



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya

Doktora Tezi

**D₃ VİTAMİNİ TEDAVİSİ ALAN KİŞİLERDE KLOTHO GENİ PROTEİN
AKTİVİTESİNİN (FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ 23, KALSİYUM VE
FOSFAT DÜZEYLERİ İLE) miRNA 22 ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Abdulrahman TATTAN
ORCID: 0009-0006-5053-0474

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK
ORCID:0000-0002-62818807

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 23DR18004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Konya – 2025

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Sonuna gelmiş olduğum doktora eğitimim boyunca çalışmamın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırmaların yürütülmesinde yardımını esirgemeyen, daima yol gösteren saygıdeğer danışman hocam Prof.Dr. Mehmet GÜRBİLEK'e ve bölümümüzün değerli öğretim üyelerine saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Hayatımın her anında yanımda olan ve dualarını hiçbir zaman esirgemeyen annem ile kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım. Bu projeyi destekleyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, vakaların seçimindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Sami KÜÇÜKŞEN'e ve Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı'nın tüm asistanlarına teşekkür ederim. Ayrıca yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Süleyman BERKAKBAŞ'a, Biyokimya Laboratuvarı çalışanlarına sunduğu destekten dolayı teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu süreçte desteklerini her daim hissettiğim ve isimlerini burada tek tek sayamadığım tüm arkadaşlarıma sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Abdulrahman TATTAN

Mayıs 2025

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-------------|
| ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR | ii |
| TEZ ONAY SAYFASI | v |
| TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU | vi |
| BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ | vii |
| KISALTMALAR | viii |
| TABLolar LİSTESİ | x |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xi |
| ÖZET | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. D Vitamini..... | 5 |
| 2.1.1. D Vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizması | 7 |
| 2.1.2. D Vitamini eksikliği tedavisi..... | 8 |
| 2.1.3. Türkiye’de D vitamini eksikliği | 9 |
| 2.2. FGF-23 | 10 |
| 2.2.1. FGF-23, D vitamini ve PTH arasındaki ilişkisi..... | 13 |
| 2.3. MikroRNA | 17 |
| 2.3.1. MikroRNA'ların biyogenezi..... | 17 |
| 2.3.2. MikroRNA biyogenezinin kanonik yolağı | 17 |
| 2.3.3. MikroRNA biyogenez kanonik olmayan yolağı | 18 |
| 2.3.4. MikroRNA ile ilgili gen düzenlemenin mekanizmaları | 20 |
| 2.3.5. MikroRNA’ların biyolojik rolleri..... | 20 |
| 2.3.6. MikroRNA’lar ve Sinir Sistemi Düzenlemesi | 20 |
| 2.3.7. MikroRNA'ların hücre farklılaşması ve gelişimi ile ilişkisi | 21 |
| 2.3.8. MikroRNA’lar ve viral enfeksiyonlar | 21 |
| 2.3.9. MikroRNA'lar ve bağışıklık | 22 |
| 2.3.10. MikroRNA'lar ve kanser | 23 |
| 2.3.11. MikroRNA'lar ve diyabet | 23 |
| 2.3.12. MikroRNA 22 | 24 |
| 2.4. Klotho Geni | 27 |
| 2.4.1. Klotho’nun fonksiyonları | 31 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 37 |
| 3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler..... | 37 |
| 3.1.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2. Serum Örneklerinin Alınması ve Analiz İçin Hazırlanması | 37 |
| 3.3. Kalsiyum ve Fosfat Çalışması..... | 37 |
| 3.4. D Vitamini Çalışması | 37 |
| 3.5. FGF-23 Düzeylerinin Belirlenmesi | 38 |
| 3.5.1. ELISA kit bilgileri..... | 38 |
| 3.5.2. Kesinlik | 38 |
| 3.5.3. Kullanılan cihazlar | 39 |
| 3.5.4. ELISA çalışması..... | 39 |
| 3.5.5. Standart çözeltinin hazırlanması | 39 |
| 3.5.6. ELISA protokolu | 40 |
| 3.6. MikroRNA 22 Analizi..... | 41 |
| 3.6.1. Kullanılan kimyasallar ve deney malzemeleri | 41 |
| 3.6.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar araçları | 41 |
| 3.6.3. Yöntem | 42 |
| 3.6.4. Plazma eldesi..... | 42 |
| 3.6.5. MikroRNA izolasyonu | 42 |
| 3.6.6. MikroRNA'lerden cDNA eldesi | 43 |
| 3.6.7. Real-Time PCR | 44 |
| 3.7. KL Geni Protein Aktivitesi Çalışması..... | 48 |
| 3.7.1. Kullanılan kimyasallar ve deney malzemeleri | 48 |
| 3.7.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar araçları | 48 |
| 3.7.3. Yöntem | 48 |
| 3.7.4. RNA İzolasyonu | 48 |
| 3.7.5. cDNA eldesi | 49 |
| 3.7.6. Real-Time PCR | 50 |
| 3.7.7. İstatiksel analiz..... | 57 |
| 4. BULGULAR | 59 |
| 4.1. Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri..... | 59 |
| 4.2. PCR (miRNA 22 ve Klotho) Sonuçları..... | 59 |
| 4.3. ELISA (Fibroblast Büyüme Faktörü 23) Sonuçları | 65 |
| 4.4. Biyokimya Sonuçları:..... | 68 |
| 5. TARTIŞMA | 75 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 87 |
| 6.1. Sonuç | 87 |
| 6.2. Öneriler..... | 87 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 89 |
| 8. EKLER..... | 97 |
| 8.1. EK 1 Etik kurul kararı | 97 |

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğrencisi **ABDULRAHMAN TATTAN**'nın "**D₃ Vitamini Tedavisi Alan Kişilerde Klotho Geni Protein Aktivitesinin (Fibroblast Büyüme Faktörü 23, Kalsiyum ve Fosfat Düzeyleri ile) Mirna 22 Üzerine Etkisinin Araştırılması**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya / 23.05.2025

Tez Danışmanı Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK İmzası

N.E.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Doç. Dr. Çiğdem DAMLA DENİZ İmzası

Konya Şehir Hastanesi/Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Doç. Dr. Filiz ALKAN BAYLAN İmzası

N.E.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Doç. Dr. Öznur KÖYLÜ İmzası

Konya Şehir Hastanesi/Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi Dr. Öğr. Üyesi İbrahim KILINÇ İmzası

N.E.Ü. Tıp Fak. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 04 / 06 /2025 tarih ve 13/06 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Hasibe VURAL

Enstitü Müdürü

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

D₃ Vitamini Tedavisi Alan Kişilerde Klotho Geni Protein Aktivitesinin (Fibroblast Büyüme Faktörü 23, Kalsiyum ve Fosfat Düzeyleri ile) miRNA 22 Üzerine Etkisinin Araştırılması başlıklı tez çalışmamın toplam 97 sayfalık kısmına ilişkin, 10.06.2025 tarihinde tez danışmanım tarafından **Turnitin** adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %17 olarak belirlenmiştir.

Uygulanan filtrelemeler:

1. Tez kabul sayfası hariç
2. Tez çalışması orijinallik raporu sayfası hariç
3. Bilimsel etik beyannamesi sayfası hariç
4. Önsöz hariç
5. İçindekiler hariç
6. Simgeler ve kısaltmalar hariç
7. Materyal ve metot hariç
8. Kaynaklar hariç
9. Alıntılar dahil
10. 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Necmettin Erbakan Üniversitesi Tez Çalışması Orijinallik Raporu Uygulama Esaslarını inceledim ve tez çalışmamın, bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranının (%30) altında olduğunu ve intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih: 10.06.2025

İmza

Abdulrahman TATTAN

İmza

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

BİLİMSEL ETİK BEYANNAMESİ

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar tüm aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini, tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez hazırlama kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel kurallara uygun olarak atıf yapıldığını ve bu kaynakların kaynaklar listesine eklendiğini beyan ederim.

10.06.2025

İmza

Abdulrahman TATTAN

KISALTMALAR

| | |
|-------------------------------|--|
| ACE | Anjiotensin dönüştürücü enzim |
| AD | Alzheimer hastalığı |
| ADAM10 | A Disintegrin and Metalloproteinase 10 |
| 1. ADAM17 | A Disintegrin and Metalloproteinase 17 |
| BACE1 | β -APP kesme enzimi 1 |
| BH | Büyüme Hormonu |
| BHRH | Büyüme Hormonu Salgılayan Hormon |
| Ca | Kalsiyum |
| cAMP | Siklik Adenozin Mono Fosfat |
| CKD | Kronik Böbrek Yetmezliği |
| DNMT | DNA Metil Transferazlar |
| DSÖ | Dünya Sağlık Örgütü |
| DNA | Deoksiribo Nükleik Asit |
| ES | Embriyonik kök |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| FGF-21 | Fibroblast Büyüme Faktörü 21 |
| FGF-23 | Fibroblast Büyüme Faktörü 23 |
| FOXO | Forkhead transkripsiyon faktörü |
| FXS | Kırılgan X Sendromu |
| IGF-1 | İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 |
| kDa | Kilo Dalton |
| KL | Klotho |
| miRNA | Mikro Ribonükleik asit |
| MnSOD | Manganez Süperoksit Dismutaz |
| mtDNA | Mitekondrial DNA |
| mKL | Membran Klotho |
| NO | Nitrik Oksit |
| P | Fosfor |
| PD | Panik hastalığı |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-kinaz |
| PKC | Protein Kinaz C |
| PTH | Paratiroid Hormonu |

| | |
|--------|--|
| RNA | Ribonükleik asit |
| ROS | Reaktif Oksijen Türü |
| ROMK 1 | Renal Dış Medullar potasyum Kanalı 1 |
| SAM | S-adenozil-metiyonin |
| SIRT | Sirtüin |
| TAK | Total Antioksidan Kapasite |
| TRPV5 | Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, V altfamilya, 5. üyesi |
| TRPV6 | Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, V altfamilya, 6. üyesi |
| VDR | D vitamini reseptörü |

TABLolar LİSTESİ

| Tablo No | Sayfa No |
|---|----------|
| Tablo 2.1. KL gen lokalizasyonu ve yapısı | 28 |
| Tablo 3.1. Test içi kesinlik | 38 |
| Tablo 3.2. Standart çözeltisinin hazırlanması | 39 |
| Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler | 43 |
| Tablo 3.4. RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri | 44 |
| Tablo 3.5. cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan protokol | 44 |
| Tablo 3.6. cDNA izolasyon kiti | 49 |
| Tablo 3.7. Real-time PCR reaksiyonunun primerlerinin miktarı | 50 |
| Tablo 3.8. Hazırlanan reaksiyon sıcaklık koşulları | 50 |
| Tablo 4.1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri | 59 |
| Tablo 4.2. Tedavi öncesi ve kontrol klotho geni protein aktivitesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonuçları..... | 61 |
| Tablo 4.3. Tedavi öncesi ve kontrol miRNA 22 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonuçları | 61 |
| Tablo 4.4. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların Klotho ve miRNA 22 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri karşılaştırılması | 62 |
| Tablo 4.5. Tedavi öncesi ve kontrol H-FGF-23'ün konsantrasyonunun sonuçları | 65 |
| Tablo 4.6. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların H-FGF-23 karşılaştırılması | 66 |
| Tablo 4.7. Hasta serumlarından alınan Ca, PO ₄ ve D ₃ test sonuçları | 68 |
| Tablo 4.8. Sağlıklı insan serumlarından alınan Ca, PO ₄ ve D ₃ test sonuçları | 68 |
| Tablo 4.9. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların çalışma biyokimya parametrelerinin karşılaştırılması | 69 |
| Tablo 4.10. Değişkenlerin P-value sonuçları | 74 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| Şekil No | Sayfa No |
|---|----------|
| Şekil 2.1. D vitamini metabolizması. | 6 |
| Şekil 2.2. D vitamini sentezi ve metabolizmasının ve Ca, fosfor ve kemik metabolizmasını düzenlemesi. | 9 |
| Şekil 2.3. FGF23'ün kemikteki post-translasyonel modifikasyonu. | 13 |
| Şekil 2.4. FGF23, Klotho ve FGFR arasındaki etkileşimin şematığı. | 16 |
| Şekil 2.5. MikroRNA biyogenezi ve etki mekanizması. | 19 |
| Şekil 2.6. MikroRNA-22 geni, kromozom 17p13'te yeridir. | 24 |
| Şekil 2.7. Klotho protein ailesi. | 29 |
| Şekil 2.8. Membran Klotho ve salgılanan Klotho'nun şematığı. | 31 |
| Şekil 2.9. Membran ve salgılanan Klotho'nun domain yapısı, membran topolojisi ve ana işlevlerini gösteren şematik diyagramı. | 32 |
| Şekil 2.10. Klotho'nun fonksiyonlarının genel mekanizmaları. | 34 |
| Şekil 3.1. Standart çözeltisinin seri dilüsyon yapılması. | 40 |
| Şekil 3.2. RT-PCR işlemi fazları. | 45 |
| Şekil 3.3. Stem-loop primer dizisinin oluşumu. | 46 |
| Şekil 3.4. qPCR Amplifikasyon Eğrisi ve C _t Değeri. | 47 |
| Şekil 3.5. Çalışma malzemeleri hazırlanma aşaması. | 51 |
| Şekil 3.6. Santrifüj aşaması. | 52 |
| Şekil 3.7. Termal Döngü cihazı. | 53 |
| Şekil 3.8. Nanodrop cihazı. | 54 |
| Şekil 3.9. Vortekslama aşaması. | 55 |
| Şekil 3.10. Real-Time PCR cihazı. | 56 |
| Şekil 4.1. MikroRNA 22'nin RT-PCR döngü sayısına göre ΔR_n değerleri. | 59 |
| Şekil 4.2. Klotho'nun RT-PCR döngü sayısına göre ΔR_n değerleri. | 60 |
| Şekil 4.3. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası klotho $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonuçları. | 63 |
| Şekil 4.4. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası miRNA 22 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonuçları. | 64 |
| Şekil 4.5. H-FGF-23 konsantrasyon eğrisi. | 65 |
| Şekil 4.6. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası H-FGF-23 sonuçları. | 67 |
| Şekil 4.7. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası D vitamin sonuçları. | 70 |
| Şekil 4.8. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası Ca sonuçları. | 71 |

Şekil 4.9. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası PO₄ 'nın sonuçları..... 72

ÖZET

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Tıbbi Biyokimya
Doktora Tezi

D₃ VİTAMİNİ TEDAVİSİ ALAN KİŞİLERDE KLOTHO GENİ PROTEİN AKTİVİTESİNİN (FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ 23, KALSİYUM VE FOSFAT DÜZEYLERİ İLE) miRNA 22 ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Abdulahman TATTAN

Konya-2025

Klotho geni proteini, miRNA 22, FGF23, kalsiyum ve fosfat; hücrel sinyalizasyon, mineral metabolizması ve kemik sağlığı üzerinde etkili önemli biyolojik parametrelerdir. Bu çalışmada, D vitamini tedavisinin klotho geni protein aktivitesi ile miRNA 22, fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23), Ca ve PO₄ düzeyleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya D vitamini eksikliği tanısı konulan 10 hasta (tedavi öncesi ve tedavi sonrası dönemleri) ve 20 sağlıklı kontrol birey dahil edilmiştir. Tedavi grubundaki hastalardan, tedavi öncesinde ve tedavinin 3. ayında kan örnekleri alınarak analiz edilmiştir. Klotho geni protein aktivitesi ve miRNA 22 seviyeleri qRT-PCR yöntemiyle ölçülmüştür. Serum Ca ve PO₄ düzeyleri fotometrik yöntemle, D vitamini elektrokemilüminesans yöntemiyle, fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) ise enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) yöntemiyle analiz edilmiştir.

D vitamini eksikliği tanısı konulan hastalara, damla formunda D₃ vitamini preparatı verilmiştir. İlk 8 hafta boyunca haftada 50.000 IU yükleme dozu uygulanmış, ardından 6 hafta boyunca günde 1.500 IU idame dozuna geçilmiştir. Çalışmada kontrol grubuna ait klotho geni protein aktivitesi (1,04±0,31) ile tedavi öncesi grup (0,80±0,21) karşılaştırıldığında, kontrol grubunda anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,021). Tedavi sonrası dönemde ise klotho geni protein aktivitesi (1,09±0,19), tedavi öncesi döneme kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır (p<0,001). miRNA 22 ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, tedavi sonrası grup (3,07±1,49) ile tedavi öncesi grup (1,15±0,72) karşılaştırılmış ve tedavi sonrası dönemde miRNA 22 ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p<0,05). Benzer şekilde, tedavi sonrası grup kontrol grubuyla (1,73±1,67) karşılaştırıldığında da anlamlı bir artış gözlenmiştir (p<0,05). H-FGF-23 serum düzeyleri, tedavi sonrası grupta (104,35±80,34) tedavi öncesi gruba (144,55±77,85) göre anlamlı şekilde azalmıştır (p<0,001). Kontrol grubu (343,18±476,9) ile karşılaştırıldığında da tedavi sonrası grubun H-FGF-23 düzeyinde anlamlı azalma gözlenmiştir (p<0,05). Serum Ca düzeyi, tedavi sonrası dönemde (9,79±0,31) tedavi öncesi döneme göre (9,44±0,33) anlamlı şekilde yükselmiştir (p<0,05). Serum PO₄ düzeyi de kontrol grubunda (3,62±0,32) tedavi öncesi gruba (3,19±0,56) göre anlamlı olarak yüksek bulunmuş (p<0,05), ayrıca tedavi sonrası dönemde PO₄ düzeyi (3,57±0,59) tedavi öncesi döneme göre anlamlı olarak yükselmiştir (p<0,001).

Sonuç olarak, D vitamininin klotho geni protein aktivitesini, miRNA 22 ekspresyonunu, serum Ca ve PO₄ düzeylerini artırdığı, FGF-23 seviyelerini ise azalttığı belirlenmiştir. Bu parametrelerin D vitamini tedavisiyle normal değerlere ulaşma mekanizmalarının ve aralarındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır. Elde edilen bulgular, bu parametrelerin D vitamini ile birlikte hastaların klinik değerlendirmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için bir öneri niteliği taşımaktadır.

Anahtar Sözcükler: D vitamini, Fibroblast Büyüme Faktörü 23, Klotho Geni Protein Aktivitesi, miRNA22.

ABSTRACT

Necmettin Erbakan University, Graduate School of Health Sciences
Medical Biochemistry Department
Medical Biochemistry
Doctoral Thesis

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF VITAMIN D₃ TREATMENT ON KLOTHO GENE PROTEIN ACTIVITY (WITH FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23, CALCIUM, PHOSPHATE LEVELS) AND miRNA 22

Abdulrahman TATTAN

Konya-2025

Klotho gene protein, miRNA 22, FGF-23, calcium, and phosphate are important biological parameters that significantly influence cellular signaling, mineral metabolism, and bone health. This study aimed to investigate the effects of vitamin D treatment on klotho gene protein activity, miRNA 22, fibroblast growth factor 23 (FGF-23), calcium, and phosphate levels.

The study included 10 patients diagnosed with vitamin D deficiency (pre-treatment and post-treatment periods) and 20 healthy control individuals. Blood samples were collected from the treatment group before treatment and at the 3rd month of treatment for analysis. Klotho gene protein activity and miRNA 22 levels were measured using the qRT-PCR method. Serum calcium and phosphate levels were analyzed using photometric methods, vitamin D levels were measured by electrochemiluminescence, and fibroblast growth factor 23 (FGF-23) was analyzed using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method.

Patients diagnosed with vitamin D deficiency were administered vitamin D₃ preparation in drop form. A loading dose of 50,000 IU was applied weekly for the first 8 weeks, followed by a maintenance dose of 1,500 IU per day for 6 weeks. In the study, the klotho gene protein activity in the control group (1.04 ± 0.31) was found to be significantly higher compared to the pre-treatment group (0.80 ± 0.21) ($p = 0.021$). In the post-treatment period, klotho gene protein activity (1.09 ± 0.19) significantly increased compared to the pre-treatment period ($p < 0.001$). When examining miRNA 22 expression levels, a significant increase was detected in the post-treatment group (3.07 ± 1.49) compared to the pre-treatment group (1.15 ± 0.72) ($p < 0.05$). Similarly, a significant increase was observed in the post-treatment group compared to the control group (1.73 ± 1.67) ($p < 0.05$). Serum levels of H-FGF-23 significantly decreased in the post-treatment group (104.35 ± 80.34) compared to the pre-treatment group (144.55 ± 77.85) ($p < 0.001$). When compared to the control group (343.18 ± 476.9), a significant decrease in H-FGF-23 levels was also observed in the post-treatment group ($p < 0.05$). Serum calcium levels significantly increased in the post-treatment period (9.79 ± 0.31) compared to the pre-treatment period (9.44 ± 0.33) ($p < 0.05$). Serum phosphate levels were also found to be significantly higher in the control group (3.62 ± 0.32) compared to the pre-treatment group (3.19 ± 0.56) ($p < 0.05$), and phosphate levels in the post-treatment period (3.57 ± 0.59) significantly increased compared to the pre-treatment period ($p < 0.001$).

In conclusion, it was determined that vitamin D increases klotho gene protein activity, miRNA 22 expression, serum calcium, and phosphate levels, while decreasing FGF-23 levels. Further studies are needed to better understand the mechanisms of normalization of these parameters and the interactions among them with vitamin D treatment. The findings suggest that these parameters could serve as biomarkers in the clinical evaluation of patients alongside vitamin D.

Keywords: Fibroblast Growth Factor 23, Klotho Gene Protein Activity, miRNA22, Vitamin D.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

D vitamini eksikliği, güneş ışığına maruz kalmanın sınırlı olması, yaşlanma ve çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. D vitamini eksikliği, kemik metabolizmasını bozarak kalsiyum emilimini engelleyebilmekte, raşitizm ve osteomalaziye neden olabilmekte ve osteoporotik kırık riskini artırabilmektedir. Ayrıca D vitamini eksikliği; kardiyovasküler hastalıklar, kronik böbrek hastalığı, diyabet, multipl skleroz, depresyon, preeklampsi, Parkinson hastalığı ve çeşitli kanser türleri gibi pek çok iskelet dışı hastalıkla da ilişkilendirilmiştir (Jiang ve ark 2023). Son zamanlarda D vitamini eksikliğini, koronavirüs hastalığı 2019'un (COVID-19) şiddetini artırdığı bildirilmiştir (Munshi ve ark 2021). D vitamininin aktif formu olan 25-hidroksivitamin D [25 (OH)D], vücuttaki D vitamini durumunun değerlendirilmesinde temel olarak serum konsantrasyonu ölçülerek belirlenir (Pham ve ark 2021). Ancak D vitamini eksikliğini tanımlama konusunda bazı tartışmalar bulunmaktadır. Yeterli D vitamini konsantrasyonunun güncel değerleri; maksimum paratiroid hormon (PTH) baskılanması, maksimum kalsiyum emilimi ve en yüksek kemik mineral yoğunluğu gibi kriterler dikkate alınarak belirlenmekte ve bu değerler yapılan çalışmalara göre farklılık göstermektedir. Optimal vitamin D seviyeleri, kemik odaklı değerlendirmelerde 50 nmol/L olarak belirtilirken, pleiotropik (çok yönlü) etkileri kapsayan değerlendirmelerde bu seviye 75 nmol/L olarak kabul edilmektedir (Jiang ve ark 2023). Uluslararası bilimsel topluluklar, D vitamini eksikliğine bağlı iskelet hastalıklarının önlenmesi için serum 25 (OH)D seviyesinin 30 nmol/L üzerinde olması gerektiğini konusunda hemfikirdir (Amrein ve ark 2020). Son çalışmalarda yapılan tanımlamalara göre, serum 25 (OH)D konsantrasyonunun <50 nmol/L veya <75 nmol/L'nin altında olması D vitamini eksikliği olarak kabul edilmektedir (Amrein ve ark 2020). Ayrıca, <25 nmol/L veya <30 nmol/L seviyelerinde tanımlanan ciddi D vitamini eksikliği; raşitizm, osteoporoz gibi iskelet sistemi hastalıklarının yanı sıra kardiyovasküler hastalıklar gibi iskelet dışı hastalıkların riskini de önemli ölçüde artırmaktadır (Zittermann ve ark 2021). Bu tez çalışmasında, serum 25 (OH)D konsantrasyonu <30 nmol/L'nin altında olan bireyler D vitamini eksikliği olan hasta olarak kabul edilmiştir.

MicroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunu düzenleyen kodlamayan RNA moleküllerinin bir sınıfıdır ve yaklaşık 22 nükleotid uzunluğundadırlar. miRNA'ların çoğu, DNA dizilerinden primer miRNA'lar (pri-miRNA) olarak transkribe edilip prekürsör miRNA'lara işlenmekte ve sonrasında olgun miRNA'lara dönüştürülmektedir. Genellikle miRNA'lar, mRNA'ların 3' translyona uğramayan bölgesi (3' UTR) ile etkileşime girerek mRNA yıkımına veya

translasyonun baskılanmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte, miRNA'ların 5' UTR, kodlayıcı bölgeler ve gen promotörleri gibi farklı bölgelerle de etkileşime girdiği gösterilmiştir. Bazı özel durumlarda, miRNA'lar translasyonu aktive edebilmekte veya transkripsiyonu düzenleyebilmektedir. miRNA'ların hedef genlerle olan etkileşimleri; miRNA'ların hücre içi lokalizasyonu, miRNA ve hedef mRNA miktarları ile miRNA-mRNA etkileşimlerinin afinitesi gibi pek çok faktöre bağlı olarak dinamik bir yapı göstermektedir. miRNA'lar, hücre dışı sıvılara salgılanabilmekte ve hedef hücrelere ekzozomlar gibi veziküller veya Argonaute proteinleri aracılığıyla taşınabilmektedir. Hücre dışına salınan (ekstrasellüler) miRNA'lar, hücreler arası iletişimi sağlayan kimyasal haberci moleküller olarak görev yapmaktadır (O'Brien ve ark 2018). miRNA'lar hücrelerin çoğalma, farklılaşma ve hayatta kalma gibi temel süreçlerinde önemli rol oynamaktadır. Ayrıca çeşitli hastalıkların patogenezinde yer aldığı bilinmektedir. Hücrel miRNA seviyelerindeki artış veya azalma birçok hastalığın ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Hastalıklarla ilişkili miRNA'ların tanımlanması, hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlamak ve daha spesifik tedavi hedefleri belirlemek açısından büyük önem taşımaktadır (Albayrak, 2022).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sayesinde çok sayıda miRNA ve hedef genleri belirlenmiştir. Ancak bunların biyolojik rollerinin daha iyi anlaşılması için spesifik araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu miRNA'lardan biri olan mikroRNA-22 (miRNA 22), farklı hücre tiplerinde hem tümör baskılayıcı hem de onkogen olarak işlev görebilmekte ve tümör oluşumu ile ilerlemesini düzenleyebilmektedir. miRNA 22 ayrıca embriyonik kök hücrelerin gelişiminde ve osteoartrit gibi metabolik kemik hastalıklarında rol oynamaktadır. Bunun yanında panik bozukluğu (PD) ile ilişkili güçlü bir düzenleyici olarak tanımlanmış ve kardiyomiyositlerde hipertrofiyi indükleyebildiği bildirilmiştir (Xiong, 2012).

Son yıllardaki çalışmalar, moleküler beslenmenin sağlık ve hastalık durumları üzerindeki potansiyel etkilerini ortaya koymuştur. Özellikle mikro besinlerin, transkripsiyon ve translasyonu modüle ederek gen ekspresyonunu düzenleyebilme yetenekleri giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Diyetle alınan vitamin ve minerallerin miRNA profillerini nasıl etkilediği ve bu etkilerin sağlık ile hastalık süreçlerindeki rolü üzerine araştırmalar halen devam etmektedir (Beckett ve ark 2014).

Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23), FGF19 ve FGF21 ile birlikte endokrin fibroblast büyüme faktörleri (FGF) ailesine ait fosfatürik bir hormondur (Château ve ark 2010). FGF-23; böbrek, paratiroid bezleri, kalp ve kemik gibi çeşitli organları etkileyebilmektedir

(Murali ve ark 2016a). FGF-23, fosfatın reabsorpsiyonunu inhibe edebilmesi ve Ca, fosfor, sodyum ve D vitamini metabolizmasını düzenleyebilmesi Klotho-bağlı etkileri (kanonik sinyalleme) nedeniyle fosfatürik hormon olarak bilinirdi; ancak, son zamanlarda FGF-23'ün, kemiklerde, kalpte ve bağışıklık sisteminde bile Klotho-bağımsız etkileri (kanonik olmayan sinyalleme) dahil olmak üzere pleiotropik etkileri olduğu kabul edilmiştir (Smith ve ark 2019). Fosfat, D vitamini, PTH, kalsiyum, aldosteron, proinflatuar sitokinler ve demir eksikliği gibi çeşitli humoral faktörler osteositlerin FGF-23 salgılaması üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Bär ve ark 2019). FGF-23, serum fosfat, kalsiyum, PTH ve D vitamini arasındaki karmaşık ilişkinin, mineral homeostazının düzenlenmesinde tam olarak nasıl rol oynadığı hala açık değildir (Dastghaib ve ark 2023).

Klotho (KL) geninin keşfi, başlangıçta olası bir yaşlanma baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır ve yaşlanma sürecinin anlaşılmasında büyük bir rol oynamıştır. Farelerde, KL geninin aşırı ekspresyonu yaşam süresini uzatırken, KL genindeki mutasyonlar yaşam süresini kısaltmaktadır. İnsan KL geni, fosfat, kalsiyum ve D vitamini metabolizmasını düzenleyen çok işlevli bir protein olan α -Klotho proteinini kodlamaktadır. α -Klotho, bir hormon olarak da işlev görebilir, ancak α -Klotho reseptör (ler)i henüz bulunamamıştır. İnsanlarda KL genindeki nokta mutasyonları hipertansiyon ve böbrek hastalığı ile ilişkilidir, bu da α -Klotho'nun normal böbrek fonksiyonunun sürdürülmesi için hayati önem taşıyabileceğini düşündürmektedir. Potansiyel olarak farklı işlevlere sahip üç α -Klotho protein tipi belirlenmiştir: tam uzunlukta transmembran α -Klotho, çözünür α -Klotho ve salgılanan α -Klotho. Son zamanlarda elde edilen kanıtlar, α -Klotho'nun insülin ve Wnt sinyal yollarını baskıladığını, oksidatif stresi inhibe ettiğini ve fosfat dengesini ve kalsiyum emilimini düzenlediğini öne sürmektedir (Xu ve ark 2015).

KL geni protein aktivitesinin metabolik yollara etkisi ve onlarla ilişkisi, odaklanmaya gereken önemli genetik ve biyokimyasal faktörlerden biridir. KL geni birkaç metabolik yolların ortak buluşma noktası sayılmaktadır. Bu yolların hem KL geni ile hem de birbirleriyle detaylı ilişkilerinin daha net şeklinde tam olarak anlaşılması için çok çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA'lar da gen ekspresyonunu düzenleyen, çok hastalıklarla bağlantılı ve önemli patolojik biyobelirteçlerden biridir. Ayrıca fibroblast büyüme faktörü 23'ün rolleri ve diğer metabolik faktörler ile ilişkisi özellikle biyokimya bakımından çok ilginçtir.

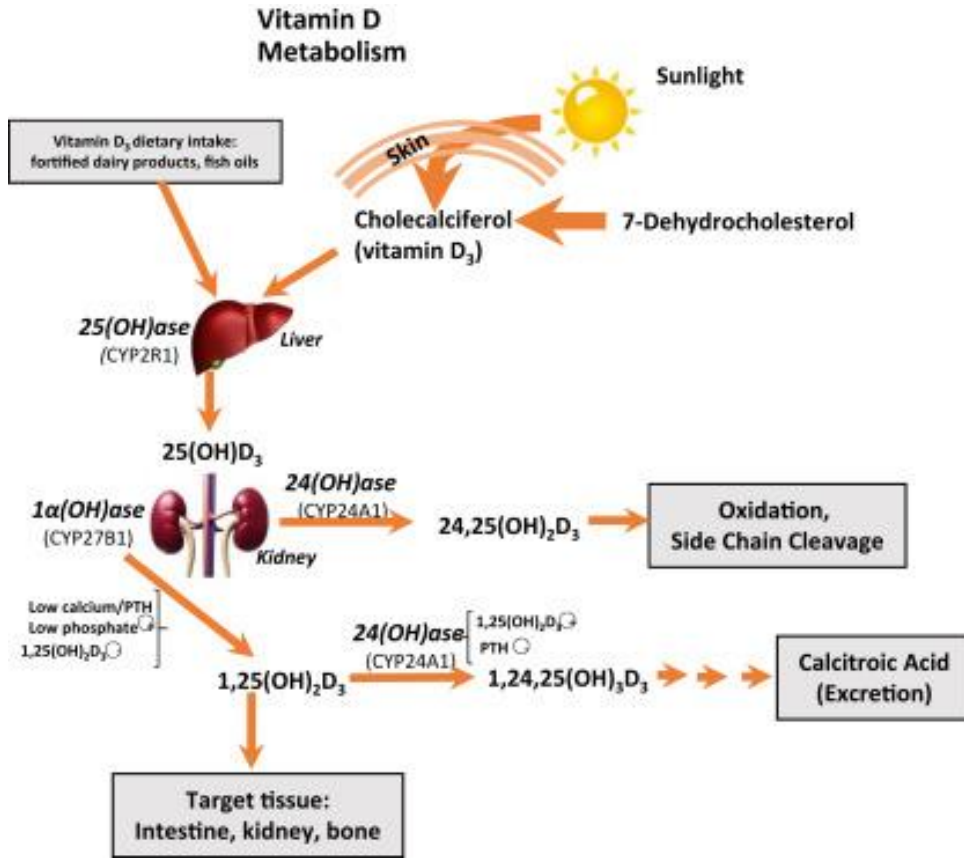
Bizim çalışmamızda D vitamini tedavi alan kişilerde hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası klotho geni protein aktivitesinin, fibroblast büyüme faktörü 23, kalsiyum ve fosfat düzeyleri ile miRNA 22 üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Bu çalışmada D vitamini seviyesi yükselirken KL geni protein aktivitesi, Ca ve PO₄ ile miRNA22 arasındaki ilişki olup olmadığı veya birbirleri ile ilişkili mekanizmaların araştırılması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamini

D vitamini, dört halkalı sterol türevi bir hormon olup, iskelet sistemi üzerinde etkilidir. Bu etkilerini, kalsiyum, fosfat ve alkalin fosfataz düzeylerini düzenleyerek ve kemik metabolizmasını kontrol ederek gösterir. D vitamini, iskeletin mineralleşmesi üzerinde doğrudan etki göstermez; ancak serumdaki kalsiyum ve fosforun vücutta tutulmasını sağlayarak dolaylı olarak kemik mineralizasyonunu destekler. Bu minerallerin kan düzeylerini artırarak kemik büyümesini desteklediği ve kemiklerin mineralleşmesine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Wacker & Holick, 2013). D vitamini etkilerini ağırlıklı olarak bağırsaklar, böbrekler ve kas-iskelet sistemi üzerinde gösterir. Ancak D vitamini reseptörlerinin vücuttaki diğer dokularda da bulunduğu keşfedilmesiyle, D vitamininin farklı sistemlerdeki fonksiyonları hakkındaki bilgiler giderek artmaktadır (Amrein ve ark 2012).

D vitamininin iki formu olan kolekalsiferol (D₃) ve ergokalsiferol (D₂) ince bağırsaklardan emilerek vücuda alınır. Bu vitaminler bağırsaklarda şilomikronlar ile birleşip lenfatik sistem yoluyla venöz dolaşıma geçer. Kanda D vitamini, D vitamini bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak portal dolaşım aracılığıyla karaciğere taşınır. D vitamini, karaciğer ve böbreklerde hidroksilasyon işlemiyle aktif hale dönüştürülür. Karaciğerde bulunan 25-hidroksilaz enzimi aracılığıyla ilk olarak 25. karbondan hidroksillenerek 25-hidroksi D vitamini (kalsidiol) oluşur. Kalsidiol daha sonra böbreklere taşınarak burada 1 α -hidroksilaz enzimi tarafından ikinci kez hidroksillenip aktif form olan 1,25-dihidroksi vitamin D'ye (kalsitriol veya 1,25 (OH)₂D₃) dönüşür. D vitamini aynı zamanda 24. karbon pozisyonundan hidroksilasyon işlemine tabi tutularak biyolojik olarak aktif olmayan 24,25 (OH)₂D₃ formunu oluşturur. 1 α -hidroksilaz enzimi ise böbrek proksimal tübül hücrelerinin mitokondrilerinde yoğun olarak bulunan bir sitokrom P450 enzimidir (Hekimsoy ve ark 2010a). Dolaşımdaki



Şekil 2.1. D vitamini metabolizması.

1,25 (OH)₂D₃ seviyesi, böbreklerdeki 1-α hidroksilaz enzimi tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Amrein ve ark 2012) (Şekil 2.1).

D vitamininin kemik sağlığı üzerindeki olumlu etkileri pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Ayrıca D vitamini; kanserin önlenmesi ve otofaji gibi önemli hücrel yanıtın düzenlenmesinde de rol oynar (Kidd, 2010). Son zamanlarda yapılan araştırmalar, D vitamininin BH ve IGF-1 ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. D vitamini eksikliği yaşayan çocuklar ve yetişkinlerde, D vitamini tedavisi serum IGF-1 seviyelerini yükseltmektedir. İki ayrı araştırma, ilk araştırma 6 ve sonraki araştırma 12 aylık BH tedavisinin, BHE'li çocuklarda 25 OH D vitamini düzeylerini artırdığını göstermiştir (Delecroix ve ark 2018).

Vitamin D, kolekalsiferol (D₃) ve ergokalsiferol (D₂) adı verilen iki formda bulunan, temel bir mikro besin maddesidir ve biyoaktif formda kemik sağlığını korumada önemli bir rol oynamaktadır (Ross ve ark 2011). Vitamin D, genellikle cildin direkt olarak ultraviyole ışığın etkisiyle üretiminden elde edilmektedir. D₃ ve D₂'nin alternatif kaynakları doğal besin maddelerinden, güçlendirilmiş besin maddelerinden ve takviyelerden alınan oral alımdır. Temel kaynak güneş ışığı olsa da oral alım besinsel D vitamini eksikliğinin hem önlenmesinde hem de düzeltilmesinde güneş ışığına öncelik vermektedir (McKenna 1992). Güneş ışığı maruziyeti,

cilt kanserine neden olabilmekte ve bu nedenle D vitamini eksikliğini önlemenin bir yolu olarak önerilememektedir. Hem D vitamini eksikliğini önlemek hem de düzeltmek için gereken oral alımın belirlenmesinde, istenmeyen ve kasıtlı güneş ışığına maruz kalma göz önünde bulundurulmalıdır. Başka bir deyişle, önerilen günlük alım miktarı, yalnızca güneş ışığından yoksun olanlar için belirtilmelidir; güneş ışığından yoksun olmayanların oral alım gereksinimleri daha düşüktür (Ross ve ark 2011).

Vitamin D, iki hidrosilasyon adımıyla aktive edilir: ilk olarak karaciğerde 25-hidroksilaz (CYP2R1) enzimi tarafından ana D vitamini kaynaklarına bağımlı olan 25OHD'ye dönüştürülür, ardından böbrekte 1 α -hidroksilaz (CYP27B1) enzimi tarafından hormonal olarak aktif form olan 1 α ,25-dihidroksivitamin D (1,25 (OH)₂D) haline getirilmekte ve bu proses PTH ve FGF-23 tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmekte (Ross ve ark 2011). Hormonal form daha sonra uzak etki bölgelerine dolaşır D vitamini reseptörüne (VDR) bağlanarak başta bağırsak olmak üzere kalsiyum ve fosfatın emilimini teşvik etmektedir. Kalsiyum ve fosfatın mineral ürünü, yaşamın her aşamasında yeni oluşan kemik matrisinin mineralizasyonu için esas sayılmaktadır. Son aktivasyon adımı ayrıca ekstrarenal dokularda da gerçekleşip yerel olarak VDR'ye bağlanmakta, bu duruma parakrin/intrakrin etki denmektedir. Bu etki, kalsiyotropik hormonlar tarafından değil, dokuya özgü ve substrata bağımlı olarak sitokinler tarafından düzenlenmektedir (Ross ve ark 2011).

IOM (Institute of Medicine) 2011 raporunda, D vitamini alımı ile iskelet sağlığı arasında iyi kurulmuş bir nedensel bağlantı bulunmuştur (Ross, Taylor, ve ark 2011). Şiddetli D vitamini eksikliği, büyüyen iskelette raşitizme ve yetişkin iskeletinde osteomalaziye yol açar. Yetişkinlerde, düşük kemik kütlesi eğilimine neden olmakta ve yaşlılarda kemik kırıklığına katkıda bulunmaktadır. İntrakrin eylemdeki eksiklikler, D vitamini eksikliği ile enfeksiyonlar, otoimmün hastalık, kardiyovasküler hastalık, diyabet mellitus, düşmeler ve kanser arasındaki ilişkileri açıklayabilmekte, ancak onun nedenselleri için kesin kanıtlar yoktur (Ross, Manson, ve ark 2011; Ross, Taylor, ve ark 2011).

2.1.1. D Vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizması

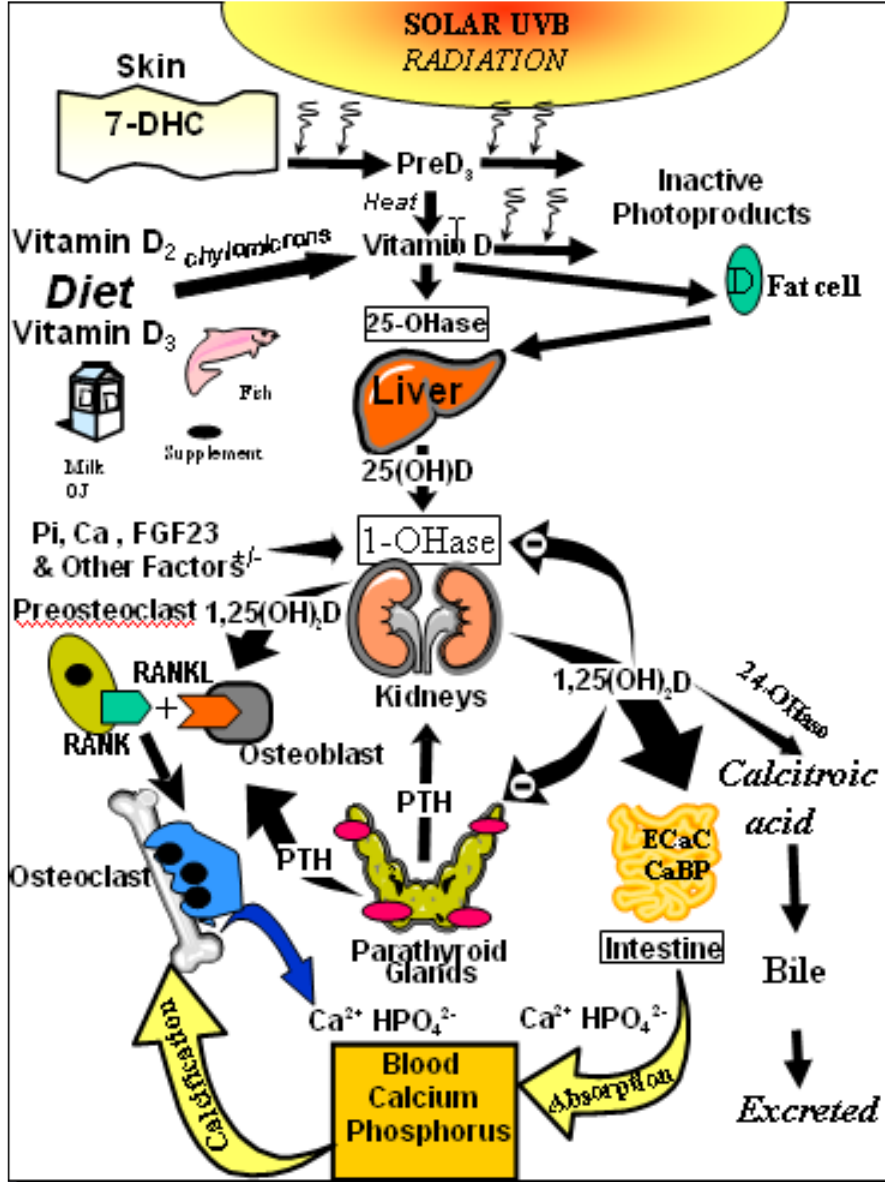
D vitamini, kalsiyum ve fosfat metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır. D vitamini bu minerallerin metabolik işlevleri ve kemik mineralizasyonu için yeterli seviyelerini sağlamaya yardımcı olmaktadır (Holick, 2007). 1,25 (OH)₂D, VDR-RXR ile etkileşime girerek bir epitelyal kalsiyum kanalı ve bir kalsiyum bağlayıcı proteinin ekspresyonunu teşvik etmekte ve böylece bağırsak kalsiyum emilim verimliliğini %10-15'ten %30-40'a çıkarmaktadır

(Holick, 2007). Kemirgenlerde yapılan birkaç deneye dayanarak, 1,25 (OH)₂D'nin ayrıca bağırsak fosfat emilimini %50-60'tan yaklaşık %80'e çıkardığı tahmin edilmiştir (Holick, 2006a). D vitamini, PTH seviyelerini düzenleyerek kalsiyum ve fosfat üzerine dolaylı etki etmektedir. Paratiroid bezlerinde CYP27B1 aktivitesi vardır. 25 (OH)D substratı kullanılarak 1,25 (OH)₂D üretimi, PTH sentezini inhibe edebilmektedir (Segersten ve ark 2002). Ancak, 25 (OH)D da VDR'yi direkt olarak aktive ederek PTH sentezini direkt olarak baskılayabilmektedir (Ritter ve ark 2006). D vitamini eksikliği, serumdaki iyonize kalsiyum seviyelerinin düşük olmasıyla ilişkilidir ve bu de PTH seviyelerinin artmasına yol açan bir uyarı sağlamaktadır. Tersine, daha yüksek 25 (OH)D seviyeleriyle ilişkili olan yüksek kalsiyum seviyeleri, PTH salgılanmasını baskılamaktadır. PTH, tübüler kalsiyumu artırıp böbrek fosfat reabsorpsiyonunu azaltmaktadır (Holick, 2006b) (Şekil 2.2). PTH ayrıca, kalsiyum ve fosfathomeostazi üzerindeki yukarıda belirtilen etkilerle 1,25 (OH)₂D üretimini uyarmaktadır (Holick, 2006a). Hem PTH hem de 1,25 (OH)₂D, iskelet kalsiyum depolarını harekete geçirmek için osteoblastları uyarmaktadır (Holick, 2007) (Şekil 2.2). D vitamini eksikliği, genellikle normalden yüksek 1,25 (OH)₂D seviyeleriyle ilişkili olan PTH artış ile ilgili 1,25 (OH)₂D üretimi ile sekonder hiperparatiroidizme yol açmaktadır (Holick, 2006a).

2.1.2. D Vitamini eksikliği tedavisi

Tedavinin amacı, serum seviyesini 30-50 ng/ml aralığına ve 100 ng/ml veya daha yüksek değere ulaşmadan getirmektir. Tedavide vitamin D₂ ve D₃ çeşitleri kullanılabilir. 25 (OH)D seviyesi 20 ng/ml'nin altında olan kişilere 50,000 IU/hafta, 6-8 hafta boyunca D₃ vitamini verilmesi tavsiye edilmekte ve 25 (OH)D seviyesinin 30 ng/ml veya daha yüksek olması amaçlanmaktadır (Börekçi, 2019).

İstenen serum D vitamini seviyesine ulaşıldığında, günlük sürdürme doz ile sürdürülmektedir. İstenen seviyeye ulaşılamazsa, D vitamini tedavisine 50,000 IU/hafta, 3-6 hafta daha devam edilmektedir. Tedaviye başladıktan 8 hafta sonra serum 25 (OH)D seviyesi ölçülmekte ve tedaviye devam edilip edilmeyeceği veya sürdürme doza geçilip geçilmeyeceği belirlenmektedir. Obez olanlar, malabsorbsiyon sendromu olanlar veya D vitamini metabolizmasını artıran ilaç kullananlar daha yüksek yükleme ve sürdürme dozlar ile tedavi edilmelidir (Börekçi, 2019).



Şekil 2.2. D vitamini sentezi ve metabolizmasının ve Ca, fosfor ve kemik metabolizmasını düzenlemesi.

2.1.3. Türkiye’de D vitamini eksikliği

Ülkemizde D vitamini eksikliği oldukça yaygın görünmektedir, ancak bu konuda yapılan araştırmalar sınırlıdır. Örneğin, 14 ila 44 yaş arasındaki 48 kadın üzerinde yapılan bir çalışma, giyim tarzlarına bağlı olarak %40 ile %60 arasında D vitamini eksikliği olduğunu göstermiştir. Ege bölgesinde ise 20 yaş üzeri 391 yetişkinde yapılan başka bir araştırmada bu eksiklik oranı %74,9 olarak belirlenmiştir. Kadınlarda bu eksiklik, erkeklere kıyasla daha yüksek bulunmuştur (%78,7’ye karşılık %66,4) (Börekeçi, 2019; Hekimsoy ve ark 2010b).

İstanbul’daki bir üniversite hastanesinde yapılan araştırmada ise 2488 hastanın %66’sında yetersizlik, %24’ünde ise eksiklik tespit edilmiştir. D vitamini düzeyleri, yaş ve mevsime göre değişiklik göstermektedir. Örneğin, 45 yaş üzeri erkeklerde kadınlara göre yaz

ve sonbahar aylarında daha yüksek olmuştur. Aynı zamanda, obez bireylerde ve yaşlı yetişkinlerde D vitamini eksikliği sıklıkla gözlemlenmiştir. Bu durum, ülkemizdeki yaşlanan nüfus ve obezite prevalansı göz önüne alındığında önem arz etmektedir (Cigerli ve ark 2013) Ayrıca, ofis çalışanları arasında yapılan bir araştırmada yaz aylarında ölçülen D vitamini düzeylerinin kışa kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu belirlenmiştir. Birinci basamak sağlık hizmetleri, toplum sağlığının korunmasında büyük bir rol oynamaktadır. Aile hekimlerinin, henüz belirtiler ortaya çıkmadan önce D vitamini eksikliğini tespit edip müdahale etmeleri, bu sağlık sorununun önlenmesi ve tedavisinde önemli bir adım olabilir (Börekçi, 2019) Ayrıca, sağlık çalışanlarının bu konuda bilinçlenmesi ve risk gruplarını belirlemesi, koruyucu hekimlik açısından büyük önem taşımaktadır. Örneğin, İngiltere'de risk grupları için önerilen D vitamini profilaksisi, benzer şekilde ülkemizde de dikkate alınabilir. Sonbahar ve kış aylarında tüm bireylere, risk grupları için ise yıl boyunca D vitamini profilaksisi verilmesi önerilmektedir. Bu, sağlık kaynaklarının etkin bir şekilde yönetilmesine katkı sağlayabilir (Oğuz ve ark 2019)

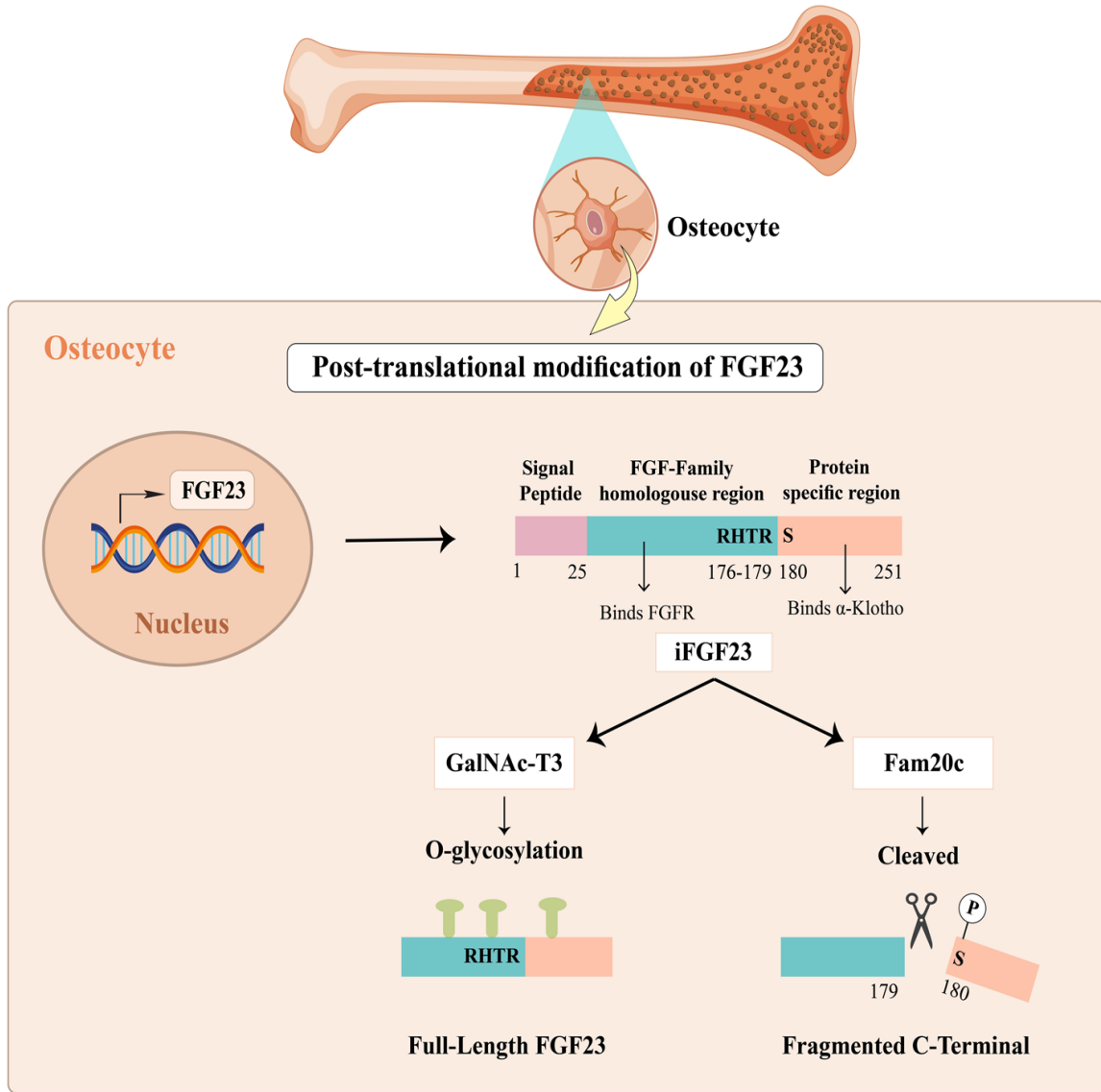
Bu öneri, giderek artan frekansta gözlenen bu sağlık meselesine karşı alınabilecek önlemlerin çoğunlukla birinci basamakta gerçekleştirilebileceğini işaret etmektedir. Dikkat, D vitamini üzerine olan ilginin artmasıyla dünya çapında yapılan ölçümlerde ciddi bir artışa neden olmaktadır. ABD'de yapılan bir tür araştırma, birinci basamak sağlık uzmanlarının D vitaminiyle ilgili tanı ve tedavi konusunda genellikle ortak bir fikre sahip olmadıklarını göstermiştir. Bu durum, genellikle hastaların isteği üzerine yapılan D vitamini tarama ve tedavileriyle sonuçlanmaktadır. ABD'de 2000 ile 2010 arasında D vitamini testleri için talebin 83 kat, İngiltere'de ise 2007 ile 2012 arasında birinci basamak sağlık kurumlarında 11 kat arttığı bildirilmektedir (K. W. Lin, 2018). Yapılan testler sonucunda konulan teşhisler, oral D vitamini takviyesiyle tedavi edilerek maliyetlerin artmasına sebep olmaktadır. D vitamini eksikliğinin tespiti ve tedavisi oldukça basit olmasına rağmen, bu konuda kaynak kullanımındaki hızlı artış endişe vericidir ve birinci basamakta güncel kılavuzlara ihtiyaç duyulmaktadır. Riskli grupların belirlenmesi ve güneşe çıkma gibi koruyucu önlemlerin teşvik edilmesi bu noktada önem arz etmektedir. Doğru yönlendirme için ülkemizde özellikle riskli gruplarda yapılacak toplum tabanlı araştırmalar, halk sağlığı açısından büyük bir öneme sahiptir (Börekçi, 2019).

2.2. FGF-23

Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23), FGF19 ve 21 ile birlikte, endokrin FGF'lerin alt ailesine ait olan bir fosfatürik hormondur (Château ve ark 2010). Böbrek, paratiroid, kalp, kemik ve muhtemelen diğer organları da etkilemektedir (Murali ve ark 2016a). İnsan FGF-23

geni, 12. kromozomda bulunur ve üç ekzon içerir. Bu gen 32 kDa büyüklüğünde bir glikoproteini kodlar. Aktif formdaki tam uzunluktaki FGF-23 (iFGF-23), 227 amino asitten oluşmaktadır (Şekil 2.3). FGF-23'ün küçük moleküler boyutu, böbreklerde kolayca parçalanmasına ve filtre edilmesine olanak sağlar (Mace ve ark 2015). Kemik kaynaklı FGF-23 hormonunun tam uzunluktaki formu biyolojik olarak aktiftir. Ancak furin benzeri proteazlar tarafından Arg179-Ser180 bölgesinden kesilerek biyolojik olarak inaktif olan C-terminal FGF-23 (cFGF-23) formuna dönüşebilir. Her iki form da dolaşımda tespit edilebilmektedir (R. Tang ve ark 2021). C-terminal FGF-23 parçası, doğal bir antagonist gibi davranmaktadır. FGF-23 molekülünün furin kesim bölgesindeki O-glikozilasyonu N-asetilgalaktosaminiltransferaz 3 (GalNT3) enzimi, fosforilasyonu ise familya 20 üyesi C (FAM20C) enzimi tarafından gerçekleştirilmektedir (Tagliabracci ve ark 2014). Bu iki enzimin farklı işlevleri vardır, bu yüzden FGF-23'ün salgılama sürecindeki kaderini belirlemektedir. GalNT3 enzimi, FGF-23 molekülünün hızlı parçalanmasını önleyici koruyucu bir rol üstlenir. FAM20C enzimi ise furin aracılı parçalanmayı kolaylaştırıcı etki gösterir (Şekil 2.3). Hücresel düzeyde bu parçalanma süreci, aktif FGF-23 molekülünün uygun miktarda salınımını sağlamak üzere hassas bir biçimde düzenlenmektedir (Tagliabracci ve ark 2014). Böbrekler, plazmadaki FGF-23 seviyelerinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. İnsanlarda yapılan çalışmalarda, FGF-23'ün böbrekler tarafından yaklaşık %40 oranında yüksek renal ekstraksiyona uğradığı gösterilmiştir (Van Ballegooijen ve ark 2016). FGF-23'ün primer üretim kaynakları fizyolojik duruma göre değişiklik göstermektedir. Normal fizyolojik koşullarda osteoblast ve osteosit gibi kemik hücreleri tarafından üretilirken, patolojik durumlarda kardiyomiyositler ve bağışıklık sistemi hücreleri (örneğin dendritik hücreler ve makrofajlar) tarafından da üretilmektedir (Dastghaib ve ark 2023). Yıllarca FGF-23, fosfatın reabsorpsiyonu inhibe edebilmesi ve kalsiyum, fosfor, sodyum ve D vitamini metabolizmasını düzenleyebilmesi Klotho-bağlı efektleri (kanonik sinyalleme) nedeniyle fosfatürik hormon olarak bilinirdi; ancak, son zamanlarda FGF-23'ün, kemiklerde, kalpte ve bağışıklık sisteminde bile Klotho-bağımsız efektleri (kanonik olmayan sinyalleme) dahil olmak üzere pleiotropik etkileri olduğu kabul edilmiştir (Smith ve ark 2019). Fosfat, vitamin D, PTH, kalsiyum, aldosteron, proinflamatuvar sitokinler ve demir eksikliği gibi çeşitli humoral osteositlerin FGF-23 salgılaması üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Bär ve ark 2019). İnsan serum veya plazmasında bulunan tam veya C-terminal FGF-23 düzeylerinin ölçülmesinde, farklı epitopları hedef alan ticari enzim bağlı immüno-sorbent test (ELISA) kitleri kullanılmaktadır. Tartışmalı bulunan verilere dayanarak, FGF-23'ün plazmada (k2-EDTA, heparin) serumdan daha fazla stabil olduğu önerilmektedir (Smith ve ark 2014).

FGF-23'ün proteaz inhibitörü kullanıldığında bile serum seviyesi, plazmadaki seviyeden çok daha düşüktür (Damasiewicz ve ark 2018). Kan örneği -80 °C'de saklanması durumunda, FGF-23 miktarında herhangi bir azalmaya neden olmamaktadır. El-Maouche ve arkadaşları, iFGF-23 ve cFGF-23 seviyelerinin beş tekrarlı dondurma ve çözme döngüsü boyunca önemli ölçüde değişmediğini bildirmiştir. Onun değerleri, 40 aydan fazla bir süre içerisinde -80 °C'de saklandığında sadece hafif bir değişiklik göstermiştir (El-Maouche ve ark 2016).



Şekil 2.3. FGF23'ün kemikteki post-translasyonel modifikasyonu.

İnsan FGF23 geni, 12. kromozomda 3 ekzon ile yer almaktadır. 32 kDa'lık bir glikoprotein kodlamaktadır. Tam formu (iFGF23) 227 amino asit içermektedir. Salgılama sürecinde Arg179-Ser180 arasında inaktif N-terminal ve C-terminal parçalara ayrılmaktadır. GALNT3'ün bir gen ürünü olan GalNAc-T3 tarafından Thr178'in O-glikozilasyonu, bu bölünmeyi inhibe edip tam uzunlukta FGF23'ü artırmaktadır. Osteositlerdeki FGF23'i etkileyen farklı fonksiyonlu iki enzim vardır. GalNAc-T3 FGF23'ün kaderini belirlemekte, bu yüzden koruyucu bir rol oynamaktadır. FAM20C, FGF23'ün hızlı bozunmasını inhibe etmekte, bu yüzden furin-bağımlı bölünmeye katkıda bulunmaktadır. FGF23: fibroblast büyüme faktörü 23, iFGF23: Tam FGF23, GalNAc-T3; N-acetylgalaktosaminiltransferaz-3, FAM20C: benzer sekans aile 20 üye C, RHTR; (Arginin, Histidin, Treonin, Arginin) (Dastghaib ve ark 2023).

2.2.1. FGF-23, D vitamini ve PTH arasındaki ilişkisi

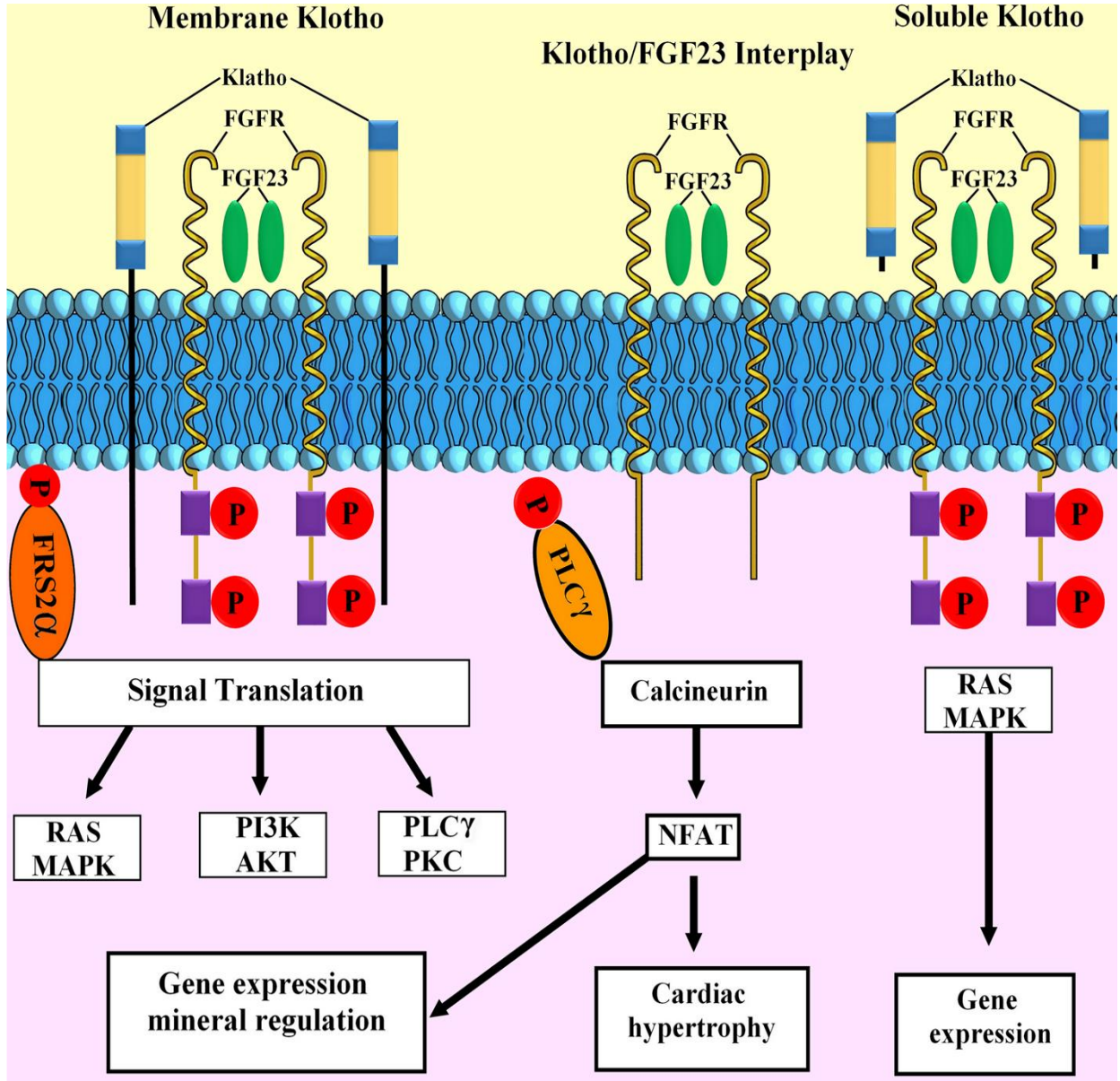
FGF-23'ün en önemli etkisi, kemikten salgılanan bir hormon olarak yüksek düzeyde α -Klotho ekspresyonu gösteren böbrekler üzerindedir (Kuro-o, 2019). Renal proksimal tübüllerde FGF-23, 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ sentezinde rol alan temel enzim olan 1 α -hidroksilaz (Cyp27b1)'in mRNA düzeyini azaltarak ve 1,25 (OH) $_2$ D $_3$ 'ü inaktive eden 24-hidroksilaz (Cyp24a1)'in

ekspresyonunu artırarak aktif D vitamini sentezini baskılamaktadır. FGF-23 ayrıca, NaPi-2b ko-transportörünün ekspresyonunu önemli ölçüde azaltarak proksimal tübüllerden fosfat (Pi) ve sodyum (Na) geri emilimini baskılamakta ve bunun sonucunda serum fosfat düzeylerini düşürmektedir (Andrukhova ve ark 2014). FGF-23 renal distal tübülleri de hedefleyerek ERK1/2-SGK1 (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinaz 1,2-serum glukokortikoid düzenleyici kinaz1) ve WNK4 (lizin olmayan kinaz 4) sinyal yolları üzerinden transiyent reseptör potansiyel vanilloid-5 (TRPV5) ve Na⁺/Cl⁻ kotransportörü (NCC) aracılığıyla Na⁺ geri emilimini artırmaktadır. Distal tübüllerde FGFR1'in spesifik çıkarılmasının ciddi renal Ca⁺² ve Na⁺ kaybına yol açtığı ortaya çıkmıştır (X. Han ve ark 2020). FGF-23'ün fosfatüri oluşturucu ve koruyucu etkileri, paratiroid hormonu (PTH) ile benzerlik göstermektedir. Ancak kalsitriol (1,25 (OH)₂D₃) üretiminde görevli olan 1 α -hidroksilazın düzenlenmesi konusunda bu iki hormonun etkileri birbirinin tam tersidir (Perwad ve ark 2007a). Birçok çalışmada, 1,25 (OH)₂D₃ uygulamasının ve diyetle alınan fosfat miktarının serum FGF-23 düzeylerini etkileyebildiği gösterilmiştir. Ayrıca, kemik hücrelerinin kültür ortamındaki 1,25 (OH)₂D₃ ve fosfatın ekstraselüler konsantrasyonu, sadece FGF-23'ün transkriptini değil, aynı zamanda post-translasyonel modifikasyonu da düzenlemektedir. Kronik renal yetmezliğinin ve sekonder hiperparatiroidizmin önlenmesi, D vitamini analogu olan Parikalsitol'ün (19-nor-1,25-dihidroksi vitamin D₂) intraperitoneal enjeksiyonunun, D vitamini eksikliği olan sıçanlarda (standart D vitamini eksikliği diyeti ile indüklenmiş) PTH, FGF-23 ve 1,25 (OH)₂D₃'te bir azalmaya neden olduğunu, ancak Ca ve PO₄ fraksiyonel atılım üzerinde herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir. FGF-23'teki azalmanın, düşük serum 1,25 (OH)₂D₃ ve PTH sonucu olabileceği sonucuna varıldı (Saki ve ark 2019). Başka bir çalışmanın verilerinde, PTH ve 1,25 (OH)₂D₃'ün FGF-23 düzenlemesindeki etkilerini doğrulanmıştır (Dastghaib ve ark 2023).

Yapılan bir klinik çalışmada, D vitamini eksikliği bulunan 119 hastaya kolekalsiferol (50.000 IU D vitamini) verilmesiyle, serum FGF-23, 1,25 (OH)₂D₃ ve 25 (OH)D₃ düzeylerinin belirgin olarak arttığı gösterilmiştir. Ayrıca, serum PTH ve 1,25 (OH)₂D₃'teki azalmanın FGF-23 seviyesi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun aksine Ca'nın negatif bir ilişkisi olduğunu belirtilmiştir. Bu bulguyu açıklamak için, kalsiyumun artan 1,25 (OH)₂D₃ nedeniyle FGF-23'ün kontrolsüz artışını azaltarak düzenleyebileceği önerilmiştir (Dastghaib ve ark 2023; Smith ve ark 2019). PTH ve FGF-23 fosfatürik hormonlar olarak bilinmektedir. Her iki hormon da renal proksimal tübüllerde fosfat geri emilimini azaltarak etki gösterir; ancak 1,25 (OH)₂D₃ metabolizması üzerindeki etkileri birbirinden tamamen farklıdır. İki yönlü olarak, PTH, D vitamini aktif formunu indüklemek için 1 α -hidroksilazı (Cyp27b1) artırarak ve

hormonun inaktivasyonunu baskılamak için 24-hidroksilazı (Cyp24a1) inhibe ederek 1,25 (OH)₂D₃'ü artırmaktadır (Dastghaib ve ark 2023). Birçok çalışma, FGF-23'ün MAPK sinyal yolu aracılığıyla paratiroid bezlerinde doğrudan etki göstererek PTH ekspresyonunu baskıladığını ortaya koymuştur. FGF-23/Klotho/FGFR1c, ERK1/2 kaskadını indükler ve FGF-23/ FGFR3,4, kalsinörin/NFAT sinyal yolunu kullandığında Klotho'dan bağımsızdır, bu da PTH sentezi ve salgılanmasının inhibisyonuna yol açmaktadır. Ek olarak, çalışmalar, FGF-23'ün, PTH'nin inhibisyonunda rolü olan paratiroid bezlerindeki bulunan VDR (vitamin D reseptörü) ve CaSR (Ca⁺² sensör reseptörü) artırabileceğini göstermiştir (Silver ve ark 2010a) (Şekil 2.4).

Bazı hücre kültürü çalışmalarında, PTH varlığında FGF-23 ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu ile tutarlı olarak, hiperparatiroidizm durumlarında serum FGF-23 düzeylerinde artış görülebilmektedir (Yamashita ve ark 2004). FGF-23'ün, Klotho ve 1,25 (OH)₂D₃'ten bağımsız olarak, otokrin/parakrin etkilerle kemikten salgılandıktan sonra osteoblast/osteosit hücrelerindeki lokal fonksiyonlar aracılığıyla kemik mineralizasyonunu düzenleyebileceği belirtilmiştir. Murali ve ark. FGF-23'ün, düşük afinite ile FGFR3'e bağlanarak gen transkript düzeyinde Tnap'ı (doku özgül olmayan alkalin fosfataz) inhibe ettiğini ve böylece osteoblastlardaki pirofosfat konsantrasyonunu artırdığını göstermiştir (Murali ve ark 2016b). FGF-23, Klotho'nun doğal olarak ifade edilmediği MC3T3.E1'deki (Bir fare yenidoğanından izole edilen bir preosteoblast hücre hattından izole edilen bir dizi klondan biridir) çözünür Klotho varlığında sadece osteoblastların mineralizasyonunu ve MAPK/ERK1,2 gen ekspresyonunu baskılamaktadır. Dikkat çekici olan, FGF-23'ün MAPK kaskadı aracılığıyla çözünür Klotho içinde bulunması, Dkk1'i (Wnt/β-katenin'in endojen inhibitörü) indükleyebilmekte ve Wnt/β-katenin sinyal yolunu (osteoblast aktivitesi, kemik gelişimi ve kemik bakımının ana etkileyicisi) inhibe etmektedir (Carrillo-López ve ark 2016). Rhee ve ark. ilk kez, kemik hücrelerinde Klotho ekspresyonu ve ardından osteosit hücrelerindeki kaldırılmasının, kemik hacminde ve osteoblast aktivitesinde ani bir artışa neden olduğunu bildirmiştir. Sonuç olarak, Klotho'nun kemik oluşumunun negatif bir düzenleyicisi olduğu ve kemik dokusunun FGF-23'ün başka bir hedef doku olduğu belirtilebilmektedir (Rhee ve ark 2011).



Şekil 2.4. FGF23, Klotho ve FGFR arasındaki etkileşimin şematığı.

FGFR'lerin ifadesi vücutta bol miktarda bulunmakta, ancak α Klotho ko-reseptörünün doku spesifik ifadesi, hücre etkilerinin belirlenmesi için sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Klotho proteini, serum, idrar ve BOS'ta tespit edilen FGF23'ten bağımsız humoral fonksiyonları olan çözünür bir formda olabilmekte ve mKL olarak adlandırılan membrana bağlanan FGF23 için esas bir ko-reseptör olarak membran formundadır. Transmembran klotho, FGF23'ün FGF reseptörüne bağlanmasını sağlamaktadır, FRS2 α 'nın fosforilasyonuna ve ardından Ras/MAPK, PI3K/AKT veya PLC γ /PKC sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır. Klotho ve sKL olmadığında, FGF23 FGFR4'e bağlanmakta ve PLC γ 'nın fosforilasyonunu ve kalsinörin/NFAT gibi kalsiyumla düzenlenen sinyal yollarının aktivasyonunu indüklemektedir. FGF23'ün çözünür Klotho ile bağlanması da mümkündür, ancak PLC γ 'den Ras/MAPK'yi etkinleştiren ve hayati genlerin ifadesini indükleyen farklı aşağı akış olaylarına neden olmaktadır. FGF23: fibroblast büyüme faktörü 23, FRS2 α : FGF reseptörü substratı 2 α , MAPK: mitojen-aktive protein kinazı, PLC γ : fosfolipaz C γ , NFAT: aktive T-hücrelerinin nükleer faktörü (Dastghaib ve ark 2023).

2.3. MikroRNA

miRNA'lar, ortalama 22 nükleotit uzunluğunda küçük kodlamayan RNA'lardır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden primer miRNA'lara (pri-miRNA) transkribe edilmekte ve öncül miRNA'lara (pre-miRNA) ve daha sonra olgun miRNA'lara dönüştürülmektedir. Çoğu durumda, miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3' UTR'si ile etkileşime girerek ifadeyi baskılamaktadır (Ha ve ark 2014). Ancak, miRNA'ların, 5' UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri gibi diğer bölgelerle de etkileşimi bildirilmiştir (Broughton ve ark 2016). Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Vasudevan, 2012). Son çalışmalar, miRNA'ların translasyon hızı ve transkripti kontrol etmek için farklı hücre içi bölmeler arasında dolaştığını öne sürmüştür (Makarova ve ark 2016). miRNA'lar, normal hayvan gelişimi için kritiktir ve çeşitli biyolojik süreçlere dahil olurlar (Fu ve ark 2013). miRNA'ların anormal ekspresyonu, birçok hastalıkla ilişkilidir (Chakraborty, 2017). Ayrıca, miRNA'lar ekstrasellüler sıvılara salgılanmaktadır. Ekstrasellüler miRNA'lar, çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak geniş çapta bildirilmiştir. Ayrıca hücre-hücre iletişimini sağlamak için sinyal molekülleri olarak görev yapmaktadır (W. Huang, 2017).

2.3.1. MikroRNA'ların biyogenezi

miRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin post-transkript veya ko-transkript olarak işlenmesiyle başlamaktadır (Ha ve ark 2014). miRNA biyogenezi, kanonik ve kanonik olmayan yollar olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.5).

2.3.2. MikroRNA biyogenezinin kanonik yolağı

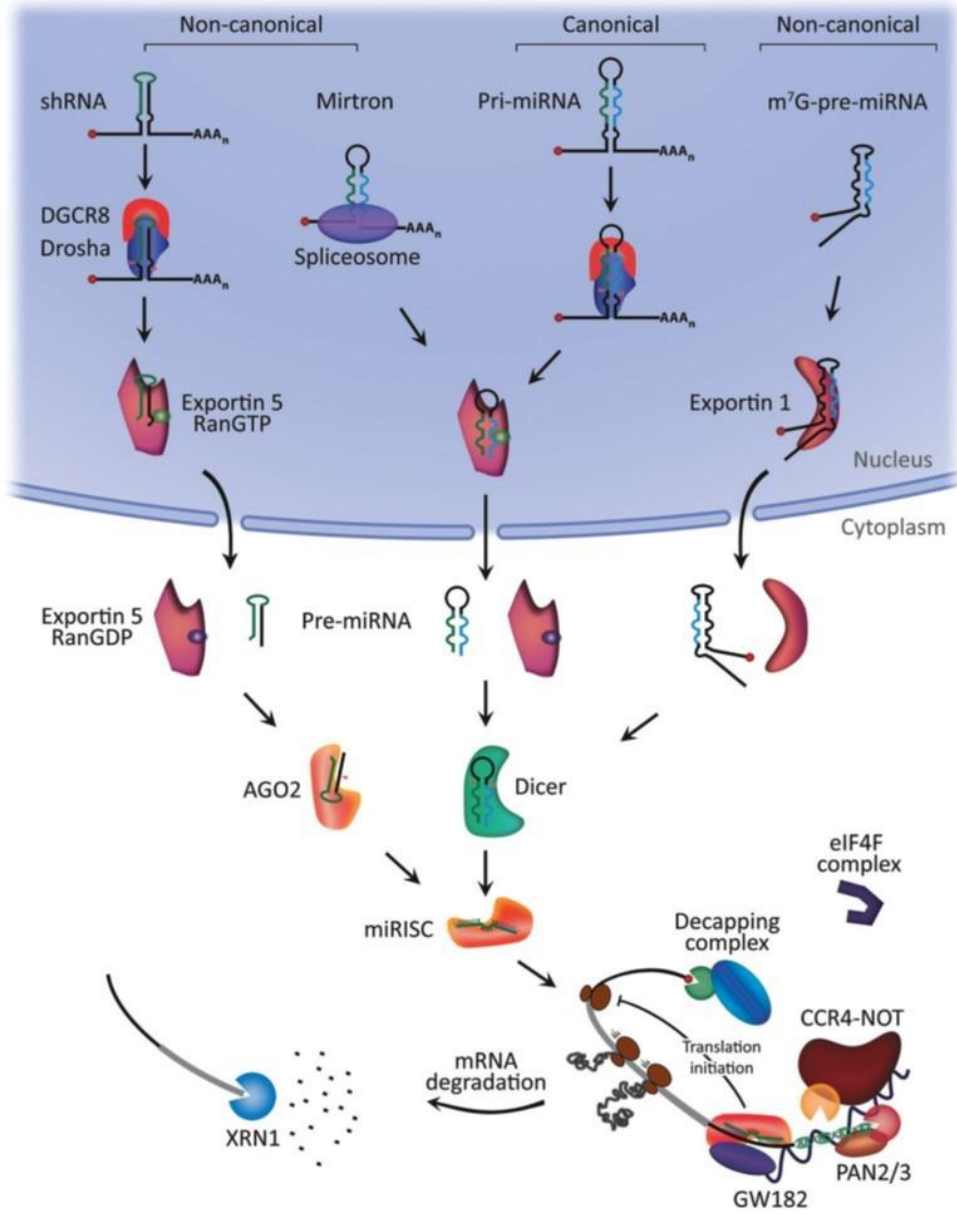
Kanonik biyogenezi yolu, miRNA'ların işlendiği baskın yoldur. Bu yolda, pre-miRNA'lar genlerinden transkribe edilmekte ve daha sonra RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi olan Drosha'dan oluşan bir mikroişlemci kompleksi tarafından pre-miRNA'lara dönüştürülmektedir (Denli ve ark 2004). DGCR8, pri-miRNA içindeki N6-metiladenilatlı GGAC ve diğer motifleri tanımaktadır (Alarcón ve ark 2015), Drosha ise pri-miRNA çift sarmalını, pri-miRNA'nın karakteristik saç tokası yapısının tabanında kesmektedir. Bu, pre-miRNA üzerinde 2 nt 3' çıkıntı (overhang) oluşmasına neden olmaktadır (J. Han ve ark 2004). pre-miRNA'lar oluşturulduğunda, bir eksportin 5 (XPO5)/RanGTP kompleksi tarafından sitoplazmaya aktarılmakta ve daha sonra RNase III endonükleaz Dicer tarafından işlenmektedir (Alarcón ve ark 2015). Bu süreç, terminal halkanın çıkarılmasını içermekte ve bu, olgun bir miRNA

çift sarmalının oluşmasına neden olmaktadır (Zhang ve ark 2004). miRNA ipliğinin yönlülüğü, olgun miRNA formunun adını belirlemektedir. 5p ipliği, pre-miRNA saç tokasının 5' ucundan türetilirken, 3p ipliği 3' ucundan türetilmektedir. Olgun miRNA çift sarmalından türetilen her iki iplik de bir ATP-bağımlı şekilde Argonaut (AGO) protein ailesine (insanlarda AGO1-4) yüklenebilmektedir (Yoda ve ark 2010). Herhangi bir miRNA için, AGO'ya yüklenmiş 5p veya 3p ipliğinin oranı, hücre tipine veya hücrenel çevreye bağlı olarak büyük ölçüde değişmektedir (Meijer ve ark 2014). 5p veya 3p ipliğinin seçimi, kısmen miRNA çift sarmalının 5' uçlarındaki termodinamik stabiliteye veya nükleotid pozisyon 1'deki 5' U'ya dayanmaktadır. Genellikle, 5' stabilitesi daha düşük olan veya 5' urasil içeren iplik, tercihen AGO'ya yüklenmekte ve rehber iplik olarak kabul edilmektedir. Yüklenmemiş iplik, yolcu ipliği olarak adlandırılmakta ve tamamlayıcılık derecesine göre çeşitli mekanizmalarla rehber iplikten hidrolize olmaktadır. Uyumsuzluklar içermeyen miRNA'nın yolcu iplikleri, AGO2 tarafından kesilmekte ve hücrenel mekanizma tarafından parçalanmakta, bu da güçlü bir iplik yönelimine (bias) oluşturabilmektedir. Aksi takdirde merkezi uyumsuzluklar içeren miRNA çift sarmalları veya AGO2'ye yüklenmemiş miRNA, pasif olarak hidrolize olup parçalanmaktadır (Ha ve ark 2014) (Şekil 2.5).

2.3.3. MikroRNA biyogenez kanonik olmayan yolağı

Bugüne kadar, birden çok kanonik olmayan miRNA biyogenez yolu bulunmuştur. Bu yollar, genellikle Drosha, Dicer, eksportin 5 ve AGO2 olmak üzere kanonik yolaktaki proteinlerin farklı kombinasyonlarını kullanmaktadır. Genel olarak, kanonik olmayan miRNA biyogenez, Drosha/DGCR8-bağımsız ve Dicer-bağımsız yollar olmak üzere gruplandırılabilir. Drosha/DGCR8- bağımsız yolak tarafından üretilen pre-miRNA'lar, Dicer substratlarına benzemektedir. Böyle pre-miRNA'lara örnek olarak, birleştirme (splicing) sırasında mRNA'nın intronlarından üretilen mirtronlar verilebilir. Başka bir örnek, 7-metilguanozin (m7G) kaplı pre-miRNA'dır. Bu yeni RNA'lar, Drosha kesimine gerek olmadan direkt olarak eksportin 1 aracılığıyla sitoplazmaya aktarılmaktadır. m7G kapağının 5p ipliğinin Argonauta yüklenmesini önlemesi nedeniyle güçlü bir 3p iplik yönelimi (bias) vardır. Öte yandan, Dicer-bağımsız miRNA'lar, endojen kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden Drosha tarafından işlenmektedir. Bu pre-miRNA'lar, sitoplazma içinde olgunlaşmalarını tamamlamak için AGO2'ye ihtiyaç vardır, çünkü Dicer substratları olmak için yetersiz uzunluktadır. Bunun için tüm pre-miRNA'nın AGO2'ye yüklenmesini ve 3p

ipliğinin AGO2-bağımlı silinmesini indüklemektedir. 5p ipliğinin 3'-5' kırılması (trimming) edilmesiyle, olgunlaşmalarını tamamlamaktadır (O'Brien ve ark 2018) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. MikroRNA biyogenezi ve etki mekanizması.

2.3.4. MikroRNA ile ilgili gen düzenlemenin mekanizmaları

Bugüne kadar yapılan çoğu çalışmalar, miRNA'ların hedef mRNA'larının 3'UTR'indeki spesifik diziyeye bağlanıp transkripsiyonel baskılandığını, mRNA'nın deadenilasyonunu ve başlık çıkarmayı (decapping) tetiklediğini göstermiştir. 3'UTR'e ek olarak 5'UTR, kodlama dizisi ve promotör bölgelerine miRNA bağlanabileceği tespit edilmiştir. miRNA'ların 5'UTR ve kodlama bölgelerine bağlanması gen ekspresyonu üzerinde susturma etkilerine sahiptir, promotör bölgesi ile miRNA etkileşiminin transkripsiyonu indüklediği bildirilmiştir. Ancak, bu etkileşimin fonksiyonel önemini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (O'Brien ve ark 2018).

2.3.5. MikroRNA'ların biyolojik rolleri

Son çalışmalar, mikroRNA'ların (miRNA'lar) gelişim, proliferasyon, farklılaşma, hücre kaderinin belirlenmesi, apoptoz, sinyal iletimi, organ gelişimi, hematopoietik köken farklılaşması, konakçı-viral etkileşimler ve tümör oluşumu dahil olmak üzere en kritik biyolojik olaylarda merkezi bir rol oynadığını göstermiştir (Bartel, 2009). miRNA'ların karakterizasyonunda ve işlevsel analiz tekniklerindeki gelişmeler, sadece çeşitli hücresel süreçlerdeki rollerini değil, aynı zamanda çeşitli hastalıklarda miRNA ekspresyonunun anormal düzenlerini de ortaya çıkarmıştır (Y. Huang ve ark 2011).

2.3.6. MikroRNA'lar ve Sinir Sistemi Düzenlemesi

Son çalışmalar, miRNA'nın erken embriyonik kök hücre hayatta kalması ve farklılaşması için gereklidir. Ayrıca olgun nöronların hayatta kalmasını ve işlevlerini sürdürmede önemli bir rol oynadığını belirlenmiştir. Aşırı büyüme, sinaptik plastisitenin kaybı, Alzheimer hastalığı (AD), kırılğan X sendromu (FXS) ve otizm dahil olmak üzere birçok sinir sistemi hastalığının ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Çalışmalar, büyüme ve sinaptik plastisitenin, sinaptik gelişme, olgunlaşma ve plastisiteye katkıda bulunan miR-134 tarafından düzenlenebileceğini öne sürmektedir (Sempere ve ark 2004). miR-133b, özellikle orta beyin dopaminerjik nöronlarında (DN'ler) ifade edilmekte ve Parkinson hastalığı olan hastaların orta beyin dokusunda eksik bulunmuştur. miR-133b, eşleşmiş-gibi homeodomain transkript faktörü Pitx3'ü içeren bir negatif geri bildirim devresiyle orta beyin DN'lerinin olgunlaşmasını ve işlevini düzenlemektedir. miR-133b'nin bu geri bildirim devresinde, lokomasyon gibi dopaminerjik davranışların düzenlenmesinde bir rol oynadığı gösterilmiştir (Smirnova ve ark 2005).

miR-124'ün nöron-spesifik gen ekspresyonunun bazı regülatörlerini etkilediği bulunmuştur. Son çalışmalar, miR-124'ün, nöronal genlerin RE1-susturma transkript faktörü (REST) aracılı baskılanması için gereken küçük C-terminal domain fosfataz-1'i (SCP1) direkt olarak inhibe edebileceğini göstermiştir (Coulson, 2005). Bu, bir negatif geri bildirim döngüsüdür, burada miR-124 ve diğer nöron-spesifik genlerin ekspresyonu, nöronal olmayan hücrelerde ve nöronal progenitör hücrelerde REST ve SCP1 tarafından inhibe edilmektedir. Hücreler nöronlara farklılaştığında, REST transkripti inhibe edilmekte ve miR-124, SCP1'i inhibe ederek REST'in biyolojik etkilerinin ortadan kaldırılmasını indüklemektedir (Shi ve ark 2009).

2.3.7. MikroRNA'ların hücre farklılaşması ve gelişimi ile ilişkisi

Son bir çalışma, let-7 miRNA'ları-somatik hücrelerde yüksek düzeyde ifade edilen miRNA'larının ailesi ancak vahşi tip değil, DGCR8^{-/-}-embriyonik kök hücrelerde (ESCs) kendini yenilemeyi baskılayabileceğini ve kendini yenileyen ile farklılaşmış hücre kaderlerini stabilize edebileceğini tespit etmiştir (Melton ve ark 2010). Bantam miRNA, overdeki dFmrp ile fiziksel olarak ilişkilidir. dFmr1 bantam sadece ilkel germ hücre farklılaşmasını baskılamak için gereklidir. Ayrıca germline kök hücre tamiri için ekstrinsik faktör olarak rol oynamaktadır. Bantam genetik olarak dFmr1 ile etkileşime girmekte ve germline kök hücrelerinin kaderini düzenlemektedir (Y. Yang ve ark 2009). DGCR8, Dicer ve Ago2, miRNA homeostazi için temel faktörlerdir. Osteoklast farklılaşması ve işlevinde kritik rolleri vardır. Small interfering RNA'lar tarafından yapılan DGCR8, Dicer veya Ago2'nin gen susturulması. Osteoklast transkript faktör ekspresyonunun ve işlevinin global inhibisyonunu, osteoklastogenezin azalmasını ve in vitro kemik rezorpsiyonunun azalmasını ortaya çıkarmıştır (Y. Huang ve ark 2011).

2.3.8. MikroRNA'lar ve viral enfeksiyonlar

Virüsler, konak hücreyi kontrol etmek için miRNA'ları kullanmaktadır; karşılıklı olarak, konak hücreler, temel viral fonksiyonları hedeflemek için miRNA'ları kullanmaktadır. Deneysel sonuçlar, miRNA'ların doğuştan gelen bağışıklıkta yer aldığını göstermiştir. Aynı sonuçlar miRNA'lar hem gen regülatörleri hem de RNA ve DNA virüslerine karşı bir konak hücre savunması olarak işlev gördüğünü göstermiştir (O'Connell ve ark 2007; Williams, 2008). İnsan hücrelerinde anti-viral miRNA tarafından primat köpük virüs tip 1 (PFV-1) birikimini etkin bir şekilde kısıtlandığı ilk olarak bildirilmiştir (Lecellier ve ark 2005). SV40

kodlu miRNA miR-S1, enfekte hücrenin bağışıklık sisteminden gizli kalmasına yardımcı olmaktadır. miR-S1 viral replikasyon döngüsünün geç aşamasında ifade edilmekte. Bu aşamada miR-S1 T antijenini kodlayan erken viral mRNA'ları parçalamaktadır. Böylece enfekte hücrenin sitotoksik T lenfositlerine maruz kalmasını kısıtlamaktadır (Sullivan ve ark 2005). miRNA-susturma mekanizması, HIV-1 replikasyonunu kontrolünde fizyolojik bir rol oynamaktadır. Hem HIV-1 ile enfekte olmuş donörlerden gelen periferik kan mononükleer hücrelerde hem de latent enfekte hücrelerde virüs replikasyonunu inhibe etmektedir (Triboulet ve ark 2007). Konak hücrenin miR-122 ekspresyonu, IFN- β aracılığıyla çalışıp hepatit C virüsünün (HCV) replikasyonunu inhibe edebilmektedir (Pedersen ve ark 2007).

2.3.9. MikroRNA'lar ve bağışıklık

miRNA kontrolü, memeli bağışıklık sisteminde kritik bir düzenleyici faktör olarak ortaya çıkmıştır. miRNA mekanizmasının genetik ablasyonu veya belirli bireysel miRNA'ların kaybı veya düzensizliği, bağışıklık gelişimini ciddi şekilde bozmakta ve otoimmünite ve kanser gibi bağışıklık bozukluklarına yol açabilmektedir. miRNA'lar, yüzlerce hedef genin protein fenotipini modüle ederken, sadece birkaç anahtar hücre proteininin konsantrasyonlarını düzenleyerek fizyolojik süreçleri etkileyebilmektedir. Bu proteinler belirli bir hücre ortamında tek veya işlevsel ilişkili yolların bileşenleri olabilmektedir (Xiao ve ark 2009). miRNA 223, granülositlerin oluşumunu ve aktivasyonunu kontrol etmektedir. Farelerde miRNA 223 eksikliği, granülosit progenitörlerinin sayısındaki hücre-otonom artıştan kaynaklanan genişlemiş bir granülosit kompartmanı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca miRNA 223 eksikliği olan granülositler aşırı olgunlaşmış, aktivasyon uyarılarına aşırı duyarlı ve artmış fungisidal aktivite göstermektedir. Sonuç olarak miRNA 223 granülosit üretimini ve inflamatuvar yanıtı için ince ayarlama bir rol oynamaktadır (Johnnidis ve ark 2008). Çalışmalar, miRNA düzensizliğinin sedef hastalığının patogenezi ile ilgili olduğunu, yerleşik ve infiltre eden hücreler arasındaki iletişim bozukluğuna katkıda bulunduğunu öne sürmektedir (Sonkoly ve ark 2007). miR-21'in sedef hastalığında ekspresyonu artmıştır. miR-21 T hücrelerinde baskın şekilde ifade edilmiştir (Wu ve ark 2007). miR-146a interferon (IFN) yolunun bir negatif düzenleyicisidir. miR-146a'nın düşük ekspresyonu, lupus hastalarında tip I IFN yolunda değişikliklere katkıda bulunmaktadır. miR-146a anahtar sinyalizasyon proteinlerini hedeflemektedir (Y. Tang ve ark 2009). miR-125a-5p'nin lipid alımını düzenlediği bulunmuştur. miR-125a-5p de oxLDL ile uyarılan monosit türevi makrofajlarda bazı inflamatuvar sitokinlerin (interlökin-2, interlökin-6, tümör

nekroz faktörü-alfa, dönüştürücü büyüme faktörü-beta) salgılanmasını azalttığı bulunmuştur (Chang ve ark 2007a).

2.3.10. MikroRNA'lar ve kanser

Kanserle birlikte görülen anormal hücre gelişimi, miRNA'larla da ilişkili bulunmuştur. Kanserde, miRNA'lar düzenleyici moleküller olarak çalışmaktadır. miRNA'lar onkogenler veya tümör baskılayıcılar olarak hareket etmektedir (Shenouda ve ark 2009). CLL (Kronik lenfositik lösemi) hastalarından alınan kan örneklerinde miR-15 ve miR-16'nın ekspresyonunu analiz edilmiştir (Calin ve ark 2002). Her iki miRNA, normal doku veya lenfositlere kıyasla, vakaların çoğunda (%68) bulunmadığı veya düşük seviyede bulunduğunu tespit edilmiştir. Bu bulgu, bu iki miRNA'nın kronik lenfositik lösemi patogenezinin neden olduğunu düşündürmüştür. Son zamanlarda, O'Connell ve ark. (O'Connell ve ark 2008), M4 veya M5 alt tiplerine sahip akut miyeloid lösemi (AML) hastalarının kemik iliği blastlarında miR-155'in ekspresyonunun arttığını bulmuştur. miR-34a P53 tümör baskılayıcı protein tarafından indüklenmektedir. Pankreatik kanser hücrelerinde eksik olduğu gösterilmiştir (Chang ve ark 2007b). miR-34a'ya yanıt veren genler, hücre döngüsü ilerlemesi, apoptozis, DNA onarımı ve anjiyogenezin düzenlenmesinde yer almaktadır (Lodygin ve ark 2008). Tümörler, kanserli olmayan dokulara kıyasla miR-26 ekspresyonunun azalmış seviyelerine sahiptir. miR-26 ekspresyon seviyesinin hepatosellüler karsinomla ilişkili olduğunu göstermiştir (Ji ve ark 2009).

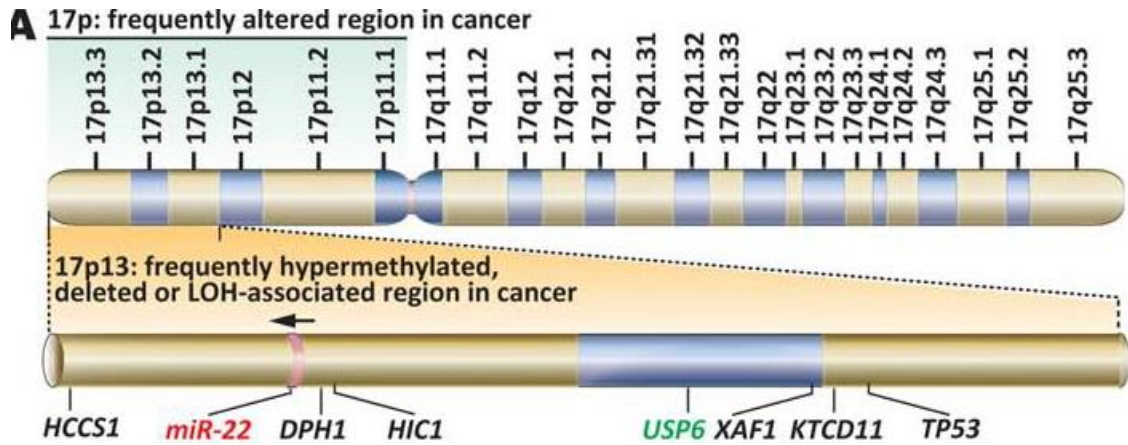
2.3.11. MikroRNA'lar ve diyabet

Bugüne kadar yapılan birçok çalışma, gen transkriptlerinin translasyonunu düzenleyen miRNA'ların, pankreas gelişiminde yer alan gen ekspresyon kaskadlarını etkilediğini göstermiştir. Örneğin miR-7 ve miR-375, pankreasta yüksek seviyelerde ifade edilmektedir. Ayrıca Zebrafish pankreas gelişimi ile farelerdeki insülin salgılanmasında yer aldıkları bilinmektedir (El Ouaamari ve ark 2008). Bu son çalışma, miR-375'in direkt olarak 3'-fosfoinozotide-bağımlı protein kinaz-1 (PDK1)'i hedeflediğini ve protein seviyesini azalttığını bulmuştur. Bunun sonucunda insülin gen ekspresyonu ve DNA sentezi üzerindeki glukoz uyarıcı etkinin azaldığını ortaya koymuştur. Glukoz, miR-375 prekürsör seviyesinde bir azalmaya ve PDK1 protein artışına yol açmaktadır (El Ouaamari ve ark 2008). miR-375, insan adacık beta hücrelerinde ve non-beta hücrelerinde farklı şekillerde ifade edilmektedir. Her iki hücre tipinde de miR-375 seviyesinde anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Tek hücrelerdeki

adacık-spesifik miRNA ve mRNA analizini incelenirken, non-beta hücrelerin daha yüksek seviyelerde miR-375 içerdiğini görülmüştür (Joglekar ve ark 2009).

2.3.12. MikroRNA 22

2001 yılında, Lagos-Quintana ve ark. ilk olarak insan miRNA 22 genini HeLa hücrelerinde klonlayıp insan miRNA 22 geninin 22-nt kodlamayan bir RNA üretmek üzere transkribe edildiğini keşfetmiştir. Ayrıca, Northern blotları, miRNA 22'nin farklı omurgalılarda görece güçlü bir sinyale sahip olduğunu göstermiştir (Lagos-Quintana ve ark 2001). 20 insan normal dokularında (beyin, akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, dalak, düz kas, mesane, prostat, testis, over, özofagus, serviks, trakea, timus, plasenta, düz bağırsak, kolon, tiroid ve yağ dokusu) miRNA 22'nin yaygın olarak ifade edildiği bulunmuştur. miRNA 22 ekspresyonunun kalp, düz kas, mesane ve yağ dokusunda daha yüksek olduğu görülmüştür (Yamakuchi ve ark 2011). Fiziksel haritalamaya insan miRNA 22'yi 17p13 kromozomunda konumlandırmıştır (Şekil 2.6). MicroRNA-22 (miRNA 22), yüksek derecede korunmuş bir 22-nt miRNA'dır. İnsan hastalıklarındaki ve normal fizyolojideki rolleri ortaya çıkmaya yeni başlandı. Son zamanlarda, miRNA 22'nin tümör oluşumu, epigenetik modifikasyon, embriyonik gelişim, iskelet metabolizması, panik bozukluk ve kardiyomiyosit hipertrofisi gibi birçok aktiviteye bağlandığı anlaşılmıştır. miRNA 22'nin aşırı ekspresyonu, çeşitli insan



Şekil 2.6. MikroRNA-22 geni, kromozom 17p13'te yeridir.

hastalıklarında belirlenmiştir. Birçok çalışma miRNA 22'nin çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir araç olarak kullanılabileceğini açıklamıştır (Xiong, 2012) (Şekil 2.6). miRNA 22, çeşitli hücre tiplerinde bir tümör baskılayıcı ve onkogen olarak rol oynamaktadır. Tümör oluşumu ve ilerlemesinin düzenlenmesine katkıda bulunabilmektedir. Ek olarak, miRNA 22, embriyonik kök (ES) hücre gelişimi ve osteoartrit gibi metabolik kemik hastalıklarında yer almaktadır. miRNA 22, güçlü bir panik bozukluk

(PD)-ilişkili düzenleyici olarak işlev görebilmektedir. Ayrıca kardiyomiyosit hipertrofiye neden olabilmektedir (Xiong, 2012).

Proteomik ve vücut kitle indeksi (BMI) korelasyon analizleri, miRNA 22-Peroxisome proliferator-activated receptor A (PPARA) ve miRNA 22-BMP7 dahil olmak üzere miRNA-hedef çiftlerinin, kıkırdak lipid metabolizma yollarıyla sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu göstermiştir. miRNA 22'nin ekspresyonu, PPARA ve BMP7 protein ekspresyonu ile yüksek derecede ters orantılıdır. Lüçiferaz raportör deneyi (luciferaz raportör protein olarak kullanılarak bir hedef genin ekspresyonunu aktive edip edemeyeceğini veya baskılayıp baskılayamayacağını araştıran bir testtir) ve Western blotlar, miRNA 22'nin, normal ve osteoartritik kondrositlerde sırasıyla PPARA 3' UTR ve BMP7 3'UTR'yi hedefleyerek PPARA ve BMP7 protein ekspresyonunu düşürdüğünü ortaya koymuştur. Son olarak, Iliopoulos ve ark. miRNA 22'nin osteoartritik kıkırdakta önemli ölçüde arttığını bulmuşlardır. Ayrıca PPARA ve BMP7'yi direkt olarak hedefleyerek, tip II kollajenin parçalanmasına neden olan IL-1/MMP13 sinyallemesini aktive ederek ve kıkırdak onarım proteini agreganı baskılayarak kıkırdak yıkımını indüklediğini bulmuşlardır (Iliopoulos ve ark 2008). Kondrosit büyümesinin inhibisyonu ile birlikte, miRNA 22'nin tümör baskılayıcı özelliğini göz önüne alındığında, miRNA 22'nin anti-büyüme aktiviteye sahip olabildiğini düşünülmektedir (Xiong, 2012).

miRNA 22'nin metabolik ve immün etkilere sahip metabolitler tarafından indüklenmektedir. Onlar retinoik asitler, safra asitleri, vitamin D ve kısa zincirli yağ asitleridir. miRNA 22, hipoksiye duyarlı faktör 1 (HIF1a) inhibe ettiği bulunmuştur. Hem hepatositlerde hem de T hücrelerinde retinoik asit sinyallemesini artırdığı görülmüştür. Ayrıca, miRNA 22 tedavisi inflamasyonu azaltıp metabolizmayı düzelttiğini tespit edilmiştir. Karaciğerde, miRNA 22, IL17 üreten T hücrelerinin miktarları azaltılmasının yanı sıra, Rorc ve Il17a genlerine HIF1a etkileşimini azaltarak IL17 sinyallemesini inhibe ettiğini bulunmuştur (Y. Hu ve ark 2023).

Orijinal bulgulara göre mikroRNA-22-3p inhibisyonunun, yağ akümüasyonu, insülin direnci ve obezite, tip 2 diyabet mellitus ve non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı gibi karmaşık metabolik bozukluklar için etkili bir tedaviye yol açabileceğini öne sürmektedir (Thibonnier ve ark 2020).

Bir çalışmada miRNA 22, insan kolon kanseri hücrelerinde 1,25 (OH)₂D₃'ün hedefi olduğu bulunmuştur. Ayrıca hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin bir kısmından sorumlu olduğu bulunmuştur. miRNA 22'nin, RNA düzeyinde, OGN, NELL2, HNRPH1, RERE ve NFAT5 gibi birkaç genin 1,25 (OH)₂D₃ tarafından baskılanmasını aracılıdığı bulunmuştur. 50 insan kolon kanseri hastasının 39'unda (%78), tümördeki miRNA 22 ekspresyonu, normal dokudan daha düşük bulunmuştur. Dikkat çekici bir şekilde, miRNA 22, zaman-, doz- ve VDR-bağımlı bir şekilde 1,25 (OH)₂D₃ tarafından indüklenmektedir. miRNA 22, post-transkripsiyonal düzeyde gen ekspresyonu modüle edici aktivitesi aracılığıyla 1,25 (OH)₂D₃'ün yeni bir hedefi olarak belirlenmiştir. Bu da onun neoplazi üzerindeki önemli koruyucu etkisini en azından kısmen açıklamaya katkıda bulunabilmektedir (Alvarez-Díaz ve ark 2012).

Son zamanlarda yapılan bir çalışmada multipl skleroz (MS) hastalarındaki miRNA 22 seviyesi, önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, miRNA 22 seviyesi ile vitamin D reseptörü VDR seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon bulunduğu gözlemlenmiştir (Khedr ve ark 2022).

Y. Hu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmaya göre miRNA 22 seviyeleri, insan ve fare yağlı karaciğerlerinde FGF21, FGFR1 ve PGC1a ile ters orantılı bulunmuştur. Bu da hepatik miRNA 22'nin bir metabolik inhibitör olarak hareket ettiğini düşündürmektedir. miRNA 22, FGFR1'i direkt olarak hedefleyerek azalttığı gözlemlenmiştir. PPAR α ve PGC1a'nın bağlayıcı motiflerine rekrutmanı azaltarak FGF21'i azaltmıştır. Buna karşılık, bir miRNA 22 inhibitörü, hepatik FGF21 ve FGFR1'ini artırmakta, bu da AMPK ve ERK1/2 aktivasyonuna yol açmaktadır. miRNA 22, FGF21 ve FGFR1'in Metabolik stimülatörler tarafından senkron indüksiyonu, FGF21 homeostazını koruyabilmekte ve ERK1/2 aktivasyonunu kısıtlayabildiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak miRNA 22'yi azaltması, hepatik FGF21'ini artırıp AMPK'yı aktive edebilmekte, bu da steatoz ve insülin direncini tedavi etmesine yeni yol açabilmektedir (Y. Hu ve ark 2020).

2.4. Klotho Geni

Klotho, ilk defa 1997 yılında Kuro-o ve araştırmacı arkadaşları tarafından farelerde keşfedilmiştir (Kuro-o ve ark 1997). Klotho geni yaşlanmayı önleyici bir gen olup, çok sayıda pleiotropik etkisi olan bir protein kodlamaktadır (Děrmaku-Sopjani ve ark 2013). İsmi, Yunan mitolojisinde "yaşamın ipliğini döndüren" anlamına gelen Klotho tanrısından almıştır. Fareler üzerinde gerçekteştirilen bir çok deney, klotho (KL) genindeki bir hata veya işlev kaybının, yaşlanma sürecini hızlandırdığını ve yaşam süresini azalttığını ortaya koymuştur. Yařam süresinin kısalmasının yanı sıra, fareler vasküler kalsifikasyon, artan ateroskleroz, osteoporoz, osteomalazi, hiperkalsemi, hiperfosfatemi ve deri atrofisi gibi bir dizi tipik yaşlanma fenotipini sergilemiştir. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar, KL genindeki hataların yaşam süresini kısalttığını, KL geninin aşırı ekspresyonunun ise ömrü %20-30 oranında uzattığını göstermiştir (Xu ve ark 2015).

KL, insan serumunda 40 yaşından itibaren yaşa bağlı olarak azalabilir. Yaşlılıkla ilişkili kanser, hipertansiyon ve böbrek rahatsızlıkları gibi bazı hastalıklar, KL seviyelerinin azalmasına neden olabilir (Xu ve ark 2015). KL'si yetersiz olan farelerin serumunda fosfat (P), kalsiyum (Ca) ve 25-OH Kolekalsiferol seviyeleri normal farelere göre daha fazla iken, serum glukoz seviyeleri daha düşük bulunmuştur (Tsuji-kawa ve ark 2003).

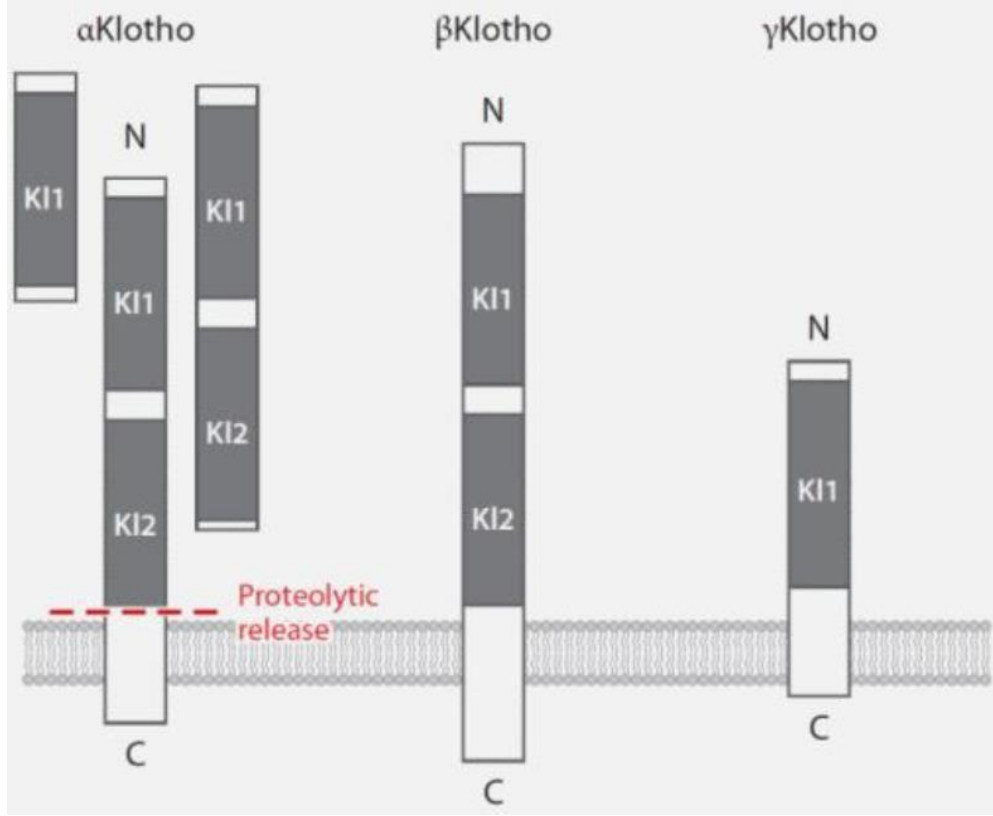
KL geni, belirli doku ve hücre tiplerinde eksprese edilmektedir. Yapılan araştırmalar, farelerde KL geninin en yoğun olarak böbreğin distal kıvrık tübüllerinde ve beyindeki koroid pleksusta eksprese edildiğini göstermiştir (Xu ve ark 2015). Ek olarak, KL geninin hipofiz bezi, plasenta, beyin, idrar kesesi, paratiroid bezi, pankreas, kolon, over, testis, iskelet kası, iç kulak ve meme epitel hücrelerinde daha düşük seviyede eksprese edildiği belirlenmiştir (Boksha ve ark 2017). İnsan KL proteininin böbrek dokularında yoğun bir şekilde eksprese edildiği, ayrıca prostat, plasenta ve ince bağırsak dokularında da KL gen ekspresyonunun olduğu tespit edilmiştir. En son yapılan çalışmalar, KL'nin pankreasın β hücrelerinde de bulunduğunu, insülin salgılamasına yardımcı olduğunu ve tip II diyabet hastalığında β hücrelerine koruma sağladığını ortaya koymuştur (Y. Lin ve ark 2015).

KL geni hem farelerde hem de insanlarda dört intron ve beş ekzon içermektedir. İnsanlarda 13.kromozomun q kolunda yer almaktadır (Tablo 2.1). Bu genin kodladığı protein, farelerdeki ile insanlardaki arasında %86 aminoasit benzerliği göstermektedir (Xu ve ark 2015). Bu bölgeye bağlı olarak şimdiye kadar hiçbir erken yaşlanma sendromu bildirilmemiştir. Ancak KL geni polimorfizminin insan ömrü ve koroner arter hastalığı gibi yaşa bağlı hastalıklarla ilişkili olduğu belirtilmiştir (Arking ve ark 2002).

Tablo 2.1. KL gen lokalizasyonu ve yapısı

| | Fare | Rat | İnsan |
|------------------------------------|-------------|------------|--------------|
| Gen Lokasyonu | 5q12 | 12q12 | 13q12 |
| Membran Form | 3042 bp | 3042 bp | 3036 bp |
| Salgılanan Form | 1650 bp | - | 1647 bp |
| Membran protein uzunluğu | 1014 a.a | 1014 a.a | 1012 a.a |
| Salgılanan protein uzunluğu | 550 a.a | - | 549 a.a |

KL ailesi üç farklı üyeye sahiptir: α -KL, β -KL ve γ -KL (Şekil 2.7). α -KL ve β -KL genleri, tip-1 tek geçişli transmembran proteinlerini kodlamakta ve aminoasit düzeyinde %41 benzerlik göstermektedir. Yaşlanmayı önleyen protein olarak ilk kez saptanan protein, α -KL'dır. α -KL'nun soluble formu kan, idrar ve beyin omurilik sıvısında bulunabilmekte, ancak β -KL ve γ -KL'nun soluble formu yoktur. α -KL başta böbrek ve paratiroid bezleri olmak üzere çeşitli dokulardan salınmakta ve FGFR1c, FGFR3c ve FGFR4 ile birleşerek Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) için ko-reseptör işlevi görmektedir. β -KL karaciğer ve yağ dokusundan salınmakta ve FGFR1c, FGFR4 ile birlikte FGF15/19 ve FGF 21'in hücre içi etkilerini sağlamakta. β -KL en çok karaciğer ve yağ dokusunda eksprese edilmekte (M. C. Hu ve ark 2013). β -KL'nun temel görevi, α -KL ile ilgisi olmayan metabolik kontrol, glikoz alımı, safra asidi üretimi ve yağ asidi metabolizmasını düzenlemektedir. Bugüne kadar, β -KL'nun



Şekil 2.7.Klotho protein ailesi.

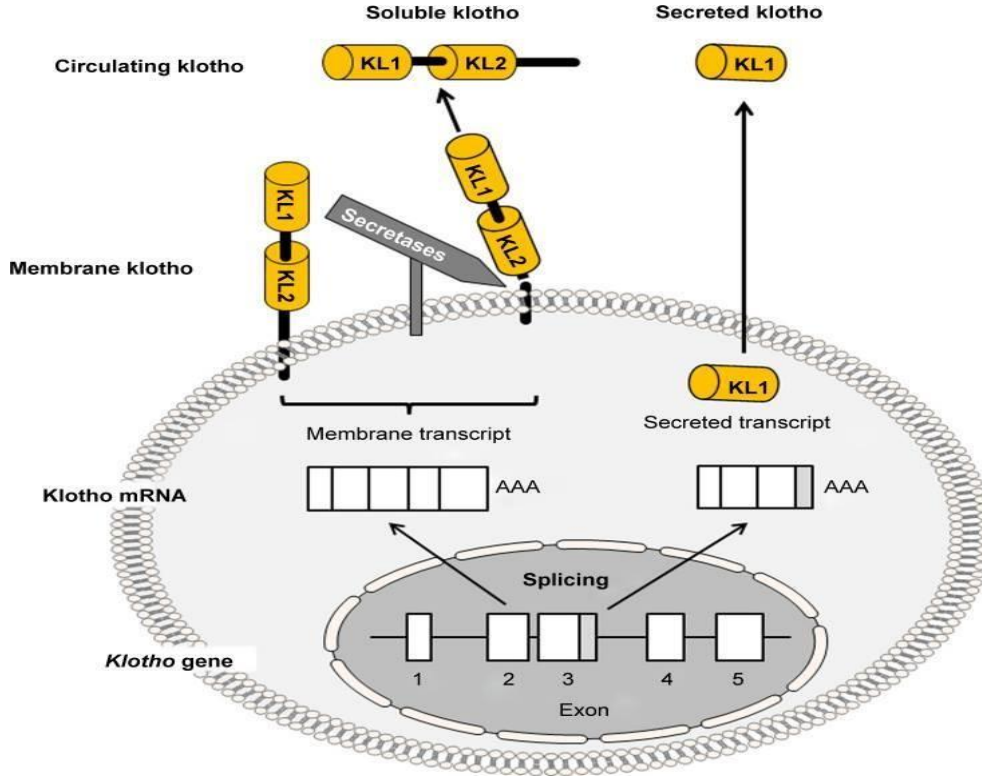
salgılanan bir formu tespit edilmemiştir (Tsuji-kawa ve ark 2003). γ -KL göz, böbrek ve yağ dokusundan salınmakta ve FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR4 ile etkileşerek FGF 19'un hücre içi etkilerini göstermektedir. Ancak γ -KL'nun diğer işlevleri henüz tam olarak bilinmemektedir (Hu ve ark 2013).

KL geni, tek geçişli bir transmembran proteini kodlamakta ve bu proteinin küçük bir hücre içi alanı ve büyük bir hücre dışı alanı vardır. KL geni tarafından kodlanan mRNA'lar alternatif olarak işlenerek iki protein üretmektedir. Bunlardan biri membrana bağlı, diğeri ise salgılanan formdur. Membran KL (mKL), 1012 amino asitlik ve yaklaşık 130 kDa'lık bir molekül ağırlığına sahip bir proteindir. mKL proteini, amino terminalinde kısa bir sinyal dizisi, karboksi terminalinde ise transmembran bölgesi içermektedir. Bu proteinin yaklaşık 980 amino asiti ekstraselüler bölgeyi meydana getirmektedir. mKL'nun ekstraselüler bölümü, KL1 ve KL2 adı verilen iki internal tekrar, bir transmembran bölge ve 10 amino asitlik çok kısa bir hücre içi bölgeden oluşmaktadır. mKL, FGF-23 için ko-reseptör görevi yapmakta ve fosfor, kalsiyum ve D vitamini metabolizmasını düzenlemektedir (Boksha ve ark 2017). Salgılanan KL, iki yolla ortaya çıkmaktadır. Bir yolu, mKL'nun transmembran bölgesinin A Disintegrin And Metalloproteinase 10 (ADAM10), A Disintegrin And Metalloproteinase 17 (ADAM17) ve β -APP kesme enzimi 1 (BACE1) tarafından proteolitik olarak kesilmesiyle oluşan çözünebilir formdur. Diğer yolu ise, KL gen transkripsiyonunun artmasıyla alternatif mRNA ekleme yoluyla oluşan salgılanan formdur (Dërmaku-Sopjani ve ark 2013). Proteolitik olarak kesilen çözünebilir form, hücre zarından ayrılmakta ve sadece KL1 veya hem KL1 hem de KL2'yi kapsamaktadır. KL'nun hücre dışı bölgesinin ADAM 10 ve ADAM 17 ile proteolitik olarak kesilip salınması, insülinle indüklenmekte ve metaloproteinaz inhibitörleriyle engellenmektedir. Kesilme süreci, bir fosfoinositid3-kinaz (PI3K) inhibitörüyle bloke edilebilmektedir. Bu da PI3K'nın kesilme sürecine katıldığını göstermektedir (Boksha ve ark 2017).

Salgılanan KL proteini, alternatif mRNA işlenmesi sonucu ortaya çıkmakta ve 62 kDa'lık bir molekül ağırlığına ve 549 aminoasitlik bir uzunluğa sahiptir. Bu protein sadece KL1'i kapsamakta ve yalnızca farelerde ve insanlarda bulunmaktadır. Salgılanan KL, çözünebilir formdan farklı olarak, hücre dışı bölgede (KL2), transmembran bölgede veya hücre içi bölgede ikinci bir internal tekrar içermemektedir (Wang ve ark 2009).

Çözünebilen form, dolaşımdaki KL'nun büyük bir bölümünü meydana getirmektedir. Salgılanan ve çözünebilen KL, idrar, kan ve beyin omurilik sıvısına aktarılmaktadır. Membran KL, FGF-23 için bir reseptör olmadığı gibi, biyolojik etkileri de FGF-23 ile ilgili değildir. Bunun yanında, yaşlanmayı önleyici ve organları koruyucu işlevlere sahiptir (Dërmaku-Sopjani ve ark 2013). KL proteininin sistemik etkileri, esas olarak, dolaşımdaki KL adı verilen hümoral bir faktör ile gerçekleşmektedir. KL, bir hormon gibi davranabilmekte ve KL'yu

üretmeyen hücrelerin veya dokuların (vasküler endotel hücreleri, düz kas hücreleri vb.) fonksiyonlarını düzenleyebilmektedir. KL geninin hormon gibi etki etmesi, bu genin mutasyonunun neden olduğu yaşlanma belirtilerinin, bu genin sadece birkaç dokuda (böbrek ve beyin koroid pleksusu vb.) eksprese edilmesine rağmen daha çok dokuda görülmesini kısmen göstermektedir (Xu ve ark 2015).



Şekil 2.8. Membran Klotho ve salgılanan Klotho'nun şematiği.

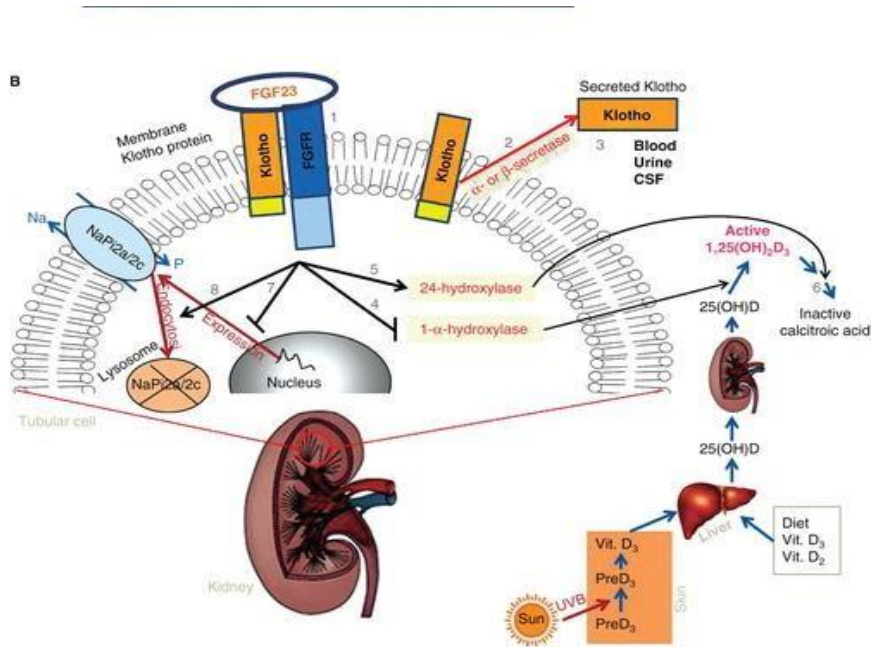
Membran formu klotho transkripti, klotho geninden türetilmektedir. Salgılanan klotho, alternatif bir RNA splicing'den türetilmektedir. İnternal splice donör yeri, klotho geninin ekzon 3'ündedir. Sonuçta alternatif olarak ayrıştırılmış transkript, ekzon 3'ten sonra 50 bp'lik bir ekleme içermekte (gri), sonunda translasyon durdurma kodon bulunmaktadır. Ürün, kan dolaşımına salınmaktadır. Diğer yandan, membran formu klotho transkripti tarafından kodlanan membran klotho proteini, tek geçişli bir transmembran proteindir. KL1 ve KL2 tekrarlarını içeren membran klotho'nun ekstrasellüler bölgesi, α/β -sekretazlar tarafından dökülür ve kesilir ve dolaşıma salınmaktadır. Bu nedenle, dolaşımda iki formda klotho proteini vardır. Biri, çözünür klotho olarak adlandırılan membran klotho'nun ekstrasellüler bölgesinin parçalanmasından türetilir, bu iyi bilinen aktif bir formdur. Diğeri, doğrudan alternatif olarak ayrıştırılmış bir klotho transkriptinden türetilen salgılanan membran proteini olup, ancak işlevi büyük ölçüde bilinmemektedir (Bian ve ark 2015).

2.4.1. Klotho'nun fonksiyonları

FOXO3a, memeli hücrelerinde mitokondriyal ROS üretimini azaltan bir enzim olan manganez süperoksit dismutazın (MnSOD) ekspresyonunu arttırmaktadır. FOXO3a, mitokondriyal antioksidan savunmaların bir negatif düzenleyicisidir. KL, FOXO3a'nın fosforilasyonunu yükselterek, KL'nun ROS ile bağlantılı OS'yi önleyebileceğini

göstermektedir. Yapılan araştırmalarda, KL'yu fazla üreten transgenik farelerde, oksidatif DNA hasarını gösteren üriner 8-hidroksi-2-deoksiguanozin seviyesi düşük ve MnSOD ifadesi yüksektir. Bu da OS'in azaldığını belirtmektedir (Xu ve ark 2015).

KL, FGF-23 ile birlikte çalışmaktadır. KL ve FGF-23, 1,25 (OH)₂D₃ (kalsitriol (1,25 (OH)₂D)) ile indüklenmekte ve renal 1 α -hidroksilaz aktivitesini baskılamaktadır. Bu da 25-hidroksi vitamin D'nin kalsitriol (1,25 (OH)₂D)'e dönüşümünü engellemektedir. Dolayısıyla KL proteini, FGF-23, paratiroid hormon ve kalsitriol (1,25 (OH)₂D) ile birlikte kan ve kemik kalsiyum/fosfor dengesinin kurulmasına katkıda bulunmaktadır. Kalsitriol (1,25 (OH)₂D) ve fosfatın geri emilimini azaltmaktadır (Wang ve ark 2009) (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Membran ve salgılanan Klotho'nun domain yapısı, membran topolojisi ve ana işlevlerini gösteren şematik diyagramı.

(Transmembran Klotho, FGF23 için bir ko-reseptör bağlama sitesi oluşturmak üzere FGFR ile bir kompleks oluşturmaktadır (1) ve fosfat ve vitamin D metabolizmasının böbrek düzenlemesinde temel bir rol oynamaktadır. Salgılanan Klotho, membran Klotho'nun a- ve b-sekretazlar ectodomain dökülmesi ile oluşturulmaktadır (2) ve idrar, kan veya beyin-omurilik sıvısına salınmaktadır (3). FGF23/Klotho kompleksi sırasıyla dolaşımdaki kalsitriol (1,25 (OH)₂D₃) seviyelerini azaltmakta, ya kalsitriol sentezine katılan enzim (1-a-hidroksilaz (Cyp27b1)) ekspresyon seviyelerini inhibe ederek (4) ya da başka bir enzim olan 24-hidroksilaz (Cyp24a1) (5) indükleyerek, bu enzim kalsitriolu inaktif formu olan kalsitriolik aside katabolize etmektedir (6). Ek olarak, FGF23/Klotho kompleksi, sodyum fosfat ko-transporterlerinin hücre membranı ekspresyonunu azaltmakta, ya gen ekspresyonlarını düşürerek (7) ya da hücre membranı protein internalizasyonunu indükleyerek (8) bunların yıkımına yol açmaktadır (Dermaku-Sopjani ve ark 2013).

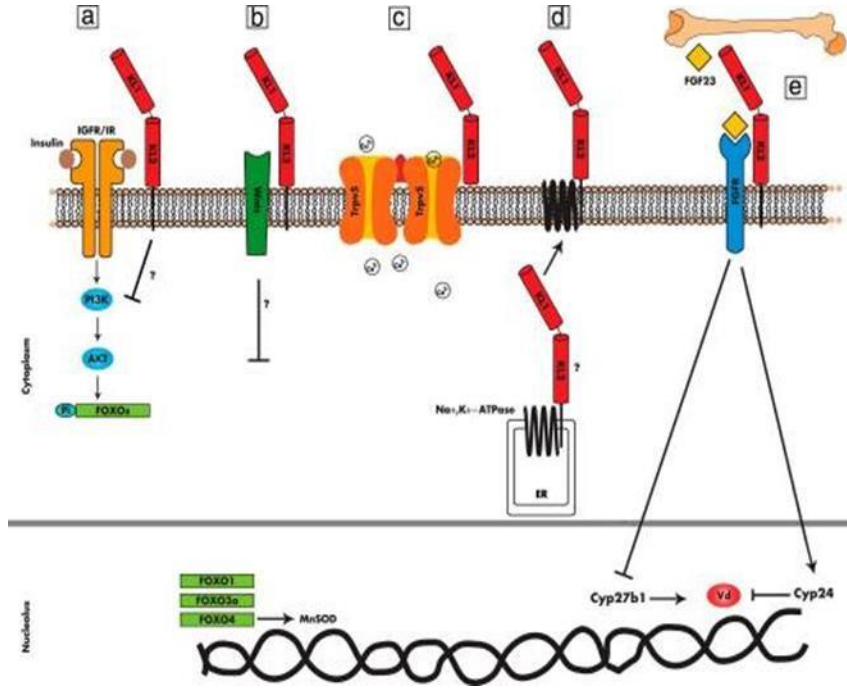
Dolaşımdaki KL, böbrekte V altfamilya, 5. üyesi (TRPV5) iyon kanalı, Geçici reseptör potansiyel katyon kanalının ve renal dış medüller potasyum kanalı 1 (ROMK 1)'in işleyişini

etkilemektedir. KL, bir glukuronidaz gibi işlev görerek TRPV5 iyon kanallarını uyarmaktadır (Yamada ve ark 2017). KL, glikozidaz ailesinin diğer üyelerine benzediği için bir glikozidaz gibi davranabilmektedir. KL, bu enzim ailesinin katalitik aktivitesi için gerekli olan glutamik asit kalıntılarını taşımamaktadır. İn vitro çalışmalarda KL'nun glikozidaz aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir (Torres ve ark 2007). KL, böbrek tübül hücrelerinde ve duodenum epitel hücrelerinde bulunan TRPV5 ve Geçici reseptör potansiyel katyon kanalı, V altfamilya, 6. üyesi (TRPV6) kalsiyum kanallarının oligosakkarit zincirlerine enzimatik olarak müdahale ederek kalsiyumun gastrointestinal ve böbrek yoluyla geri alınmasını sağlamaktadır. Bu da KL'nun kalsiyum dengesinin sağlanmasındaki rolünü kanıtlamaktadır (Yamada ve ark 2017). ROMK 1, bir potasyum kanalıdır ve idrardaki potasyum seviyesini belirlemektedir. Dolaşımdaki KL, plazma membranında ROMK 1 miktarını yükseltmektedir. İdrardaki potasyum miktarını arttırmaktadır (Semba ve ark 2011).

Fosfatın fizyolojik olarak dengede olması, biyolojik açıdan önem taşımaktadır. Vücutta fazla fosfat birikmesi, bazı hastalıklara sebep olabilmektedir. KL, fosfat dengesinin kritik bir düzenleyicisidir. KL/- farelerde, böbrekte tip II sodyum-fosfat taşıyıcısının aktivitesinin yükseldiği görülmüştür. Bu da fosfat toksisitesine bağlı olarak erken yaşlanma gibi özelliklerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (Dermaku-Sopjani ve ark 2013).

KL, endotel fonksiyonunu korumaktadır (Semba ve ark 2011). Kardiyovasküler hastalıkların ilerlemesi sonucu gelişen endotel disfonksiyonu, esas olarak nitrik oksit (NO) ROS ile inaktive edilmesiyle oluşmakta, bu da NO'nun biyolojik olarak kullanılabilirliğini azaltmaktadır. KL, eNOS'un fosforilasyonunu baskılayabilmekte, böylece endotelden kaynaklanan NO üretiminin bozulması, vasküler endotel disfonksiyonunun düzelmesine katkıda bulunabilmektedir. Ayrıca KL, NO'nun üretimini yükselterek ve OS'yi azaltarak kardiyovasküler sistemi koruyabilmektedir (Wang ve ark 2009).

KL'nun başka bir önemli işlevi, hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesine dahil olmasıdır. Bu sinyal yolları; İnsülin/IGF-1, p53/p21 sinyal yolu, siklik adenozin monofosfat (cAMP) sinyal yolu, protein kinaz (PKC) sinyal yolu ve Wnt sinyal yoludur. KL'nun bu çok yönlü işlevi için ortak moleküler mekanizmanın belirlenmesi, KL'nun yaşlanmayı önleyici özelliklerini anlamak açısından önemlidir (Boksha ve ark 2017) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Klotho'nun fonksiyonlarının genel mekanizmaları.

a. Klotho IGF sinyal yolunu inhibe etmesi. Akış aşağı faktörler FOXO1, -3a ve -4, Klotho'nun işlevine aracılık etmektedir. b, Klotho Wnt sinyal yolunu bastırması. c, Klotho Trpv5 Ca kanallarını düzenlemesi. d, Klotho PTH sentezini düzenlemesi. e. Klotho -FGF-23 kompleksi Pi emilimi, mineral metabolizması ve D3 vitamini ekspresyonu ve aktivitesini düzenlemesi (Xu ve ark 2015).

KL, hücre içi sinyallerden insülin ve IGF-1'i inhibe eden bir hormon işlevi görmektedir (Wang ve ark 2009). KL, bu işlevleri sayesinde antiaging etkilerine katkı sağlayabilmektedir. İnsülin benzeri sinyalleme baskılanması, uzun yaşam için evrimsel olarak muhafaza edilmiş bir mekanizmadır (Torres ve ark 2007).

p53 proteini, hücre döngüsünün durdurulması, apoptozis, senesans ve sağ kalmanın düzenlenmesine katkıda bulunan karmaşık bir sinyalleme ağının merkezindedir (Wang ve ark 2009). KL eksikliği, yeni hücre oluşumunu engelleyerek ve yaşlı hücre sayısını artırarak p53/p21'nin fazla eksprese edilmesine yol açmaktadır (de Oliveira, 2006). Ikushima ve arkadaşları, KL'nun insan göbek dokusundaki endotel hücrelerde p53/p21 yollarını baskılayarak Hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynaklı apoptozis ve senesansi azalttığını göstermiştir. Bu nedenle, KL takviyesi, p53/p21 sinyal yolunu engelleyerek hücre yaşlanma ve apoptozis önlemektedir (Ikushima ve ark 2006).

Yang ve arkadaşlarına göre KL, özellikle endotel hücrelerinde cAMP seviyesini yükseltmektedir. Bu protein, henüz tanımlanmamış bir hücre yüzeyi KL reseptörü ile bağlanmakta ve böbrek ve testis hücrelerinde protein kinaz C (PKC) yolunu uyarmaktadır.

KL, ayrıca birçok hücre tipinde cAMP yolunu aktive etmektedir. Çalışma sonuçlarına göre insan umbilikal vasküler endotelinde KL, cAMP- protein kinaz A'ya bağlı bir yol ile Anjiotensin-1-dönüştürücü enzim (ACE) aktivitesini artırmaktadır (J. Yang ve ark 2003).

KL, 1 α -hidroksilaz enzimini etkilemeden cAMP ve PKC aracılığıyla 25 hidroksi D vitamini seviyesini azaltmaktadır. PKC yolunun KL ile uyarılması, sadece KL'nun çok ifade edildiği böbrek ve testiste görülmektedir (Imai ve ark 2004).

Son zamanlarda KL proteininin hücre dışı bölgesinin çeşitli Wnt ligandlarına bağlandığı ve Wnt sinyalini aktive etme kabiliyetlerini kısıtladığı bildirilmiştir (Wang ve ark 2009). Wnt, kök hücre çoğalması ve bakımı için gereken salgılanan faktörlerden biridir. Wnt sinyalleşmesinin fazla tetiklenmesi, kök hücrelerin erken tükenmesine ve böylece yaşlanma süreçlerine potansiyel olarak etki edebilmektedir (Bian ve ark 2015). Liu ve arkadaşları, KL'nun farklı Wnt ligand tiplerine bağlanarak aşağı akış sinyal iletimini engellediğini ve KL nakavt farelerde Wnt sinyalini yükselttiğini rapor etmişlerdir (Liu ve ark 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunu Oluşturan Örnekler

Araştırma kontrol amacıyla Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon bölümüne müracaat eden ve kolekalsiferol eksikliği tanısı almış 10 kişi ve kolekalsiferol düzeyi referans aralığında olan 20 kişinin artakalan tam kan, plazmalar ve serumlarından çalışma yapıldı. Hekim tarafından tıbbi biyokimya laboratuvarına sevk edilen hastaların kanlarında istenen testler çalışıldıktan sonra kalan artakalan tam kan, plazmalar ve serumlarından tezde belirtilen testler için gerekli örnek alınarak -80 C'de saklandı.

Çalışmaya katılmak isteyen gönüllüler tarafımızca bilgilendirilip onamları alınmıştır. Çalışmada kolekalsiferol kullanmadan önce rutin analizler için verdikleri venöz kan örneklerinden artakalan numuneler ile kolekalsiferol kullanımına başladıktan 3 ay sonra gelinen kontrolde rutin analiz için verdikleri venöz kan örneklerinden artakalan numuneler kullanılmıştır.

3.1.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

- D₃ vitamini preparatı 3 ay boyunca tedavi olmak.
- Stabil vücut ağırlığına sahip olmak.
- Sigara, uyuşturucu ve alkol gibi kötü alışkanlıkları olmamak.
- Onamları alınan yetişkin (18 yaş üstü) katılımcı birey olmak.

3.2. Serum Örneklerinin Alınması ve Analiz İçin Hazırlanması

Kan alımı: Katılımcıların antekübital venlerinden 5–10 mL tam kan örnekleri rutin biyokimya tüplerine alınıp, 4500 rpm'de 15 dk santrifüj edilerek serum ayrılmıştır.

Depolama: Analiz öncesi artan serum örnekleri –80 °C'de saklanmıştır

3.3. Kalsiyum ve Fosfat Çalışması

Serum kalsiyum ve fosfat düzeyleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında yapılan rutin analiz sonuçlarından elde edildi.

3.4. D Vitamini Çalışması

Serum 25 (OH)D düzeyleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında yapılan rutin analiz sonuçlarından elde edildi.

3.5. FGF-23 Düzeylerinin Belirlenmesi

Tedavi öncesi ve kontrol grubuna ait serum FGF-23 düzeyleri, insan FGF-23 ELISA kiti (BT lab; Katalog no: E0059Hu) kullanılarak enzim bağlantılı immünosorbent test yöntemine göre ölçülmüştür.

3.5.1. ELISA kit bilgileri

Katalog no: E0059Hu

Kitin menşei: Çindir

Kitin duyarlılığı: 2.49pg/ml

Analiz aralığı: 5-1500pg/ml

3.5.2. Kesinlik

Test içi kesinlik:

Bilinen konsantrasyonlara sahip üç örnek, test içi kesinliği değerlendirmek amacıyla aynı plakada test edilmiştir. Aynı parti/lot içerisindeki E0059Hu örneklerinden rastgele seçilenler ölçülerek kitlerin performans tutarlılığı kontrol edilmiştir.

Tablo 3.1. Test içi kesinlik

| Test İçi | Örnek | n | Ortalama | Standart Sapma | CV (%) |
|----------|-------|----|----------|----------------|--------|
| Test İçi | 1 | 18 | 284.3 | 14.43 | 5.1 |
| Test İçi | 2 | 18 | 345.5 | 12.54 | 3.6 |
| Test İçi | 3 | 18 | 164.3 | 9.42 | 5.7 |

Testler arası kesinlik:

Bilinen konsantrasyonlara sahip üç örnek, testler arası kesinliği değerlendirmek amacıyla farklı zamanlarda ve ayrı testlerde analiz edilmiştir.

Kesinlik katsayısı (CV, %), standart sapmanın ortalamaya oranının yüzdesi olarak hesaplanmıştır:

$$CV (\%) = SD / \text{Ortalama} \times 100$$

Testler arası değişkenlik için CV değeri %10'un altında olmalıdır (CV <%10).

3.5.3. Kullanılan cihazlar

Allsheng | AMR-100 elisa reader mikroplate okuyucu.

Allsheng APW-200 elisa mikropkaya yıkayıcı.

3.5.4. ELISA çalışması

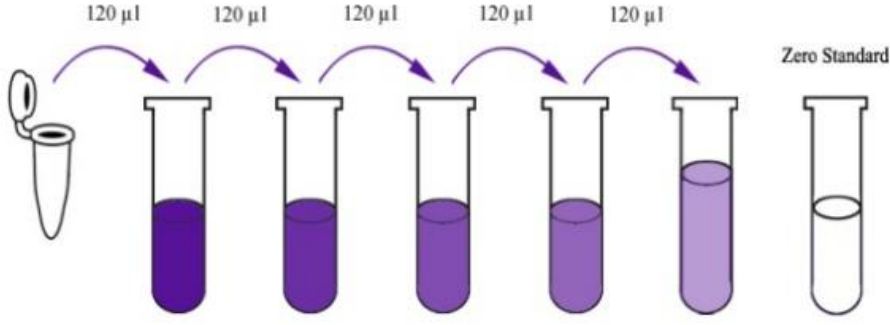
Laboratuvarda -80°C'de muhafaza edilen insan serumları çıkartılarak oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir. Ayrıca kitin içerisinde çıkan tüm reaktifler de oda ısısına geldikten sonra çalışma başlatılmıştır.

3.5.5. Standart çözeltinin hazırlanması

Çalışma için beş standart ve bir kör (negative kontrol) çözeltisi hazırlanmıştır. Standart hafifçe çalkalanarak 15 dakika bekletilmiştir. İlk önce altı tüpe 120 µl standart çözelti eklenmiştir. Daha sonra birinci tüpe 120 µl standart eklenerek altıncı tüpe kadar 1:2 oranında seri dilüsyon yapılarak yoğunluk yarı yarıya düşürülmüştür.

Tablo 3.2. Standart çözeltisinin hazırlanması

| Standart konsantrasyon | | |
|------------------------|------------------------|--|
| 400 µl | Standart No 5 | 120 µl Standart seyreltici +120 µl Orijinal standart |
| 200 µl | Standart No 4 | 120 µl Standart seyreltici + 120 µl Standart No.5 |
| 100 µl | Standart No 3 | 120 µl Standart seyreltici+ 120 µl Standart No.4 |
| 50 µl | Standart No 2 | 120 µl Standart seyreltici +120 µl Standart No.3 |
| 25 µl | Standart No 1 | 120 µl Standart seyreltici +120 µl Standart No.2 |
| 12,5 µl | Negatif Kontrol | 120 µl Standart çözelti |



Şekil 3.1. Standart çözeltisinin seri dilüsyon yapılması.

3.5.6. ELISA protokolu

1. İlk altı kuyucuğa 50 µl standart eklenmiştir.
2. Numune kuyucuklarına (26 kuyucuk) 40 µl insan serumu eklemiştir.
3. Ardından numune kuyucuklarına 10 µl insan FGF-23 antikor eklenmiştir. Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden standart kuyucuklarına antikor eklenmemiştir.
4. Bunun ardından her bir kuyucuğa 50 µl streptavidin-HRP eklenmiş ve pipetaj yapılmıştır. Plak kapaticıyla örtülerek 37°C'lik etüvde 60 dakika inkübe edilmiştir.
5. İnkübasyondan sonra kapaticıyı çıkarıp plak 5 kez yıkama tamponuyla yıkanmıştır. 20 ml yıkama tamponu + 480 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır. Otomatik yıkama cihazında, kuyucuklar 300 µl yıkama tamponuyla 30 saniye yıkanmıştır.
6. Daha sonra her bir kuyucuk aspire edilerek boşaltılarak yıkama tamponu ile tekrar 5 kez yıkanmıştır.
7. Yıkama işleminden sonra plak kağıt havlularla hafifçe kurutulmuştur.
8. Daha sonra her bir kuyucuğa 50 µl substrat solüsyonu A ve ardından 50 µl substrat solüsyonu B eklenmiştir. Plak yeni bir kapaticıyla örtülerek karanlıkta 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir.
9. İnkübasyondan sonra her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenerek, mavi renk hemen sarıya dönüştüğü gözlemlenmiştir.
10. Durdurma çözeltisini ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış bir mikropilaya okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) hemen okutulmuştur.

3.6. MikroRNA 22 Analizi

3.6.1. Kullanılan kimyasallar ve deney malzemeleri

Kullanılan Kimyasallar

- Total miRNA izolasyon kiti
- Total miRNA izolasyon kitinin içeriği
 - mirnaextractor
 - kloroform
 - RPE solüsyon
 - RNaz-free Water
 - etanol
- Applied Biological Materials (abm) miRNA All-In-One cDNA Sentez Kiti (G898)
- Abm U6 Referans Gen Primerleri
- Abm target miRNA primerleri
- Hedef miRNA Primerleri

3.6.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar araçları

- Santrifüj
- Real Time PCR (LightCycler® 96)
- Roche LightCycler 96 Multiwell Plak
- Etüv
- Mikrosantrifüj
- Vorteks karıştırıcı
- (DNase & RNase free) ddH2O
- 96-100% Etanol
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml, 2.0 ml)
- Mikropipet seti ve steril filtreli mikropipet uçları
- Spin Kolonlar
- Toplama Tüpleri
- ElüsyonTüpleri

3.6.3. Yöntem

3.6.4. Plazma eldesi

1. Kan örneği alındıktan sonra en az 5-10 kez yavaşça alt-üst edilerek karıştırıldı.
2. Oda sıcaklığında bekleyen örneklerin 2 saat içerisinde plazmaları ayrıldı.
3. Tüpler 2.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi.
4. Santrifüj işlemi sonunda tüpler sarsılmadan dikkatlice santrifüjden çıkarıldı ve yavaşça kapakları açıldı. Plazmanın en üst kısmından 200µl'lik pipetlerle (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) 5 kez toplamda 1.000 µl olacak şekilde plazma steril ependorf tüplere toplandı.
5. Toplanan 1.000 µl'lik bu plazma örneği 2.000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve plazmanın üst kısmından (en üstte bir miktar zor görülen lipid birikir ona değmeden) 250 µl'lik kısım steril bir ependorf tüpe alındı. Bu işlem alttaki hücresel kısım rahatsız edilmeden (DNase, RNase Free, filtreli pipet uçları kullanılarak) pipet ile yapıldı
6. Bu şekilde ayrılan plazma örnekleri -80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

3.6.5. MikroRNA izolasyonu

1. Plazma örneklerini miRNA Ekstraktör ile oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.
2. 0.2 ml kloroform eklendi ve 30 saniye vorteksleyerek. 4 ° C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj edildi.
-Santrifüjlemeden sonra, numune 3 faza ayrılır. Üst, renksiz, sulu faz RNA içerir.
3. Süpernatantı (yaklaşık 540 ul) temiz bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı, 1/3 hacim (genellikle 180 ul) %100 etanol ekleyin ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı.
4. Çözeltiyi Spin Column TR santrifüjüne aktarıldı. 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve yeni bir 1.5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne akış (genellikle 690 ul) aktarıldı.
5. %100 etanolden 2/3 hacim eklendi (Örn. 690 ul akışta ise, 460 ul etanol eklendi) ve pipetleyerek birkaç kez iyice karıştırıldı. Çözeltiyi Spin kolumn MR aktarıldı ve 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve akış kısmı atıldı.

6. Spin kolonuna 0.5 ml RPE çözeltisi ilave edildi. 30 saniye boyunca 12.000 x g'de santrifüj yapıldı ve akış kısmı atıldı.

7.6. Adım tekrarlandı.

8.30 saniye boyunca 12.000 x g'de plazmanın tekrar santrifüj edildi.

9. Plazmayı yeni bir 1.5 ml santrifüj tüpüne konuldu, 30-50 ul RNaz-free Water eklendi. 2 dakika bekletildi. 12.000 x g 30 saniyede santrifüjlendi, -80 ° C de elüte edilmiş RNA çözeltisi kaydedildi.

3.6.6. MikroRNA'lardan cDNA eldesi

40 plazma örneklerinden elde edilen miRNA'lar için ABM miRNA All-In-One cDNA Sentez Kiti ile aşağıda verilen protokol ve parametreler uygulanarak cDNA reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3.3. cDNA sentezi için gerekli olan bileşenler

| Ürün Bileşenleri | Hacim |
|----------------------------------|---|
| 2X miRNA cDNA Synthesis SuperMix | 10 µl |
| Enzyme Mix | 2 µl |
| RNA templak | Değişken (200 ng small RNA veya 2 µg total RNA) |
| Nuclease-Free H ₂ O | 20 µl'ye tamamlandı. |

Karışımı 37°C'de 30 dakika, ardından 50°C'de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu 85°C'de 5 dakika ısıtarak hemen durduruldu ve buz üzerine alınarak soğutuldu.

3.6.7. Real-Time PCR

cDNA'ların referans gen açısından amplifikasyonunu sağlamak ve ilgili bölgeleri işaretlemek amacıyla ABM BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix ve snord44 PCR Primer Mix'leri üretici firmanın tavsiyelerine uyularak tabloda verilen hacimlere göre hazırlandı.

Tablo 3.4. RT-PCR için gerekli olan bileşenler ve hacimleri

| | |
|---------------------------------------|--------|
| ABM BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix | 10 µl |
| Mirna forward Primer (10 mM) | 0,5 µl |
| Mirna reverse primer (10 mM) | 0,5 µl |
| cDNA (yaklaşık 200 ng) | 5 µl |
| H₂O | 4 µl |
| Total Volume | 20 ul |

Hazırlanan referans gen real time PCR mix'leri ve hedef gen miRNA 22 ile Real time PCR mix'leri uygun cDNA'lar ile Light Cycler 96 sistemine ait 96 kuyucuklu plak'ler üzerinde bir araya getirildikten sonra aşağıda verilen tablo'da belirtilen ısı protokolü uygulanarak Light Cycler 96 sisteminde real time PCR işlemine alındı.

Tablo 3.5. cDNA sentezi için termal döngü cihazında uygulanan protokol

| | |
|--|--|
| Denaturasyon | 95°C de 10 dk. |
| Amplifikasyon | 95°C de 10 sn. |
| Bu döngü 40 kez sağlanır. (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi) | 60°C de 15sn 72 °C de 30sn Okuma |
| Melting Curve | 95°C de 30 sn. 50 °C de 1 dk. 90 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C) |
| Cooling | 40 °C de 1 dk. |

Elde edilen cDNA lar nanodropta ölçüldü. Ölçülen örnekler 500 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. Her bir örnek kendi primerleri ile Real Time PCR yapıldı. Plak dizaynı word dosyası olarak kaydedildi.

GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR)

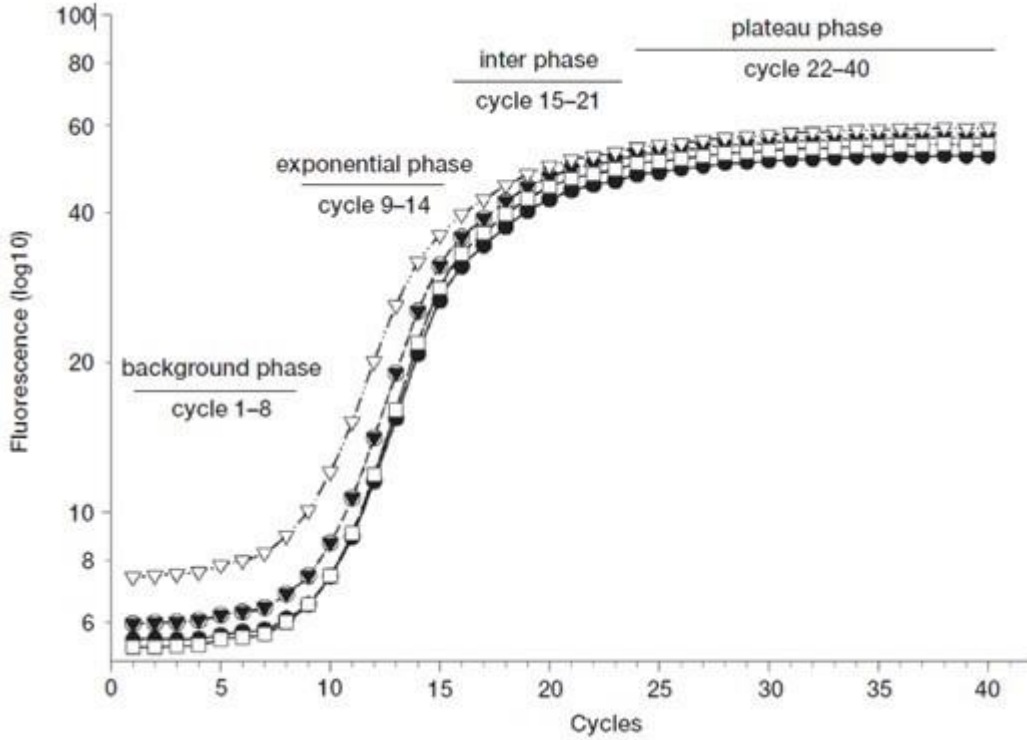
Real-time çalışmalarında 4 aşamada eğri görünümü vardır.

1) Doğrusal Faz (Linear ground phase). Bu fazda PCR yeni başlamıştır. Floresan emisyonu bu fazda daha yükselmeye başlamaz. Taban hattı floresan hesaplaması bu fazda yapılır.

2) Erken Oluşum Fazı (Early exponential phase): PCR ürün oluşumu bu fazda başlar. Floresan etkileşimi başlangıç miktarına bağlı olarak taban hattından ayrılmaya bu fazda başlar (genellikle 10 cu döngüden sonra yükselme görülür).

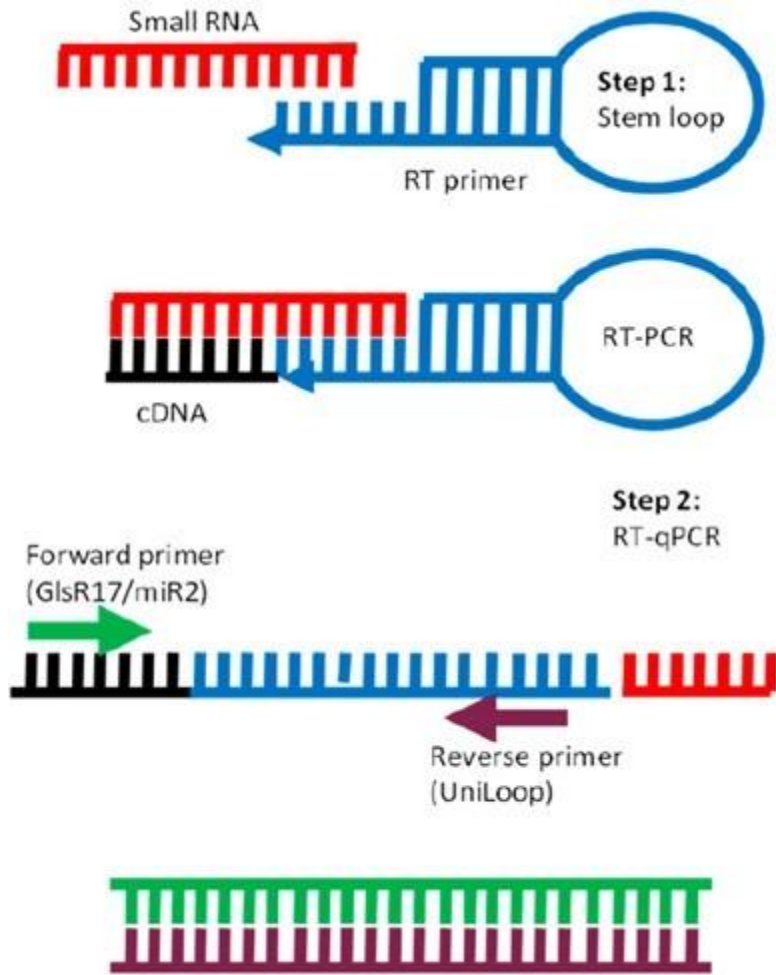
3) Uzun Doğrusal Faz (Long Linear phase): PCR için en uygun şartların olduğu ve kendini her döngüde çoğalttığı fazdır. Bu faz bileşenlerin bitmesi ve floresan etkiyle daha fazla hesaplama yapılamayınca kadar devam eder.

4) Plato Fazı (Plaku phase): Bu fazda PCR ürünü elde edilmez, reaksiyon yavaşlar, ortamda bulunan enzim miktarı azalır ve oluşan ürünler daha fazla ürün oluşumunu inhibe eder. Yani bu faz yeni ürün oluşmadığı, reaksiyonların durduğu fazdır.



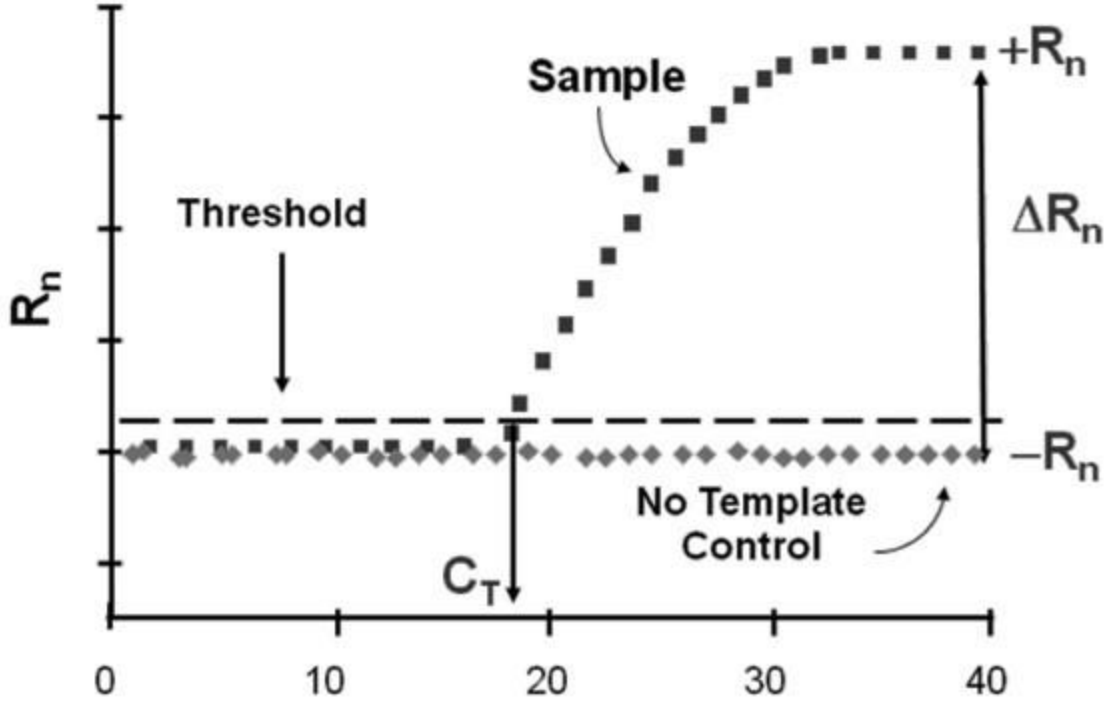
Şekil 3.2. RT-PCR işlemi fazları.

MikroRNA boyut olarak 20-24 nükleotid uzunluğunda olduğu için Forward ve Reverse primerlerinin bu kısa bölgeden seçilmesi çok zordur. Bunun için bu kısa bölgenin uzatılması gerekir. Bu da iki yöntemle gerçekleştirilebilir. İlki genel olarak kullanılan polyA kuyruğunun eklenmesi, diğeri ise stem-loop yapısının eklenmesidir. PolyA kuyruğu eklendiği zaman plazma içerisindeki diğeri miRNA'lara da bağlanabilir. Ancak stem-loop primeri ile yaptığımızda diziyeye özgü bölge ile çakıştırdığımız için onun dışındaki herhangi bir miRNA'ya bağlanması söz konusu değildir. Bu çalışmada daha zahmetli ancak daha güvenilir sonuç veren stem-loop yapısını kullanıldı. Öncelikle stem-loop yapısı oluşturuldu. miRbase adlı sitede istediğimiz miRNA'yı yazdığımızda bize uygun bir stem-loop dizisi veriyor. Bu stem-loop yapısının son 6 bazı hedef dizinin son 6 bazı ile eşleşir. Primer uzunlukları 25 bazın üstüne çıkmamasına, kendi üzerine ve birbiri ile eşleşme durumunun en az olmasına dikkat edilir.



Şekil 3.3. Stem-loop primer dizisinin oluşumu.

RT-PCR işleminde en önemli faz oluşumun gözlemlendiği (exponential phase) fazdır. Farklı ürünlerin oluşum serilerinin incelenebilmesi bu fazda olur ve bu fazın oluşumu öncelik olarak başlangıç miktarına bağlıdır. Bütün ürünlerin çoğalma dengesi aynı noktaya geldiğinde karşılaştırmaya başlanabilir. Bu noktaya eşik noktası (threshold point) denir. Eşik noktası oluşum fazındaki kesin okumanın yapıldığı yerdir. Örneklerin karşılaştırıldığı bu faz C_T (Cycle Threshold) olarak gösterilir.



Şekil 3.4. qPCR Amplifikasyon Eğrisi ve C_T Değeri.

1) R_{n+} değeri bütün componentlere bağlıdır. 2) R_{n-} değeri taban değeridir. 3) ΔR_n ; R_{n+} ile R_{n-} arasındaki farktır arasındaki farkın büyüğü elde edilen PCR ürünün miktarının sinyalidir. 4) ΔR_n değerinin ürün oluşum döngü sayısına oranı C_t değerini verir.

3.7. KL Geni Protein Aktivitesi Çalışması

3.7.1. Kullanılan kimyasallar ve deney malzemeleri

Kullanılan Kimyasallar

- Total mRNA İzolasyon Kiti
- Total mRNA İzolasyon Kitinin İçeriği
- miRNAextractor
- Kloroform
- RPE Solüsyon
- Rnaz-Free Water
- Etanol
- cDNA İzolasyon Kiti
- mRNA Qpcr Mastermix
- Referans Gen Primerleri
- Hedef RNA Primerleri

3.7.2. Kullanılan cihazlar ve laboratuvar araçları

- Santrifüj
- Roche LightCycler 96 Multiwell Plak
- Mikrosantrifüj
- Vorteks karıştırıcı
- (DNase & RNase free) ddH₂O
- 96-100% Etanol
- Mikrosantrifüj tüpleri (1.5 ml, 2.0 ml)
- Mikropipet seti ve steril filtreli mikropipet uçları
- Spin Kolonlar
- Toplama Tüpleri
- ElüsyonTüpleri

3.7.3. Yöntem

3.7.4. RNA İzolasyonu

1. 40 örnek için miRNA Extractor ile oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edildi.
2. 0.2 ml kloroform eklendi ve 30 saniye boyunca vortekslenme yapıldı.

3. 4°C'de 10 dakika boyunca 12.000 x g'de santrifüj yapıldı.
4. Santrifüjden sonra numune 3 aşamaya ayrılır. Üstteki renksiz sulu faz RNA'yı içerir.
5. Süpernatantı (yaklaşık 540 µl) temiz bir 1,5 ml RNaz içermeyen santrifüj tüpüne aktarıldı. 1,5 hacim (genellikle 810 µl) %100 etanol ekleyin ve birkaç kez yukarı ve aşağı pipetleyerek iyice karıştırıldı.
6. Daha sonra Spin Column TR'ye aktarıldı, 12.000 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı ve akışı atın. (Lizat hacmi 750 µl'yi aşarsa kolona 750 µl ekleyin, 30 saniye santrifüj edin ve sıvıyı atın. Kalan lizatı aynı plazmaya ekleyin ve yukarıdaki gibi tekrar santrifüjleyin.)
7. Döndürme Kolonu TR'ye 0,5 ml RPE Solüsyonu ekleyin, 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edin, akışı atın.
8. Spin kolumn TR'ye 0,5 ml RPE Solüsyonu ekleyin, 12.000 x g'de 30 saniye santrifüj edin, akışı atın. 5. adımı bir kez daha tekrarlayın.
9. Plazmayı 12.000 × g'de 30 saniye boyunca santrifüjleyin.
10. Kolonu yeni bir 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne yerleştirin, 30-50 µl RNaz içermeyen Su ekleyin ve 2 dakika bekletin. 30 saniye boyunca 12.000 x g'de santrifüjleyin, elüt edilen RNA çözeltisini -80°C'de saklayın.

3.7.5. cDNA eldesi

- Aşağıda verilen abm marka cDNA izolasyon kitine ait tablo uygulanarak tüm örnekler için reaksiyon kuruldu.

Tablo 3.6. cDNA izolasyon kiti

| Bileşen | Hacim |
|-------------------------------|-------------------------|
| 5× RT Buffer | 4 ul |
| dNTP | 1 ul |
| primers | 1 ul |
| Toplam RNA veya poly (A)+mRNA | Variable (1ng-2 ug/rxn) |
| One Script plus RTase | 1 ul |
| Nuclease-free H2O | 20 ul |

- 50-55°C'de 15 dakika inkübe ederek cDNA sentezini gerçekleştirin.
- 85°C'de 5 dakika ısıtarak reaksiyonu durdurun ve buz üzerinde soğutun.
- Uygulanan protokol sonrasında cDNA'lar elde edildi. -20° C ye kaldırıldı.

3.7.6. Real-Time PCR

- GAPDH ve Klotho primerleri için BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix içerisinde verilen koşullar sağlanarak Real-time PCR reaksiyonu kuruldu.

Tablo 3.7. Real-time PCR reaksiyonunun primerlerinin miktarı

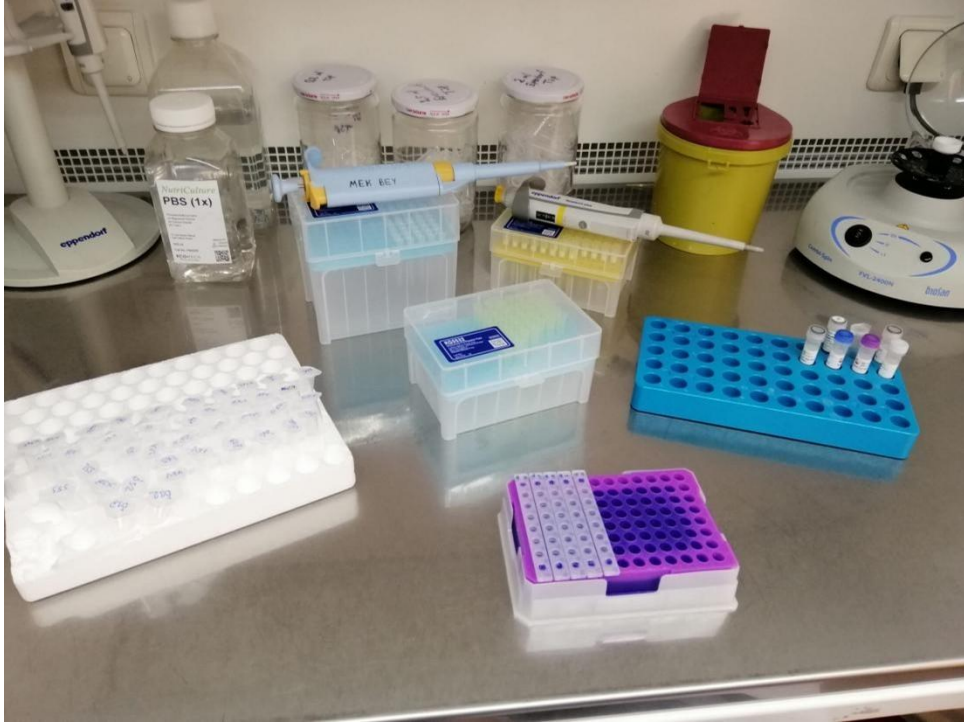
| | |
|-----------------------------------|--------|
| BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix | 10 ul |
| F-primer | 0,5 ul |
| R-primer | 0,5 ul |
| ddH₂O | 4 ul |
| cDNA | 5 ul |
| Toplam Hacim | 20 ul |

Hazırlanan reaksiyon aşağıdaki sıcaklık koşulları sağlanarak kuruldu.

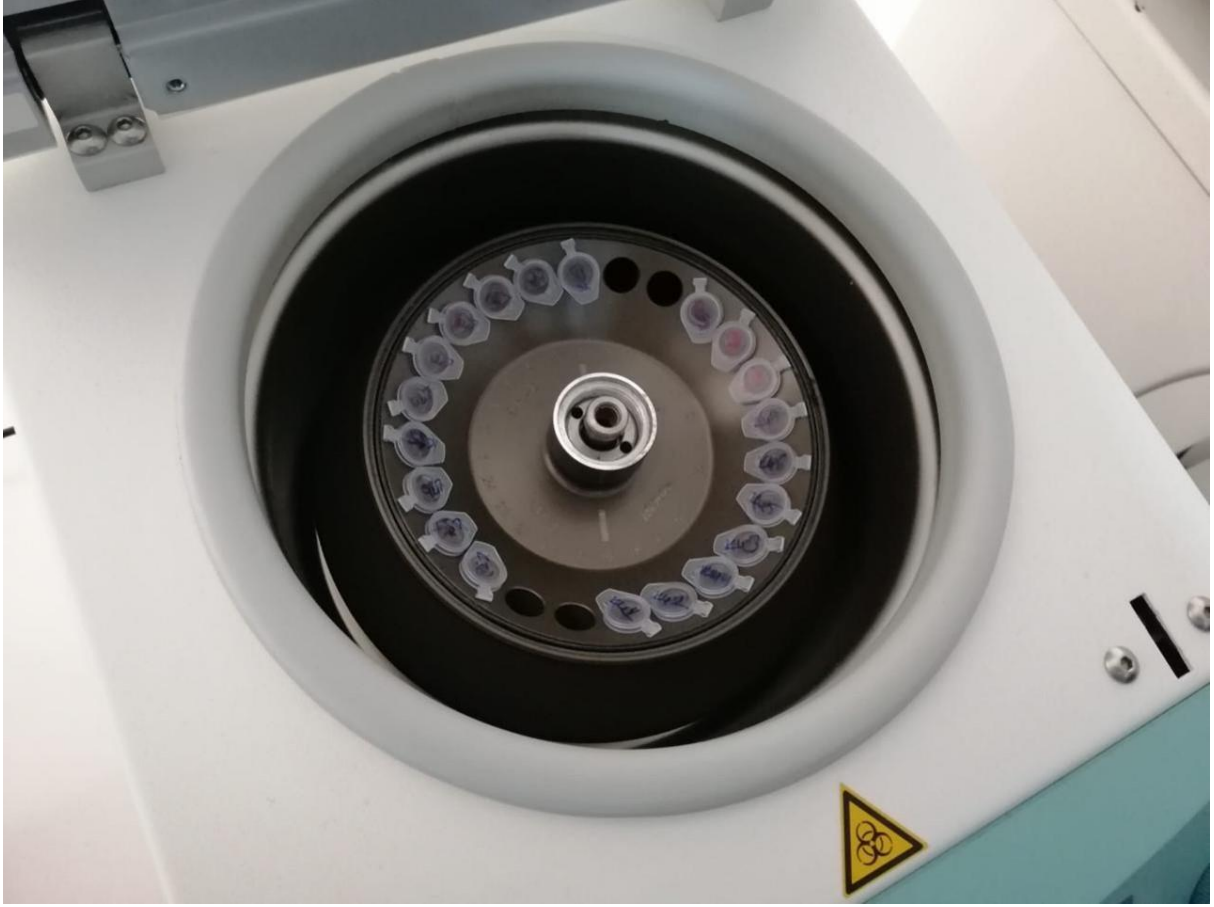
Tablo 3.8. Hazırlanan reaksiyon sıcaklık koşulları

| | |
|--|---|
| Denaturasyon | 95°C de 180 sn |
| Amplifikasyon Bu döngü 40 kez sağlanır. (40 cycle, Ramp-rite 1,6°C/sn, saniyedeki ısı değişimi) | 95°C de 10 sn. x°C de 30 sn 72 °C de 5 sn |
| Melting Curve | 95°C de 10 sn. 65 °C de 60 sn. 97 °C de continue (Acquisitions 3 per/°C) |
| Cooling | 37 °C de 30 sn |

X. Primer bağlanma sıcaklığı (GAPDH:53 °C, Klotho:58 °C)



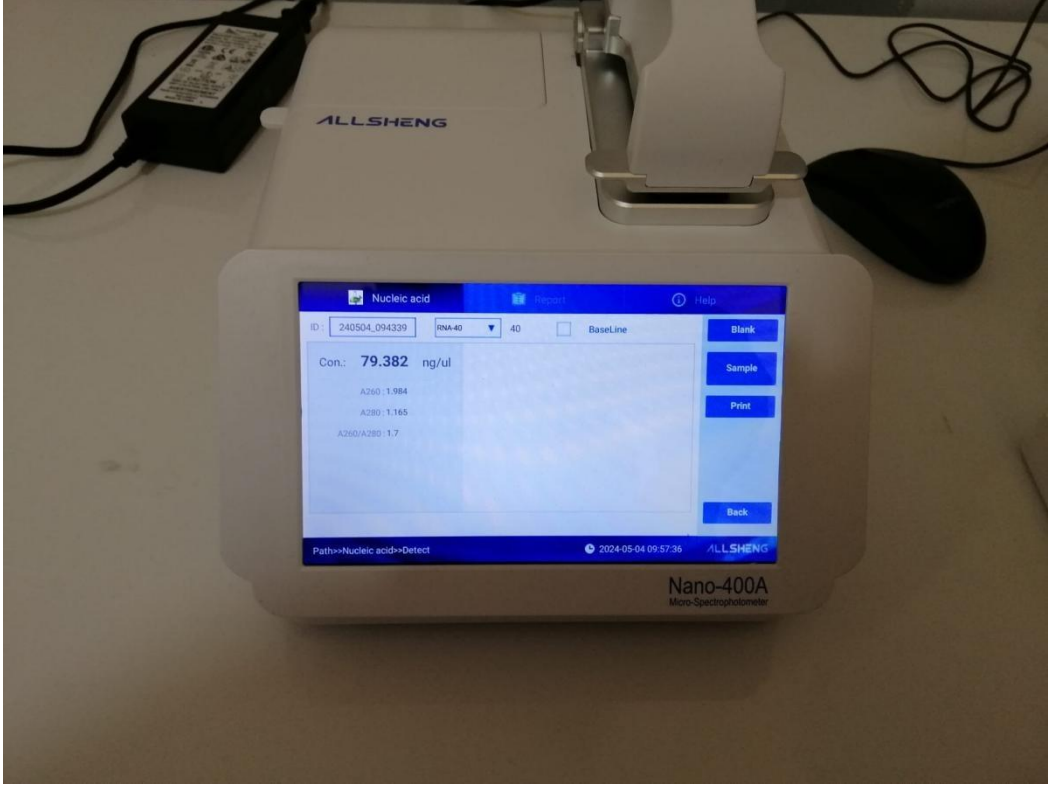
Şekil 3.5. Çalışma malzemeleri hazırlanma aşaması.



Şekil 3.6. Santrifüj aşaması



Şekil 3.7. Termal Döngü cihazı.



Şekil 3.8. Nanodrop cihazı.



Şekil 3.9.Vortekslama aşaması.



Şekil 3.10. Real-Time PCR cihazı.

3.7.7. İstatiksel analiz

Hipotezi desteklenmek için t testi kullanıldı. Etki büyüklüğünü belirlemek için önceki çalışmalardan tahmin yürütüldü (cohen's d). Anlamlılık düzeyi 0,05 kabul edildi. Gerekli örnekleme büyüklüğü yeterli kaynak göz önüne alınarak belirlendi (G power).

Tüm istatistiksel analizler R Version 3.6.1 (www.r-project.org) uygulaması yardımıyla yapıldı. İstatistiksel değerlendirmelerde, tedavi öncesi ve sonrası grupların (grup içi) karşılaştırmasında paired t-testi kullanılırken, hasta (tedavi öncesi ve sonrası) ve kontrol gruplarının (gruplar arası) karşılaştırmasında Welch's two sample t-test ve Fisher's exact test kullanılmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonucunun 1'den küçük olması, gen ekspresyonunun azaldığını; $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonucunun 1'den büyük olması ise gen ekspresyonunun arttığını gösterir. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonucunun tam olarak 1 olması durumunda, hedef genin ekspresyonunun hiç değişmediği anlaşılır (Livak & Schmittgen, 2001).

Çalışmanın istatistiksel sonuçları, hem gruplar arası değişimleri (kontrol grubu ve tedavi öncesi grubu ölçümlerinin kıyaslanması) hem de grup içi değişimleri (hasta grubunun öncesi ve sonrası ölçümlerinin karşılaştırılması) inceleyecek şekilde iki kademeli olarak gerçekleştirildi. Kontrol ve tedavi öncesi gruplarının cinsiyet dağılımları ise Fisher's exact test ile analiz edildi. İstatistiksel testlerde anlam seviyesi (p-değeri) 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri

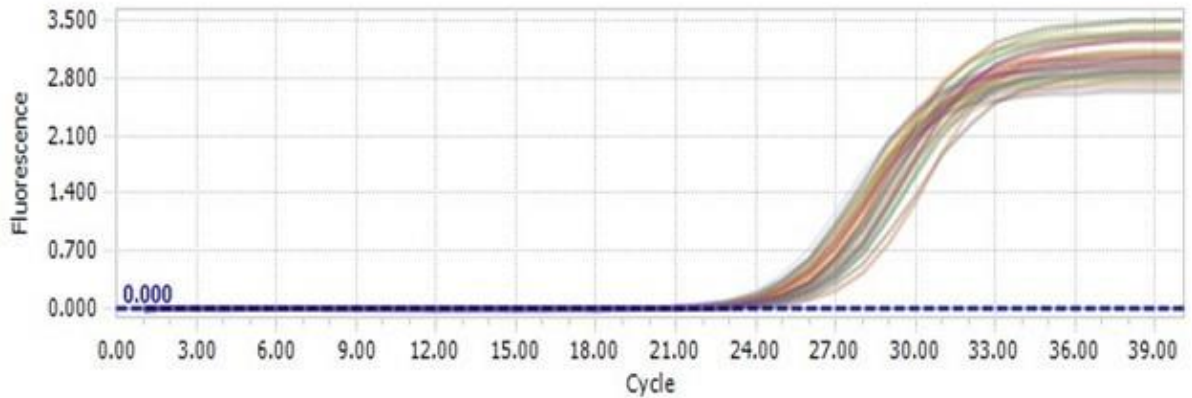
Çalışmaya kontrol grubunda 20 kişi, tedavi öncesi grubunda 10 kişi olmak üzere toplam 30 kişi alındı. (Tablo 4.1) de bilgilere göre sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması ve tedavi öncesi grubundakilerin yaş ortalamasının arasında fark bulunmadı ($P>0,05$). Kontrol grubunun 55%'ü kadın iken, tedavi öncesi grubundakilerin 70%'i de kadındı ve grupların cinsiyet dağılımları arasında fark bulunmadı ($P>0,05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma gruplarının demografik özellikleri

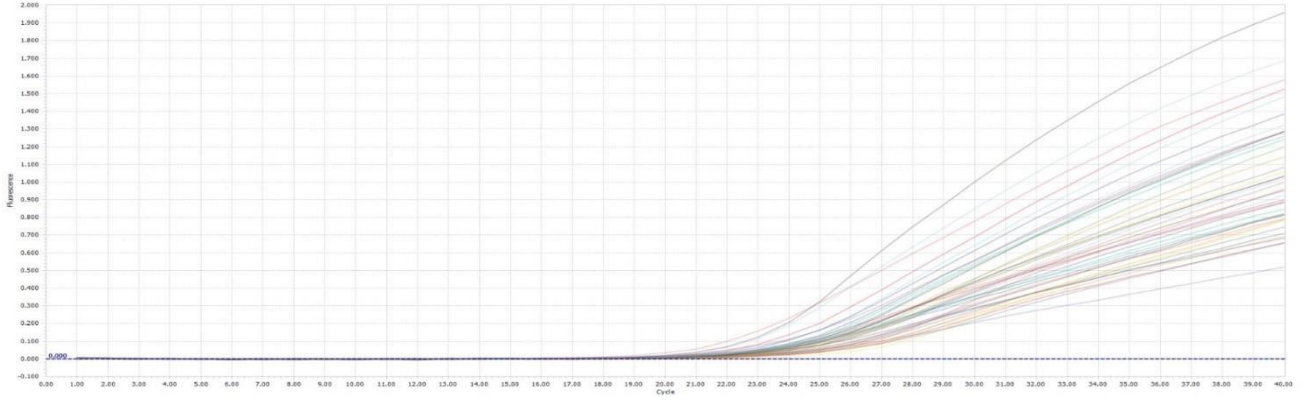
| Demografik Özellikler | Kontrol (n=20) | Tedavi öncesi (n=10) | P-value |
|-----------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------|
| Yaş (Yıl) | 40.95±7.64 | 49.20±15.40 | 0.14 |
| Cinsiyet | Kadın:11 (55%) Erkek: 9 (45%) | Kadın: 7 (70%) Erkek: 3 (30%) | 0.69 |

4.2. PCR (miRNA 22 ve Klotho) Sonuçları

Araştırmaya katılan kişilerin D vitamini eksikliği tedavi olmadan önce ve olduktan sonraki alınan venöz plazmalarından izole edilen ve sonra cDNA'ya dönüştürülen miRNA 22 ve Klotho genleri sırayla Snord44 ve GAPDH referans genlerinin gerçek zamanlı PCR işlemi sırasında çoğalmaya başladığı, C_T değerleri kullanılarak gen ekspresyonu düzeyleri hesaplanıp bu değerler birbirleriyle kıyaslandı. Elde edilen miRNA 22 ve Klotho genlerine ait gerçek zamanlı PCR çoğalma eğrileri aşağıdaki şekillerde eklenmiştir.



Şekil 4.1. MikroRNA 22'nin RT-PCR döngü sayısına göre ΔR_n değerleri.



Şekil 4.2. Klotho'nun RT-PCR döngü sayısına göre ΔR_n değerleri.

Gerçek zamanlı PCR verilerinin analizi için en sık tercih edilen yöntem, bağıl ölçüm yöntemidir. Bu yöntemde, D vitamini kullanımından önce ve sonra hedef genin sinyalleri dikkate alınır. Deneylerde gen ifadelerindeki nispi değişikliklerin değerlendirilmesinde $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi değeri uygulanır. Hedef genlerimiz olan miRNA 22, Klotho ve referans genimize ait C_T değerleri belirlenerek, aşağıdaki formül yardımıyla genlerin ifade seviyelerindeki artış veya azalma oranları hesaplanır.

$$\Delta C_T = C_T (\text{HEDEF}) - C_T (\text{REFERANS})$$

ΔC_T ; Hedef ve referans genler için belirlenen threshold cycle (C_T), yani döngü sayısı farkını ifade eder. Uygulamada, temel floresans sinyallerinin 10 kat standart sapma değeri threshold olarak kabul edilir ve C_T değerinin 35'ten büyük olması uygun görülmez.

$$\Delta\Delta C_T = (C_T (\text{hedef}) - C_T (\text{referans})) \text{ SONRA} - (C_T (\text{hedef}) - C_T (\text{referans})) \text{ ÖNCE}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Ürün miktarı oranı}$$

Tablo 4.2. Tedavi öncesi ve kontrol klotho geni protein aktivitesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonuçları

| Tedavi öncesi | | | Kontrol | | | |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|---------|------------------------|----|------------------------|
| No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (önce) | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (sonra) | No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
| 1 | 1.11 | 1.29 | 1 | 1.03 | 11 | 0.77 |
| 2 | 0.55 | 0.76 | 2 | 0.71 | 12 | 1.05 |
| 3 | 0.93 | 1.21 | 3 | 0.63 | 13 | 1.08 |
| 4 | 0.72 | 0.99 | 4 | 0.9 | 14 | 2.11 |
| 5 | 0.87 | 1.24 | 5 | 0.84 | 15 | 1.32 |
| 6 | 1.05 | 1.17 | 6 | 0.9 | 16 | 1.18 |
| 7 | 0.67 | 1.22 | 7 | 0.91 | 17 | 1.1 |
| 8 | 0.65 | 1.11 | 8 | 0.91 | 18 | 0.9 |
| 9 | 0.94 | 1.16 | 9 | 1.29 | 19 | 0.89 |
| 10 | 0.49 | 0.77 | 10 | 1.15 | 20 | 1.04 |

Tablo 4.3. Tedavi öncesi ve kontrol miRNA 22 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ sonuçları

| Tedavi öncesi | | | Kontrol | | | |
|---------------|-------------------------------|--------------------------------|---------|------------------------|----|------------------------|
| No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (önce) | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (sonra) | No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | No | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
| 1 | 0.4 | 4.7 | 1 | 1.4 | 11 | 0.7 |
| 2 | 1.3 | 1.8 | 2 | 0.1 | 12 | 0.7 |
| 3 | 1 | 4.6 | 3 | 0.2 | 13 | 1.4 |
| 4 | 0.3 | 2.7 | 4 | 3.4 | 14 | 2.4 |
| 5 | 1.8 | 5.8 | 5 | 0.2 | 15 | 4.6 |
| 6 | 1.2 | 2.6 | 6 | 0.3 | 16 | 1.4 |
| 7 | 0.3 | 2.3 | 7 | 0.7 | 17 | 1.3 |
| 8 | 2.4 | 3 | 8 | 0.3 | 18 | 3.6 |
| 9 | 1.9 | 2.2 | 9 | 0.3 | 19 | 5.7 |
| 10 | 0.9 | 1 | 10 | 1.9 | 20 | 4 |

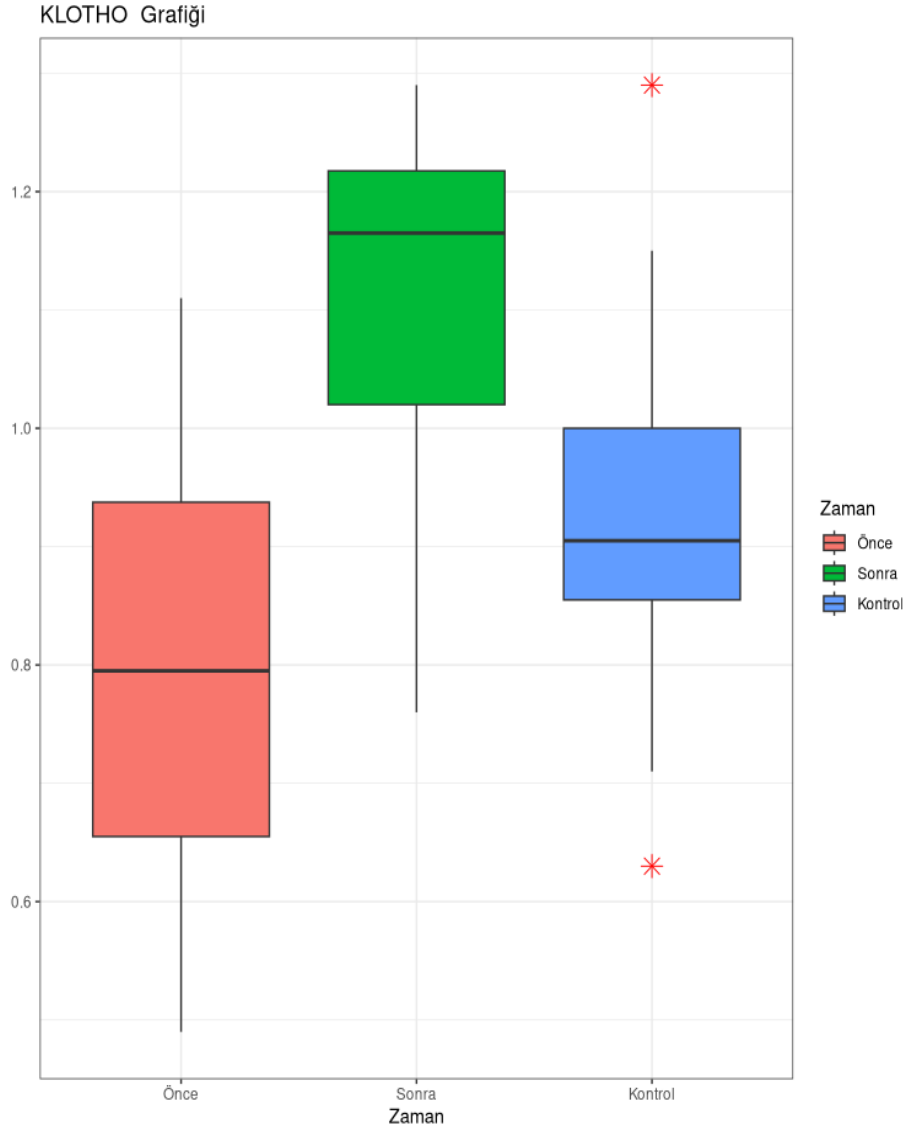
Kontrol grubunun Klotho geni protein aktivitesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri (1.04 ± 0.31) tedavi öncesi grubu (0.80 ± 0.21) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.021$) (Tablo 4.4). Tedavi sonrası grubun Klotho geni protein aktivitesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri (1.09 ± 0.19) ile tedavi öncesi değerleri arasında anlamlı bir artış bulundu ($p<0.001$). Tedavi sonrası grubunun Klotho geni protein aktivitesinin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0,05$) (Tablo 4.4) (Şekil 4.3).

Kontrol grubunun miRNA 22'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri (1.73 ± 1.67) tedavi öncesi grubun (1.15 ± 0.72) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P>0,05$) (Tablo 4.4). Tedavi sonrası grubun miRNA 22'nin $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri (3.07 ± 1.49) ile tedavi öncesi değerleri arasında anlamlı bir artış bulundu ($p=0.004$). Tedavi sonrası grubun miRNA

22'nin 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında anlamlı bir artış bulundu (p=0.038) (Tablo 4.4) (Şekil 4.4).

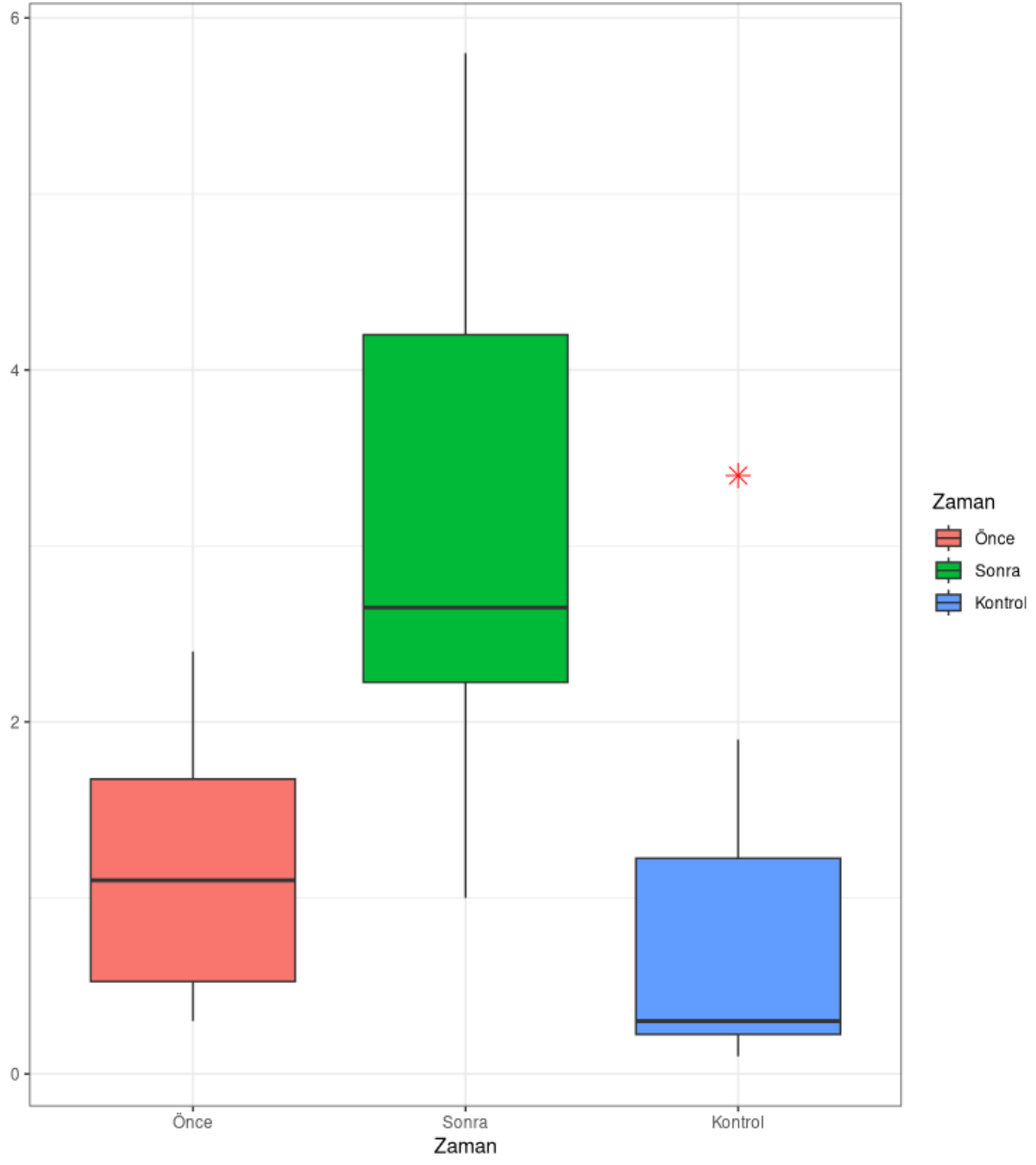
Tablo 4.4. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların Klotho ve miRNA 22 2- $\Delta\Delta$ Ct değerleri karşılaştırılması

| Grup | Klotho (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}) | miRNA 22 (2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}) |
|---|---|---|
| Kontrol (M \pm SD) | 1.04 \pm 0.31 | 1.73 \pm 1.67 |
| Tedavi öncesi (M \pm SD) | 0.80 \pm 0.21 | 1.15 \pm 0.72 |
| Tedavi sonrası (M \pm SD) | 1.09 \pm 0.19 | 3.07 \pm 1.49 |
| P-value (Kontrol-Tedavi öncesi) | 0.021 | P>0,05 |
| P-value (Tedavi öncesi-T. sonrası) | <0.001 | 0.004 |
| P-value (Kontrol-T. sonrası) | P>0,05 | 0.038 |



Şekil 4.3. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası klotho $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonuçları.

MI_RNA22 Grafiği



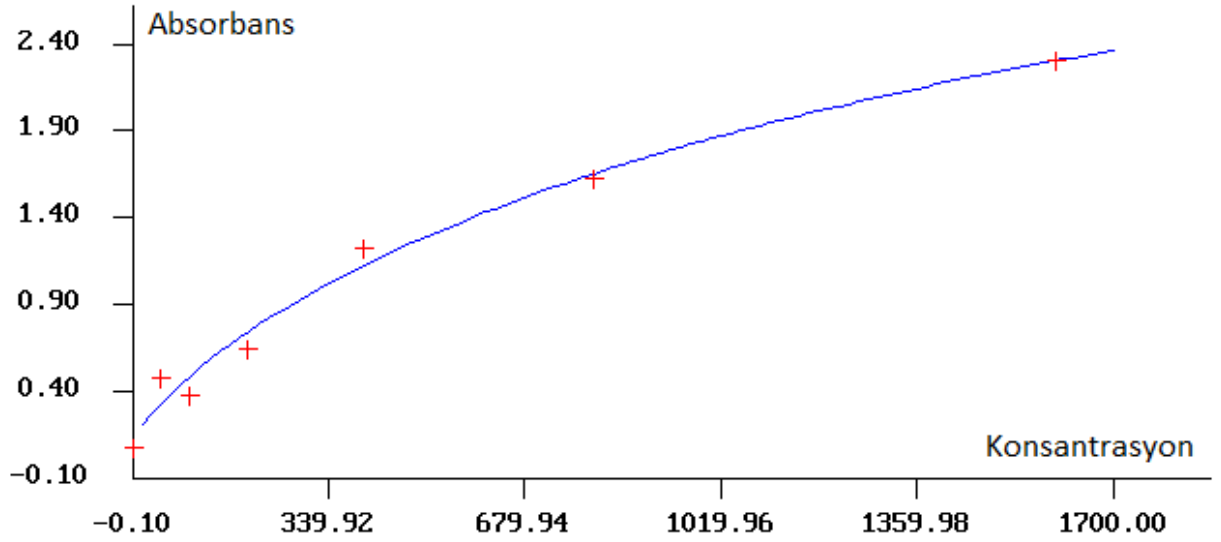
Şekil 4.4. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası miRNA 22 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sonuçları.

4.3. ELISA (Fibroblast Büyüme Faktörü 23) Sonuçları

Araştırmaya katılan kişilerin D vitamini eksikliği tedavi olmadan önce ve olduktan sonraki alınan venöz serumlarda Fibroblast Büyüme Faktörü 23 seviyesini Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Deneyi “ELISA” yöntemi kullanarak ölçülmüştür. Aşağıdaki tablolarda çalışmanın sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Tedavi öncesi ve kontrol H-FGF-23’ün konsantrasyonunun sonuçları

| Tedavi öncesi (pg/ml) | | | Kontrol (pg/ml) | | | |
|-----------------------|---------|---------|-----------------|---------|----|-----------|
| No | Önce | Sonra | No | Kontrol | No | Kontrol |
| 1 | 133,580 | 79,891 | 1 | 140,105 | 11 | 148,344 |
| 2 | 111,406 | 57,176 | 2 | 200,747 | 12 | 1,224,398 |
| 3 | 114,638 | 75,661 | 3 | 131,065 | 13 | 103,160 |
| 4 | 157,575 | 88,534 | 4 | 102,076 | 14 | 587,104 |
| 5 | 116,014 | 103,049 | 5 | 99,576 | 15 | 1,846,912 |
| 6 | 63,041 | 20,060 | 6 | 730,399 | 16 | 82,102 |
| 7 | 109,331 | 81,059 | 7 | 104,196 | 17 | 40,517 |
| 8 | 126,761 | 100,680 | 8 | 49,915 | 18 | 829,917 |
| 9 | 351,827 | 319,660 | 9 | 115,654 | 19 | 96,092 |
| 10 | 161,345 | 117,722 | 10 | 118,655 | 20 | 112,638 |



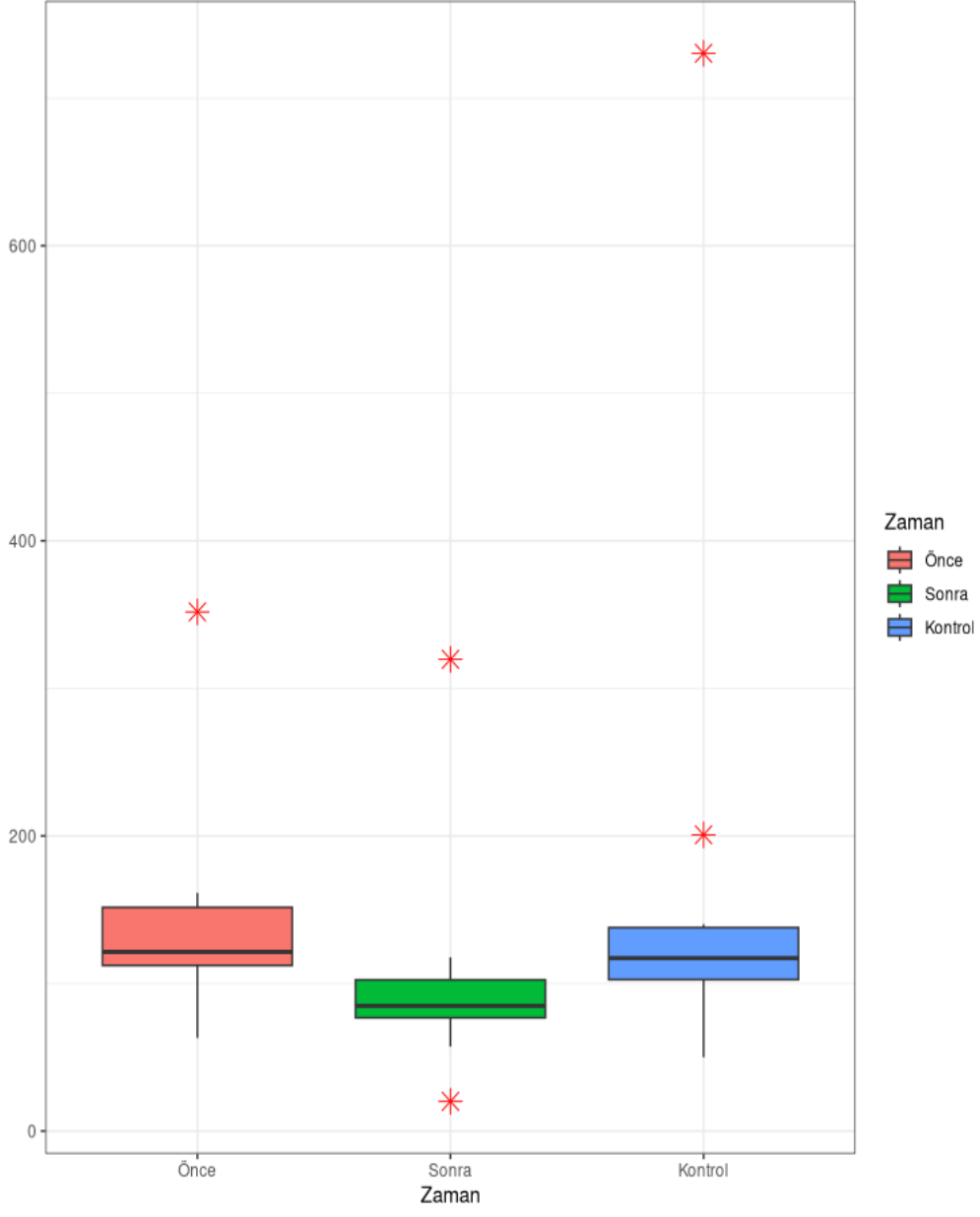
Şekil 4.5. H-FGF-23 konsantrasyon eğrisi.

H-FGF-23 serum seviyesi kontrol grubunda (343.18±476.99) tedavi öncesi grubun değerlerine (144.55±77.85) göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (p=0.084) (Tablo 4.6) tedavi sonrası ölçümlerde ise (104.35±80.34) tedavi öncesi grubuna göre H-FGF-23 serum seviyesinde anlamlı bir azalma bulundu (p<0.001). Ayrıca tedavi sonrası grubunun H-FGF-23 serum seviyesi ile kontrol grubunun değerleri arasında anlamlı bir azalma bulundu (p=0.041). Fakat bu azalma kontrol>tedavi öncesi> tedavi sonrası sırayla bulundu (Tablo 4.6) (Şekil 4.6).

Tablo 4.6. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların H-FGF-23 karşılaştırılması

| Grup | H-FGF-23 |
|---|-----------------|
| Kontrol (M ± SD) | 343.18±476.99 |
| Tedavi öncesi (M ± SD) | 144.55±77.85 |
| Tedavi sonrası (M ± SD) | 104.35±80.34 |
| P-value (Kontrol-Tedavi öncesi) | P>0,05 |
| P-value (Tedavi öncesi-T. sonrası) | <0.001 |
| P-value (Kontrol-T. sonrası) | 0.041 |

H_FGF23 Grafiği



Şekil 4.6. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası H-FGF-23 sonuçları.

4.4. Biyokimya Sonuçları:

Tablo 4.7. Hasta serumlarından alınan Ca, PO₄ ve D₃ test sonuçları

| Hasta | | | | | | |
|-------|------------------------|-------|------------|-------|-------------------------|-------|
| No | D ₃ (ng/ml) | | Ca (mg/dl) | | PO ₄ (mg/dl) | |
| | Önce | Sonra | Önce | Sonra | Önce | Sonra |
| 1 | 17.6 | 23.3 | 9.57 | 9.82 | 2.33 | 2.76 |
| 2 | 27.7 | 28.2 | 9.27 | 9.46 | 3.31 | 3.68 |
| 3 | 6.16 | 21.7 | 8.98 | 9.52 | 3.85 | 3.98 |
| 4 | 14.3 | 22.7 | 9.38 | 9.6 | 2.71 | 3.07 |
| 5 | 28.3 | 36.3 | 9.28 | 9.53 | 3.65 | 4.42 |
| 6 | 17.3 | 25.4 | 9.87 | 10.33 | 2.4 | 2.59 |
| 7 | 13.19 | 31.46 | 9.21 | 9.56 | 3.27 | 3.73 |
| 8 | 21.4 | 23.6 | 9.09 | 10.16 | 3.07 | 3.49 |
| 9 | 12.2 | 26.2 | 9.94 | 10.04 | 3.93 | 4.04 |
| 10 | 22.7 | 29.7 | 9.77 | 9.88 | 3.37 | 3.95 |

Tablo 4.8. Sağlıklı insan serumlarından alınan Ca, PO₄ ve D₃ test sonuçları

| Kontrol | | | | | | | | | | |
|-------------------------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|
| No | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| D ₃ (ng/ml) | 32.3 | 34.8 | 59.1 | 62.9 | 33.9 | 32.6 | 40.8 | 31.2 | 32.1 | 33.1 |
| Ca (mg/dl) | 9.79 | 9.98 | 9.54 | 9.68 | 8.66 | 10.4 | 10.5 | 9.95 | 9.98 | 9.88 |
| PO ₄ (mg/dl) | 4.02 | 3.99 | 3.5 | 4 | 4.1 | 3.55 | 3.2 | 3.66 | 3.56 | 3.74 |
| No | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| D ₃ (ng/ml) | 33 | 38.5 | 34 | 71.2 | 30.8 | 46.2 | 42.9 | 30.6 | 45.6 | 30.4 |
| Ca (mg/dl) | 9.89 | 9.14 | 10.44 | 9.18 | 9.53 | 9.61 | 9.41 | 9.5 | 9.27 | 9.51 |
| PO ₄ (mg/dl) | 3.42 | 3.67 | 3.65 | 3.1 | 2.89 | 3.45 | 3.98 | 3.69 | 3.58 | 3.6 |

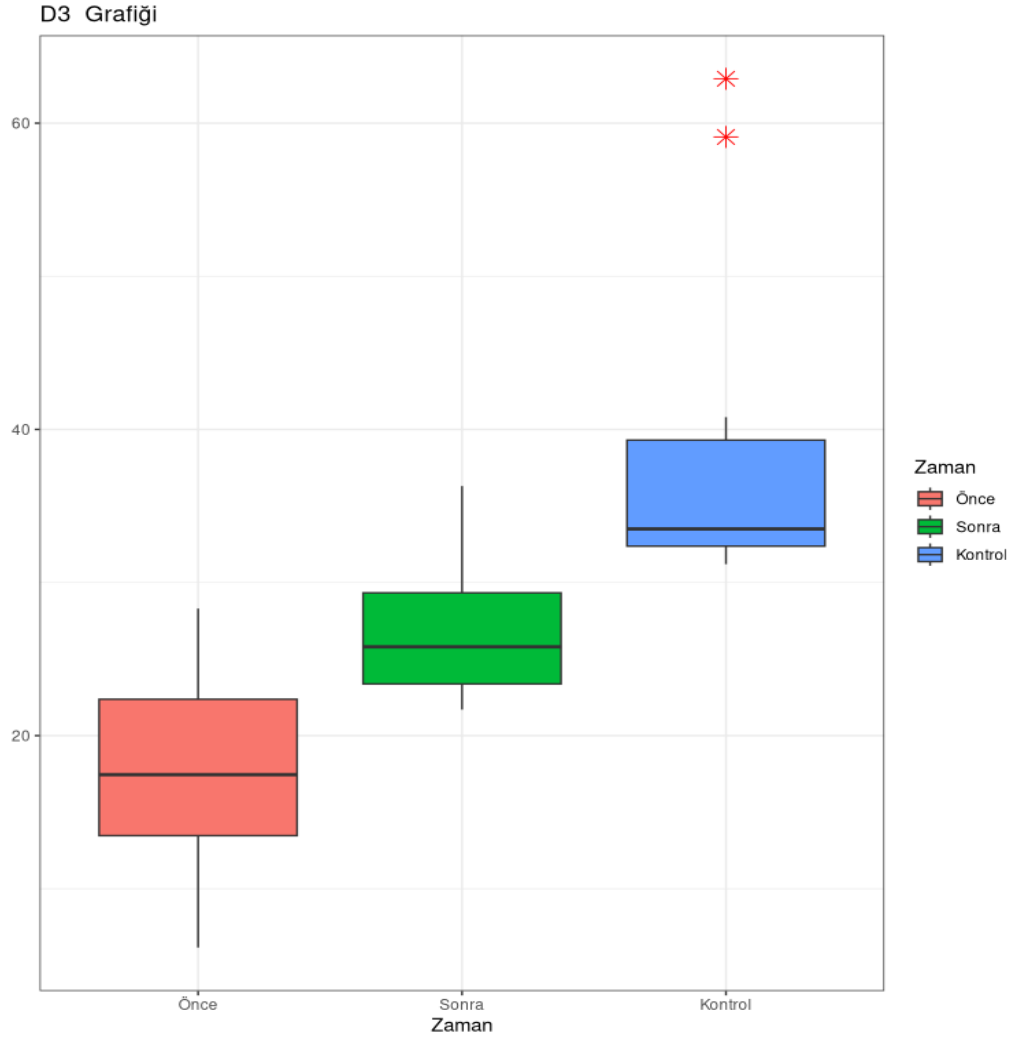
Vitamin D seviyesi kontrol grubunda (39.80 ± 11.83) tedavi öncesi grubun değerlerine (18.09 ± 7.03) göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p < 0.001$) (**Error! Reference source not found.**). Tedavi sonrası ölçümlerde ise (26.86 ± 4.59) tedavi öncesi grubuna göre vitamin D seviyesinde anlamlı bir artış bulundu ($p < 0.001$). Tedavi sonrası grubunun Vitamin D seviyesi ile kontrol grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p < 0.001$) (**Error! Reference source not found.**) (Şekil 4.7). Tedavi sonrası grubunda vitamin D seviyesinin yükselmesine rağmen bu artış kontrol grubundan daha düşük olduğu görüldü.

Kontrol grubunun kalsiyum değerleri (9.69 ± 0.46) tedavi öncesi grubun değerleri (9.44 ± 0.33) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$) (**Error! Reference source not found.**). Tedavi sonrası kalsiyum değerleri (9.79 ± 0.31) ile tedavi öncesi değerler arasında anlamlı bir artış bulundu ($p = 0.004$). Tedavi sonrası grubunun kalsiyum değerleri ile kontrol grubunun değerleri istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$) (**Error! Reference source not found.**) (Şekil 4.8).

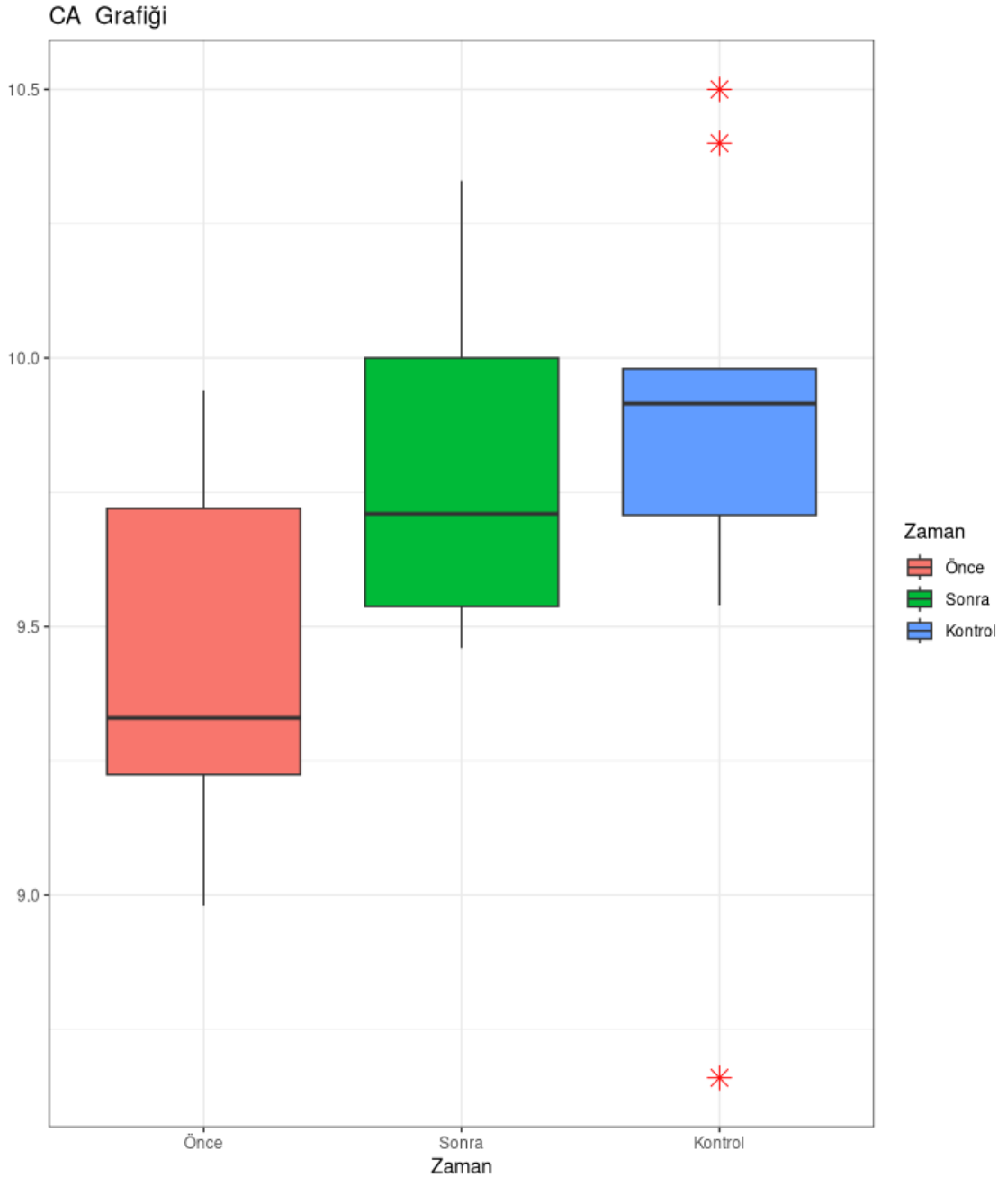
Kontrol grubunun fosfat değerleri (3.62 ± 0.32) ile tedavi öncesi grubun (3.19 ± 0.56) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p = 0.045$) (**Error! Reference source not found.**). Ancak tedavi sonrası grubundaki ölçümlerde (3.57 ± 0.59) fosfat değerinin tedavi öncesi grubuna göre yükseldiği görüldü ($p < 0.001$). Tedavi sonrası grubunun fosfat değerleri ile kontrol grubunun değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P > 0.05$) (**Error! Reference source not found.**) (Şekil 4.9).

Tablo 4.9. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası grupların çalışma biyokimya parametrelerinin karşılaştırılması

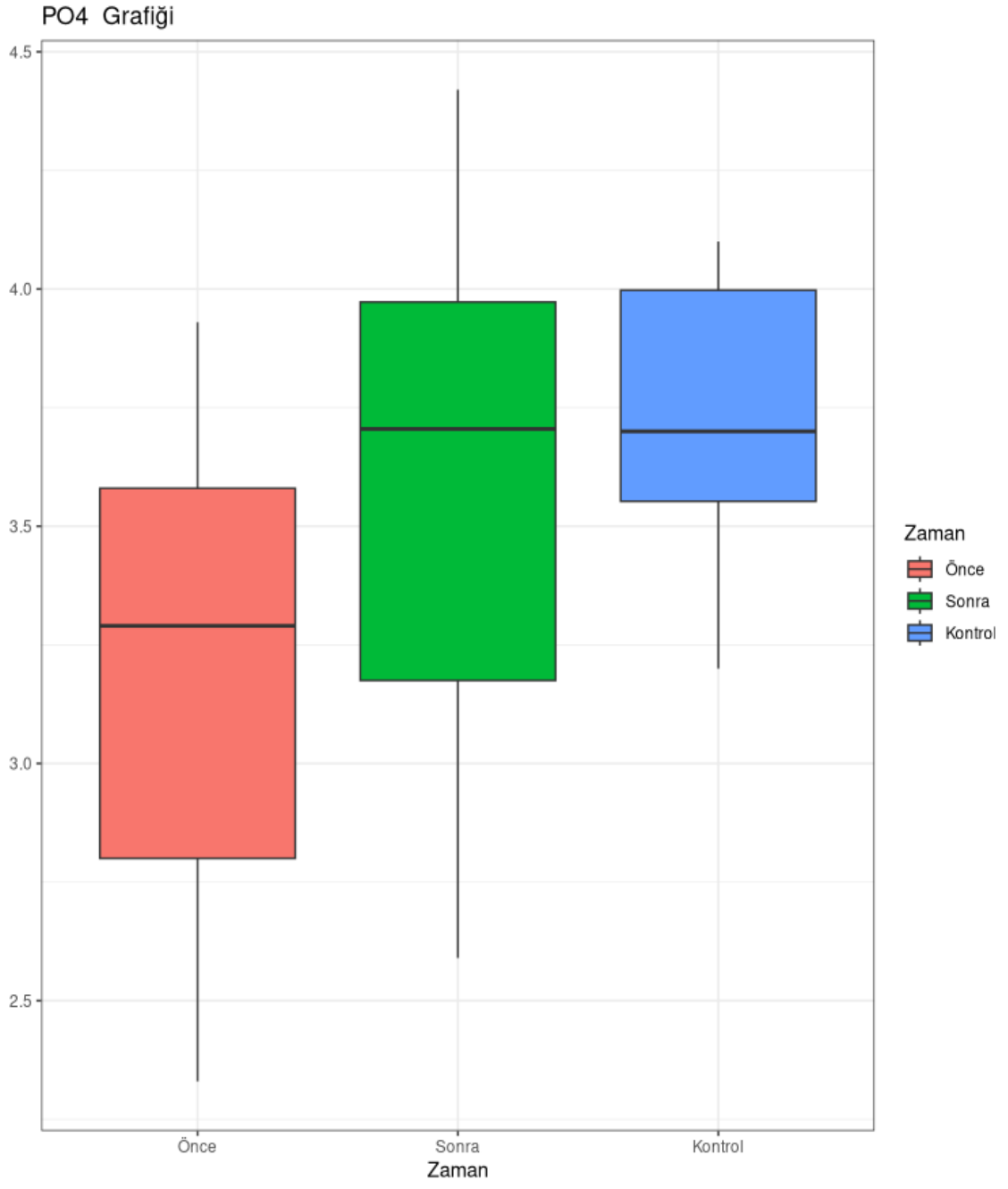
| Grup | Kalsiyum (mg/dL) | Fosfor (mg/dL) | Vitamin D (ug/L) |
|---|------------------|-----------------|-------------------|
| Kontrol (M ± SD) | 9.69 ± 0.46 | 3.62 ± 0.32 | 39.80 ± 11.83 |
| Tedavi öncesi (M ± SD) | 9.44 ± 0.33 | 3.19 ± 0.56 | 18.09 ± 7.03 |
| Tedavi sonrası (M ± SD) | 9.79 ± 0.31 | 3.57 ± 0.59 | 26.86 ± 4.59 |
| P-value (Kontrol-Tedavi öncesi) | $P > 0.05$ | 0.045 | < 0.001 |
| P-value (Tedavi öncesi-T. sonrası) | 0.004 | < 0.001 | < 0.001 |
| P-value (Kontrol-T. sonrası) | $P > 0.05$ | $P > 0.05$ | < 0.001 |



Şekil 4.7. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası D vitamin sonuçları.



Şekil 4.8. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası Ca sonuçları.



Şekil 4.9. Kontrol, tedavi öncesi ve tedavi sonrası PO₄ 'nın sonuçları.

Kontrol grubunda tedavi öncesi grubuyla karşılaştırıldığında Klotho geni protein aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p=0.021$). Tedavi sonrası grupta tedavi öncesi grubuna kıyasla Klotho geni protein aktivitesinde anlamlı düzeyde bir artış gözlemlendi ($p<0.001$). Tedavi sonrası grubu kontrol grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında Klotho geni protein aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi ($P>0.05$) (Tablo 4.10) (Şekil 4.3).

Kontrol grubunda tedavi öncesi grubuyla karşılaştırıldığında miRNA 22'nin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p=0.021$). Tedavi sonrası grupta tedavi öncesi grubuna kıyasla miRNA 22'nin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0.004$). Tedavi sonrası grupta kontrol grubuna kıyasla miRNA 22'nin ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p=0.038$) (Tablo 4.10) (Şekil 4.4).

Kontrol grubu ile tedavi öncesi grubu karşılaştırıldığında H-FGF-23 serum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). Tedavi sonrası ölçümlerde ise tedavi öncesi grubuna göre H-FGF-23 serum seviyesinde anlamlı bir azalma bulundu ($p<0.001$). Tedavi sonrası grupta kontrol grubuna kıyasla H-FGF-23 serum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0.041$). Ancak bu azalma kontrol> tedavi öncesi> tedavi sonrası şeklinde bir sıralama gösterdi (Tablo 4.10) (Şekil 4.6).

Kontrol grubu ile tedavi öncesi grubu karşılaştırıldığında kalsiyum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$). Ancak tedavi sonrası grupta tedavi öncesi grubuna kıyasla kalsiyum seviyesinde anlamlı bir artış bulundu ($p=0.004$). Ayrıca tedavi sonrası grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında kalsiyum seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$) (**Error! Reference source not found.**) (Şekil 4.8).

Kontrol grubunda tedavi öncesi grubu ile karşılaştırıldığında fosfat seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu ($p=0.045$). Tedavi sonrası grupta tedavi öncesi grubuna kıyasla fosfat seviyesinde anlamlı bir artış bulundu ($p<0.001$). Tedavi sonrası grubu kontrol grubuna kıyasla fosfat seviyesinde anlamlı bir fark bulunmadı ($P>0.05$) (Tablo 4.10) (Şekil 4.9).

Tablo 4.10. Değişkenlerin P-value sonuçları

| Değişken | P-value (Kontrol-T. öncesi) | P-value (Kontrol-T. sonrası) | P-value (Tedavi öncesi-sonrası) |
|-----------------------|--|---|--|
| Ca | 0.10 | 0.49 | 0.004 |
| PO₄ | 0.045 | 0.82 | <0.001 |
| D₃ | <0.001 | <0.001 | <0.001 |
| H-FGF-23 | 0.084 | 0.041 | <0.001 |
| Klotho | 0.021 | 0.54 | <0.001 |
| miRNA 22 | 0.20 | 0.038 | 0.004 |

| Değişkenlerin ortalaması ve standart sapması | | | | | |
|---|----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------------|--|
| Grup | Klotho (M ± SD) | miRNA 22 (M ± SD) | H-FGF-23 (M ± SD) | Ca (mg/dL) (M ± SD) | PO₄ (mg/dL) (M ± SD) |
| Kontrol | 1.04±0.31 | 1.73±1.67 | 343.18±476.9 | 9.69±0.46 | 3.62±0.32 |
| Tedavi öncesi | 0.80±0.21 | 1.15±0.72 | 144.55±77.85 | 9.44±0.33 | 3.19±0.56 |
| Tedavi sonrası | 1.09±0.19 | 3.07±1.49 | 104.35±80.34 | 9.79±0.31 | 3.57±0.59 |

5. TARTIŞMA

D vitamini, dört halkalı bir sterol türevi olan ve iskelet sistemi üzerinde etkisi olan bir hormondur. Bu etkilerini kalsiyum (Ca), fosfat (PO₄) ve alkalin fosfataz seviyelerini düzenleyerek ve kemik metabolizmasını kontrol ederek gösterir. D vitamini, iskeletin mineralleşme sürecinde doğrudan etki göstermemektedir. Serumdaki Ca ve PO₄'ın vücutta tutulumunu sağlamaktadır. Bu minerallerin kan seviyelerini yükselterek kemik büyümesini desteklediği ve kemik mineralleşmesine yardımcı olduğu ispat edilmiştir (Wacker ve ark 2013). D vitamini, etkilerini genellikle bağırsak, böbrek ve kas-iskelet sistemi üzerinde göstermektedir. Ancak, D vitamini reseptörünün vücudun diğer dokularında da bulunması nedeniyle, D vitamininin işlevleri hakkında yeni ve artan görüşler ortaya çıkmaktadır (Amrein ve ark 2012). Bu nedenle, D vitamininin normal düzeylerine dönerken bazı parametrelerin incelenmesi ve spesifik araştırılması önemli bir konu sayılmaktadır. Böylece, D vitamini ile alakalı hastalıkların tanı ve tedavi yöntemleri ve stratejilerinin bulunması ve geliştirilmesinde kritik bir rol oynayabilir.

D vitamini, Ca ve PO₄ iyonlarının serum homeostazında önemli bir rol oynamaktadır. (Vitamin D Reseptörü) aktivasyonu ile doğrudan upregüle (örn. CYP24A1, CaBP-D9k, CaBP-D28k, BGLAP ve TNFSF11) veya downregüle (örn. PTH ve CYP27B1) birçok genin sentezini etkilemektedir. Ca homeostazında, 1,25 (OH)₂D, plazma Ca ve PO₄ seviyelerini artırmak için PTH (paratiroid hormonu) ile birlikte çalışmaktadır. Fizyolojik döngü, düşük Ca seviyesi paratiroid bezindeki Ca sensörleri tarafından fark edildiğinde başlamaktadır ve bu da PTH salgılamaktadır. Bu, yüksek dolaşımdaki 25 (OH)D havuzundan daha fazla 1,25 (OH)₂D üreten böbrek enzimi 25OH D-1 α hidroksilazı uyarmaktadır. Ortaya çıkan kolekalsiferol artışı, bağırsağa Ca emiliminin artmasına, kemik mineralizasyonunun desteklenmesine ve böbreklerde Ca geri emiliminin artmasına yol açar. Tüm bu olaylar plazma Ca düzeylerinin normale dönmesini sağlamakta ve paratiroid bezi hücrelerindeki Ca reseptörlerini uyarmaktadır. PTH'nin salgılanması, Ca'nın feedback işleviyle durdurulur; ayrıca aynı 1,25 (OH)₂D seviyesi, paratiroid bezindeki PTH sentezini doğrudan baskılayan VDR'leri aktive ederek daha hızlı bir inhibitör etki gösterebilmektedir (Bellavia ve ark 2016). Ca ve fosfatların bağırsaktan emilimi de kalsitriol (1,25 (OH)₂D) ile artmaktadır. Kalsitriol ayrıca, kemik mineralizasyonunda kritik bir rol oynayarak, osteoid matristeki kollajen lifleri arasında kristallerin birikmesini sağlar. 1,25 (OH)₂D reseptörleri, aktivitelerini uyardıkları osteoblastlarda da bulunur (Bellavia ve ark 2016).

Çalışmamızda da beklendiği gibi, D vitamini eksikliğinin tedavisi sonrasında hastaların serum Ca seviyelerinde artış bulundu. O artış istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulundu. Tedavi grubundaki serum Ca düzeyleri kontrol grubunun düzeylerine oldukça yaklaşmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ca tuzlarına ek olarak D vitamini takviyesi uygulanması, Ca eksikliği durumlarında faydalı olabilir ve normal düzeylerine getirebilmesinde önemli bir rol oynayabilir.

Organizma, fizyolojik ihtiyaçlarına bağlı olarak bağırsaklardan Ca alımını kontrol edebilmektedir. Kalsitriolün prekürsörüne göre yarı ömrü çok kısadır (yaklaşık 10-24 saat). Bu, organizmanın kendisi tarafından düzenlenen moleküllerin varyasyonlarına hızlı tepkileri ile ilişkilidir. Enzim aktivitesinin düzenlenmesinde Ca, PO₄, FGF-23 ve 1,25 (OH)₂D gibi birçok molekül bulunmaktadır. Ancak, bu moleküllerin fazlalığı, düzenleme mekanizmalarının net olarak anlaşılmasını zorlaştırabilir (Bellavia ve ark 2016). 1,25 (OH)₂D, VDR-RXR kompleksi ile etkileşime girerek hem epitelyal Ca kanalı hem de Ca bağlayıcı proteinin ekspresyonunu teşvik etmekte ve böylece bağırsak Ca emilim verimliliğini %10-15'ten %30-40'a çıkarmaktadır (Holick, 2007). Kemirgenlerde yapılan birkaç deneye dayanarak, 1,25 (OH)₂D'nin bağırsak PO₄ emilimini %50-60'tan yaklaşık %80'e çıkardığı tahmin edilmiştir (Holick, 2006a). Çalışmamızda da beklendiği gibi, D vitamini eksikliğinin tedavisi sonrasında hastaların serum PO₄ seviyelerinde artış bulundu. O artış istatistiksel olarak incelenirken de anlamlı bulundu. Kontrol grubunda tedavi öncesi grupla karşılaştırıldığında PO₄ seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış bulundu. Tedavi grubundaki serum PO₄ düzeyleri kontrol grubunun düzeylerine oldukça yaklaşmış olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. D vitamini takviyesi, PO₄'ın eksikliği durumlarında normal düzeylerine getirmesinde önemli bir rol oynayabilir.

D vitamini, PTH seviyelerini düzenleyerek Ca ve PO₄ üzerinde dolaylı etkiye sahiptir. Paratiroid bezlerinde CYP27B1 aktivitesi vardır. 25 (OH)D substratı kullanılarak 1,25 (OH)₂D üretimi, PTH sentezini inhibe edebilmektedir (Segersten ve ark 2002). Ancak, 25 (OH)D de VDR'yi doğrudan aktive ederek PTH sentezini doğrudan baskılayabilmektedir (Ritter ve ark 2006). D vitamini eksikliği, serumdaki iyonize Ca seviyelerinin düşük olmasıyla ilişkilidir ve bu da PTH seviyelerinin artmasına yol açan bir uyarı sağlamaktadır. Tersine, daha yüksek 25 (OH)D seviyeleriyle ilişkili olan yüksek Ca seviyeleri, PTH salgılanmasını baskılamaktadır. PTH, tübüler Ca'ı artırıp böbrek PO₄ reabsorpsiyonunu azaltmaktadır (Holick, 2006b). PTH ayrıca, Ca ve PO₄ homeostazı üzerindeki yukarıda belirtilen etkilerle 1,25 (OH)₂D üretimini

uyarmaktadır (Holick, 2006a). Hem PTH hem de 1,25 (OH)₂D, iskelet Ca depolarını harekete geçirmek için osteoblastları uyarmaktadır (Holick, 2007). D vitamini eksikliği, genellikle normalden yüksek 1,25 (OH)₂D seviyeleriyle ilişkili olan PTH artışı ile ilgili 1,25 (OH)₂D üretimi ile sekonder hiperparatiroidizme yol açmaktadır (Holick, 2006a). D vitamini sentezi, PTH aracılığıyla modüle edilir. D vitamini, PTH seviyelerini düzenleyerek Ca ve PO₄ üzerinde dolaylı etki etmektedir. Çalışmamızda PTH seviyeleri incelenmemiştir, ancak D vitamininin Ca ve PO₄ ile ilişkisi göz önüne alındığında, PTH'nin incelenmesinin faydalı olabileceği düşünülmektedir.

FGF-23, kemik kaynaklı bir hormon olup, böbreklerde fosfat geri Emilimini ve D vitamini biyosentezini inhibe eder. Bu sayede, idrarla PO₄ atılımını artırır ve 1,25-dihidroksivitamin D seviyelerini baskılar. FGF-23, FGF ligand süper ailesine aittir ve çoğu FGF aile üyesi, FGFR'ler (FGF reseptörleri) ile etkileşime girerek işlev görür. FGF-23, reseptörleri aracılığıyla sinyal iletmeye rağmen, in vitro koşullarda herhangi bir FGFR'ye zayıf afinite gösterir (Wang ve ark 2009). Son zamanlarda, Klotho'nun ekstraselüler alanının doğrudan birden fazla FGF reseptörüne bağlandığı gösterilmiştir. Bu bağlanma nedeniyle Klotho, FGF-23 sinyalizasyonunda ko-reseptör olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür. Klotho-FGFR1c, Klotho-FGFR3c ve Klotho-FGFR4 dahil olmak üzere bu ko-reseptörler, hepsi FGF-23'e FGFR'lerden veya Klotho'dan tek başına olsa bile çok daha yüksek afinite ile bağlanmaktadır (Wang ve ark 2009). Klotho, FGF-23 sinyalizasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Klotho-FGF-23 sinyali proliferasyonu uyarmakta ve D vitaminine bağlı apoptozu önlemektedir (Medici ve ark 2008). Bu nedenle, Klotho ve FGF-23, mineral iyon homeostazının düzenlenmesinde ortak bir sinyal yolunda çalışabilmektedir. Farelerde, Klotho eksikliği, Klotho-FGF-23 sinyal yolunu bozmakta ve 1,25 (OH)₂D₃ (Ca metabolizmasında önemli bir rol oynayan D vitamininin aktif bir metaboliti) üretiminin artmasına neden olmaktadır. 1,25 (OH)₂D₃ yüksek serum seviyeleri, bağırsaktan diyetle alınan PO₄ ve Ca Emilimini artırmaktadır. Sadece hiperfosfatemi değil, aynı zamanda bu mutantlarda hiperkalsemi de indüklemektedir (Nabeshima, 2006). Klotho eksikliği, 1,25 (OH)₂D₃ aşırı üretimine ve oksidatif stresin artmasına yol açmaktadır. Kandaki Ca seviyelerinin yükselmesi, kan damarlarının ve yumuşak dokuların ektopik kalsifikasyonuna yatkınlık oluşturmaktadır. Klotho eksikliği olan fareler ve FGF-23 knockout farelerin hiperfosfatemi, hiperkalsemi ve 1,25 (OH)₂D₃ sentezi artmasına neden olabilmektedir. Klotho olmadan, FGF-23'ün işlevi tam olarak ortadan kaldırılmıştır (Wang ve ark 2009).

FGF-23'ün ana kaynakları, çeşitli uyarıcılarla fizyolojik durumda kemikteki osteoblast ve osteositlerdir; ancak belirli patolojik koşullarda kardiyomyositler ve immün hücreler (dendritik hücreler ve makrofajlar) de FGF-23 salgılayabilmektedir. FGF-23'ün, kemik kaynaklı bir hormon olarak en önemli etkisi, yüksek düzeyde α Klotho (α Klotho) ekspres eden böbrek üzerinedir. Renal proksimal tübüllerde, FGF-23, aktif D vitamini formunu indüklemek için ana enzim D-1 α -hidroksilazın (Cyp27b1) mRNA seviyesini azaltarak 1,25 (OH)₂D₃'ün sentezini baskılamakta ve 1,25 (OH)₂D₃ inaktivasyonunda yer alan 24-hidroksilazın (Cyp24a1) ekspresyonunu artırmaktadır. Ayrıca, NaPi-2b ko-transportörünün ekspresyonu üzerinde önemli bir etkiye sahip olup proksimal tübüllerden Pi ve Na'nın geri emilimini baskılamaktadır. Sonuç olarak, serum fosfat seviyesini azaltmaktadır. FGF-23, renal distal tübülleri de hedef alıp sırasıyla geçici reseptör potansiyel vanilloid-5 (TRPV5) ve Na/klorid kanalı (NCC) aracılığıyla Ca⁺² ve Na⁺ alımını artırmaktadır. Bu süreç ERK1/2-SGK1 (ekstraselüler sinyal düzenlenmiş kinaz 1,2- serum glukokortikoid düzenlenmiş kinaz 1) ve WNK4 (Lizin içermeyen kinaz 4) sinyalizasyon kaskadı ile gerçekleşmektedir. Distal tübüllerde FGFR1'in spesifik silinmesinin, şiddetli renal Ca⁺² ve Na⁺ kaybına yol açtığı ortaya konmuştur. FGF-23'e ek olarak, PO₄ sodyum geri emilimi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ve kan hacmini ve kan basıncını düzenleyebilmektedir. FGF-23, proksimal tübüllerde PO₄'un yeniden emilimini etkilemesi ve α -Klotho/FGFR1 varlığında distal kıvrımlı tübüllere bağlanmasının yorumlanması için birkaç hipotez öne sürülmüştür. Bunlar FGF-23 veya Klotho'nun parakrin etkileri, proksimal tübüllerde FGF-23'ten bağımsız olarak glukuronidaz aktivitesi yoluyla NaPi-2a'yı değiştirerek otokrin fosfatürik çözümlü Klotho'nun etkileri veya FGF-23'ün, 1 α -hidroksilazı bir dereceye kadar Klotho'dan bağımsız bir şekilde bastırabilmesidir (Dastghaib ve ark 2023). Birkaç araştırmada D vitamini seviyelerinin artması, osteoblastlar tarafından FGF-23 üretimini indüklediği görülmüştür. Bu osteoblastlar, hücre ölümüne yol açabilecek daha yüksek PO₄ konsantrasyonlarından korunmuş olmaktadır (Murshed ve ark 2005; Sitara ve ark 2008). Bizim çalışmamızda tedavi öncesi grubun serum PO₄ seviyeleri yüksek değildi. Tedavi ve kontrol gruplarında PO₄ seviyeleri normal aralıktaydı. Yani PO₄ seviyelerinin azaltılması gerekmemektedir. Bundan dolayı PO₄ geri emilimini inhibe eden FGF-23'ün üretilmesi uyarılmadığı düşünülmektedir.

Normal olarak, FGF-23 osteositler tarafından üretilmektedir. Böbrek tip-II taşıyıcıların aşağı regülasyonu yoluyla renal PO₄ atılımını artırmak için böbrek üzerinde etki edip plazma PO₄ azalmasına yol açmaktadır. Ayrıca FGF-23, 1,25 (OH)₂D₃ plazma seviyesini de azaltmaktadır. Bu da iskeletten PO₄ (ve Ca) salınımını ve bağırsakta PO₄ emiliminin yukarı

regülasyonunu indükleyen PTH ve 1,25 (OH)₂D'nin etkisini kısmen önlemektedir (Bellavia ve ark 2016). FGF-23'ün fosfatürik ve Ca⁺² konservasyonu üzerindeki önemli etkileri, PTH hormonunun işlevine çok benzemektedir. Fakat kalsitriol (1,25 (OH)₂D) üretimindeki 1 α -hidroksilazın düzenlenmesine ilişkin işlevleri birbirlerine zıt yönde çalışmaktadır (Perwad ve ark 2007b).

D vitamini sterolleri doğrudan osteoblast olgunlaşmasını uyarmaktadır. Ayrıca osteosit dönüşümünü artırmaktadır. Osteoklast farklılaşma faktörlerinin osteoblast ekspresyonunu da artırmaktadır. Böylece muhtemelen osteoblast/osteoklast/osteosit dengesini düzenlemektedir. Erken osteosit sayısını artırarak, D vitamini sterolleri kemikte FGF-23 ekspresyonunu artırmaktadır (Pereira ve ark 2019). Bizim çalışmamızda D vitamini verildikten sonra D vitamini eksikliği olan hastaların serumlarındaki Ca ve PO₄ düzeylerinin arttığı görüldü. Öte yandan FGF-23'ün serum seviyesi D vitamini verildikten sonra azaldığı görüldü. Tedavi sonrası grubunda FGF-23 seviyesi sağlıklı kontrollere göre anlamlı azalma bulundu. Bundan dolayı D vitamini vücuttaki FGF-23 seviyelerini etkileyebilmektedir. D vitamini seviyeleri arttığında, FGF-23 sekresyonunda bir azalma olabilmektedir. Bunun nedeni, D vitamininin Ca ve PO₄ emilimini artırması ve kan PO₄ seviyelerini düzenleyen FGF-23 ihtiyacını azaltması olabilir.

Klinik bir çalışmada D vitamini eksikliği olan 119 hastanın kolekalsiferol (50.000 IU vitamin D) ile tedavi edildiğinde kolekalsiferolün serum FGF-23, 1,25 (OH)₂D₃ ve 25 (OH)D₃'ü önemli ölçüde artırabileceği öne sürülmüştür. Ayrıca, serum PTH ve 1,25 (OH)₂D₃'teki azalmanın FGF-23 seviyesi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Bunun aksine Ca'nın negatif bir ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Ca'nın artan 1,25 (OH)₂D₃ nedeniyle FGF-23'ün kontrolsüz artışını azaltarak düzenleyebileceği önerilmiştir (Dastghaib ve ark 2023; Smith ve ark 2019). Çalışmamızda hastalara D vitamininin yanına Ca takviyesi de verilmiş olabilir. Bu sebeple FGF-23 seviyelerinin düşmesine katkıda bulunmuş olabilir.

Başka bir çalışmada D vitamini takviyesi, hafif-orta dereceli kronik böbrek hastalığı olan çocuklarda Klotho ve sklerostin normalleştirdiği bulunmuştur. Ayrıca ileri CKD'de FGF-23'ü daha da artırdığı bulunmuştur (Lerch ve ark 2018). Böbrek fonksiyonlarının iyi olması, böbrek sağlığını destekleyici tedavilerin kullanılması veya kronik hastalıkların kontrol altına alınması durumunda FGF-23 düzeyinde azalma görülebilir. Bunun nedeni, FGF-23'ün esas olarak yüksek PO₄ seviyelerine yanıt olarak kemik hücreleri tarafından üretilmesi ve böbrek

fonksiyonunun iyileştirilmesinin PO₄'u azaltabilmesi ve dolayısıyla FGF-23 salgılanmasını azaltabilmesidir.

Klotho geni, yaşlanmayı önleyici bir gen olup, çok sayıda pleiotropik etkisi olan bir protein kodlamaktadır (Dërmaku-Sopjani ve ark 2013). Yaşam süresinin kısalmasının yanı sıra, fareler vasküler kalsifikasyon, artan ateroskleroz, osteoporoz, osteomalazi, hiperkalsemi, hiperfosfatemi ve cilt atrofisi gibi bir dizi tipik yaşlanma fenotipini sergilemişlerdir. Fareler üzerinde yapılan araştırmalar, KL genindeki hataların yaşam süresini kısalttığını, KL geninin aşırı ekspresyonunun ise ömrü %20-30 oranında uzattığını göstermiştir (Xu ve ark 2015). İnsan KL proteininin böbrek dokularında yoğun bir şekilde eksprese edildiği, ayrıca prostat, plasenta ve ince bağırsak dokularında da KL gen ekspresyonunun bulunduğu tespit edilmiştir. En son yapılan çalışmalar, KL'nin pankreasın β hücrelerinde de bulunduğunu, insülin salgılamasına yardımcı olduğunu ve tip II diyabet hastalığında β hücrelerine koruma sağladığını ortaya koymuştur (Y. Lin ve ark 2015).

KL geni, tek geçişli bir transmembran proteini kodlamakta ve bu proteinin küçük bir hücre içi alanı ve büyük bir hücre dışı alanı vardır. KL geni tarafından kodlanan mRNA'lar alternatif olarak işlenerek iki protein üretmektedir. Bunlardan biri membrana bağlı, diğeri ise salgılanan formdur. Membran KL (mKL), FGF-23 için ko-reseptör görevi yapmakta ve PO₄, Ca ve D vitamini metabolizmasını düzenlemektedir (Boksha ve ark 2017).

Bugüne kadar PO₄ toksisitesinin memeli yaşlanmasındaki kesin mekanizması net olarak belirlenmemiştir. Klotho^{-/-} farelerin NaPi2a'nın böbrek aktivitesini artırdığı gösterilmiştir. Bu nedenle PO₄ toksisitesinin ortaya çıktığı ve erken yaşlanma benzeri özelliklerin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir. Genetiđi değiştirilmiş NaPi2a/Klotho çift^{-/-} fareler, PO₄ toksisitesini azaltıp hayatta kalmalarını uzatmaktadır. PO₄ toksisitesi, çeşitli organ sistemleri üzerinde sitotoksik etkiler gösterebilmekte, fonksiyonel yeteneklerini tehlikeye atabilmekte ve disfonksiyonla sona erebilmektedir. Böylece, PO₄ homeostazını düzenleyen faktörlerin belirlenmesi, PO₄ homeostazının yanlış regülasyona bağlı hastalıkların (ve memeli yaşlanmasının) kontrolü için potansiyel bir terapötik araç sağlayabilmektedir. Buna bağlı olarak Klotho, PO₄ dengesinin önemli bir düzenleyicisidir (Dërmaku-Sopjani ve ark 2013).

FGF-23^{-/-} veya Klotho^{-/-} nakavt fareleri, dokuların şiddetli atrofisi de dahil olmak üzere erken yaşlanma ile birçok patofizyolojik süreç göstermektedir. FGF-23-Klotho tarafından başlatılan sinyal transdüksiyon yollarının proliferasyonu uyararak ve aşırı sistemik D

vitamininin neden olduğu apoptozu önleyerek doku atrofisini önlediği gösterilmiştir. FGF-23 veya Klotho'nun genetik olarak yok edilmesiyle aktif D vitamininin serum düzeyleri büyük oranda arttığından, bu moleküllerin hem 1α -hidroksilaz ekspresyonunun negatif düzenlenmesi hem de Kaspaz aktivitesinin fosfoinozimid-3 kinaz bağımlı inhibisyonu yoluyla D vitamininin apoptotik etkilerinin baskılanmasında ikili bir role sahip olduğu bulunmuştur. Bu veriler FGF-23 ve Klotho'nun fizyolojik rolleri hakkında yeni bilgiler sağlamaktadır (Medici ve ark 2008). KL'si yetersiz olan farelerin serumunda P, Ca ve 25-OH Kolekalsiferol seviyeleri normal farelere göre daha fazla iken, serum glukoz seviyeleri daha azdır (Tsujikawa ve ark 2003). Bizim çalışmamızda D vitamini hastalara verildikten üç ay sonra Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyeleri arttığı bulundu. Kontrol grubunda D vitamini eksikliği tedavi öncesi grupla karşılaştırıldığında Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyelerinde anlamlı bir artış bulundu. Ayrıca tedavi grubunda Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyelerinin değişimi tedavi öncesi gruba göre daha fazla artış göstermiştir. O artış istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulunmuştur. Bu nedenle D vitamini düzeylerinin artması Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyelerini etkilediğini göstermektedir. Tedavi grubu kontrol grubuna göre kıyasla istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda D vitamini düzeylerinin artması Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyelerini etkilediği nedenler şu şekilde açıklanabilir: D vitamini gen ekspresyonunu düzenleme yeteneği ile bilinmektedir. D vitamininin Klotho Geni Protein Aktivitesi seviyelerini artırarak Klotho protein üretiminin artmasına yol açtığı düşünölmektedir. Klotho, vücuttaki Ca ve PO_4 seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynayan bir proteindir. Klotho, böbrek sağlığında çok önemli bir rol oynamaktadır. D vitamini, böbrek fonksiyonlarının iyileştirilmesine yardımcı olmaktadır. Klotho eksikliği, renal hastalıklarla ilişkilidir. Bu nedenle D vitamini, genel sağlıktaki iyileşmeye tepki olarak Klotho üretiminin artmasına yol açabilmektedir. D vitamininin anti-inflamatuar etkisi vardır. İnflamasyonu azaltmak, Klotho ekspresyonunu artırmaya yardımcı olabilmektedir, çünkü kronik inflamasyon Klotho seviyelerini azaltabildiği görölmüştür. D vitamini verildiğinde bağırsaktan Ca ve PO_4 emiliminde artış gösterilmektedir. Klotho, bu minerallerin düzenlenmesinde rol oynayabilmekte, böylece düzenleme ihtiyacının artması durumunda düzeylerini yükseltebilmektedir. D vitamini, kemik sağlığını desteklemesinde rol oynayabilmektedir. Kemik sağlığı iyi oldukça, kemik sağlığını destekleme ve kemik hastalığı riskini azaltma yanıtının bir unsuru olarak Klotho seviyeleri artabilmektedir. D vitamini, tiroid ve paratiroid bezleri de dahil olmak üzere endokrin sistemini etkilemektedir. Bu etkiler, Klotho seviyelerinde

değişikliklere yol açabilmektedir. KL geni protein aktivitesinin metabolik yollara etkisi ve onlarla alakası, odaklanmaya gereken önemli genetik ve biyokimyasal faktörlerden biridir. Klotho, vücudun sağlıklı olup olmadığını gösteren önemli unsurlardan biri olarak sayılmaktadır. KL geni, birkaç metabolik yolların ortak buluşma noktası sayılmaktadır. Bu yolların hem KL geni ile hem de birbirleriyle detaylı ilişkileri daha bilgili ve net şekilde tam olarak anlaşılması için çok çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

miRNA'lar ortalama 22 nükleotit uzunluğunda küçük kodlamayan RNA'lardır. Çoğu miRNA, DNA dizilerinden primer miRNA'lara (pri-miRNA) transkribe edilmekte ve öncül miRNA'lara (pre-miRNA) ve olgun miRNA'lara dönüştürülmektedir. Çoğu durumda, miRNA'lar, hedef mRNA'ların 3'UTR'si ile etkileşime girerek ifadeyi baskılamaktadır (Ha ve ark 2014). Ancak, miRNA'ların 5'UTR, kodlama dizisi ve gen promotörleri gibi diğer bölgelerle dahil etkileşimi de bildirilmiştir (Broughton ve ark 2016). Ayrıca, miRNA'ların belirli koşullar altında gen ekspresyonunu aktive ettiği gösterilmiştir (Vasudevan, 2012). Son çalışmalar, miRNA'ların translasyon hızı ve transkripti kontrol etmek için farklı hücre içi bölmeler arasında dolaştığını öne sürmüştür (Makarova ve ark 2016). miRNA'lar normal hayvan gelişimi için kritiktir ve çeşitli biyolojik süreçlere dahil olurlar (Fu ve ark 2013). miRNA'ların anormal ekspresyonu, birçok hastalıkla ilişkilidir (Chakraborty, 2017). Ayrıca, miRNA'lar ekstrasellüler sıvılara salgılanmaktadır. Ekstrasellüler miRNA'lar, çeşitli hastalıklar için potansiyel biyobelirteçler olarak geniş çapta bildirilmiştir. Ayrıca, hücre-hücre iletişimini sağlamak için sinyal molekülleri olarak hizmet etmektedir (W. Huang, 2017). miRNA'ların sayısı çok fazla ve çeşitlidir, ayrıca birçok alt türü vardır. Bu sebeple güncel araştırmalar, çalışmalar ve makaleler incelenerek kapsamlı bir literatür taraması gerçekleştirilmiş ve çalışmamızda miRNA 22'ye yer verilmiştir.

MicroRNA-22 (miRNA 22), yüksek derecede korunmuş bir 22-nt miRNA'dır. İnsan hastalıklarındaki ve normal fizyolojideki rolleri ortaya çıkmaya yeni başlamaktadır. 20 insan normal dokularında (beyin, akciğer, karaciğer, kalp, böbrek, dalak, düz kas, mesane, prostat, testis, over, özofagus, serviks, trakea, timus, plasenta, düz bağırsak, kolon, tiroid ve yağ dokusu) miRNA 22'nin yaygın olarak eksprese edildiği bulunmuştur. miRNA 22 ekspresyonunun kalp, düz kas, mesane ve yağ dokusunda daha yüksek olduğu görülmüştür (Yamakuchi ve ark 2011). Son zamanlarda, miRNA 22'nin tümör oluşumu, epigenetik modifikasyon, embriyonik gelişim, iskelet metabolizması, panik bozukluk ve kardiyomiyosit hipertrofisi gibi birçok aktiviteye bağlandığı görülmüştür. miRNA 22'nin aşırı ekspresyonu, çeşitli insan hastalıklarında

belirlenmiştir. Birçok çalışma miRNA 22'nin çeşitli insan hastalıklarının önlenmesi ve tedavisinde potansiyel bir araç olarak kullanılabilceğini açıklamıştır (Xiong, 2012). miRNA 22'nin metabolik ve immün etkilere sahip metabolitler tarafından indüklendiği belirtilmiştir. Bunlar retinoik asitler, safra asitleri, vitamin D ve kısa zincirli yağ asitleridir (Y. Hu ve ark 2023). miRNA 22'nin biyobelirteçleri olarak kullanılması, gelecekteki ilaçların geliştirilmesi, belirli biyolojik değişikliklerle bazı hastalıklarla ilişkili farklılıkların açıklanması ve bazı hastalıkların tanısında rol oynayabilir. Bu nedenle miRNA 22'nin etkileri, fonksiyonları ve diğer biyolojik faktörlerle ilişkisini incelemek çok önemli düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda vitamin D'nin seviyeleri yükselirken miRNA 22'nin nasıl etkilendiği incelenmiştir.

Bir çalışmada miRNA 22, insan kolon kanseri hücrelerinde 1,25 (OH)₂D₃'ün hedefi olduğunu bulunmuştur. Ayrıca hücre proliferasyonu ve migrasyonu üzerindeki inhibitör etkisinin bir kısmından sorumlu olduğu bulunmuştur. miRNA 22'nin, RNA düzeyinde, OGN, NELL2, HNRPH1, RERE ve NFAT5 gibi birkaç genin 1,25 (OH)₂D₃ tarafından baskılanmasını aracılık ettiği bulunmuştur. 50 insan kolon kanseri hastasının 39'unda (%78), tümördeki miRNA 22 ekspresyonu, normal dokudan daha düşük bulunmuştur. Dikkat çekici bir şekilde, miRNA 22, zaman-, doz- ve VDR-bağımlı bir şekilde 1,25 (OH)₂D₃ tarafından indüklenmektedir. miRNA 22, post-transkripsiyonel düzeyde gen ekspresyonunu modüle edici aktivitesi aracılığıyla 1,25 (OH)₂D₃'ün yeni bir hedefi olarak belirlenmiştir (Alvarez-Díaz ve ark 2012). Anti-miRNA 22 ekspresyonu, birkaç hedef genin RNA seviyelerinin 1,25 (OH)₂D₃ tarafından düzenlenmesini ortadan kaldırmaktadır. Önemli olarak, miRNA 22 kolon tümörlerinin yüksek bir oranında aşağı düzenlenmektedir. miRNA 22'nin ekspresyonu doğrudan VDR'nin ekspresyonuyla ilişkilidir. Birlikte, miRNA 22, 1,25 (OH)₂D₃'ün bir hedefidir ve birçok hastalığa karşı koruyucu etkisini kısmen aracılık etmektedir (Erfan ve ark 2022). Son zamanlarda yapılan bir çalışmada multipl skleroz (MS) hastalarındaki miRNA 22 seviyesi, önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Ayrıca, miRNA 22 seviyesi ile vitamin D reseptörü VDR seviyeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir pozitif korelasyon bulunduğunu gözlemlenmiştir (Khedr ve ark 2022). Bizim çalışmamızda tedavi sonrası grubunda miRNA 22 gen ekspresyonu seviyesi, tedavi öncesi grubuna göre kıyasla bir artış bulundu. O artış istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulundu. Ayrıca tedavi sonrası grubunda miRNA 22 gen ekspresyonu seviyesi kontrol grubuna göre kıyasla artış bulundu. Bu artış istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulundu. Diğer taraftan tedavi öncesi grubu miRNA 22 gen ekspresyonu seviyesi sağlıklı kişilere göre kıyasla istatistiksel olarak incelenirken anlamlı bulunmadı. Bu nedenle D vitamini düzeylerinin artması, miRNA 22

ekspresyonunun seviyelerini artırdığını göstermektedir. D vitamini, DNA'nın belirli bölgeleriyle etkileşime giren D vitamini reseptörleri (VDR) aracılığıyla gen ekspresyonunu etkileyebilmektedir. Bu etkileşimler, miRNA'ların inflamatuvar yanıt ve metabolizma ile ilişkili genlerin düzenlenmesinde rol oynaması nedeniyle, miRNA 22 ekspresyonunun artmasına yol açabilmiştir. Bu nedenle D vitamini uygulamasının hormonal dengeyi iyileştirmeye yönelik vücudun yanıtının bir faktörü olarak miRNA 22 ekspresyonunu artırabileceği düşünülmektedir. Birçok araştırmada, D vitamininin anti-inflamatuvar etkilere sahip olduğu ve vücudun inflamasyonu azaltma mekanizmasının bir parçası olarak miRNA 22 seviyelerinin artmasına yol açabileceği belirtilmektedir. miRNA 22, inflamatuvar yanıtı düzenlemedeki rolü ile bilinmekte ve artışı kronik enfeksiyonları azaltmaya yardımcı olabilmektedir. Bu nedenle D vitamini verilmesi, vücudun inflamasyonu iyileştirmeye yönelik yanıtını yansıtan miRNA 22'de bir artışa neden olabilmektedir.

Bizim çalışmamızın tarzında yapılan bir çalışmada miRNA'lar incelenmiştir. Başlangıçta serum 25-hidroksivitamin D ve miR-532-3p ekspresyonu arasında pozitif anlamlı bir korelasyon bulunmuştur. MiRNA 221'in başlangıçtan 12 aya kadar olan ekspresyonundaki değişiklik, D vitamini ve plasebo grubu arasında da önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bu değişiklik nedeni esas olarak plasebo grubuna atfedilmiştir. Bu çalışmada özet olarak D vitamini suplementasyonunun plazmadaki miRNA ekspresyon profili üzerindeki önemli bir etkisi görülmemiştir (Jorde ve ark 2012). Böylece D vitamini, tüm miRNA'larına değil, spesifik olarak etkisini göstermiştir. Bizim çalışmamızda miRNA 22 ekspresyonunun D vitamini ile etkilendiği görülmüştür. D vitamini, miRNA 22 ekspresyonunun seviyesini yükselttiği bulunmuştur. D vitamini reseptörleri (VDR), miRNA'ların düzenlenmesinde rol oynayabilir. D vitamini, bazı hücre içi sinyal yollarını aktive etmektedir. Böylece miRNA 22'nin transkripsiyonunu artırmasında bir rolü olabilir.

Y. Hu ve arkadaşlarının çalışmasına göre miRNA 22 seviyeleri, insan ve fare yağlı karaciğerlerinde FGF21, FGFR1 ve PGC1a ile ters orantılı bulunmuştur. Bu da hepatik miRNA 22'nin bir metabolik inhibitör olarak hareket ettiğini düşündürmektedir. miR-22'nin, FGFR1'i doğrudan hedefleyerek baskıladığı ve aynı zamanda PPAR α ile PGC1 α 'nın FGF21 promotör bölgesindeki bağlanma motiflerine recruit'ini (bağlanmasını) azaltarak FGF21 ekspresyonunu düşürdüğü tespit edilmiştir. Buna karşılık, bir miRNA 22 inhibitörü, hepatik FGF21 ve FGFR1'i artırmakta, bu da AMPK ve ERK1/2 aktivasyonuna yol açmaktadır. miRNA 22, FGF21 ve FGFR1'in metabolik stimülatörler tarafından senkron indüksiyonunu koruyabilmekte ve

ERK1/2 aktivasyonunu kısıtlayabilmektedir (Y. Hu ve ark 2020). Birçok kanıt, FGF-23'ün direkt etkilerle, MAPK kaskadı aracılığıyla paratiroid bezine PTH hormonunun ekspresyonunu baskıladığını öne sürmektedir. FGF-23/Klotho/FGFR1c, ERK1/2 kaskadını indükler ve FGF-23/FGFR3,4, kalsineurin/NFAT sinyal yolunu kullandığında Klotho'dan bağımsızdır; bu da PTH sentezi ve salgılanmasının inhibisyonuna yol açmaktadır (Silver ve ark 2010a). Bizim çalışmamızda FGF-23'ün serum düzeyinin, D vitamini seviyesinin yükselmesinden sonra azaldığını gördük. Bunun nedeni miRNA 22'nin FGFR1'i direkt olarak hedefleyerek azaltması olabilir. Sonucunda, artan miRNA 22 seviyelerinin FGF-23 ekspresyonunu azaltabileceğini bulduk. Bu etki, artmış D vitamini ile ilişkili olabilir, çünkü birkaç araştırmada artmış D vitamini, miRNA 22 ekspresyonunu artırabileceğini bulmuştur; bu da daha düşük FGF-23 seviyelerine yol açabilmektedir. miRNA 22 ekspresyonunun seviyesinin yükselmesinin nedeni daha net ve spesifik olarak açıklanması için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1. Sonuç

KL geni protein aktivitesinin metabolik yollara etkisi ve bunlarla ilişkisi odaklanması gereken önemli genetik ve biyokimyasal faktörlerden biridir. KL geni birkaç metabolik yolların ortak buluşma noktası sayılmaktadır. Bu yolların hem KL geni ile hem de birbirleri ile detaylı alakaları daha bilgili ve net şekilde tam olarak anlaşılması için çok çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. miRNA'lar da gen ekspresyonunu düzenleyen, çok hastalıklara bağlayan ve önemli patolojik biyobelirteçlerinden biridir. Ayrıca fibroblast büyüme faktörü 23'ün rolleri ve diğer metabolik faktörler ile ilişkisi özellikle biyokimya bakımından çok önemli olduğu görülmektedir.

Çalışmamızın analizi sonucunda, D vitamini eksikliği olan hastalara D vitamini verildikten sonra klotho geni protein aktivitesi, miRNA 22 gen ekspresyonu, fosfat ve kalsiyum düzeyleri arttığı ve FGF-23 düzeyleri azaldığı bulundu. Tedavi sonrası grubu tedavi öncesine kıyasla tüm incelenen parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Tedavi grubta kontrol grubuna göre miRNA 22 gen ekspresyonu arttığını ve FGF-23 düzeyleri azaldığını görüldü. miRNA 22 gen ekspresyonundaki artış ve FGF-23 düzeylerindeki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

6.2. Öneriler

D vitamininin klotho geni protein aktivitesi, miRNA 22 gen ekspresyonu, Ca ve PO₄ düzeylerini artırma FGF-23 düzeylerini ise azaltma potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Elde edilen bulgular, bu parametrelerin D vitamini ile birlikte hastaların klinik değerlendirmesinde biyobelirteç olarak kullanılabilmesi için bir öneri niteliği taşımaktadır. Bu parametrelerin D vitamini tedavisiyle normal değerlere ulaşma mekanizmalarının ve aralarındaki etkileşimlerin daha iyi anlaşılması için ileri düzey çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N 6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. *Nature*, *519* (7544), 482–485.
- Albayrak, İ. G. (2022). miRNA'lar: Biyogenezi, Analiz Yöntemleri ve Biyobelirteç Potansiyeli. *Van Sağlık Bilimleri Dergisi*, *15* (1), 95–102.
- Alvarez-Díaz, S., Valle, N., Ferrer-Mayorga, G., Lombardía, L., Herrera, M., Domínguez, et. al (2012). MicroRNA-22 is induced by vitamin D and contributes to its antiproliferative, antimigratory and gene regulatory effects in colon cancer cells. *Human Molecular Genetics*, *21* (10), 2157–2165. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds031>
- Amrein, K., Scherkl, M., Hoffmann, M., Neuwersch-Sommeregger, S., Köstenberger, M., et. al (2020). Vitamin D deficiency 2.0: an update on the current status worldwide. *European Journal of Clinical Nutrition*, *74* (11), 1498–1513.
- Amrein, K., & Venkatesh, B. (2012). Vitamin D and the critically ill patient. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 15, Issue 2, pp. 188–193). <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32834f0027>
- Andrukhova, O., Slavic, S., Smorodchenko, A., Zeitz, U., Shalhoub, V., et. al (2014). FGF 23 regulates renal sodium handling and blood pressure. *EMBO Molecular Medicine*, *6* (6), 744–759.
- Arking, D. E., Krebsova, A., Macek Sr, M., Macek Jr, M., Arking, A., et. al I. (2002). Association of human aging with a functional variant of klotho. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99* (2), 856–861.
- Bär, L., Stournaras, C., Lang, F., & Föller, M. (2019). Regulation of fibroblast growth factor 23 (FGF 23) in health and disease. *FEBS Letters*, *593* (15), 1879–1900.
- Bartel, D. P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, *136* (2), 215–233.
- Beckett, E. L., Yates, Z., Veysey, M., Duesing, K., & Lucock, M. (2014). The role of vitamins and minerals in modulating the expression of microRNA. *Nutrition Research Reviews*, *27* (1), 94–106. <https://doi.org/10.1017/S0954422414000043>
- Bellavia, D., Costa, V., de Luca, A., Maglio, M., Pagani, S., et. al (2016). Vitamin D Level Between Calcium-Phosphorus Homeostasis and Immune System: New Perspective in Osteoporosis. *Current Osteoporosis Reports*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11914-016-0331-2>
- Bian, A., Neyra, J. A., Zhan, M., & Hu, M. C. (2015). Klotho, stem cells, and aging. In *Clinical Interventions in Aging* (Vol. 10, pp. 1233–1243). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CIA.S84978>
- Boksha, I. S., Prokhorova, T. A., Savushkina, O. K., & Tereshkina, E. B. (2017). Klotho protein: Its role in aging and central nervous system pathology. In *Biochemistry (Moscow)* (Vol. 82, Issue 9, pp. 990–1005). Maik Nauka Publishing / Springer SBM. <https://doi.org/10.1134/S0006297917090024>
- Börekçi, N. Ö. (2019). D vitamini eksikliği ile ilgili güncel bilgiler. *The Journal of Turkish Family Physician*, *10* (1), 35–42.
- Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., & Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the seed supports microRNA targeting specificity. *Molecular Cell*, *64* (2), 320–333.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., et. al (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99* (24), 15524–15529.

- Carrillo-López, N., Panizo, S., Alonso-Montes, C., Román-García, P., Rodríguez, I., et. al (2016). Direct inhibition of osteoblastic Wnt pathway by fibroblast growth factor 23 contributes to bone loss in chronic kidney disease. *Kidney International*, 90 (1), 77–89.
- Chakraborty, S. (2017). *Interplay between miRNA and human diseases*.
- Chang, T.-C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., et. al. (2007a). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell*, 26 (5), 745–752.
- Chang, T.-C., Wentzel, E. A., Kent, O. A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K. H., et. al (2007b). Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Molecular Cell*, 26 (5), 745–752.
- Château, M.-T., Araiz, C., Descamps, S., & Galas, S. (2010). Klotho interferes with a novel FGF-signalling pathway and insulin/Igf-like signalling to improve longevity and stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Aging (Albany NY)*, 2 (9), 567.
- Cigerli, O., Parildar, H., Unal, A. D., Tarcin, O., Erdal, R., & Demirag, N. G. (2013). Vitamin D deficiency is a problem for adult out-patients? A university hospital sample in Istanbul, Turkey. *Public Health Nutrition*, 16 (7), 1306–1313.
- Coulson, J. M. (2005). Transcriptional regulation: cancer, neurons and the REST. *Current Biology*, 15 (17), R665–R668.
- Damasiewicz, M. J., Lu, Z. X., Kerr, P. G., & Polkinghorne, K. R. (2018). The stability and variability of serum and plasma fibroblast growth factor-23 levels in a haemodialysis cohort. *BMC Nephrology*, 19 (1), 1–7.
- Dastghaib, S., Koohpeyma, F., Shams, M., Saki, F., & Alizadeh, A. (2023). New concepts in regulation and function of the FGF23. In *Clinical and Experimental Medicine* (Vol. 23, Issue 4, pp. 1055–1066). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00844-x>
- de Oliveira, R. M. (2006). Klotho RNAi induces premature senescence of human cells via a p53/p21 dependent pathway. *FEBS Letters*, 580 (24), 5753–5758.
- Delecroix, C., Brauner, R., & Souberbielle, J.-C. (2018). Vitamin D in children with growth hormone deficiency due to pituitary stalk interruption syndrome. *BMC Pediatrics*, 18 (1), 1–7.
- Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F., & Hannon, G. J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432 (7014), 231–235.
- Dërmaku-Sopjani, M., Kolgeci, S., Abazi, S., & Sopjani, M. (2013). Significance of the anti-aging protein Klotho. *Molecular Membrane Biology*, 30 (8), 369–385.
- El Ouaamari, A., Baroukh, N., Martens, G. A., Lebrun, P., Pipeleers, D., et. al (2008). miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic β -cells. *Diabetes*, 57 (10), 2708–2717.
- El-Maouche, D., Dumitrescu, C. E., Andreopoulou, P., Gafni, R. I., Brillante, B. A., et. al (2016). Stability and degradation of fibroblast growth factor 23 (FGF23): the effect of time and temperature and assay type. *Osteoporosis International*, 27, 2345–2353.
- Erfan, R., & Morcos, G. (n.d.). *Effect of vitamin D on Expression of microRNA-22 and microRNA-125b in Behcet Disease*. <https://www.researchgate.net/publication/355041617>
- Fu, G., Brkić, J., Hayder, H., & Peng, C. (2013). MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (3), 5519–5544.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15 (8), 509–524.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., & Kim, V. N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, *18* (24), 3016–3027.
- Han, X., Cai, C., Xiao, Z., & Quarles, L. D. (2020). FGF23 induced left ventricular hypertrophy mediated by FGFR4 signaling in the myocardium is attenuated by soluble Klotho in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, *138*, 66–74.
- Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MicroRNAs: crucial regulators of placental development. *Reproduction*, *155* (6), R259–R271.
- Hekimsoy, Z., Dinç, G., Kafesçiler, S., Onur, E., Güvenç, Y., Pala, T., et. al (2010a). Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. *BMC Public Health*, *10*, 1–7.
- Hekimsoy, Z., Dinç, G., Kafesçiler, S., Onur, E., Güvenç, Y., Pala, T., et. al (2010b). Vitamin D status among adults in the Aegean region of Turkey. *BMC Public Health*, *10*, 1–7.
- Holick, M. F. (2006a). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation*, *116* (8), 2062–2072.
- Holick, M. F. (2006b). Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *The Journal of Clinical Investigation*, *116* (8), 2062–2072.
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New England Journal of Medicine*, *357* (3), 266–281.
- Hu, M. C., Shiizaki, K., Kuro-O, M., & Moe, O. W. (2013). Fibroblast growth factor 23 and klotho: Physiology and pathophysiology of an endocrine network of mineral metabolism. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 75, pp. 503–533). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183727>
- Hu, Y., Liu, H. X., Jena, P. K., Sheng, L., Ali, M. R., et. al (2020). miRNA 22 inhibition reduces hepatic steatosis via FGF21 and FGFR1 induction. *JHEP Reports*, *2* (2). <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2020.100093>
- Hu, Y., Setayesh, T., Vaziri, F., Wu, X., Hwang, S. T., Chen, X., et. al (2023). miRNA 22 gene therapy treats HCC by promoting anti-tumor immunity and enhancing metabolism. *Molecular Therapy*, *31* (6), 1829–1845. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2023.04.019>
- Huang, W. (2017). MicroRNAs: biomarkers, diagnostics, and therapeutics. *Bioinformatics in MicroRNA Research*, 57–67.
- Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M., et. al (2011). Biological functions of microRNAs: A review. In *Journal of Physiology and Biochemistry* (Vol. 67, Issue 1, pp. 129–139). <https://doi.org/10.1007/s13105-010-0050-6>
- Ikushima, M., Rakugi, H., Ishikawa, K., Maekawa, Y., Yamamoto, et. al (2006). Anti-apoptotic and anti-senescence effects of Klotho on vascular endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *339* (3), 827–832.
- Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P., & Tsezou, A. (2008). Integrative microRNA and proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative metabolic and inflammatory networks. *PloS One*, *3* (11), e3740.
- Imai, M., Ishikawa, K., Matsukawa, N., Kida, I., Ohta, J., Ikushima, M., et. al (2004). Klotho protein activates the PKC pathway in the kidney and testis and suppresses 25-hydroxyvitamin D 3 1 α -hydroxylase gene expression. *Endocrine*, *25*, 229–234.
- Ji, J., Shi, J., Budhu, A., Yu, Z., Forgues, M., Roessler, S., Ambs, S., Chen, Y., et. al (2009). MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *New England Journal of Medicine*, *361* (15), 1437–1447.
- Jiang, Z., Pu, R., Li, N., Chen, C., Li, J., Dai, W., et. al (2023). High prevalence of vitamin D deficiency in Asia: A systematic review and meta-analysis. In *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (Vol. 63, Issue 19, pp. 3602–3611). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1990850>

- Joglekar, M. V., Joglekar, V. M., & Hardikar, A. A. (2009). Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expression Patterns*, 9 (2), 109–113.
- Johnnidis, J. B., Harris, M. H., Wheeler, R. T., Stehling-Sun, S., Lam, M. H., Kirak, et. al (2008). Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 451 (7182), 1125–1129.
- Jorde, R., Svartberg, J., Joakimsen, R. M., & Coucheron, D. H. (2012). Plasma profile of microRNA after supplementation with high doses of vitamin D 3 for 12months. *BMC Research Notes*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-245>
- Khedr, A., Shaker, O. G., Hassan, A., Hussein, M., Kamal, Y. S., & Azouz, T. A. (2022). MicroRNA-22 Level in Patients with Multiple Sclerosis and Its Relationship with Vitamin D and Vitamin D Receptor Levels. *Neuroimmunomodulation*, 29 (2), 128–134.
- Kidd, P. M. (2010). Vitamins D and K as pleiotropic nutrients: clinical importance to the skeletal and cardiovascular systems and preliminary evidence for synergy. *Altern Med Rev*, 15 (3), 199–222.
- Kuro-o, M. (2019). Klotho and endocrine fibroblast growth factors: markers of chronic kidney disease progression and cardiovascular complications? *Nephrology Dialysis Transplantation*, 34 (1), 15–21.
- Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., Utsugi, T., et. al (1997). Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature*, 390 (6655), 45–51.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294 (5543), 853–858.
- Lecellier, C.-H., Dunoyer, P., Arar, K., Lehmann-Che, J., Eyquem, S., Himber, et. al (2005). A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 308 (5721), 557–560.
- Lerch, C., Shroff, R., Wan, M., Rees, L., Aitkenhead, H., Bulut, I. K., Thurn, et. al (2018). Effects of nutritional Vitamin D supplementation on markers of bone and mineral metabolism in children with chronic kidney disease. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 33 (12), 2208–2217. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfy012>
- Lin, K. W. (2018). Vitamin D screening and supplementation in primary care: time to curb our enthusiasm. *American Family Physician*, 97 (4), 226–227.
- Lin, Y., & Sun, Z. (2015). In vivo pancreatic β -cell-specific expression of antiaging gene Klotho: a novel approach for preserving β -cells in type 2 diabetes. *Diabetes*, 64 (4), 1444–1458.
- Liu, H., Fergusson, M. M., Castilho, R. M., Liu, J., Cao, L., Chen, J., Malide, et. al (2007). Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science*, 317 (5839), 803–806.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25 (4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Knyazev, P., Diebold, J., & Hermeking, H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7 (16), 2591–2600.
- Mace, M. L., Gravesen, E., Hofman-Bang, J., Olgaard, K., & Lewin, E. (2015). Key role of the kidney in the regulation of fibroblast growth factor 23. *Kidney International*, 88 (6), 1304–1313.
- Makarova, J. A., Shkurnikov, M. U., Wicklein, D., Lange, T., Samatov, T. R., et. al (2016). Intracellular and extracellular microRNA: An update on localization and biological role. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 51 (3–4), 33–49.
- Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Fierro, F., Vanoye-Carlo, A., Rufino-González, Y., et. al (2016). Stem-loop RT-qPCR as an efficient tool for the detection and quantification of small RNAs in *Giardia lamblia*. *Genes*, 7 (12). <https://doi.org/10.3390/genes7120131>

- McKenna, M. J. (1992). Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *The American Journal of Medicine*, 93 (1), 69–77.
- Medici, D., Razzaque, M. S., DeLuca, S., Rector, T. L., Hou, B., Kang, K., et. al (2008). FGF-23–Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D–induced apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 182 (3), 459–465.
- Medici, D., Razzaque, M. S., DeLuca, S., Rector, T. L., Hou, B., Kang, K., et. al (2008). FGF-23 - Klotho signaling stimulates proliferation and prevents vitamin D-induced apoptosis. *Journal of Cell Biology*, 182 (3), 459–465. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803024>
- Meijer, H. A., Smith, E. M., & Bushell, M. (2014). Regulation of miRNA strand selection: follow the leader? *Biochemical Society Transactions*, 42 (4), 1135–1140.
- Melton, C., Judson, R. L., & Blueloch, R. (2010). Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 463 (7281), 621–626.
- Munshi, R., Hussein, M. H., Toraih, E. A., Elshazli, R. M., Jardak, C., et. al (2021). Vitamin D insufficiency as a potential culprit in critical COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93 (2), 733–740.
- Murali, S. K., Roschger, P., Zeitz, U., Klaushofer, K., Andrukhova, O., et. al (2016a). FGF23 regulates bone mineralization in a 1, 25 (OH) 2D3 and klotho-independent manner. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31 (1), 129–142.
- Murali, S. K., Roschger, P., Zeitz, U., Klaushofer, K., Andrukhova, O., & Erben, R. G. (2016b). FGF23 regulates bone mineralization in a 1, 25 (OH) 2D3 and klotho-independent manner. *Journal of Bone and Mineral Research*, 31 (1), 129–142.
- Murshed, M., Harmey, D., Millán, J. L., McKee, M. D., & Karsenty, G. (2005). Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. *Genes & Development*, 19 (9), 1093–1104.
- Nabeshima, Y. (2006). Toward a better understanding of Klotho. In *Science of Aging Knowledge Environment* (Vol. 2006, Issue 8, pp. pe11–pe11). American Association for the Advancement of Science.
- O’Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- O’Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., Boldin, M. P., Taganov, K. D., Nicoll, J., et. al (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *The Journal of Experimental Medicine*, 205 (3), 585–594.
- O’Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G., & Baltimore, D. (2007). MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104 (5), 1604–1609.
- Oğuz, S., Çamcı, G., Arpacıoğlu, Y., Şeker, M., Erbek, H., & Yurtdaş, M. (2019). Bir aile sağlığı merkezine başvuran bireylerin obezite durumunun belirlenmesi. *JAREN*, 5 (1), 10–16.
- Pedersen, I. M., Cheng, G., Wieland, S., Volinia, S., Croce, C. M., et. al (2007). Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*, 449 (7164), 919–922.
- Pereira, R. C., Salusky, I. B., Bowen, R. E., Freymiller, E. G., & Wesseling-Perry, K. (2019). Vitamin D sterols increase FGF23 expression by stimulating osteoblast and osteocyte maturation in CKD bone. *Bone*, 127, 626–634. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2019.07.026>
- Perwad, F., Zhang, M. Y. H., Tenenhouse, H. S., & Portale, A. A. (2007a). Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293 (5), F1577–F1583.

- Perwad, F., Zhang, M. Y. H., Tenenhouse, H. S., & Portale, A. A. (2007b). Fibroblast growth factor 23 impairs phosphorus and vitamin D metabolism in vivo and suppresses 25-hydroxyvitamin D-1 α -hydroxylase expression in vitro. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293 (5), F1577–F1583.
- Pham, H., Waterhouse, M., Baxter, C., Romero, B. D., McLeod, D. S. A., et. al (2021). The effect of vitamin D supplementation on acute respiratory tract infection in older Australian adults: an analysis of data from the D-Health Trial. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 9 (2), 69–81.
- Razzaque, M. S. (2022). Interactions between FGF23 and vitamin D. In *Endocrine Connections* (Vol. 11, Issue 10). BioScientifica Ltd. <https://doi.org/10.1530/EC-22-0239>
- Rhee, Y., Bivi, N., Farrow, E., Lezcano, V., Plotkin, L. I., et. al (2011). Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 in vitro and in vivo. *Bone*, 49 (4), 636–643.
- Ritter, C. S., Ambrecht, H. J., Slatopolsky, E., & Brown, A. J. (2006). 25-Hydroxyvitamin D3 suppresses PTH synthesis and secretion by bovine parathyroid cells. *Kidney International*, 70 (4), 654–659.
- Ross, A. C., Manson, J. E., Abrams, S. A., Aloia, J. F., Brannon, P. M., et. al (2011). The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 96 (1), 53–58.
- Ross, A. C., Taylor, C. L., Yaktine, A. L., & Del Valle, H. B. (2011). Committee to review dietary reference intakes for vitamin D and calcium. *Food and Nutrition Board*.
- Saki, F., Omrani, G. R., & Koohpeyma, F. (2019). *Investigating the effect of paricalcitol on serum FGF23 in vitamin D deficient rats*.
- Segersten, U., Correa, P., Hewison, M., Hellman, P., Dralle, H., et. al (2002). 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase expression in normal and pathological parathyroid glands. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87 (6), 2967–2972.
- Semba, R. D., Cappola, A. R., Sun, K., Bandinelli, S., Dalal, M., et. al (2011). Plasma klotho and mortality risk in older community-dwelling adults. *Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences*, 66 (7), 794–800.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., et. al (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5, 1–11.
- Shenouda, S. K., & Alahari, S. K. (2009). MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer and Metastasis Reviews*, 28, 369–378.
- Shi, Y., & Jin, Y. (2009). MicroRNA in cell differentiation and development. *Science in China Series C: Life Sciences*, 52 (3), 205–211.
- Silver, J., & Naveh-Manly, T. (2010a). FGF23 and the parathyroid glands. *Pediatric Nephrology*, 25, 2241–2245.
- Silver, J., & Naveh-Manly, T. (2010b). FGF23 and the parathyroid glands. In *Pediatric Nephrology* (Vol. 25, Issue 11, pp. 2241–2245). <https://doi.org/10.1007/s00467-010-1565-3>
- Sitara, D., Kim, S., Razzaque, M. S., Bergwitz, C., Taguchi, T., et. al (2008). Genetic evidence of serum phosphate-independent functions of FGF-23 on bone. *PLoS Genetics*, 4 (8), e1000154.
- Smirnova, L., Gräfe, A., Seiler, A., Schumacher, S., Nitsch, R., et. al (2005). Regulation of miRNA expression during neural cell specification. *European Journal of Neuroscience*, 21 (6), 1469–1477.
- Smith, E. R., Holt, S. G., & Hewitson, T. D. (2019). α Klotho–FGF23 interactions and their role in kidney disease: a molecular insight. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 76 (23), 4705–4724.

- Smith, E. R., McMahon, L. P., & Holt, S. G. (2014). Fibroblast growth factor 23. *Annals of Clinical Biochemistry*, *51* (2), 203–227.
- Sonkoly, E., Wei, T., Janson, P. C. J., Sääf, A., Lundeberg, L., et al (2007). MicroRNAs: novel regulators involved in the pathogenesis of psoriasis? *PloS One*, *2* (7), e610.
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M., & Ganem, D. (2005). SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, *435* (7042), 682–686.
- Tagliabracci, V. S., Engel, J. L., Wiley, S. E., Xiao, J., Gonzalez, D. J., Nidumanda Appaiah, H., Koller, A., Nizet, V., White, K. E., & Dixon, J. E. (2014). Dynamic regulation of FGF23 by Fam20C phosphorylation, GalNAc-T3 glycosylation, and furin proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111* (15), 5520–5525.
- Tang, R., Lu, Y., Yin, R., Zhu, P., Zhu, L., et al (2021). The Effects of Storage Time and Repeated Freeze–Thaw Cycles on Intact Fibroblast Growth Factor 23 Levels. *Biopreservation and Biobanking*, *19* (1), 48–52.
- Tang, Y., Luo, X., Cui, H., Ni, X., Yuan, M., et al (2009). MicroRNA-146a contributes to abnormal activation of the type I interferon pathway in human lupus by targeting the key signaling proteins. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, *60* (4), 1065–1075.
- Thibonnier, M., Esau, C., Ghosh, S., Wargent, E., & Stocker, C. (2020). Metabolic and energetic benefits of microRNA-22 inhibition. *BMJ Open Diabetes Research & Care*, *8* (1). <https://doi.org/10.1136/bmjdr-2020-001478>
- Torres, P.-U., Prie, D., Molina-Bletry, V., Beck, L., Silve, C., et al (2007). Klotho: an antiaging protein involved in mineral and vitamin D metabolism. *Kidney International*, *71* (8), 730–737.
- Triboulet, R., Mari, B., Lin, Y.-L., Chable-Bessia, C., Bennasser, et al (2007). Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science*, *315* (5818), 1579–1582.
- Tsujikawa, H., Kurotaki, Y., Fujimori, T., Fukuda, K., & Nabeshima, Y.-I. (2003). Klotho, a gene related to a syndrome resembling human premature aging, functions in a negative regulatory circuit of vitamin D endocrine system. *Molecular Endocrinology*, *17* (12), 2393–2403.
- van Ballegooijen, A. J., Rhee, E. P., Elmariah, S., de Boer, I. H., et al (2016). Renal clearance of mineral metabolism biomarkers. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, *27* (2), 392.
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, *3* (3), 311–330.
- Wacker, M., & Holiack, M. F. (2013). Vitamin D-effects on skeletal and extraskeletal health and the need for supplementation. In *Nutrients* (Vol. 5, Issue 1, pp. 111–148). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu5010111>
- Wang, Y., & Sun, Z. (2009). Current understanding of klotho. In *Ageing Research Reviews* (Vol. 8, Issue 1, pp. 43–51). <https://doi.org/10.1016/j.arr.2008.10.002>
- Williams, A. E. (2008). Functional aspects of animal microRNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *65*, 545–562.
- Wu, H., Neilson, J. R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., et al (2007). miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells. *PloS One*, *2* (10), e1020.
- Xiao, C., & Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, *136* (1), 26–36.
- Xiong, J. (2012). Emerging Roles of MicroRNA-22 in Human Disease and Normal Physiology. In *Current Molecular Medicine* (Vol. 12).

- Xu, Y., & Sun, Z. (2015). Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. *Endocrine Reviews*, *36* (2), 174–193.
- Yamada, S., & Giachelli, C. M. (2017). Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho. *Bone*, *100*, 87–93.
- Yamakuchi, M., Yagi, S., Ito, T., & Lowenstein, C. J. (2011). MicroRNA-22 regulates hypoxia signaling in colon cancer cells. *PLoS One*, *6* (5), e20291.
- Yamashita, H., Yamashita, T., Miyamoto, M., Shigematsu, T., Kazama, J. J., et. al (2004). Fibroblast growth factor (FGF)-23 in patients with primary hyperparathyroidism. *European Journal of Endocrinology*, *151* (1), 55–60.
- Yang, J., Matsukawa, N., Rakugi, H., Imai, M., Kida, I., et. al (2003). Upregulation of cAMP is a new functional signal pathway of Klotho in endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *301* (2), 424–429.
- Yang, Y., Xu, S., Xia, L., Wang, J., Wen, S. et. al (2009). The bantam microRNA is associated with drosophila fragile X mental retardation protein and regulates the fate of germline stem cells. *PLoS Genetics*, *5* (4), e1000444.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., et. al (2010). ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nature Structural & Molecular Biology*, *17* (1), 17–23.
- Zhang, H., Kolb, F. A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., & Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, *118* (1), 57–68.
- Zittermann, A., Trummer, C., Theiler-Schwetz, V., Lerchbaum, E., März, W. et. al (2021). Vitamin D and cardiovascular disease: an updated narrative review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22* (6), 2896.

8. EKLER

8.1. EK 1 Etik kurul kararı

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

| | |
|----------------------|--------------------------------|
| Toplantı Sayısı: 173 | Toplantı Tarihi: 07 Nisan 2023 |
|----------------------|--------------------------------|

Karar Sayısı:2023/4266: (13524) N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'in "D3 Vitamini Tedavisi Alan Kişilerde Klotho Geni Protein Aktivitesinin (Fibroblast Büyüme Faktörü 23, Kalsiyum ve Posfat Düzeyleri ile) MiRNA 22 Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı doktora tez çalışması ile ilgili 22.03.2023 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü. Doktora öğrencisi Abdulrahman TATTAN'ın doktora tez çalışmasının N.E.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK'in sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oyçokluğu ile karar verilmiştir. Not: Çalışma ile ilgili gerekli izinlerin alınması ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.

Sorumlu Araştırmacı: Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

Yardımcı Araştırmacılar: Abdulrahman TATTAN, Prof. Dr. Sami KÜÇÜKŞEN, Doç. Dr. Çiğdem Damla ÇETİNKAYA

ASLI GİBİDİR
07.04.2023

Prof. Dr. Saim AÇIKGÖZOĞLU
İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkanı