üye Doç. Dr. Özden Hatırnaz NG
Acıbadem Mehmet Ali
Aydınlar Üniversitesi

Üye Dr. Öğr. Üyesi Zehra Kaya
Van Yüzüncü Yıl
Üniversitesi

İmza
İmza
İmza
İmza
İmza

BEYAN

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

12.06.2019

MİNENUR KALYONCU

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu çalışmada; menopoz sonrası sağlıklı kadınlarda D vitamini seviyelerinin telomer boyu ile ilişkisini ve D vitamini takviyesinin menopoz sonrası kadınlarda telomer boyuna etkisini araştırmayı amaçladık.

Bilgi birikimi ve tecrübesiyle projenin ortaya çıkmasına sebep olan, akademik kariyeri ve insani değerleriyle bana her zaman yol gösteren ve destek olan değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Deniz Ağırbaşlı' ya,

Değerli anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Aysel Özpınar'a,

Metotlar konusunda bana yol gösteren, her konuda bilgi birikimi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Meltem Müftüoğlu'na,

Lisansüstü eğitimimde büyük emeği geçen Biyokimya ve Moleküler Biyoloji Anabilim dalının değerli öğretim üyelerine,

D vitamini düzeyi ölçümlerinde destekleri için Acıbadem Lab-Med Laboratuvarı'na,

Hasta numunelerini toplamamda tüm destek ve yardımlarını benden esirgemeyen Dr. İsmihan Onur'a, Manyas Sağlık Ocağı doktor ve hemşirelerine,

Sonuçların analizinde yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Süleyman Selim Çınaroğlu'na, gecemi gündüzüme kattığım deney ve tez yazım aşamasında destek olan Muazzez Ceren Yılmaz, Hazal Yılmaz, Süleyman Bozkurt ve değerli yüksek lisans arkadaşlarıma,

Hayallerimi gerçekleştirmek için çıktığım yolda her zaman arkamda olan, koşulsuz ve daima bana destek olan gizli kahramanlarım sevgili annem Göknur Kalyoncu, sevgili babam Yaşar Kalyoncu, sevgili ağabeyim Mehmet Can Kalyoncu'ya, en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Bu araştırma TÜBİTAK tarafından desteklenen 116Z812 numaralı (TÜBİTAK 3001 Projesi) – Postmenopozal kadınlarda D vitamini ile lökosit telomer uzunluğu arasındaki ilişkinin araştırılması başlıklı proje kapsamında yapılmıştır. TÜBİTAK'a projeye desteklerinden dolayı ve bursiyeri olduğum için teşekkür ederim.

Minenur KALYONCU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	iv
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÖZET	1
SUMMARY	2
1 GİRİŞ VE AMAÇ	3
2 GENEL BİLGİLER	5
2.1 D vitamini	5
2.2 D Vitamini Metabolizması	6
2.3 D vitamini Eksikliği	10
2.4 D vitamini Eksikliğinin Hastalıklarla İlişkisi	10
2.5 D vitamini Eksikliği ve Menopoz	11
2.6 D vitamininin Yaşlanmadaki Rolü	11
2.7 Telomer Yapı ve Fonksiyonu	13
2.7.1 Lökosit telomer uzunluğu ve menopoz	16
2.7.2 Lökosit telomer uzunluğu ve D vitamini ilişkisi	17
3 GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1 Gereç	19
3.2 Yöntem	21
3.2.1 Çalışma planı	21
3.2.2 Kan ve serum eldesi	23
3.2.3 Serumdan 25(OH)D ₃ ölçümü	23
3.2.4 Periferel kandan mononükleer hücre (PBMC) izolasyonu	24
3.2.5 DNA izolasyonu	25
3.2.6 Lökosit telomer uzunluğu tayini	26
4 BULGULAR	29

4.1	Çalışma Grubu Klinik ve Biyokimyasal Sonuçları	29
4.2	Lökosit Telomer Uzunluğu Sonuçları	32
4.2.1	Telomer qPCR sonuçları	32
5	TARTIŞMA.....	38
6	SONUÇ VE ÖNERİLER	43
7	KAYNAKLAR	44
8	EKLER	49
9	ÖZGEÇMİŞ	55



TABLÖLAR LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Kullanılan cihaz ve malzemeler	19
Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemeler (devamı)	20
Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 4. Telomer, 36B4 ve β -globin primer dizileri	27
Tablo 5. Telomer primerleri için qPCR inkübasyon koşulları	28
Tablo 6. 36B4 ve β -globin primerleri için qPCR inkübasyon koşulları	28
Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen bireylerin klinik ve biyokimyasal özellikleri	29

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1. D vitamininin kimyasal formları	5
Şekil 2. D vitamini sentezi ve metabolizması	7
Şekil 3. D vitamini metabolizması ve etki bölgeleri. Monosit/makrofajlarda D vitamininin etkileri	9
Şekil 4. D vitaminin hücrenin yaşamsal faaliyetleri üzerindeki etkileri	12
Şekil 5. Telomer yapısı	14
Şekil 6. Telomeraz yapısı ve etki mekanizması	15
Şekil 7. Ficoll-Paque gradient santrifügasyon yöntemiyle ayrıştırılan fazlar	25
Şekil 8. NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre ile ölçülen DNA örnekleri ..	25
Şekil 9. Telomer, 36B4 ve β -globin primerleri için seri dilüsyon protokolü	28
Şekil 10. a. yaş, b. kilo, c. boy, d. VKİ değerlerinin telomer uzunluğu ($2^{-\Delta C_t}$) ile karşılaştırılması	30
Şekil 11. 25(OH)D seviyesinin tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) değişimi. a. Plasebo grubu, b. D vitamini grubu. (Wilcoxon test kullanıldı.)	31
Şekil 12. a. Telomer qPCR seri dilüsyonları, b. 36B4 tek kopya gen ve β -globin seri dilüsyonları. (Her örnek duplike çalışıldı)	32
Şekil 13. qPCR relatif T (telomer)/S (tek kopya gen) oranı. Dilüsyon faktörü ~ 1.68 olacak şekilde konsantrasyonları 12.64- 100 ng arasında değişen 5 DNA örneği kullanıldı. Kareler, tek kopya gen 36B4; dörtgenler telomeri göstermektedir	33
Şekil 14. Telomer qPCR'ın %4'lük agaroz jeldeki smear görüntüsü	34
Şekil 15. Tedavi öncesi ve sonrası telomer uzunlukları a. plasebo grubu, b. D vitamini grubu (Wilcoxon test kullanıldı.)	35

Şekil 16. D vitamini ve plasebo kullananlar arasındaki LTU korelasyonu (Pearson korelasyonu uygulandı.)	36
Şekil 17. Gruplar arası (Plasebo ve D vitamini) katlama değışikliğı karşılaştırılması (Mann-Whitney test kullanıldı.)	36
Şekil 18. a. Farklı mevsimlerde D vitamini kullanan tedavi grubu katılımcılarının 25(OH)D seviyelerinin karşılaştırılması b. Farklı mevsimlerde D vitamini kullanan tedavi grubu katılımcılarının telomer uzunluklarının karşılaştırılması. TÖ: tedavi öncesi, TS: tedavi sonrası	37



ÖZET

D vitamini hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptoz gibi hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde rol oynar. D vitamini inflamasyonu azalttığı ve genomik kararlılık ile ilişkili olduğu için, D vitamini seviyesindeki değişikliğin telomer uzunluğu ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmanın amacı menopoza sonrası sağlıklı kadınlarda D vitamini seviyelerinin telomer boyu ile ilişkisini ve D vitamini takviyesinin menopoza sonrası kadınlarda telomer boyuna etkisini araştırmaktır. Çalışmaya kabul edilen katılımcılardan ayrıntılı kişisel bilgileri alındı. D vitamini takviyesinden önce sağlıklı, postmenopozal kadınlardan (n=100) kan örnekleri toplandı. Deney grubu rastgele ikiye bölündü. İlk gruba (n=50) 2 ay boyunca 50,000 IU / hafta oral D3 vitamini takviyesi, diğer gruba (n=50) ise plasebo verildi. Serum D vitamini düzeyleri ve qPCR ile lökosit telomer uzunlukları tedavi öncesi ve sonrası karşılaştırıldı. Bireylerin yaş ve vücut kütle indeksi ortalaması sırasıyla 58.4 ve 26.7'dir. D vitamini düzeylerindeki değişim hem plasebo grubunda (tedavi öncesi 11.8 ± 4.2 , tedavi sonrası 15.2 ± 5.9 , $p < 0.001$) hem de D vitamini grubunda (tedavi öncesi 11.3 ± 3.6 , tedavi sonrası 28.6 ± 10.3 , $p < 0.0001$) anlamlıdır. Telomer uzunluğu hem plasebo grubunda (tedavi öncesi $2^{\Delta Ct}$: 96, tedavi sonrası $2^{\Delta Ct}$: 244) hem de tedavi grubunda (D vitamini kullananlarda) (tedavi öncesi $2^{\Delta Ct}$: 97, tedavi sonrası $2^{\Delta Ct}$: 180) anlamlı bir şekilde arttı. Bu çalışmanın bulguları, postmenopozal kadınlarda D vitamini düzeylerinin artmasının D vitamini takviyesi ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Telomer uzunluğu D vitamini takviyesi alanlarda ve plasebo grubunda anlamlı bir şekilde arttığı için D vitamini seviyesi ile telomer uzunluğu arasında bir ilişki bulunmamaktadır.

Anahtar Kelimeler: 25(OH)D, D Vitamini eksikliği, Lökosit telomer uzunluğu, Postmenopozal dönem, Telomer

SUMMARY

Association of Vitamin D Levels with Leukocyte Telomere Length in Postmenopausal Women

Vitamin D is involved in vital activities of the cell such as cell differentiation, proliferation and apoptosis. Since vitamin D decrease inflammation and is related to genomic stability; change in vitamin D levels is thought to be associated with telomere length. The objective of the study is to investigate the association between vitamin D levels and leukocyte telomere length in healthy postmenopausal Turkish women. Detailed personal information was obtained from the participants. Blood samples were collected from healthy postmenopausal women (n=100) before vitamin D supplementation. The subjects were randomly divided into two. The first group (n = 50) received oral vitamin D3 supplementation at 50,000 IU / week for 2 months, and the other group (n = 50) received placebo. Serum Vitamin D levels and leukocyte telomere length by qPCR were compared in these groups before and after the supplementation. The mean age and body mass index of the subjects were 58.4 and 26.7 respectively. Changes in vitamin D levels are significant in both the placebo group (before treatment 11.8 ± 4.2 , after treatment 15.2 ± 5.9 , $p < 0.001$) and the vitamin D group (before treatment 11.3 ± 3.6 and after treatment 28.6 ± 10.3 , $p < 0.0001$). Telomere length was significantly increased in both the placebo group (before treatment $2^{\Delta Ct}$: 96, after treatment $2^{\Delta Ct}$: 244) and in the treatment group (before treatment $2^{\Delta Ct}$:97, after treatment $2^{\Delta Ct}$:180). The findings of the present study show that Vitamin D supplementation was associated with improved vitamin D levels in the postmenopausal women. Telomere length was significantly increased in vitamin D supplementation group and placebo group, indicating that the telomere length is not associated with vitamin D levels.

Keywords: 25(OH)D, Vitamin D deficiency, Leukocyte telomere length, Postmenapousal term, Telomere

1. GİRİŞ VE AMAÇ

D vitamini, güneş ışığı yardımıyla deride sentezlenen steroid bir hormondur. Hücre farklılaşması, proliferasyonu ve apoptoz gibi hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde rol oynar. Kemiklerin mineralizasyonu, kan-kalsiyum seviyelerinin kararlılığı, bağışıklık sistemi ve sinir iletimi üzerinde etki gösterir.

D vitamini eksikliği [25(OH)D<20 ng/ml/ 50 nmol/L] her yaşta ve cinsiyetten kişiyi etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. D vitamini eksikliği her yaşta görülebilmesine karşın, menopoza sonrası kadınlarda östrojen seviyelerinin düşmesiyle daha sık görülür.

D vitamini eksikliği osteoporoz, otoimmün hastalıklar, kardiyovasküler olaylar, depresyon ve kansere kadar birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. D vitamini seviyelerinin düzenlenmesinde kişiler arası farklılıklara sebep olan genetik belirteçlerin iyi tanımlanması, etkili ve kişiye özel tedaviye olanak sağlayacaktır.

Telomerler, kromozomun uç kısmında bulunan tekrarlayan DNA dizilerinden (TTAGGG) oluşur. Kromozom kararlılığını sağlayarak, genomun bütünlüğünü korur. Somatik hücrelerde yaşlanma ile birlikte telomer boyu kısalmaya başlar ve bu kısalma belli bir limite ulaştıktan sonra hücre ölüme gider.

Telomer kısalması, yaşla ve oksidatif stresle doğru orantılıdır. D vitamini, enflamasyonu azalttığı ve genomik kararlılıkta önemli rol oynadığı için yaşlanma ve telomer boyu ile ilişkilendirilmiştir.

Menopoza sonrası birçok hormonal ve metabolik değişiklikler olmaktadır. Telomer boyuna pozitif etkisi olan östrojenin etkisi azalmaktadır. Östrojen seviyelerinin düşmesiyle hücre yenilenmesi yavaşlamakta, telomer boyu kısalması hızlanmaktadır. Menopoza sonrası kadınlarda D vitamini takviyesinin telomer boyuna olası etkisi hücre yaşlanmasının geciktirilmesi ile ilgili yeni araştırmaların oluşmasına katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı menopoza sonrası sağlıklı kadınlarda D vitamini seviyelerinin telomer boyu ile ilişkisini ve D vitamini takviyesinin telomer boyuna etkisini araştırmaktır.

Bu tez çalışması D vitamini mekanizmasını daha iyi anlamamızı sağlayacak, bu mekanizmaya yönelik yeni çalışmalara yol açacak ve D vitamini takviyesi alan kişilerde bu tedavinin kişiye özgü şekilde verilmesini sağlayacaktır. D vitamini ile lökosit telomer uzunluğu arasındaki ilişkiyi detaylı bir şekilde ortaya koyarak literatüre katkıda bulunacak; yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı olarak ortaya çıkan hastalıkların araştırılmasına temel olacaktır.



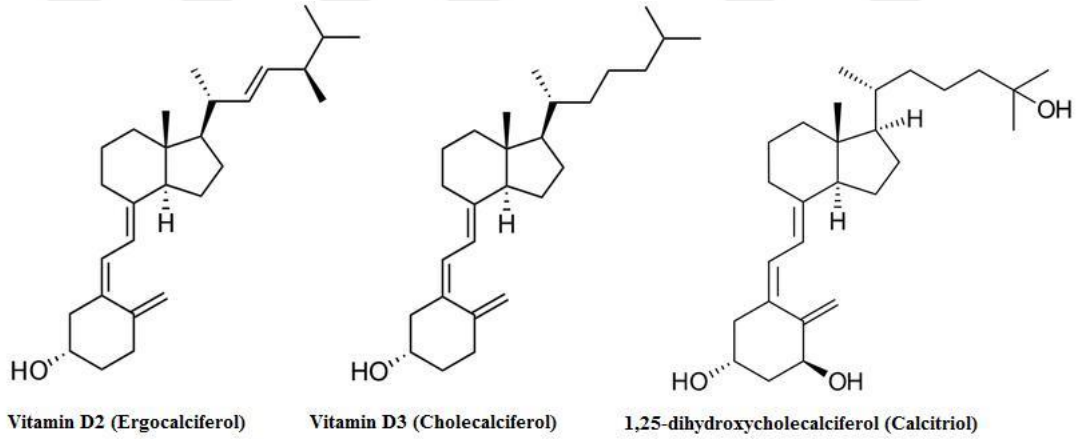
2. GENEL BİLGİLER

2.1. D vitamini

1920'lerde McCollum tarafından yapılan bir çalışmada oksitlenmiş morina balığı karaciğer yağında keşfedilmiş ve daha sonra D vitamini olarak adlandırılmıştır (1,2).

D vitamini, güneş ışığı yardımıyla deride sentezlenen; kemik, böbrek, bağırsak ve paratiroid gibi çeşitli hedef dokularda etki gösteren sekosteroid (B halkası açık steroid) bir hormondur (1, 3). Yağda çözünen vitaminler grubunda incelenir.

D vitamini birçok kimyasal yapıda bulunmaktadır. Bunlar arasında biyolojik ve kimyasal yönden en önemlileri kolekalsiferol (D3 vitamini) ve ergokalsiferol (D2 vitamini)'dür (Şekil 1).



Şekil 1. D vitamininin kimyasal formları

Kaynak: Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25 dihydroxivitamin D (3) analogs as immunomodulatory agents. Trends Mol Med 2002;8:174-9. (4).

2.2 D Vitamini Metabolizması

D vitamini besinlerden (%20) eksojen veya güneş ışığı ile deride (%80) endojen olarak sentezlenir.

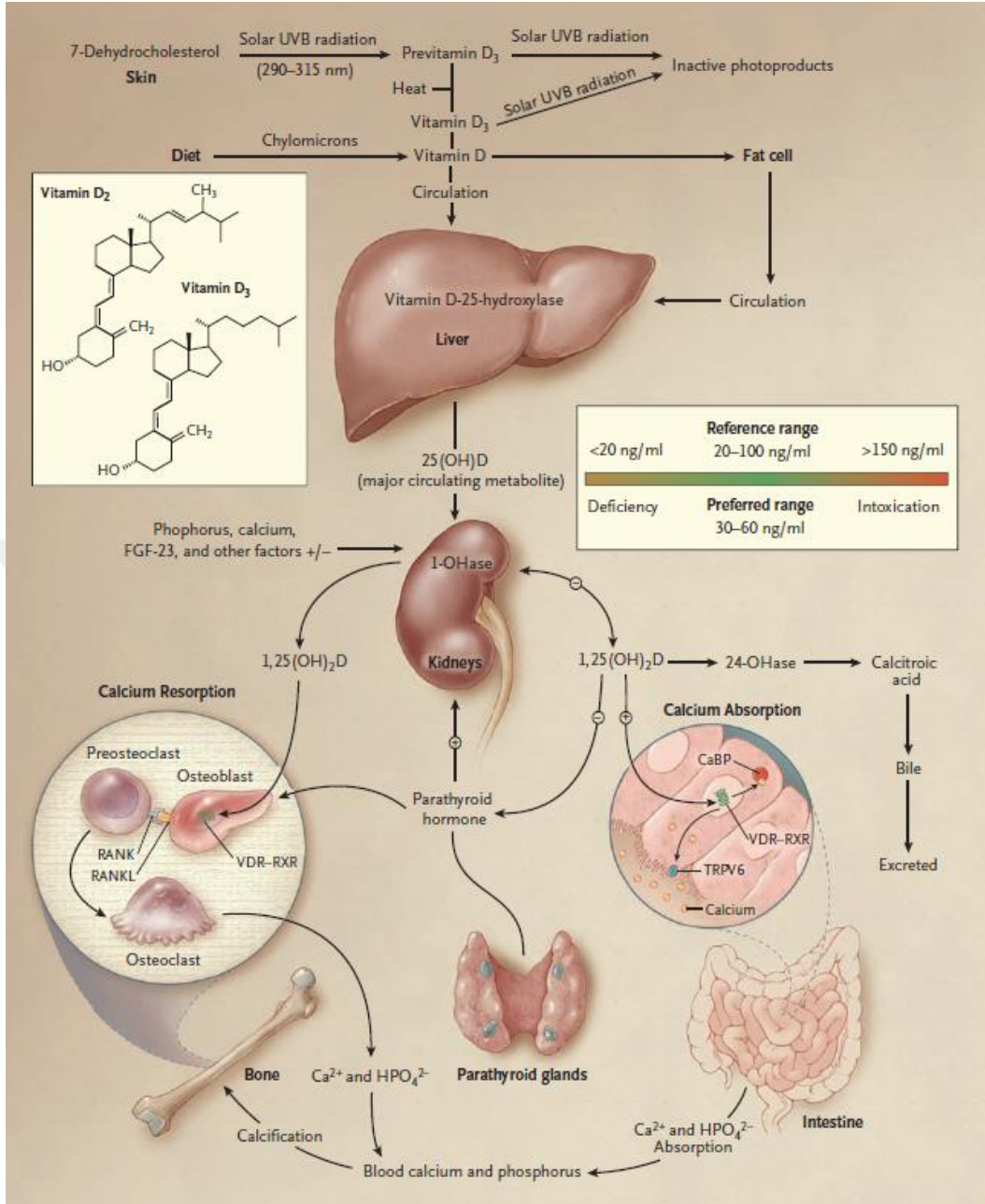
D vitamininin ana diyet kaynakları; bitkisel yağlar (D_2 kaynağı), yağlı balıklar (sardalya, somon, uskumru), süt ürünleri, yumurta ve dana karaciğeri gibi gıdalardır (1). Diyetle alınan D vitamini, bağırsaklarda enterositler tarafından emilir ve şilomikronlar içinde karaciğere taşınır (2).

D vitamininin sentezi ciltte bulunan (keratinositlerde) pro-vitamin D'nin güneş ve ultraviyole ışınların etkisiyle kolekalsiferole (Vitamin D_3) dönüşmesiyle gerçekleşir. Güneş ışığına maruz kalma sırasında, ultraviyole B (UVB) radyasyonu (290–315 nm), deride 7-dehidrokolesterol (pro-vitamin D) tarafından absorbe edilir, enzimatik olmayan fotokimyasal reaksiyonla pre-vitamin D_3 'ü oluşturur. Pre-vitamin D_3 doğal olarak dengesizdir ve sıcaklığa bağlı olarak hızlıca D_3 vitaminine dönüşür. Sentezlenen D_3 vitamini deri hücresinden dışarı atılarak dolaşıma geçer ve D vitamini bağlayıcı protein (VDBP) tarafından karaciğere taşınır.

Karaciğere getirilen D vitamini, VDBP'den ayrılır ve sitokrom P450 enzim kümesi tarafından metabolize edilerek hepatik 25-hidroksilaz (CYP27A1) prohormonu ile hidroksilasyonu sonucu $25(OH)D_3$ 'e dönüştürülür. Yarı ömrü yaklaşık 2-3 hafta olan $25(OH)D_3$, dolaşımdaki kararlı formudur. Ancak D vitaminin bu formu aktif değildir ve aktifleşmek için böbreklere taşınır.

$25(OH)D_3$, böbrek proksimal tübüllerindeki mitokondrilerde, 25-hidroksivitamin D-1 a-hidroksilaz (CYP27B1) enzimiyle aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D_3 ($1,25(OH)_2D_3$)'e hidroksillenir (Şekil 2) (2, 5-7). $1,25(OH)_2D_3$, 4-6 saat yarı ömre sahip, D vitaminin fizyolojik olarak aktif formudur (8).

D vitamini ve $1,25(OH)_2D_3$ 'nin sentezi, kalsiyum dengesi ile yakın ilişki içindedir ve parathormon (PTH), serum kalsiyum ve fosfor düzeyleri ile düzenlenir (6).

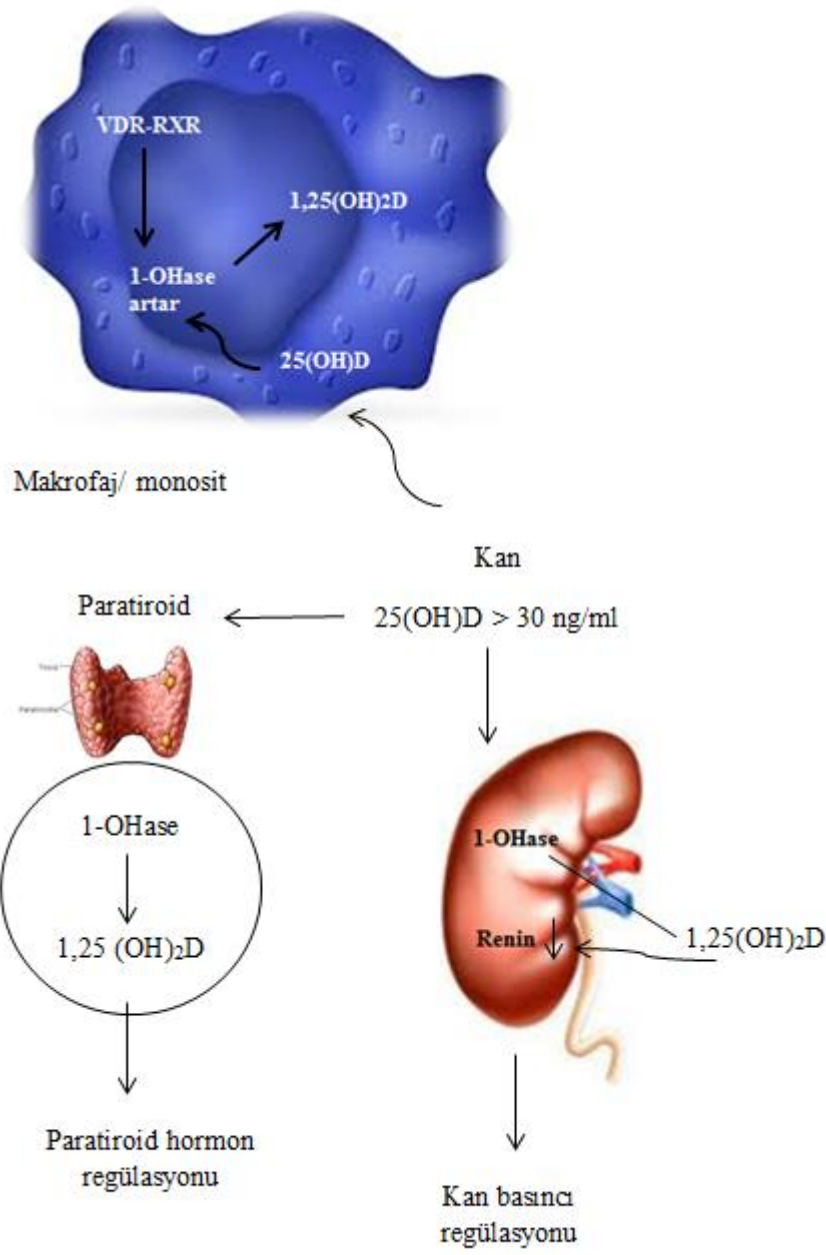


Şekil 2. D vitamini sentezi ve metabolizması

Kaynak: Holick MF. Vitamin D deficiency. N Engl J Med. 2007; 19;357(3):266-81 (6).

D vitamininin, kemik gelişimi ve mineralizasyonunda, kalsiyum-fosfat homeostazında (kalsiyum emiliminde %30, fosfor emiliminde %80 artış), bağışıklık sisteminde ve kalsiyum-fosforun absorpsiyon etkinliğini arttırmada önemli etkileri vardır. 1,25-dihidroksivitamin D, doğrudan veya dolaylı olarak, hücresel proliferasyonun, farklılaşmanın, apoptozun ve anjiyogenezin düzenlenmesinden sorumlu genler dahil olmak üzere 200'den fazla geni kontrol ederek hücrenin yaşamsal faaliyetlerinde rol oynar (Şekil 3) (2,6).

1,25(OH)₂D₃, güçlü bir immünomodülatördür. Makrofajlarda, dendritik hücrelerde (DC) ve aktive edilmiş B-T lenfositlerinde D vitamini reseptörleri bulunur ve serum 25-hidroksivitamin D, mililitre başına 20 ng'nin (litre başına 50 nmol) altına düştüğünde, monosit veya makrofajın doğal bağışıklık tepkisini başlatması engellenir (4,6,9).



Şekil 3. D vitamini metabolizması ve etki bölgeleri. Monosit/makrofajlarda D vitamininin etkileri

2.3 D vitamini Eksikliği

D vitamini eksikliği Dünya Sağlık Örgütü tarafından 25(OH)D<20 ng/ml/ 50 nmol/L olarak tanımlanan, her yaştan ve cinsiyetten kişiyi etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (10-13).

Derideki D₃ vitamini sentez etkinliği, epidermise giren UVB fotonların sayısına ve pro-vitamin D'nin deri depolarına bağlıdır. Cam, güneş kremi, kıyafetler ve cilt pigmenti UVB'yi absorbe eder ve D₃ vitamini sentezini engeller. Suboptimal diyet D vitamini alımı, çalışma koşullarının kapalı ortamlarda ve uzun süreli olması, çevre kirliliğinin artması, güneş ışığının kanserojen potansiyeli hakkındaki endişelerden kaynaklanan eşzamanlı artan güneş koruyucu kullanımı, sentez ve emiliminin azalması, kalıtsal bozukluklar D vitamini eksikliğinin sebepleri olarak gösterilmektedir (2, 6, 14).

2.4 D vitamini Eksikliğinin Hastalıklarla İlişkisi

Literatürde D vitamini eksikliği osteoporoz, otoimmün hastalıklar, diyabet, bulaşıcı hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, depresyon ve kanser gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (15).

D vitamini eksikliği, diyetle alınan kalsiyum (%20'si) ve fosforun (~%50-60'ı) etkili bir şekilde emilmesini önler. Kalsiyumun zayıf emilimi, serum iyonize kalsiyum seviyelerinde bir azalmaya neden olur. Bu sebeple kalsiyum metabolizmasını, osteoblastik aktiviteyi, matriks mineralizasyonunu, kemik modellenmesini ve kemik yoğunluğunu olumsuz etkilemektedir (5,14).

Düşük 25-hidroksi D (25OHD) sekonder hiperparatiroidizm ve kemik yıkımı artışı ile ilişkilidir. D vitamini eksikliği osteoporoz için önemli bir risk faktörü olarak bilinmektedir (15).

2.5 D vitamini Eksikliği ve Menopoz

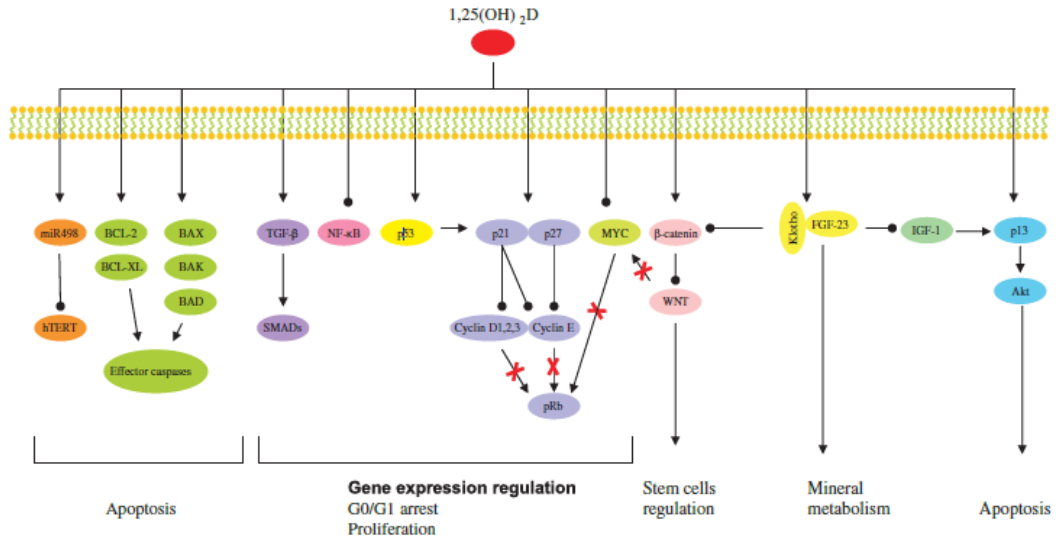
D vitamini eksikliği her yaşta görülebilmektedir. Ancak östrojen seviyesinin azalması, yaş ve yağ kütlesinin artması pre ve postmenopozal kadınlarda vitamin D eksikliğinin görülme riskini arttırmaktadır (16).

Kemiklerde VDBP ifadesi östrojene bağımlı olduğu için menopoz, vitamin D gereksiniminde önemli bir geçişi temsil etmektedir (17). Menopoz sonrası dönemde estradiol seviyelerinin düşmesi D vitamini ve DBP seviyelerini de etkilemektedir. Premenopozal kadınlarda VDBP ve 25(OH)D3 seviyeleri postmenopozal kadınlara göre anlamlı derecede yüksek ve estradiol seviyeleri VDBP ($p<0.01$) ve 25(OH)D3 ($p<0.01$) ile korele bulunmuştur (18). Ayrıca etnik farklılıklar VDBP seviyesini ve bağlanma kapasitesini etkilemektedir.

Östrojen seviyesinin düşmesiyle kemik matris oluşumunda ve kemik mineralizasyonunda belirgin bir azalma meydana gelir. Bu sebeple menopoz sonrası kadınlarda osteoporoz riskinde artış gözlenmektedir (16, 19).

2.6 D vitaminin Yaşlanmadaki Rolü

D Vitamini, hücre büyümesinin düzenlenmesi, proliferasyon (TGF- β , NF- κ B, p53, p21, p27 ve MYC), apoptoz (hTERT, BCL-2, BCL-XL, BAX, BAK, BAD ve p13), kök hücre regülasyonu (Wnt), mineral metabolizması (Klotho-FGF-23) ile ilgili çeşitli yolları etkiler (Şekil 4).



Şekil 4. D vitaminin hücrenin yaşamsal faaliyetleri üzerindeki etkileri

Kaynak: Pusceddu I, Farrell CJ, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. Clin Chem Lab Med. 2015 Oct 1;53(11):1661-78. (20).

D Vitamini, siklinler, sikline bağımlı kinazlar (CDK'lar) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü (CDK'l'ler) p21 ve p27 gibi hücre döngüsünde yer alan bir dizi proteini düzenleyerek hücrenin G1/S faz geçişinde rol oynar. Ayrıca c-myc' nin bazı hücre hatlarında D vitamini tarafından down-regüle edildiği ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olduğu bulunmuştur (20).

Transkripsiyon faktörü NF-κB, oksidatif stresi, iltihaplanma ve yaralanmaya karşı hücrel yanıtı artırır. D vitamini, insan lökositlerinde NF-κB aktivitesini azaltarak, enflamatuvar yanıt üzerinde inhibe edici etki gösterir.

Mitokondriyal radikal oksijen birikimi oksidatif stresi artırır. D vitamini, H₂O₂'nin H₂O'ya dönüşümünü kataliz eden glutasyon peroksidaz ekspresyonunu artırarak radikal oksijen moleküllerinin birikimini engelleyerek ve oksidatif stresi azaltır.

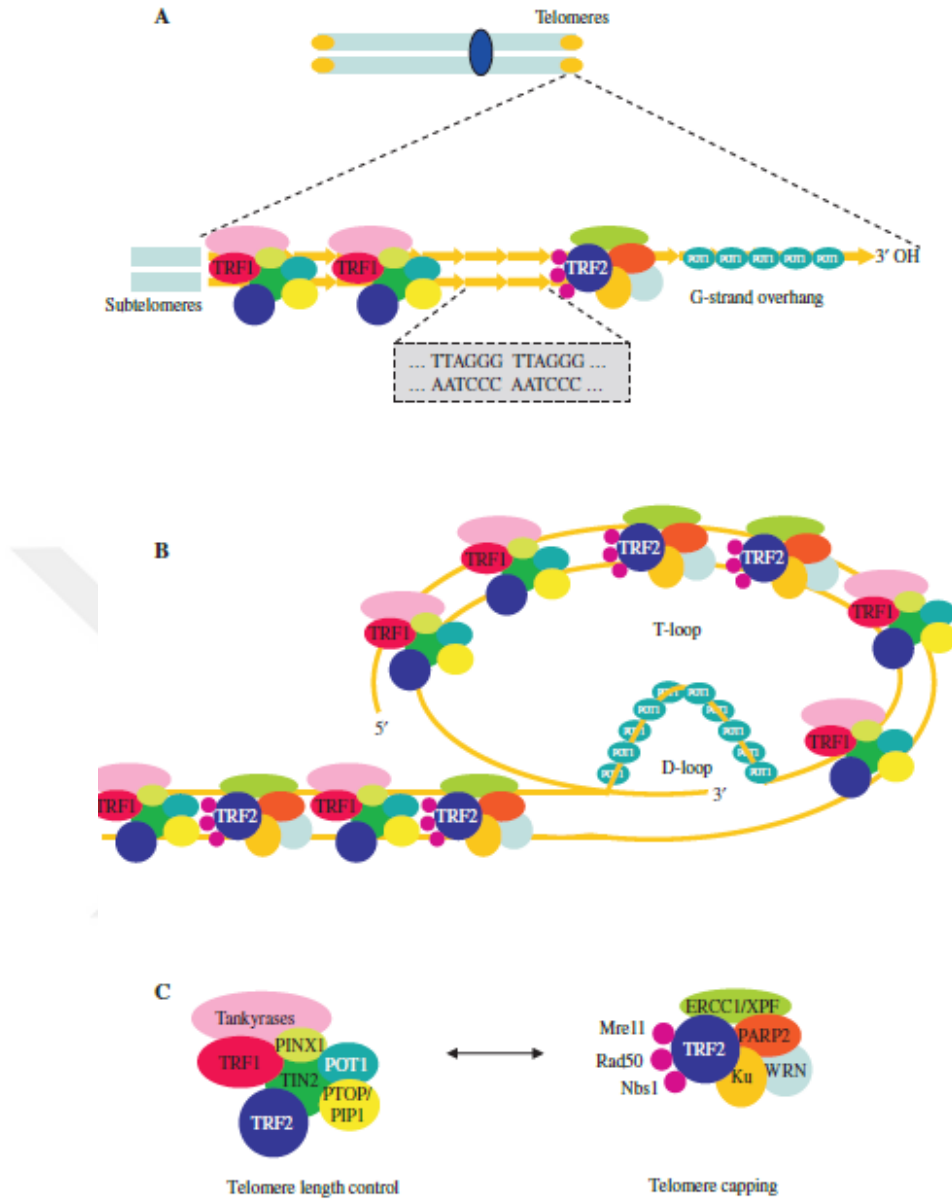
D vitamininin apoptozu indüklediği mekanizma tam olarak anlaşılmasa da, BCL-2 ailesi üyeleri üzerinden sitokrom c salınımını düzenleyerek apoptozu kontrol ettiği rapor edilmiştir (20).

2.7. Telomer Yapı ve Fonksiyonu

Yaşlanma, yaşa bağlı hastalıklar ve ölüm riskinin artmasına neden olan ilerleyen organ işlevlerinin azalması ile karakterize çok faktörlü bir biyolojik olaydır. Genomik bütünlüğün bozulması ve genomik kararsızlık hücresel düzeyde yaşlanmada kritik unsurlardır. İlk olarak 1938’de Hermann Müller tarafından tanımlanan telomerler, genomik stabilite ve hücresel yaşlanma için kritik öneme sahiptir (20).

Telomer, telomerik proteinler ve tekrarlayan DNA dizilerinden oluşan, kromozomların uçlarını yıpranmadan ve diğer kromozomlarla füzyondan koruyarak kromozom kararlılığını sağlayan nükleoprotein yapılardır. İnsanlarda telomerik DNA sekansı, yaklaşık 10-15 kilobaz uzunluğunda tandem TTAGGG tekrarlarından oluşur (20). Telomerik DNA, çift iplikçiklidir ancak 3’ ucunda G nükleotidince zengin tek iplikli çıkıntı (150-200 bp) vardır (Şekil 5.A). G-iplikçik çıkıntısı, telomeri korumak için çift zincir bölgesine t-loop oluşturur. T-loop kapalı konfigürasyonu, kromozom için bir başlık görevi görür (Şekil 5.B).

TRF1 kompleksi, telomerazın telomer sekansına erişimini düzenleyen telomer uzunluğu kontrolünde rol oynar. TRF2 kompleksi ise, G iplikçik çıkıntısının bozulmadan korunmasını ve telomerik füzyonların önlenmesinde rol oynar.

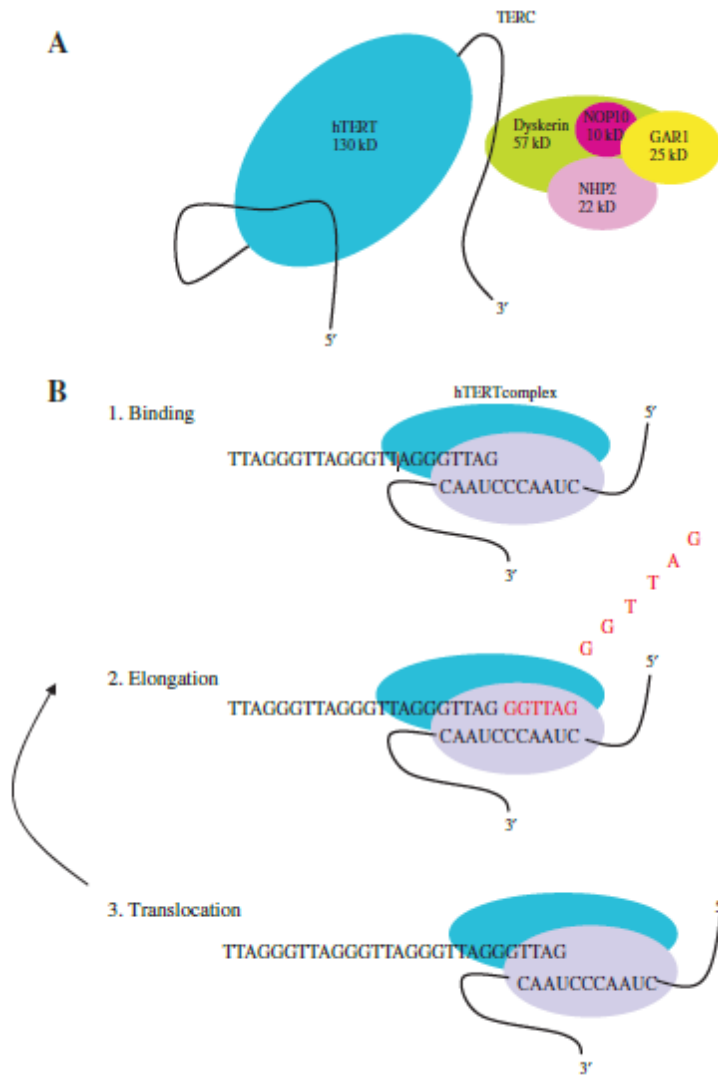


Şekil 5. Telomer yapısı

Kaynak: Pusceddu I, Farrell CJ, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. Clin Chem Lab Med. 2015 Oct 1;53(11):1661-78 (20).

DNA polimerazının 3' ucunun kopyalamaması nedeniyle, her hücre bölünmesinde 50-200 bp telomerik sekans kaybı olur. Ancak telomeraz enzimi ve “T-loop” yapısında bulunan telomerik proteinler uçları replike ederek bu kısalmayı önler.

Telomeraz, ters transkripsiyon aktivitesine sahip bir ribonükleoproteindir ve kromozom uçlarına de novo telomer heksanükleotid tekrarı ekler (Şekil 6). Telomeraz enzimi, insan telomeraz ters transkriptaz enzimi (hTERT), telomeraz RNA bileşeni (TERC) ve Dyskerin'den meydana gelir (Şekil 6.A). Telomeraz, kromozom uçlarına de novo telomer heksanükleotid tekrarını üç aşamada; 1) hTERT kompleksinin tanınması ve bağlanması; 2) tamamlayıcı nükleotitler ekleyerek uzama; 3) hTERT kompleksinin translokasyonu ekler (Şekil 6.B).



Şekil 6. Telomeraz yapısı ve etki mekanizması

Kaynak: Pusceddu I, Farrell CJ, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. Clin Chem Lab Med. 2015 Oct 1;53(11):1661-78 (20).

Yaşlanma ile birlikte somatik hücrelerde ve yetişkin kök hücrelerde telomerez aktivitesi azalır ve telomer boyu korunamaz. Yaşlanmayla telomer boyu Hayflick limiti denilen belli bir uzunluğa kadar kısalmır. Bu limitten sonra hücre apoptoza gider (20, 21).

Telomerlerin “T-loop” yapısını koruyan telomere bağlanan proteinler bulunmaktadır. Bu proteinlerden birinin eksikliği telomerin yapısını bozarak kısalmasına neden olabilir. Dolayısıyla telomerin kısalması sadece telomerez aktivitesine bağlı değildir, farklı faktörler de telomerin kısalmasına sebep olabilir. Oksidatif stress, enflamasyon ve hücre proliferasyonu telomer kısalmasının artışı ile ilişkilendirilmiştir (21, 22).

2.7.1 Lökosit telomer uzunluğu ve menopo

Östrojenin varlığı telomerez yapımını uyarır ve reaktif oksijen radikallerin azalmasına neden olur. Menopoz sonrası kadınlarda östrojen seviyelerinin düşmesi ve hücre yenilenmesinin yavaşlamasının ve telomer boyu kısalmasını hızlandırmakta etkili olduğu rapor edilmiştir (23). Menopoz ve telomer uzunluğu ile ilgili araştırmalar çeşitlidir. 65 yaş sonrası 486 kadında yapılan bir çalışmada da telomer uzunluğunun menopoza girme yaşı ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (24).

Östrojenin telomer uzunluğuna etkisi daha geniş gruplarda çalışılması gereken bir konudur. Çünkü menopozdaki kadınlarda eksojen östrojenin verilmesinin telomer uzunluğunda bir etkisi olmadığı bulunmuş (25), endojen östrojenin de telomer uzunluğunda eksojen östrojenden nasıl farklı bir etkisi olduğu halen bilinmemektedir.

2.7.2. Lökosit telomer uzunluğu ve D vitamini ilişkisi

Lökosit telomer uzunluğu (LTU), kişinin hayatı boyunca maruz kaldığı oksidatif stres ve enflamasyonun kümülatif bir indekssidir (26). Oksidatif stresin ve enflamatuvar yanıtın artması lökosit bölünmesini artırarak LTU'nun kısalmasına sebep olur. Ayrıca, proinflamatuvar yanıtı tetikleyen genetik ve çevresel faktörler (sigara içme, obezite, sedanter yaşam) oksidatif stres kaynağıdır ve LTU kısalması ile ilişkilidir (26).

Deneysel çalışmalarda, D vitamini metabolitlerinin, IL-6 ve TNF-a içeren insan monositleri ile enflamatuvar sitokinlerin üretimini inhibe ettiği gösterilmiştir (27). D vitamininin enflamatuvar yanıt üzerindeki inhibe edici etkisinin, oksidatif stres ve enflamasyonla artan LTU kısalmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (20, 26, 28).

Lökositlerde telomerlerin kısalması, D vitaminin koruyucu olduğu birçok çeşitli kronik hastalıkla ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirildiğinden (29, 30). D vitaminin, telomer bütünlüğünün korunmasında etkili olabileceği düşünülmektedir (31).

Vitamin D reseptörü (VDR), $1(25)OH_2D_3$ 'ü özgül olarak bağlayan ve hücre içi etkisine aracılık eden bir hormon reseptörüdür. VDR reseptörleri, enterositler, miyositler, immün hücreleri (T ve B lenfositleri, makrofajlar, dendritik hücreler), nöronlar ve glial hücreler gibi birçok hücrede bulunur (6). Lökositlerde vitamin D reseptörü bulunduğundan, D vitamini ile lökosit telomer uzunluğu arasında ilişki olabileceği düşünülmektedir (32).

Sonuç olarak; D vitamininin hücre proliferasyonu, yaşlanma ve apoptozdaki rolünden dolayı telomer uzunluğu üzerine etkisi olabileceği düşünülmektedir. D vitamini replasmanının nükleer faktör-kB aktivitesini azalttığı, antienflamatuar IL10 düzeylerini yükselttiği ve proenflamatuar interlökinleri azalttığı bilinmektedir (4). Ancak D vitamini telomer seviyesi ile ilişkili olmasına rağmen D vitamini replasmanının telomer boyu üzerine faydası olup olmadığı da bilinmemektedir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu tez çalışmasında kullanılan cihaz ve malzemeler Tablo 1 ve 2’de, kimyasal maddeler ise Tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan cihaz ve malzemeler

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	Marka/ Model
Derin Dondurucu Buzdolabı (-20°C ve -80°C)	Kirsch Medical
+4°C Buzdolabı	Kirsch Medical
Termal Döngü Cihazı	BIORAD
Real-Time PCR Cihazı	BIORAD CFX 96 QPCR
Hassas Analitik Terazı	AUW/220D Shimadzu
Soğutmalı ve soğutmasız santrifüjler	Nüve-NF400, NF-046 ve 1200R modelleri
Jel Görüntüleme cihazı	1708280 Chemidoc MP System BioRad
Santrifüj	Thermo Fischer Scientific
Çeşitli Hacimlerde Otomatik Pipetler	Thermo Scientific
Etüv (37°C)	Hera Term Oven Thermo Scientific
Otoklav	Nüve SteamArt
pH Metre	Thermo Scientific
Vorteks	VWR VV3
Çalkalayıcı ısı Bloğu	Witeg Wisd Laboratory Instruments
200, 600, 1500 µl hacimli Eppendorf tüpler	Axygen
Çeşitli Hacimlerde Pipet Uçları (0,1-1000 µl)	Jet-Biofil
5, 10 ve 25 ml hacimli Steril Serolojik Pipetler	Axygen

Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemeler (devamı)

Kullanılan Cihaz ve Malzemeler	Marka/ Model
Çeşitli Cam Malzemeler	Isolab
Biyogüvenlik Kabini	Safe 2020 Thermo Scientific
Mor kapaklı (EDTA'lı) kan alma tüpü (10 cc)	Vacusera
Sarı kapaklı kan alma tüpü (8 cc)	Vacusera
XPT cihazı	ADVIA Centaur
15 ml ve 50 ml falkon tüp	SPL
Spektrofotometre	NanoDrop™ 2000/ 2000c
qPCR için 96 well plate	Axygen

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Firma/ Kodu
Devit-3® Oral Damla 50.000 I.U/15 ml	Deva
10X PBS Buffer	GeneMark (GB07)
Histopaque®	Sigma-Aldrich, 1077
Quick-DNATM Miniprep Plus Kit	Zymo Research, D4068
Primerler	Sentegen
SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit	Bioline, BIO-98020
Potasyum klorür (KCl)	Sigma, 7447-40-7
Hidroklorik asit	Sigma, 7647-01-0
(Hidroksimetil)aminometan (Tris)	Sigma, 252859
DL-Dithiothreitol (DTT) (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	GE Healthcare, 17-1318-02
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma, 276855
6X DNA Loading Dye	Thermo Scientific, #R0611
HyperLadder™ (50bp)	Bioline, BIO-33054
Etanol (C ₂ H ₆ O)	Merck, 111727

Bu tez çalışması Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Değerlendirme Kurulu tarafından 14 Ocak 2016 tarihinde incelenmiş ve etik açıdan uygun bulunup (ATADEK 2016/1) (EK 1), 2017-2019 yılları içinde Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışma planı

Telomer uzunluğunun cinsiyetle ve östrojenle ilişkisi düşünülerek östrojenin etkisinden bağımsız bir popülasyon oluşturmak ve östrojenin karıştırıcı faktör etkisinin dışlanması için menopoza sonrası kadınlar çalışma grubu olarak belirlendi (33).

Kuvvet analizinde tip 1 hata %5, tip 2 hata %20 ve beklenen telomer uzunluğu farkı 2 grup arasında %10 olarak alındığında örnek büyüklüğü her grup için minimum 38 olarak bulundu.

Bu tez çalışması, kontrollü çalışma olarak planlandı, İstanbul Medeniyet Üniversitesi Göztepe Eğitim-Araştırma Hastanesi Endokrinoloji Polikliniği'ne ve Balıkesir Manyas sağlık ocağına başvuran, sağlıklı, D vitamini takviyesi hiç kullanmamış veya 1 senedir kullanmayan, D vitamini seviyeleri 20 ng/ml'nin altında olan, aydınlatılmış onam formunu (EK 2) imzalayan, gönüllü 100 postmenopozal (en az bir senedir adet görmeme ve doktor tarafından menopoza teşhisi almış olmak) kadın çalışmaya dahil edildi. Ayrıca çalışmaya katılan her gönüllüden demografik bilgilerini, sigara, alkol kullanımı, egzersiz ve diyet alışkanlıklarını ve geçirdiği hastalıkları sorgulayan bir sağlık ve yaşam tarzı anketi (EK 3) doldurması istendi.

Çalışmaya dahil edilen kişilerde lökosit telomer uzunluğu bakıldı ve grup (n=100) rastgele ikiye ayrıldı. Birinci gruba (n=50) 2 ay boyunca 50 000 IU/hafta dozda oral D3 vitamini takviyesi, diğer gruba (n=50) plasebo olarak ayçiçek yağı verildi (34-37). Katılımcılara çalışma düzeni anlatıldı. Tek kör çalışma olacak şekilde düzenlenen çalışmada araştırma kapsamına alınan deneklere hangi yöntemin uygulanacağı (tedavi/ plasebo) araştırmacılar tarafından bilinip katılımcılar tarafından bilinmiyordu. Çalışma sonrasında plasebo alan gruba tedavi grubuna verildiği miktarda D vitamini preparatları ücretsiz olarak verildi.

2 ay süren D vitamini tedavisi ve bir ay bekleme süresi sonucunda tüm katılımcılar çağırılıp D vitamini seviyeleri ve lökosit telomer uzunluklarına tekrar bakıldı. Tedavi alanlarda ve plasebo alanlarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası 25(OH)D ölçümleri Acıbadem-LabMed laboratuvarlarında yapıldı.

Çalışma grubundan dışlanma kriterleri aşağıdaki gibi belirlendi:

1. Serum D vitamini seviyelerini düşüren herhangi bir hastalığı bulunan ve ilaç kullanan kişiler
2. Megaloblastik anemi teşhisi almış kişiler
3. D vitamini kullanan veya bir sene içinde D vitamini replasman tedavisi alan kişiler
4. Tiroid ve paratiroid hastalığı bulunan kişiler
5. Kanser kimyasal tedavisi gören kişiler
6. Karaciğer fonksiyon bozukluğuna sebep olan karaciğer hastalığı bulunan kişiler
7. Böbrek hastalığı bulunan kişiler
8. Yaygın deri hastalığı bulunan kişiler
9. Aşırı stres/ depresyon yaşayan kişiler
10. Malabsorbsiyon/ malnutrisyon
11. Akut/kronik enfeksiyon bulunan kişiler
12. Kronik enflamasyon bulunan kişiler
13. Yüksek doz statin tedavisi alan kişiler
14. Sıkı vegan diyeti uygulayan kişiler
15. D vitamini seviyelerini düşüren bilinen herhangi bir mutasyonu bulunan kişiler
16. Bilinen kalıtsal hastalığı olan kişiler
17. Aydınlatılmış onam formunu imzalamayarak çalışmaya katılmayı reddeden kişiler

3.2.2. Kan ve serum eldesi

Çalışma grubundaki kişilerden kan örnekleri, D vitamini ölçümleri için sarı kapaklı jelli tüplere (8cc), genetik ölçümler için mor kapaklı EDTA'lı tüplere (10cc) alındı.

Periferik venden kan alınmasından sonra 1 saat içinde, sarı kapaklı jelli tüpler 3000 rpm'de 6 dakika santrifüjlenerek serum elde edildi ve serum 1.5 ml'lik Eppendorf tüplere porsiyonlanarak D vitamini ölçümleri için -80°C'de saklandı.

Genetik analizler için alınan mor kapaklı (EDTA'lı) tüplere kan alınmasından sonra, 6 saat içinde Ficoll-Paque gradient santrifügasyon yöntemi kullanılarak periferik kandan mononükleer hücre (PBMC) izole edildi.

3.2.3. Serumdan 25(OH)D₃ ölçümü

25(OH)D'nin yarı ömrü uzun olduğu ve dolaşımda 1.25(OH)₂D' e kıyasla daha kararlı olduğu için D vitamini seviyeleri olarak 25(OH)D ölçümleri kabul edildi. D vitamini seviyelerinin biyokimyasal ölçümleri, Acıbadem Üniversitesi LAB-MED laboratuvarında rutin ve araştırmada kullanılmak için geliştirilen ADVIA Centaur XPT cihazında CLIA yöntemi ile yapıldı.

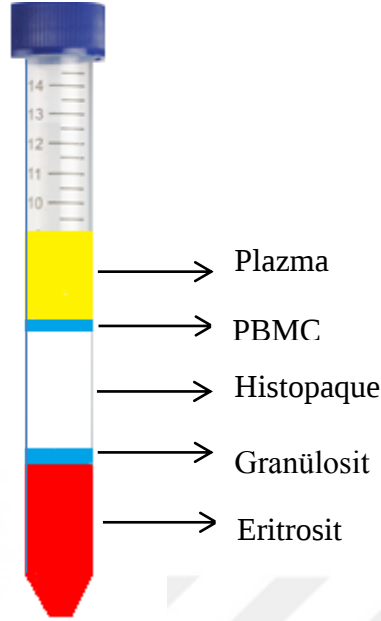
Örnekler ADVIA centaur Vit D testi (y) ile ID-LC-MS/MS 25(OH) Vitamin DRMP (x) arasındaki ilişki Dening regresyonu kullanılarak Centaur VitD =0.99 (ID LC-MS/MS)+0.53 ng/ml (1.33 nmol/l), r=0.96 denklemiyle LAB MED tarafından standardizasyonu yapıldı.

D vitamini ölçümleri için Eppendorf tüpte -80°C’de saklanan serum örnekleri cihaza yerleştirilmeden önce 1000 g’de 10 dakika santrifüj edildi, kabarcık içermemesine dikkat edilerek küvetlere aktarıldı ve 15 saniye inkübe edildi. 200 µl yardımcı paket reaktifi ile 37°C’de 4.5 dakika, 50 µl lite reaktif ile 37°C’de 5.5 dakika, 100 µl katı faz reaktifi ve 50 µl yardımcı kuyucuk reaktifi ile 37°C’de 3 dakika inkübe edildi. Katı fazın karışımdan ayırarak reaktifin aspirasyonu cihaz tarafından gerçekleştirildi ve küvetler yıkandı. Kemilüminesans reaksiyonu başlatıldı ve sonuçlar rapor edildi.

3.2.4. Periferik kandan mononükleer hücre (PBMC) izolasyonu

Mor kapaklı (EDTA’lı) tüp yavaşça 6-8 kez alt üst edilerek karıştırıldı. 15 ml’lik falkona periferik kan ve aynı oranda (1:1) PBS (1X) eklendi. Temiz bir 15 ml falkona 1:1.5 oranında Histopaque doldurulup, kan+PBS karışımı yavaşça falkonun duvarından akıtarak Histopaque’ın üzerine aktarıldı. 20°C’de 400 g’de 30 dakika (ACC:9, DEC:1) santrifüj edildi.

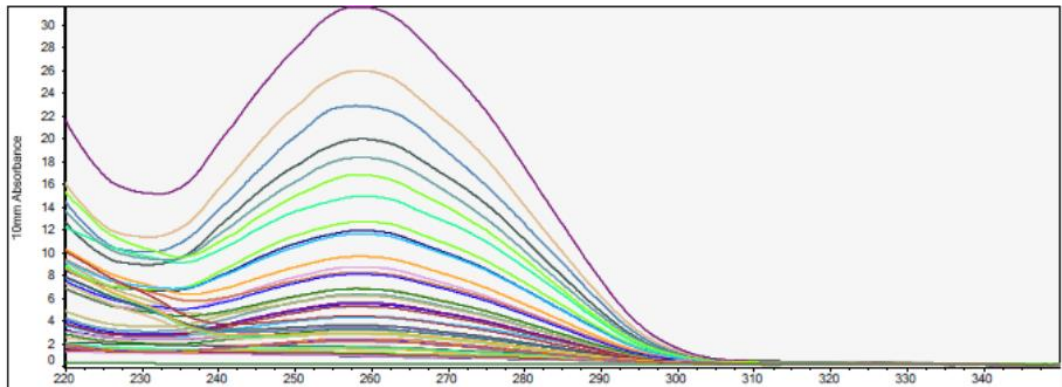
Ficoll-Paque gradient santrifügasyon yöntemiyle oluşturulan ara faz (Şekil 7) temiz bir 15 ml falkona alındı. Ayrılan hücrelere PBS (1X) eklenerek, 20°C’de 400 g de 8 dakika santrifüj edildi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Yıkama sonrası oluşan süpernatant atıldı ve pellet 500 µl 1X PBS’te çözülerek 1.5 ml Eppendorf tüpe alındı. 20°C’de 400 g’de 8 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Elde edilen pellet -80°C’de saklandı.



Şekil 7. Ficoll-Paque gradient santrifügasyon yöntemiyle ayrıştırılan fazlar

3.2.5. DNA izolasyonu

Periferal kandan izole edilen mononükleer lökositlerden Quick-DNA™ Miniprep Plus Kit (Zymo Research, USA) kullanılarak total DNA izole edildi. DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonu NanoDrop™ 2000/2000c spektrofotometresi ile ölçüldü. Ölçüm sonucunda A260/280 oranı 1.8 nm ile 2 nm, A260/230 oranı ise 2 nm ile 2.2 nm arasında olan DNA örnekleri çalışmada kullanılmak üzere seçilerek -20°C’de saklandı (Şekil 8).



Şekil 8. NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre ile ölçülen DNA örnekleri

3.2.6. Lökosit telomer uzunluğu tayini

Lökosit telomer uzunluğunun tayini için diğer metotlara (Terminal Restriksiyon Fragman Assay (TRF), FISH) göre az miktarda DNA ile yüksek çıktılı sonuçlar alınabilen qPCR metodu kullanıldı (38, 39). Dizayn edilen primerlerin telomer bölgesinin C ve G nükleotidlerine bağlanacak ancak primer dimerlerini engelleyecek şekilde mismatch bölgeleri taşıması bu metodun temel prensibidir.

Telomere özel primerlerle amplifikasyon (tPCR) kantitatif olarak ölçüldü ve kontrol olarak kullanılan tek kopya genin aynı primerlerle amplifikasyonu (sPCR) ile kıyaslanarak bir oran bulundu. Her örnek için telomer/ tek kopya gen (T/S) oranı alındı. Tek kopya gen olarak 36B4 kullanıldı. T/S oranına göre telomer boyunun relatif uzunluğunu bulmak için 36B4'teki S kopya numaraları her örnekte aynı olması için kontrol olarak β -globin geni (referans gen) kullanıldı (39).

Telomer, 36B4 ve β -globin primer dizileri ve kullanılan konsantrasyonlar Tablo 4'te verilmiştir. qPCR, SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit (Bioline, USA) kullanılarak BIORAD CFX96 RT-qPCR cihazında gerçekleştirildi. Çoğaltma sırasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek ve daha objektif sonuçlar almak için 900 mM Tris-HCl, 2 M KCl, 300 mM DTT ve %60 DMSO kullanıldı (39).

PCR ürünü qPCR'ın her döngüsünde yaklaşık olarak iki katına çıktığından, T/S oranı $[2^{Ct(telomer)}/2^{Ct(36B4)}]^{-1}=2^{-\Delta Ct}$ olarak hesaplandı. Referans DNA ile karşılaştırıldığında, tek kopya gen için nispi oran (36B4 / β -globin) ~1.0 olarak beklendi (39).

Hem D vitamini alanlarda hem de plasebo alanlarda telomer uzunluğu değişimi için aşağıdaki metot kullanıldı (40).

$$Ct(\beta \text{ globin})/ Ct(36B4) = 1$$

$$[2^{Ct(telomer)}/2^{Ct(36B4)}]^{-1}=2^{-\Delta Ct}$$

$$\text{Tedavi öncesi } \Delta Ct_1 = Ct \text{ ort Tel} - Ct \text{ ort } 36B4$$

$$\text{Tedavi sonrası } \Delta Ct_2 = Ct \text{ ort Tel} - Ct \text{ ort } 36B4$$

$$\text{Tedaviye bağlı katsayı değişimi (fold change): } 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

Standart sapmaların hesaplanması (https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_042380.pdf Erişim tarihi: 16.05.2019)

Duplike çalışma sırasında her örnek için Ct değerlerinin standart sapmaları hesaplandı. ΔCt hesaplanırken standart sapmalar aşağıdaki formüle göre hesaplandı;

$$\Delta Ct (\text{Tedavi öncesi}) = Ct \text{ örnek 1} - Ct \text{ referans}$$

$$\text{Standart sapma } \Delta Ct = (S1^2 + S2^2)^{1/2}$$

Örneğin;

$$\Delta Ct (18.84 \pm 0.37) - (22.97 \pm 0.28) = -4.13 \pm 0.46$$

$$\Delta Ct (\text{Tedavi sonrası}) = Ct \text{ örnek 1} - Ct \text{ referans}$$

$$\text{Standart sapma } \Delta Ct = (S1^2 + S2^2)^{1/2}$$

$\Delta \Delta Ct$ 'nin standart sapması aynı şekilde bulunmuştur. $2^{\Delta \Delta Ct}$ nin ortalamasının hesaplanmasında şu formül kullanılmıştır;

$$2^{\Delta \Delta Ct} = [2^{(\Delta \Delta Ct + \text{standart sapma})} + 2^{(\Delta \Delta Ct - \text{standart sapma})}] / 2$$

Tablo 4. Telomer, 36B4 ve β -globin primer dizileri

Primerler	Primer dizileri	Konsantrasyon
Tel 1	GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTG	5 μ M
	AGGGTGAGGGT	
Tel 2	TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTA	20 μ M
	TCCCTATCCCTA	
36B4u	CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC	6 μ M
36B4d	CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA	12 μ M
HBG 1	GCTTCTGACACAACGTGTCTCACTAGC	10 μ M
HBG 2	CACCAACTTCATCCACGTTCCACC	10 μ M

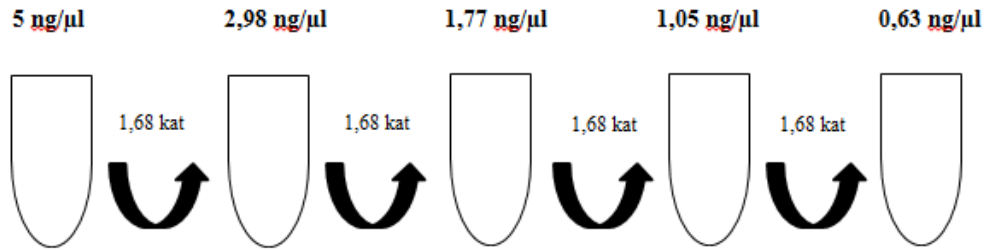
Tablo 5. Telomer primerleri için qPCR inkübasyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
95°C	10 dakika	1
95°C	15 saniye	22
54°C	2 dakika	

Tablo 6. 36B4 ve β -globin primerleri için qPCR inkübasyon koşulları

Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü
95°C	10 dakika	1
95°C	15 saniye	
58°C	1 dakika	30

Protokolde uygun DNA miktarını bulabilmek için 1.68 kat seri dilüsyonlar yapılarak telomer, 36B4 ve β -globin primerlerine qPCR’da standart oluşturuldu (Şekil 9). Her örnek duplike çalışıldı.



Şekil 9. Telomer, 36B4 ve β -globin primerleri için seri dilüsyon protokolü

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Grubu Klinik ve Biyokimyasal Sonuçları

Çalışmaya sağlıklı, D vitamini takviyesi hiç kullanmamış veya 1 senedir kullanmayan, D vitamini seviyeleri 20 ng/ml'nin altında olan, 100 postmenopozal kadın dahil edildi.

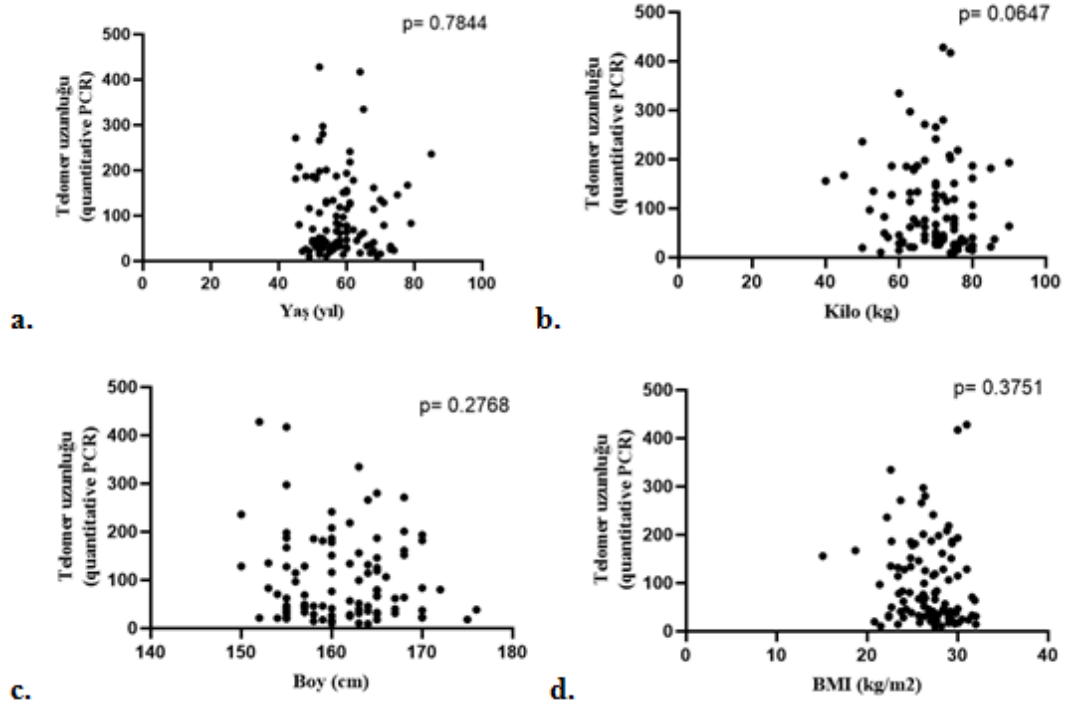
Çalışma grubundaki ortalama serum 25(OH)D 11.3 ± 3.6 ng/ml iken, plasebo grubundaki ortalama değer 11.8 ± 4.2 ng/ml bulundu. Tablo 7'de gösterildiği gibi, bu iki deney grubu, klinik ve biyokimyasal özellikleri bakımından karşılaştırıldı. One sample Kolmogorov-Smirnov testi ile parametrelerin normal dağılıp dağılmadığı araştırıldı. Yaş, boy, VKİ, menopoz yaşı, tedavi öncesi vitamin D, tedavi sonrası vitamin D, tedavi sonrası telomer uzunluğu normal dağılım gösterirken, kilo ve tedavi öncesi telomer uzunluğu normal dağılım göstermediği bulundu.

Tablo 7. Çalışmaya dahil edilen bireylerin klinik ve biyokimyasal özellikleri

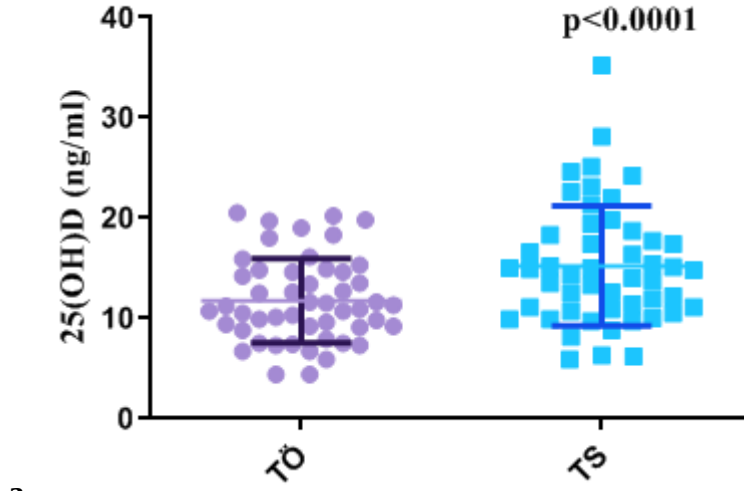
Parametreler	Tüm grup	Grup		p değeri*
		D vitamini kullananlar (n= 49)	Plasebo kullananlar (n= 48)	
Yaş (yıl)	58.4 ± 8.0	59.2 ± 8.6	57.7 ± 7.4	NS
Kilo (kg)	69.6 ± 9.1	68.8 ± 9.5	70.4 ± 8.6	NS
Boy (cm)	161.2 ± 5.5	161.4 ± 5.8	161.1 ± 5.2	NS
VKİ (kg/m ²)	26.7 ± 3	26.4 ± 3.2	27 ± 2.7	NS
Menopoz yaşı	47.5 ± 4	47 ± 4.9	48.1 ± 4.3	NS
Tedavi öncesi D vitamini düzeyi	11 ± 3.9	11.3 ± 3.6	11.8 ± 4.2	NS
Tedavi sonrası D vitamini düzeyi	22 ± 10.7	28.6 ± 10.3	15.2 ± 5.9	<0.0001

* T-Test (iki kuyruklu dağılım) ile belirlendi.

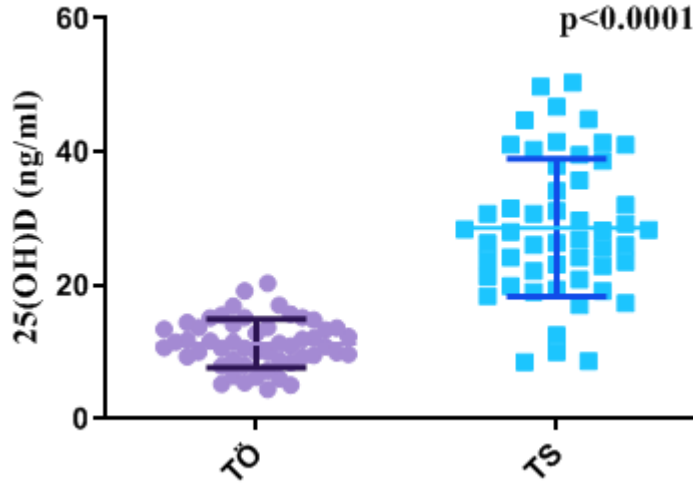
Katılımcıların yaş, boy, kilo ve VKİ değerleri ile telomer uzunluğu arasındaki ilişki Şekil 10'da gösterilmiştir. Yaş, boy, VKİ ile telomer uzunluğu arasındaki korelasyon Pearson korelasyon testi ile bulundu. Kilo ile telomer uzunluğu arasındaki korelasyon ise Spearman korelasyon testi ile bulundu. Boy, kilo VKİ ve yaş ile relatif telomer uzunluğu arasında anlamlı ilişki bulunamadı.



Şekil 10. a. Yaş, b. Kilo, c. Boy, d. VKİ değerlerinin telomer uzunluğu ($2^{-\Delta C_t}$) ile karşılaştırılması



a.



b.

Şekil 11. 25(OH)D seviyesinin tedavi öncesi (TÖ) ve tedavi sonrası (TS) değişimi. **a.** Plasebo grubu, **b.** D vitamini grubu. (Wilcoxon test kullanıldı.)

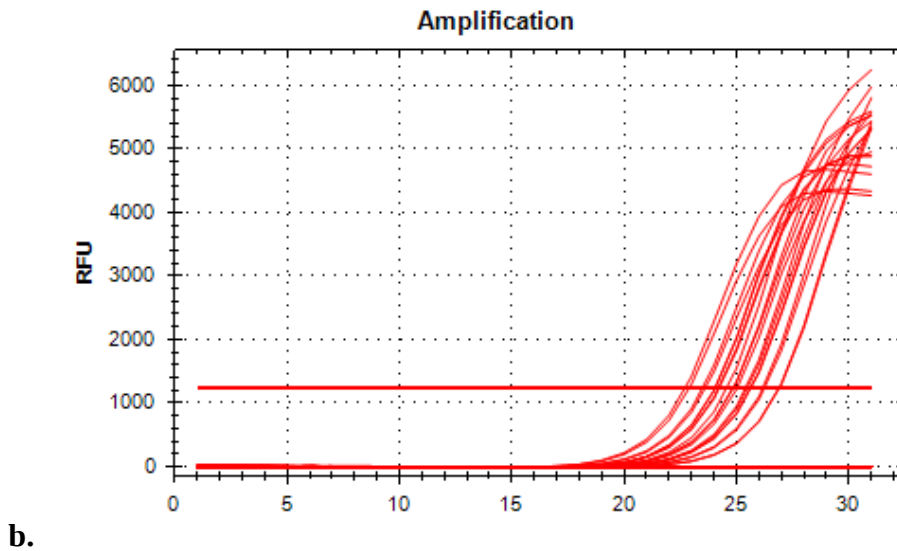
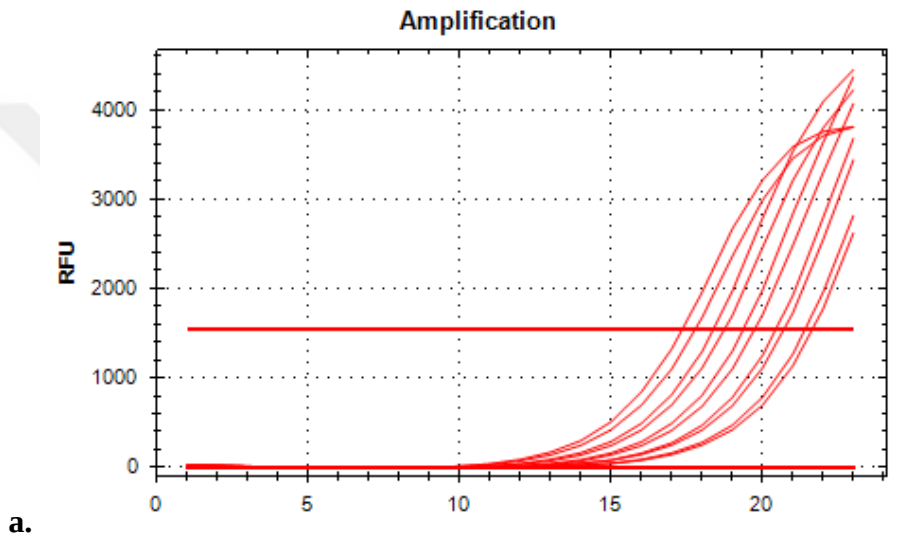
25(OH) D seviyeleri hem 3 ay boyunca plasebo kullananlarda hem de D vitamini preparatı kullananlarda ölçüldü. İlk ölçümler sırasında tüm katılımcılarda 25(OH)D₃ seviyeleri < 20 ng/ml (50nmol/l) olarak seçildi.

D vitamini düzeylerindeki değişim hem plasebo grubunda (tedavi öncesi 11.8 ± 4.2 , tedavi sonrası 15.2 ± 5.9 , $p < 0.001$) hem de D vitamini grubunda (tedavi öncesi 11.3 ± 3.6 , tedavi sonrası 28.6 ± 10.3 , $p < 0.0001$) anlamlı bulundu. Ancak tedavi grubunda D vitamini seviyelerinin 2.5 kat arttığı belirlendi. Plasebo grubunda ise 1.29 kat artmaktadır (Şekil 11).

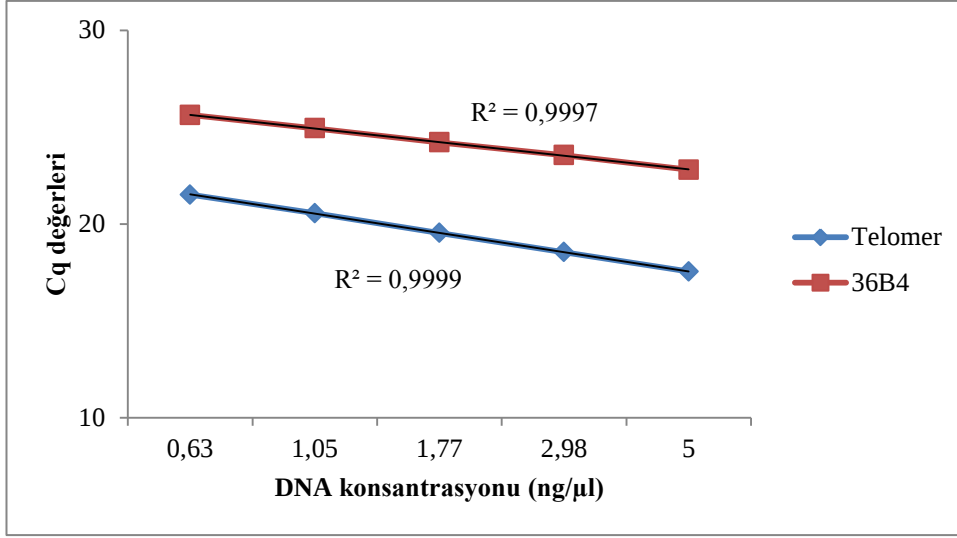
4.2. Lökosit Telomer Uzunluğu Sonuçları

4.2.1. Telomer qPCR sonuçları

Lökosit telomer uzunluğu tayininde protokolde uygun DNA miktarını bulabilmek için 1.68 kat seri dilüsyonlar yapılarak telomer, 36B4 ve β -globin primerlerine qPCR’da standart oluşturuldu (Şekil 12).



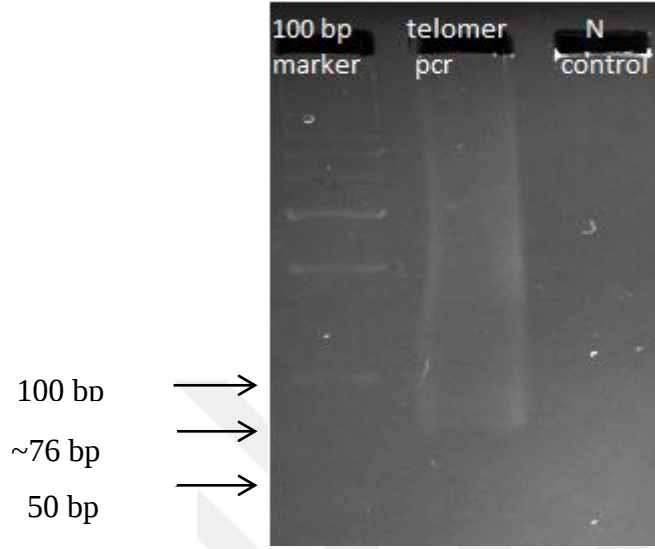
Şekil 12. a. Telomer qPCR seri dilüsyonları, **b.** 36B4 tek kopya gen ve β -globin seri dilüsyonları. (her örnek duplike çalışıldı).



Şekil 13. qPCR relatif T (telomer)/S (tek kopya gen) oranı. Dilüsyon faktörü ~1.68 olacak şekilde konsantrasyonları 12.64- 100 ng arasında değişen 5 DNA örneği kullanıldı. Kareler, tek kopya gen 36B4; dörtgenler telomeri göstermektedir.

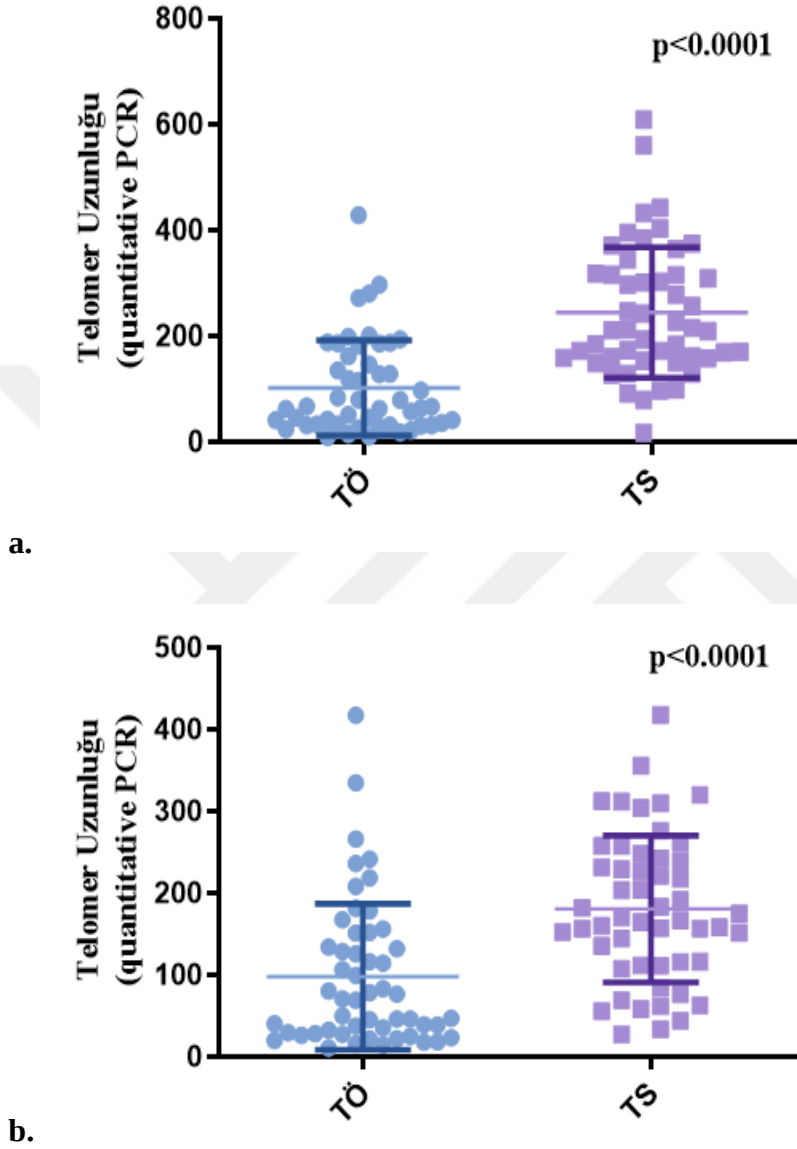
Referans DNA ile karşılaştırıldığında, tek kopya gen için nispi oran (36B4/ β -globin), beklendiği gibi ~1.05 olarak bulundu. Ortalama ΔCq ise 4.69'dur. Yani tek kopya gen qPCR'si telomer qPCR kadar floresan sinyali üretmek için yaklaşık 5 döngü daha gerektirir. ΔCt 'nin standart sapması ise 0.46 olarak bulundu. Tüm bunlar sonucunda qPCR için optimum DNA konsantrasyonu 7.08 ng/μl olarak belirlendi.

Telomer primerleri ile yapılan qPCR sonuçları aynı zamanda %4'lük agaroz jelde yürütülerek referans makalede (39) belirtilen 76 bp'e denk gelen smear görüntüsü elde edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Telomer qPCR'ın %4'lük agaroz jeldeki smear görüntüsü

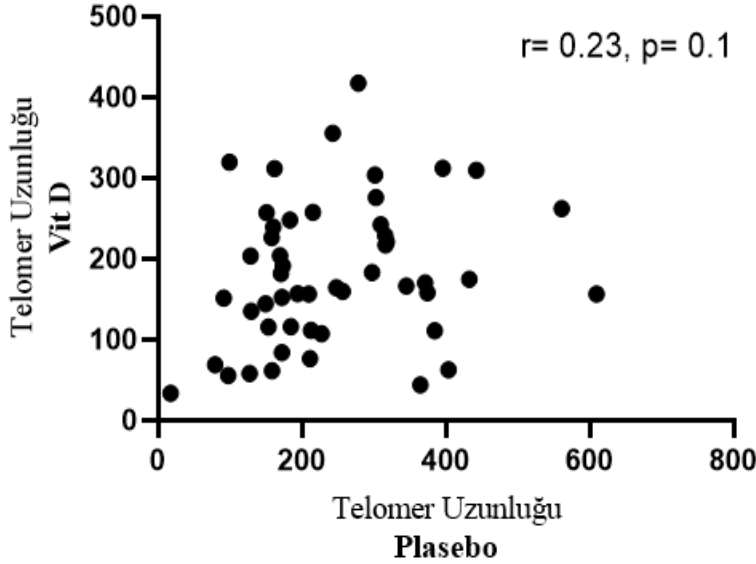
Telomer uzunluğunun hem plasebo grubunda (tedavi öncesi $2^{\Delta Ct}$: 96, tedavi sonrası $2^{\Delta Ct}$: 244) hem de tedavi grubunda (D vitamini kullananlarda) (tedavi öncesi $2^{\Delta Ct}$: 97, tedavi sonrası $2^{\Delta Ct}$: 180) anlamlı bir şekilde arttığı bulundu (Şekil 15).



Şekil 15. Tedavi öncesi ve sonrası telomer uzunlukları **a.** plasebo grubu, **b.** D vitamini grubu (Wilcoxon test kullanıldı.)

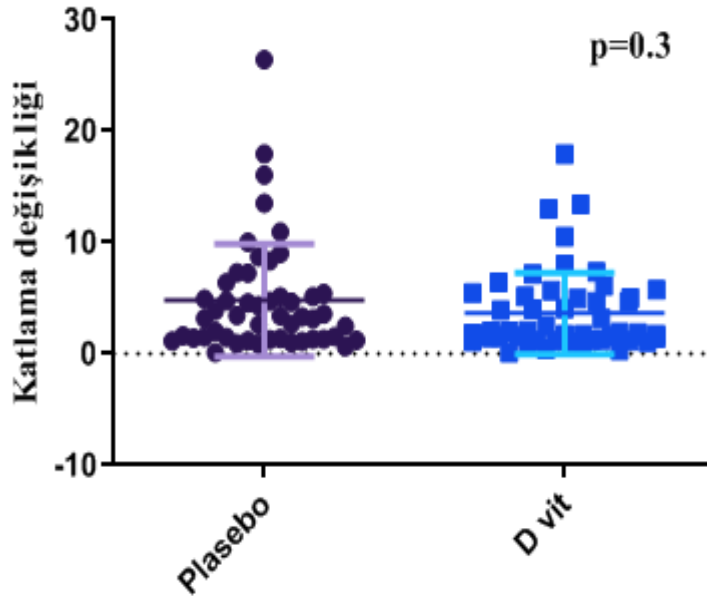
Ancak tedavi sonrası plasebo ve tedavi grubunun kıyaslanmasında plasebo grubundaki telomer uzunluğu artışı tedavi grubuna göre daha anlamlı bulundu ($p=0.004$).

Telomer uzunluğu, D vitamini tedavisinde plasebo grubuna göre ($r=0.23$) zayıf korelasyon gösterdi ($p = 0.1$) (Şekil 16).



Şekil 16. D vitamini ve plasebo kullananlar arasındaki LTU korelasyonu (Pearson korelasyonu uygulandı.)

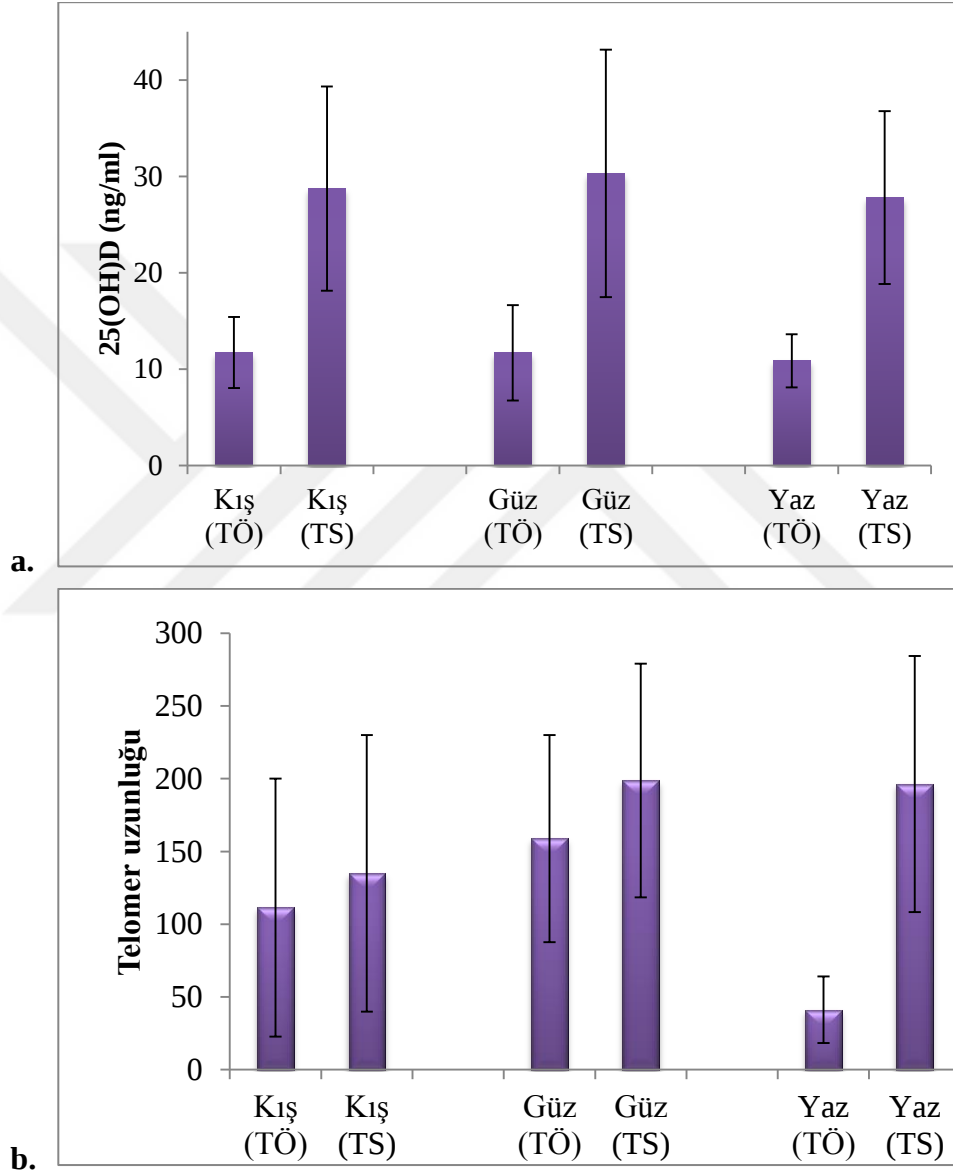
Gruplar arası (plasebo ve D vitamini) katlama değişikliği karşılaştırıldı ancak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.39$) (Şekil 17).



Şekil 17. Gruplar arası (Plasebo ve D vitamini) katlama değişikliği karşılaştırılması (Mann-Whitney test kullanıldı.)

Katılımcıların farklı mevsimlerde toplanmasının sonuçlarımıza etkisi araştırıldı. Kış aylarında 8 plasebo, 12 tedavi, güz aylarında 3 plasebo ve 15 tedavi, yaz aylarında ise 25 tedavi, 39 plasebo kullanan katılımcılar çalışmaya alındı.

Mevsimsel olarak farklı zamanlarda toplanan tedavi gurubu örneklerinin 25(OH)D seviyeleri ve telomer uzunluğu karşılaştırılması Şekil 18’de verilmiştir.



Şekil 18. a. Farklı mevsimlerde D vitamini kullanan tedavi grubu katılımcılarının 25(OH)D seviyelerinin karşılaştırılması **b.** Farklı mevsimlerde D vitamini kullanan tedavi grubu katılımcılarının telomer uzunluklarının karşılaştırılması. TÖ: tedavi öncesi, TS: tedavi sonrası

5. TARTIŞMA

D vitamini eksikliği [25(OH)D<20 ng/ml/ 50 nmol/L] her yaştan ve cinsiyetten kişiyi etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (10). D vitamini seviyelerinin düzenlenmesinde kişiler arası farklılıklara sebep olan genetik belirteçlerin iyi tanımlanması, etkili ve kişiye özel tedaviye olanak sağlayacaktır.

D vitamini seviyeleri D vitamini takviyesi ile yaşam standartları ile ilgili değişiklikler ile artış göstermektedir. D vitamini kullanılmadan 25(OH)D seviyelerindeki artış topluma, iklime bağlı değişiklik göstermektedir. Hollanda’da yapılan Dutch Longitudinal Aging Study Amsterdam çalışmasında 25(OH)D konsantrasyonları 55-65 yaşındaki kişilerde (kadın ve erkek) 6 yıl içinde ortalama en fazla 4 nmol/L artış göstermiştir. Buna karşı, serum 25(OH)D seviyeleri 65–88 yaşındaki kişilerde 13 yıl içinde ortalama 4 nmol/L azalmıştır (41). Bu da bize 25(OH) D seviyelerinin sezona bağlı değişiklikler olsa da yıllar içinde stabil kaldığını göstermektedir.

D vitamini seviyesi hem plasebo grubunda hem de D vitamini grubunda ilk ölçümlere göre anlamlı olarak artmış olup ($p<0.0001$), D vitamini grubunda 25(OH)D₃ seviyesi daha yüksek bulunmuştur. Ancak çalışmamızda iki ay tedavi ardından bir ay bekleme süresi sonucunda ölçümler yapılmış olup bu sonuçlar kısa dönem verilerini göstermektedir. Vitamin D replasmanı kişinin 25(OH)D ölçümlerine göre takip edilerek tekrarlanabilir.

Telomerler, kromozom kararlılığını sağlayarak, genomun bütünlüğünü korur. Lökosit telomer uzunluğunun bulunmasında geleneksel yöntem Southern blot olmasına rağmen referans makalede (39), kantitatif PCR ile ölçülen relatif T/S oranları ve göreceli TRF uzunlukları arasındaki korelasyon, Southern blot ile ölçülen relatif telomer uzunluk sonucunu kuvvetle desteklemektedir. Bu sebeple lökosit telomer uzunluğunun tayini için diğer metotlara (Terminal Restriksiyon Fragman Assay (TRF), FISH) göre az miktarda DNA ile yüksek çıktılı sonuçlar alınabilen qPCR metodu kullanılmıştır (38, 39).

Telomer kısalması, yaşla ve oksidatif stresle doğru orantılıdır. D vitamini, enflamasyonu azalttığı ve genomik kararlılıkta önemli rol oynadığı için yaşlanma ve telomer boyu ile ilişkilendirilmiştir. D Vitamini, hücre büyümesinin düzenlenmesi, proliferasyon, apoptoz, kök hücre regülasyonu, mineral metabolizması ile ilgili çeşitli yolları etkileyerek telomer uzunluğunun kısalmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Ancak D vitamini ile telomer uzunluğu arasındaki ilişki tam olarak bilinmemektedir. D vitamininin telomer uzunluğunu arttırdığını gösteren çalışmalar olsa da telomer boyunun D vitamini seviyelerinden bağımsız olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Bu çalışmaların geniş popülasyon çalışmaları ile desteklenmesi gerekmektedir.

Enflamasyon ve oksidatif stres yaşlanma biyolojisinde kilit belirleyicilerdir. Richard ve arkadaşlarının yaptığı çalışma lökosit telomer uzunluğunun, bireyin yaşam boyu oksidatif stres ve inflamasyon yükünün kümülatif bir endeksi kavramını desteklemektedir. Çalışmada yüksek serum 25-hidroksivitamin D konsantrasyonları, kadın popülasyonunda daha uzun LTU ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma kadınlarda telomer boyu ve D vitamini seviyeleri arasındaki korelasyonunu gösteren ilk çalışmadır (26).

Benzer olarak Liu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da erkeklerde LTU ile D vitamini seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı pozitif korelasyon göstermiştir. Bu çalışmada aynı zamanda GC (rs4588 ve rs7041) polimorfizmlerine ve VDR (vitamin D reseptör) polimorfizmlerine bakılmış, ancak telomer boyu ile ilişkilendirilmemiştir (32).

Obez Afro Amerikalılarla yapılan bir çalışmada D vitamini takviyesinin periferik mononükleer kan hücrelerinde telomeraz aktivitesinde artışa sebep olduğu gösterilmiştir, telomer uzunluğu ölçülmemiştir (42). Ancak telomer boyu telomeraz enziminin aktivitesinden bağımsız olarak da korunabilmektedir. Over kanseri hücrelerinde 1,25 (OH)₂D₃'ün miRNA aracılığıyla telomeraz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (43). Bu çalışma genomik instabilite gösteren kanser hücre serilerinde yapılmıştır, çalışma sağlıklı hücrelerde D vitamininin telomer üzerindeki etkisinin nasıl işlediği hakkında bilgi vermemektedir.

Julin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D ile LTU arasındaki ilişki incelenmiş ve herhangi bir ilişki bulunamamıştır (31). 50-74 yaş arası 9940 kişide yapılan başka bir çalışma 25(OH)D seviyelerini yaşlanma ile ilgili bir belirteç olarak göstermiş ancak LTU ile ilişkisi gösterilememiştir (44). Polülasyon farklılıklarının da LTU uzunluğu ve 25(OH)D seviyeleri ilişkisine de etki ettiği rapor edilmiştir (27). Ayrıca LTU'nun D vitamini seviyeleri ile orta düzeyde ilişkisini rapor eden ancak bunun klinik etkisinin de araştırılmasını öneren yayınlar da bulunmaktadır (45). 25(OH)D seviyelerinin LT uzunluğuna etkisinin klinik olarak önemi henüz araştırma konusudur.

Çalışmamızda sağlıklı postmenopozal kadınlarda LTU araştırılmıştır. Literatürde D vitamini seviyelerini LTU ile ilişkilendiren çalışmalar bulunsa da telomer ve vitamin D seviyelerini ilişkilendiren kontrollü çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda katılımcılar 3 ay boyunca takip edilerek tedavi öncesi ve sonrası değerleri ölçülmüştür. Diğer çalışmalarda sadece D vitamini seviyesi ve LTU kıyaslanırken, çalışmamızda her iki grubun (2 ay boyunca D vitamini preparatı alan kadınlar plasebo kullananlar) tedavi öncesi ve tedavi sonrası LTU çalışması yapılmıştır.

Telomer uzunluğu hem plasebo grubunda (tedavi öncesi 2^{ΔCt}: 96, tedavi sonrası 2^{ΔCt}: 244) hem de tedavi grubunda (D vitamini kullananlarda) (tedavi öncesi 2^{ΔCt}: 97, tedavi sonrası 2^{ΔCt}: 180) anlamlı bir şekilde artmıştır. Plasebo grubunda bu artış tedavi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır (p=0.004). Hipotezimizden farklı olarak plasebo grubunda LTU'nun tedavi grubunda olduğu gibi hatta daha fazla artmış olmasının olası sebepleri aşağıda tartışılmıştır.

Ayçiçeğinin D vitamini ve telomere etkisi düşünülebilir. Ancak D vitamini ile yapılan çalışmalarda plasebo olarak ayçiçek yağı kullanılmıştır (34,35). Çalışmamızda plasebo olarak ayçiçek yağını kullanmamızın sebebi 7-dehidrokolesterol bakımından en düşük oranı içermesidir (37). Ayrıca bir hayvan çalışmasında da ayçiçek yağı kullanımının telomer uzunluğuna etkisinin olmadığı rapor edilmiştir (36). Bu sebeple çalışma planlanırken plasebo için ayçiçek yağı seçilmiştir.

Telomer uzunlukları cinsiyet, popölasyonlar arası farklar ve çevresel değişikliklerden etkilenmektedir. Buna örnek olarak yapılan bir çalışmada 10-15 yaş arası 5 sene boyunca takip edilen erkek çocuklarda vitamin D takviyesiyle telomer uzunluğunun artmasına rağmen kızlarda herhangi bir artışın gözlenmediği rapor edilmiştir (46). Bizim çalışmamızda da topluma has özelliklerin ve çevresel değişikliklerin telomer uzunluğuna etki ettiği düşünölebilir.

Katılımcıların farklı mevsimlerde toplanmasının sonuçlarımıza etkili olabileceği tartışılmıştır. Kış aylarında 8 plasebo, 12 tedavi, sonbahar aylarında 3 plasebo ve 15 tedavi, ilkbahar aylarında ise 25 tedavi, 39 plasebo kullanan katılımcı çalışmamıza alınmıştır. Yaz aylarında plasebo kullananların sayıca fazla olması D vitamini seviyelerine ve telomer uzunluğuna etki etmiş olabileceği düşünölmektedir. Yaz aylarında güneşe maruziyetin D vitamini seviyelerini tedaviden bağımsız şekilde arttırması ve telomer boyuna etki etmesi tartışılabilir. Tedavi grubu mevsimsel özelliklere göre ayrıldığında yaz aylarında telomer uzunluğu diğer mevsimlerde alınan tedaviye kıyasla daha fazla artış göstermiş ancak tedavi grubunun mevsimlerde homojen olarak dağılması sebebiyle telomere etkisini azaltmıştır.

Kişiler arası farklı çevresel etkenlere maruziyet de telomer boyu üzerine etki gösterebilir. Örneğin yapılan bir hayvan çalışmasında telomer uzunluğunun Salmonella enfeksiyonu geçirenler ve enfeksiyon sonrası iyileşme sağlayanlar arasında farklı olduğu belirtilmiştir (47).

Katılımcıların ortalama vücut kütle indeksleri 26.7 ± 3 olarak bulunmuştur. Obezite ve telomer uzunluğu arasındaki ilişki ters orantılı olsa da vücut kitle indeksi yüksek kişilerin D vitamininden faydalanma oranları düşük olabilmektedir (48).

Kuvvet analizinde tip 1 hata %5, tip 2 hata %20 ve beklenen telomer uzunluğu farkı 2 grup arasında %10 olarak alındığında örnek büyüklüğü her grup için minimum 38 olarak bulunmuştur. Ancak daha büyük gruplarda yapılan çalışmalarda sonuçların değişebileceği düşünölmektedir.

Katılımcılarda 2 ay tedavi/ plasebo kullandıktan sonra 1 ay beklenerek ikinci ölçümler alınmıştır. Bu sonuçlar hem plasebo hem de tedavi grubunda uzun dönem sonuçları yansıtmayabilir.

Menopoz sonrası birçok hormonal ve metabolik değişiklikler olmaktadır. Telomer boyuna pozitif etkisi olan östrojenin etkisi azalmaktadır. Östrojen seviyelerinin düşmesiyle hücre yenilenmesi yavaşlamakta ve telomer boyu kısalması hızlanmaktadır. Bu tez çalışması menopoz sonrası dönemde D vitaminin lökosit telomer uzunluğuna etkisini anlamamızda önemli rol oynamaktadır. Menopoz sonrası kadınlar dahil edilerek östrojenin telomer boyuna etkisi elimine edilmiştir.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamız kontrollü olarak planlanmış ve postmenopozal kadınlarda 25(OH)D seviyelerindeki değişimin lökosit telomer uzunluğuyla ilişkisi araştırılmıştır. D vitamini ile telomer uzunluğu arasındaki ilişki önemli bir çalışma konusu olmasına karşın farklı yayınlarda çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Çalışmamızın güçlü bir yönü kontrollü bir çalışma olmasıdır. Hem D vitamini hem plasebo kullananlarda tüm ölçümler tedavi/plasebo öncesi ve sonrası tekrarlandığı için replasmanın etkisi ve telomer boyu ve D vitamini ilişkisi açısından güvenilir bir sonuç vermektedir. Kontrollü çalışmalar daha geniş popülasyonlarda tekrarlanmalıdır. Ayrıca telomer uzunluğunun etkilendiği mekanizmaların aydınlatılması için hücresel çalışmalara, D vitamini-telomer uzunluğu ilişkisinin klinik etkisini araştırmak için de geniş klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Luk, J., Torrealday, S., Neal Perry, G., & Pal, L. Relevance of vitamin D in reproduction. *Human reproduction* 2012;27(10): 3015-3027.
2. Boullion, R. Vitamin D: From photosynthesis, metabolism, and action to clinical application. *Endocrinology*. Philadelphia: Elsevier Saunders 2006;1435-1463
3. Duque G, El Abdaimi K, Macoritto M, Miller MM, Kremer R. Estrogens (E2) regulate expression and response of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 receptors in bone cells: changes with aging and hormone deprivation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 6;299(3):446-54.
4. Mathieu C, Adorini L. The coming of age of 1,25 dihydroxivitamin D (3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med* 2002;8:174-9.
5. Holick, M. F. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of clinical investigation* 2006; 116(8), 2062-2072.
6. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 2007; 19;357(3):266-81
7. Holick, M. F. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Annals of epidemiology* 2009; 19(2), 73-78.
8. DeLuca, Hector F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1689S-96S
9. Penna, G., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K. C., Berti, E., Colonna, M., & Adorini, L. 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): 3490-3497.
10. Malaban A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D deficiency. *Lancet* 1998;351:805-806.
11. WHO Scientific Group on the Prevention and Management of Osteoporosis 2003 Prevention and management of osteoporosis: report of a WHO scientific group. Geneva: World Health Organization
12. Bischoff-Ferrari, H. A., Giovannucci, E., Willett, W. C., Dietrich, T., & Dawson-Hughes, B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *The American journal of clinical nutrition* 2016; 84(1), 18-28.

13. Cashman, K. D., Dowling, K. G., Škrabáková, Z., Gonzalez-Gross, M., Valtueña, J., De Henauw, S., ... & Jorde, R. Vitamin D deficiency in Europe: pandemic?. *The American journal of clinical nutrition* 2016;103(4), 1033-1044.
14. Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, Ragi-Eis S, Chandler J. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation *J Intern Med*. 2006 Sep;260(3):245-54.
15. Pludowski P1, Holick MF, Pilz S, Wagner CL, Hollis BW, Grant WB, Shoenfeld Y, Lerchbaum E, Llewellyn DJ, Kienreich K, Soni M. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality—a review of recent evidence. *Autoimmun Rev*. 2013;12(10):976-89.
16. Lerchbaum, E. Vitamin D and menopause: A narrative review. *Maturitas* 2014;79(1), 3-7.
17. Verboven, C., Rabijns, A., De Maeyer, M., Van Baelen, H., Bouillon, R., & De Ranter, C. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. *Nature Structural & Molecular Biology* 2002;9(2):131.
18. Zhang J, Habiels DM, Ramadass M, Kew RR. Identification of two distinct cell binding sequences in the vitamin D binding protein. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:623–9
19. Villareal, Dennis T., et al. Subclinical vitamin D deficiency in postmenopausal women with low vertebral bone mass. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 1991;72.3: 628-634.
20. Pusceddu I, Farrell CJ, Di Pierro AM, Jani E, Herrmann W, Herrmann M. The role of telomeres and vitamin D in cellular aging and age-related diseases. *Clin Chem Lab Med*. 2015 Oct 1;53(11):1661-78.
21. von Zglinicki T. Role of oxidative stress in telomere length regulation and replicative senescence." *Ann N Y Acad Sci*. 2000 Jun;908:99-110
22. Houben JM, Mercken EM, Ketelslegers HB, Bast A, Wouters EF, Hageman GJ, Schols AM. Telomere shortening in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med*. 2009;103(2):230-6.

23. Aviv A. Telomeres, sex, reactive oxygen species, and human cardiovascular aging. *J Mol Med* 2002;80(11):689–695.
24. Gray KE, Schiff MA, Fitzpatrick AL, Kimura M, Aviv A, and Starra JR. Leukocyte telomere length and age at menopause. *Epidemiology* 2014 Jan; 25(1): 139–146
25. Lin J, Kroenke CH, Epel E. Greater endogenous estrogen exposure is associated with longer telomeres in postmenopausal women at risk for cognitive decline. *Brain Res* 2011;1379:224–31
26. Richard JB, Valdes AM, Gardner JP, Paximadas D, Kimura M, Nessa A, Lu X, Surdulescu GL, Swaminathan R, Spector TD, Aviv A. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. *Am J Clin Nutr* 2007;86(5):1420-5
27. Liu, J. J., Cahoon, E. K., Linet, M. S., Little, M. P., Dagnall, C. L., Higson, H., ... & Freedman, D. M. Relationship between plasma 25-hydroxyvitamin D and leucocyte telomere length by sex and race in a US study. *British Journal of Nutrition* 2016;116(6):953-960.
28. Williams, D. M., Palaniswamy, S., Sebert, S., Buxton, J. L., Blakemore, A. I., Hyppönen, E., & Jarvelin, M. R. 25-Hydroxyvitamin D concentration and leukocyte telomere length in young adults: findings from the Northern Finland Birth Cohort 1966. *American journal of epidemiology* 2015; 183(3), 191-198.
29. Butt HZ, Atturu G, London NJ, Sayers RD, Bown MJ. Telomere length dynamics in vascular disease: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2010;40(1):17-26.
30. Pooley KA, Sandhu MS, Tyrer J, Shah M, Driver KE, Luben RN, Bingham SA, Ponder BA, Pharoah PD, Khaw KT, Easton DF, Dunning AM. Telomere length in prospective and retrospective cancer case-control studies. *Cancer Res.* 2010;70(8):3170-6.
31. Julin B, Shui IM, Prescott J, Giovannucci EL, De Vivo I. Plasma vitamin D biomarkers and leukocyte telomere length in men. *Eur J Nutr.* 2017 Mar;56(2):501-508
32. Liu JL, Prescott J, Giovannucci E, Hankinson SE, Rosner B, Han J, De Vivo I. Plasma Vitamin D Biomarkers and Leukocyte Telomere Length. *Am J Epidemiol* 2013;177(12):1411-7.

33. Gardner, M., Bann, D., Wiley, L., Cooper, R., Hardy, R., Nitsch, D., ... & Bekaert, S. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Experimental gerontology* 2014;51, 15-27.
34. Mason, C., Tapsoba, J. D. D., Duggan, C., Imayama, I., Wang, C. Y., Korde, L. A., ... & McTiernan, A. Effects of vitamin D supplementation during weight loss on sex hormones in postmenopausal women. *Menopause (New York, NY)*, 2016; 23(6), 645.
35. Jastrzebska, M., Kaczmarczyk, M., Suárez, A. D., Sánchez, G. F. L., Jastrzebska, J., Radziminski, L., & Jastrzebski, Z. Iron, Hematological Parameters and Blood Plasma Lipid Profile in Vitamin D Supplemented and Non-Supplemented Young Soccer Players Subjected to High-Intensity Interval Training. *Journal of nutritional science and vitaminology* 2017; 63(6), 357-364.
36. Varela-Lopez, A., Pérez-López, M. P., Ramirez-Tortosa, C. L., Battino, M., Granados-Principal, S., del Carmen Ramirez-Tortosa, M., ... & Quiles, J. L. Gene pathways associated with mitochondrial function, oxidative stress and telomere length are differentially expressed in the liver of rats fed lifelong on virgin olive, sunflower or fish oils. *The Journal of nutritional biochemistry* 2018; 52, 36-44.
37. Baur, A. C., Brandsch, C., König, B., Hirche, F., & Stangl, G. I. Plant oils as potential sources of vitamin D. *Frontiers in nutrition* 2016;3, 29.
38. O'Callaghan, Nathan J., and Michael Fenech. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. 2011;13.1: 3.
39. Cawthon, Richard M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research* 2002;30.10:e47-e47.
40. Schmittgen TD & Livak KJ. Analyzing real time pcr data by the comperative Ct method. *Nature Protocols* 2008;3(6):1101-1108
41. van Schoor N.MKnol D.L, Deeg D.J., Peters F.P., Heijboer A.C., Lips P Longitudinal changes and seasonal variations in serum 25-hydroxyvitamin D levels in different age groups: results of the Longitudinal Aging Study Amsterdam Osteoporos Int. 2014; 25:1483-1491.
42. Zhu H, Guo D, Li K, Pedersen-White J, Stallmann-Jorgensen IS, Huang Y, Parikh S, Liu K, Dong Y. Increased telomerase activity and vitamin D

- supplementation in overweight African Americans. *Int J Obes (Lond)*. 2012;36(6):805-9.
43. Kasiappan R, Shen Z, Tse AK, Jinwal U, Tang J, Lungchukiet P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses telomerase expression and human cancer growth through microRNA-498. *J Biol Chem* 2012;287:41297 - 309.
 44. Schöttker B, Hagen L, Zhang Y, Gào X, Holleczeck B, Gao X, Brenner H. Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels as an Aging Marker: Strong Associations With Age and All-Cause Mortality Independent From Telomere Length, Epigenetic Age Acceleration, and 8-Isoprostane Levels. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2019;74(1):121-128.
 45. Beilfuss J, Camargo CA Jr, Kamycheva E. Serum 25-Hydroxyvitamin D Has a Modest Positive Association with Leukocyte Telomere Length in Middle-Aged US Adults 2017;147(4):514-520.
 46. Van Aart, C., Michels, N., Sioen, I., Martens, D., Nawrot, T., & De Henauw, S. Vitamin D as predictor of telomere length in the transition from child to adolescent. *Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique* 2018;66, S237.
 47. Monaghan, P. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2010;1206(1), 130-142.
 48. Kim, S., Parks, C. G., DeRoo, L. A., Chen, H., Taylor, J. A., Cawthon, R. M., & Sandler, D. P. Obesity and weight gain in adulthood and telomere length. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers* 2009;18(3), 816-820.

8. EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı



SAYI: ATADEK-2016/1
KONU: Etik Kurul Kararı

Sayın Yrd.Doç.Dr. Deniz Ağırbaşı

Sorumluğunu yürüttüğünüz “Postmenopozal kadınlarda D vitamini ve lökosit telomer uzunluğu arasındaki ilişkinin araştırılması” başlıklı proje 14.01.2016 tarih 2016/1 Sayılı Atadek Kurul Toplantısında görüşülmüş olup 2015-16/17 karar numarası ile tıbbi etik yönden uygun bulunmuştur.

A handwritten signature in blue ink, likely of Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS.

Prof.Dr. İsmail Hakkı ULUS
ATADEK Kurul Başkanı

EK 2. Aydınlatılmış Onam Formu

Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı ve Medeniyet Üniversitesi'nde yürütülen bağımsız bir araştırmanın parçası olan ve yukarıda adı geçen çalışmaya davet edilmiş bulunuyorsunuz.

Bu çalışmanın amacı düşük D vitamini düzeyleri olan menopoz sonrası kadınlarda D vitamini takviyesinin ve bu takviyeden faydalanma düzeyinin genetik sebeplerini araştırmaktır.

D vitamini kemik gelişiminde ve kemiklerin mineral yoğunluğunun korunmasında etkilidir. D vitamini besinlerden (süt, balık yağı) alındığı gibi vücutta da sentezlenir. D vitamini dolaşımında, D vitamini bağlayıcı protein(VDBP) ile taşınır. D vitamini bağlayıcı protein Gc adı verilen gen tarafından sentezlenir. Bu gende insanlar arası farklılıkların vit D seviyeleri ile ilgili olduğu gösterilmiştir. D vitamini eksikliğinde çocuklarda ve yetişkinlerde kemik kırıkları riski artar. D vitamini seviyeleri kemik sağlığı için önemli olmakla beraber son zamanlardaki çalışmalarda kanserden koruyucu etkileri de bulunmuştur.

Bunun için sizden alınacak 20 ml kandan DNA analizi yapılarak bu gendeki değişikliğe ve bunun vitamin D seviyeleri ile olan ilişkisine bakılacaktır. Alınan kanda eğer D vitamin seviyeleriniz düşük çıkarsa çalışmaya alınacaksınız ve düşük D vitamini seviyesinin hangi genetik faktörlere bağlı olduğu araştırılacaktır. D vitamini takviyesinin faydasını araştırmak için çalışma grubu ikiye ayrılacak, bir grup 3 aylık D vitamini, diğer grup benzer besleyici madde takviyesi kullandıktan sonra da tekrar 10 ml kan alınarak bu parametrelere bakılıp karşılaştırılması yapılacaktır. Eğer D vitamini kullanan grupta değilseniz ve 3 ay sonunda D vitamini seviyeleriniz düşük çıkmaya devam ederse D vitamini takviyesi yapılacaktır. Sizden alınacak kan ileriki çalışmalarda D vitamini ile ilgili başka moleküllerin araştırılmasında da kullanılabilir. Kan alımından başka herhangi bir ek girişim talep edilmeyecektir.

Sizden çalışma ile ilgili hiçbir ücret talebinde bulunulmayacaktır. Size bu çalışma karşılığında herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Çalışmaya katılmanız halinde tedavi öncesi ve sonrası D vitamini düzeylerinizi hiçbir ücret ödmeden öğrenebilirsiniz.

Çalışmaya katılmanız halinde isminiz ve kişisel bilgileriniz bizde saklı tutulacak ve herhangi bir yerde açıklanmayacaktır. Bu çalışma tamamen araştırma amaçlı olup, araştırma sorumlularının ve /veya kurumun yürütülecek araştırmadan hiçbir maddi çıkarı bulunmamaktadır. Bu çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayanır. İstedığınız her an çalışmadan çekilme hakkına sahipsiniz. Çalışma ile ilgili danışmak istediğiniz bir konu olduğunda aşağıda telefon numarası bulunan araştırmacılarla temasa geçebilirsiniz. Katılımınız için teşekkür ederiz.

Yrd. Doç. Dr. Deniz Ağırbaşı

Dr. Kağan Güngör

Aydınlatılmış onam formunda verilen tüm bilgileri okudum ve anladım. Çalışma için alınan kanın D vitamini araştırması ile ilgili gerekli tetkikler için kullanılmasında sakınca görmüyorum. Bu çalışmaya kendi rızamla gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı Soyadı

İmza

Tarih

EK 3. Sağlık ve Yaşam Tarzı Anketi

**POSTMENOPÖZAL KADINLARDA D VİTAMİNİ İLE LÖKOSİT
TELOMER UZUNLUĞU ARASINDAKİ İLİŞKİNİN ARAŞTIRILMASI**

SAĞLIK VE YAŞAM TARZI ANKETİ

TÜBİTAK PROJE NO: 116Z812

KATILIMCI NO:

İSİM, SOYİSİM:

YAŞ:

KİLO: kg

BOY:cm

DOĞUM YERİNİZ:

YAŞADIĞINIZ ŞEHİR:

Kaç Senedir Yaşıyorsunuz :

TELEFON:

ÖĞRENİM DURUMUNUZ: *YOK () İLKOKUL () ORTOKUL ()*

LİSE () ÜNİVERSİTE () LİSANSÜSTÜ ()

SİGARA İÇİYOR MUSUNUZ

HİÇ KULLANMADIM ()

KULLANIYORUM ()

BIRAKTIM ()

ALKOL KULLANIYOR MUSUNUZ?

HAYIR ()

EVET ()

VEGAN DİYETİ YAPIYOR MUSUNUZ?

EVET ()

HAYIR ()

ALLERJİNİZ VAR MI?

EVET ()

HAYIR ()

HAFTADA YAPTIĞINIZ EGZERSİZ SÜRESİ: YOK ()

HAFTADA 1-4 SAAT ARASI ()

HAFTADA 4 SAATTEN FAZLA ()

GENEL SAĞLIK DURUMUNUZ

MÜKEMMEL () son 12 aydaki doktor muayenesikez TANI:

İYİ () son 12 ayda hastanede yatma süresi.....gün TANI:

ORTA ()

SIK SIK HASTA ()

MENOPOZA GİRDİNİZ Mİ?

EVET () Adetten kesilme yaşı

HAYIR ()

YUMURTALIKLARINIZ ALINDI MI?

EVET () Ameliyat sırasındaki yaş

HAYIR ()

AŞAĞIDAKİ HASTALIKLARDAN BİRİ SİZDE VAR MI?

- *KRONİK KARACİĞER HASTALIĞI* ()
- *KRONİK BÖBREK HASTALIĞI* ()
- *KİSTİK FİBROZİS* ()
- *ÇÖLYAK HASTALIĞI* ()
- *CROHN HASTALIĞI / ÜLSERATİF KOLİT* ()
- *YAYGIN DERİ HASTALIĞI* ()
- *ANOREKSİA/BLUMİA (sürekli yediklerini çıkarma ve yemek yeme bozukluğu)* ()
- *MİDE ÜLSERİ* ()
- *TİROİD PARATİROİD HASTALIKLARI* ()
- *MEGALOBLASTİK ANEMİ* ()

AŞAĞIDAKİ İLAÇLARDAN BİRİNİ SÜREKLİ KULLANIYOR MUSUNUZ?

- *KORTİZON* ()
- *EPİLEPSİ (SARA) İLAÇLARI* ()
- *DIÜRETİKLER* ()
- *DİGOKSİN* ()
- *STATİN* ()
- *KAN SULANDIRICI* ()
- *KEMİK ERİMESİ (OSTEOPOROZ) İLACI (örn :fosamax)* ()
- *ŞU ANDA KEMOTERAPİ TEDAVİSİ GÖRÜYORUM* ()

BU KISIM DOKTOR TARAFINDAN DOLDURULACAKTIR:

BAŞLANGIÇTA VİTAMİN D (25(OH)D) DÜZEYİ:

KULLANDIĞI PREPARAT:

TEDAVİ SONRASI VİTAMİN D (25(OH)D) DÜZEYİ:

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Minenur	Soyadı	Kalyoncu
Doğum Yeri	BALIKESİR/ Bandırma	Doğum Tarihi	06.08.1995
Uyruğu	TC	Telefon	
E-mail	minenurkalyoncu10@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi	2019
Lisans	Haliç Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik	2017
Lise	Bandırma Anadolu Lisesi	2013

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

* Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	80,08956	82,86477	74,24848

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
MS,Office Programları	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin