

KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİTAMİN D RESEPTÖR (VDR) GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
METABOLİK HASTALIKLARDA BİYOMARKER OLARAK ROLÜ

MERAL KIZILKANAT

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEFKOŞA

2015

KKTC
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİTAMİN D RESEPTÖR (VDR) GENİ POLİMORFİZMLERİNİN
METABOLİK HASTALIKLARDA BİYOMARKER OLARAK ROLÜ

MERAL KIZILKANAT
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. NEDİME SERAKINCI

LEFKOŞA

2015

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir)

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasında ve eğitim sürecimde değerli katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım çok değerli hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Prof Dr. Nedime SERAKINCI'ya,

Yüksek Lisans eğitimime bilgi ve tecrübeleriyle büyük emekleri geçen değerli hocalarım Dr. Mahmut Çerkez ERGÖREN, Dr. Rasime KALKAN, Dr. ve Pınar TÜLAY

Ayrıca statistik çalışmalarında yardımları için Dr. Mahmut Çerkez ERGÖREN'e,

Tezim için gerekli tüm malzeme ve yardımı ile bana destek olan İntron Sağlık Ürünleri İth.İhr.Tic.Ltd.Şti yöneticisi Sayın Serhat DEMİRKOL'a

Yardımlarını ve sevgilerini benden esirgemeyen sevgili anneme, babama, eşime ve kızlarıma tüm kalbimle

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzm.Mol.Biy. Meral KIZILKANAT

İTHAF

Kızlarım İpek Nazlı ve Elif'e ithaf ediyorum....

Vitamin D Reseptör Geni 'nin Kardiyometabolik Hastalıklardaki Rolü ve Biyomarker Olarak Kullanılması

Meral Karafistan Kızıllanat

Yakın Doğu Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik AD, Lefkoşa, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti

GİRİŞ VE AMAÇ: Vitamin D eksikliği günümüzde oldukça yüksek prevalansa sahip bir durum olup, düşük vitamin D değerinin kemik hastalıklarıyla ilişkisi uzun süredir bilinmektedir. Yakın geçmişte Vitamin D eksikliğin, kardiyovasküler sisteminin de arasında bulunduğu bir çok organın optimum fonksiyonda çalışması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür. Bugün Vitamin D eksikliğin kardiyovasküler hastalık (KVH) riskini artıran rolü olduğu yolunda veriler birikmekte olup diyabet, sol ventrikül hipertrofisi ve kronik vasküler enflamasyon gibi KVH 'ın bilinen risk faktörleri arasında yerini almaya başlamıştır. Çalışmanın amacı, vitamin D eksikliği ve KVH riski arasında patofizyolojik bir ilişki olup olmadığını inceleyerek, Vitamin D reseptör (VDR) geni varyantlarının kardiyometabolik hastalıklara olan yatkınlığı belirleyici bir biyomarker olarak kullanılabilirliğini araştırmaktır.

YÖNTEM: Polimeraz zincir reaksiyonu- restriksiyon fragment uzunluğu polimorfizm yöntemi (PCR-RFLP) kullanılarak biyolojik yollarda etkisi olduğu kanıtlanan FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI (rs7975232) ve TaqI (rs731236) VDR gen varyantlarının total kolesterol (50-200 mg/dL), glukoz (74-109 mg/dL), LDL-kolesterol (60-100 mg/dL), HDL-kolesterol (29-84 mg/dL), trigliserid (<200 mg/dL) gibi biyokimyasal belirleyiciler ile ilişkisini Kuzey Kıbrıs Türk popülasyonunda (n: 320; yaş aralığı 18 – 73) araştırdık. Genotipi belirlenen popülasyonun Hardy Weinberg Eşitliğine uyumlulukları test edildikten sonra, two-tailed t-testiyle istatistiksel olarak önemliliğine bakıldı.

BULGULAR: Sonuçlar, VDR gen varyantlarından sırasıyla FokI C varyantının glukoz, kolesterol ve LDL-kolesterol biyokimyasal seviyeleriyle doğrudan bağlantısı olduğuna (P: 0.02, P: 0.04, P: 0,002), aynı zamanda TaqI C alellinin de FokI C alleli gibi glukozun değerleri ile ilişkili olduğunu (P:0.02) göstermiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ: Bu çalışmada VDR geni FokI polimorfizmi C allelinin aktivite baskılayıcı allel olarak diyabet, kardiovasküler hastalıklar gibi metabolik hastalıklarda önemli rol oynayan glukoz ve LDL-kolesterol seviyelerini artırıcı bir rol oynadığı gösterilmiştir. Bu bulgular, VDR geni FokI CC homozigotluğunun KVH risk faktörleri arasında yer alan biyokimyasal değerleri etkileyerek, CC homozigot bireylerin KVH yatkınlığının tanısında önemli bir etken olduğu ve FokI polimorfizminin yüksek kolesterol ve glukoz ile birlikte değerlendirildiğinde KVH yakalanma riskini 2 kat artırdığını göstermektedir. Bu bulgular ışığında söz konusu varyasyonun, klinik uygulamalarda değerlendirilebilir bir belirteç olduğu bu çalışma ile ileri sürülmektedir.

Anahtar Kelimeler: vitamin D eksikliği, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, populasyon, polimorfizm, Vitamin D Reseptör (VDR) geni

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İTHAF.....	v
ÖZET.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiv
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Steroid yapılı hormon Vitamin D ve Vitamin D metabolizması.....	4
2.2 VDR geni ve polimorfizmleri.....	8
2.3 Vitamin D, VDR ve immün sistem.....	11
2.4 VDR Geni Polimorfizmlerinin Hastalılarla İlişkisi.....	13
2.5 Mutasyon ve Polimorfizm.....	22
2.6 Polimorfizmleri tanımlama teknikleri.....	23
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	26
3.1 Gereç.....	26
3.1.2 Kullanılan Gereçler.....	26
3.1.2 Kimyasallar.....	26

3.1.2.1 Enzimler.....	26
3.1.2.2 Moleküler Belirteçler.....	26
3.1.2.3. Oligonukleotidler.....	26
3.1.2.4 Standart Solüsyonlar.....	27
3.1.3 Çalışma Grubu.....	29
3.1.4 Çalışmada kullanılan Biyokimyasal Parametreler.....	29
3.2 Yöntemler.....	30
3.2.1 Periferik Kandan DNA izolasyonu.....	30
3.2.2 DNA Konsantrasyonu.....	30
3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
3.2.3.1 VDR genindeki FokI polimorfizmi için PZR protokolü.....	31
3.2.3.2 VDR genindeki TaqI polimorfizmi için PZR protokolü.....	32
3.2.3.3 VDR genindeki Apal polimorfizmi için PZR protokolü.....	33
3.2.3.4 VDR genindeki BsmI polimorfizmi için PZR protokolü.....	34
3.2.4 Restriksiyon Enzim Kesim Reaksiyonu (PCR-RFLP).....	35
3.2.4.1 FokI polimorfizmi restriksiyon kesim enzimi işleminin koşul ve içeriği.....	35
3.2.4.2 TaqI polimorfizmi restriksiyon kesim enzimi işleminin koşul ve içeriği.....	36
3.2.4.3 Apal polimorfizmi restriksiyon kesim enzimi işleminin koşul ve içeriği.....	36
3.2.4.4 BsmI polimorfizmi restriksiyon kesim enzimi işleminin koşul ve içeriği.....	37
3.2.5 Agaroz Jel Elektrofrez ve Görüntüleme İşlemi.....	37
3.2.6 Biyoistatistik Değerlendirme.....	38

4.BULGULAR.....	39
4.1 Anket Sonuçları.....	39
4.2 Biyokimyasal Sonuçlar.....	39
4.3 Moleküler Analizler.....	41
4.3.1 VDR gen polimorfizm bölgelerinin PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılması.....	41
4.3.2 VDR gen polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm (PZR-RFLP)ile genotiplemesi	42
4.3.2.1 FokI.....	42
4.3.2.2 TaqI.....	42
4.3.2.3 ApaI.....	43
4.3.2.4 BsmI.....	44
4.4 VDR gen polimorfizminin popülasyondaki genotip dağılımlarının Hardy Weinberg eşitliğine göre doğrulanması.....	45
4.5 VDR gen polimorfizmleri ile biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki.....	46
4.5.1 VDR gen polimorfizmi ile glukoz seviyesi arasındaki bağlantı.....	46
4.5.2 VDR gen polimorfizmi ile LDL- kolesterol arasındaki bağlantı.....	48
4.5.3 VDR gen polimorfizmi ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki bağlantı.....	50
4.6 FokI rs2228570 C>T ve TaqI rs731236 C>T polimorfizmi arasındaki bağlantı eşitliği.....	50
4.6.1 Glukoz ve LDL- kolesterol seviyeleri arasında genotip etkinin ölçülmesi.....	50
5. TARTIŞMA.....	53
6. KAYNAKLAR.....	64

EKLER.....	87
FORMLAR.....	91
Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Gönüllü Onam Formu.....	91

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan VDR gen polimorfizmlerinin primer listesi....	27
Tablo 3.2 FokI polimorfizm PZR karışım içeriği ve konsantrasyon bilgileri....	31
Tablo 3.3 FokI polimorfizmi PZR döngü, döngü sayısı, ısı koşulları ve zaman detayları.....	31
Tablo 3.4 TaqI polimorfizm PZR karışım içeriği ve konsantrasyon bilgileri....	32
Tablo 3.5 TaqI polimorfizmi PZR döngü, döngü sayısı, ısı koşulları ve zaman detayları.....	32
Tablo 3.6 ApaI polimorfizm PZR karışım içeriği ve konsantrasyon bilgileri....	33
Tablo 3.7 ApaI polimorfizmi PZR döngü, döngü sayısı, ısı koşulları ve zaman detayları.....	33
Tablo 3.8 BsmI polimorfizm PZR karışım içeriği ve konsantrasyon bilgileri.....	34
Tablo 3.9 Bsm I polimorfizmi PZR döngü, döngü sayısı, ısı koşulları ve zaman detayları.....	34
Tablo 4.1 Populasyonda rastgele seçilmiş gönüllü bireyler (Grup I), KVH sahip bireyler (Grup II) ve Diyabet hastası bireyler.....	40
Tablo 4.2 VDR gen polimorfizmi genotiplerinin Hardy- Weinberg eşitliği ve two tailed t-test'e göre anlamlılığına bakılması.....	45
Tablo 4.3 VDR gen polimorfizminin allel dağılımları ile glukoz değerlerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.4 VDR gen polimorfizminin allel dağılımları ile düşük LDL- kolesterol değerlerinin karşılaştırılması.....	49

Tablo 4.5 VDR FokI ve TaqI polimorfik bölgelerine ait allelerin oluşturdukları genotiplerin eşitliklerinin ve istatistiksel değerler ile olası bağlantının gösterilmesi.....	52
--	----

Tablo 5.1 VDR geni polimorfizmi ve çeşitli hastalıklarla arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar.....	59
---	----

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Vitamin D metabolizması.....	6
Şekil 2.2 Vitamin D'den VDR'ye giden yol	7
Şekil 2.3 VDR geni polimorfizmleri.....	8
Şekil 2.4 VDR'nin immun sistemdeki rolü.....	12
Şekil 2.5 VDR geni polimorfizminin bağlantılı olduğu farklı dokular.....	14
Şekil 2.6 VDR aktivasyonunun renin-angiotensin sistemi üzerinden etkileri.....	15
Şekil 2.7 VDR'ye bağlı kardiyovasküler risk oluşumu.....	16
Şekil 2.8 Hedef hücreler içinde 1,25(OH) ₂ D faaliyet mekanizması.....	18
Şekil 2.9 VDR'nin farklı yollar ile bağlantısı.....	20
Şekil 2.10 VDR ve etkileri.....	21
Şekil 2.11 Normal dizi, polimorfizm ve mutasyon şematik görünümü.....	23
Şekil 2.12 PCR-RFLP uygulamalarının şematik görünümü.....	24
Şekil 2.13 SNP array uygulamalarının gösterilmesi.....	25
Şekil 4.1 VDR gen polimorfizmlerinin PZR amplifikasyon sonrası agaroz jel elektroforez sonrası UV altındaki görünümü.....	41
Şekil 4.2 PZR-RFLP yöntemi kullanılarak VDR geni FokI ve TaqI polimorfizm bölgelerinin genotiplendirilmesi.....	43
Şekil 4.3 PZR-RFLP yöntemi kullanılarak VDR geni ApaI ve BsmI polimorfizm bölgelerinin genotiplendirilmesi.....	44
Şekil 4.4 PZR-RFLP yöntemi kullanılarak VDR geni FokI ve TaqI polimorfizm bölgelerinin genotiplendirilmesi.....	48

Şekil 4.5 VDR gen polimorfizmlerine ait genotipler ile düşük LDL- kolesterol seviyesi dağılımının gösterilmesi.....	49
---	----

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

25 (OH) D : 25 hidroksi vitamin D

25 (OH) D2 : 25 hidroksi vitamin D2

25 (OH) D3 : 25 hidroksi vitamin D3

1,25 (OH) D : 1,25 dihidroksi vitamin D

1,24 (OH)D : 1,24 dihidroksi vitamin D

VDR:Vitamin D Reseptörü

T2DM: Tip 2 Diyabet

KVH: Kardiyovasküler Hastalıklar

PZR (PCR): Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

LDL KOLESTEROL: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein

HDL KOLESTEROL:Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein

KCl: Potasyum Klorür

dntp: deoksinükleotitfosfatlar

bp(bç): Baz Çifti

NaCl:Sodyum Klorür

TE:Tris-EDTA kimyasalı

EDTA:Ethylenediamine tetraacetic Acid

RBC Buffer:Red Blood Cell (Kırmızı Kan Hücresi) Kimyasalı

Lysis Buffer:Hücre parçalama Solusyonu

NH₄Cl:Amonyum Klorür

KHCO₃:Potasyum Bikarbonat

Tris:Hydroxymethylaminomethane

TBE:Tris-Borate EDTA

VDRE:D vitaminine cevap veren element

DBP:D- Binding Protein (Vitamin D bağlayan Protein)

BMD :Becker Müsküler Distrofi

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Vitamin D eksikliği günümüzde oldukça yüksek öneme sahip olmakla birlikte, vitamin D değerinin düşük olmasının kemik hastalıklarıyla ilişkili olduğu uzun yıllardan itibaren bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Vitamin D eksikliğinin, kardiyovasküler sistemin de arasında bulunduğu bir çok organın optimum fonksiyonda çalışması için gerekli olduğu ileri sürülmüştür (Veysel Kıdır, 2013). Günümüzde Vitamin D eksikliğinin kardiyovasküler hastalık (KVH) riskini artıran bir rolü olduğu yolunda veriler daha da artmış ve bilinen risk faktörleri yani diyabet, sol ventrikül hipertrofisi ve kronik vasküler enflamasyonun yanında KVH risk faktörleri arasında yerini almaya başlamıştır.

Vitamin D'nin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, vücutta intrasellüler hormon reseptörü olan VDR'ye bağlanarak etkisini göstermektedir. VDR reseptör geninde N terminal bölgede FokI, C terminal bölgede BsmI, ApaI, TaqI, TruI ve Poly A mikrosatellit ve 5' promotor bölgede Cdx-2 polimorfizmleri tanımlanmıştır (Özkan B ve diğerleri, 2011). Son yıllarda VDR gen polimorfizmi ile çeşitli hastalıklar arasındaki olası bağlantıyı araştıran birçok genetik çalışma yapılmıştır. Yapılan literatür taramaları sonucunda VDR gen polimorfizmlerinden en önemlileri FokI, TaqI, BsmI ve ApaI'nın immun sistem bozukluklarına dayalı metabolik hastalıklar ile anlamlı bağlantıları olduğu görülmüştür. Bu bulgular doğrultusunda bizim çalışmamızda Vitamin D reseptör (VDR) gen polimorfizmlerinden FokI (rs2228570), BsmI (rs1544410), ApaI, TaqI (rs731236) ile metabolik hastalıklar arasındaki bağlantıya bakılarak, insan sağlığını tehdit eden metabolik hastalıklar için bir biyolojik belirteç olarak kullanılıp kullanılamayacağı ve biyokimyasal parametreler (Glukoz, Total Kolesterol, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol, Trigliserid) ile arasındaki olası ilişki araştırılmıştır.

Vitamin D reseptörü (*VDR*) geni bir çok farklı dokuda eksprese olmaktadır. *VDR* gen polimorfizmi ve D vitamini eksikliğinin daha önce obezite, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz gibi bir çok metabolik sendrom ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Derinin güneşe maruz kalması sonucu değişime uğrayıp kana geçtiğinde inaktif durumda olan Vitamin D, karaciğer ve böbrekte uğradığı bazı metabolik değişimler sonucu aktif Vitamin D haline dönüşmekte ve bu oluşum kimyasal yapısı, etki mekanizmaları ile bir vitaminden ziyade bir hormon özelliği sergilemektedir. Bu bilimsel gerçek ile birlikte Kuzey Kıbrıs'ın coğrafi konumu da göz önünde bulundurulduğunda bu ada da yaşayan kişilerin Vitamin D yapımında sorun olmaması beklenmektedir. Ancak vücudumuzda Vitamin D, vitamin D reseptörleri tarafından tutulmaktadır ve bu proteini kodlayan *VDR* geninde meydana gelen polimorfizmlerin vücuda yeterli vitamin D'nin tutunmasını engellendiği bilinmektedir. Dolayısı ile, güneşten aşırı korunma veya *VDR* polimorfizmlerinden dolayı Vitamin D yapım veya kullanımında problemler ortaya çıkabilmektedir.

Bu çalışmada *VDR* gen polimorfizmlerinin metabolik hastalıklarda biyomarker olarak kullanılıp kullanılamayacağı ve *VDR* gen polimorfizminin metabolik hastalıklar ile genotip- fenotip bağlantısına bakılması hedeflenmiştir.

VDR geni varyantlarının diyabet, kardiyovasküler hastalıklar gibi metabolik hastalıklarda önemli rol oynayan glukoz ve LDL-kolesterol profillerini etkilediği gösterilmiştir. Bu bulgular, *VDR* geni FokI polimorfizminin KVH risk faktörleri arasında yer alan biyokimyasal değerleri etkileyerek, KVH'ın olan yatkınlık da rol oynayan bir etken olduğu ileri sürmesi açısından önem arz etmekte olup bu varyasyonun, klinik uygulamalarda değerlendirilebilir bir belirteç olabileceği bu çalışma ile ileri sürülmektedir. Ayrıca sonuçlarımız FokI polimorfizminin yüksek kolesterol profili ve glukoz düzeyi durumunda KVH yakalanma riskini 2 kat artırdığını göstermesi açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak çalışmamızın bu yönde yapılacak çalışmalara yol gösterici bilgiler vereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Vitamin D reseptör, polimorfizm, metabolik sendrom, KVH

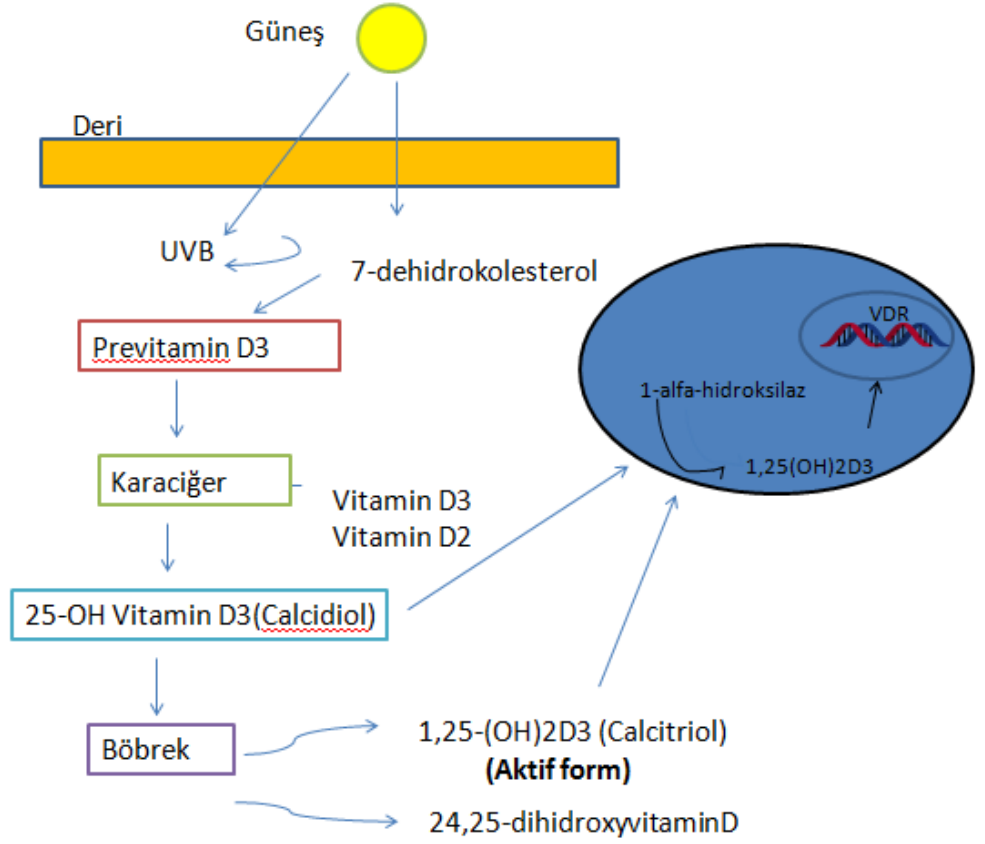
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Steroid yapılı hormon vitamin D ve vitamin D metabolizması

1980' li yıllarda Vitamin D' nin sadece kemik metabolizmasında önemli olduğu bilinirken günümüzde yapılan çalışmalarda kemik metabolizması dışında da birçok metabolik olayda görevli olduğu bulunmuştur. Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)₂D₃, hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonu ile ilgili olan birçok genin regülasyonunu VDR aracılığı ile yapmaktadır. Yani vitamin D hücre diferansiyasyonu ve apoptoz, hücre proliferasyonu, immün regulasyon gibi diğer yollarda da görev almaktadır (Jones G., 2012). Günümüzde vitamin D'nin birçok metabolik yolak için gerekli olduğu bilinmekle birlikte çeşitli hastalıkların progresyonunda, hastalığın seyrinin yavaşlatılmasına neden olduğu da bilinmektedir (Şekil 2.9). Örneğin, otoimmün hastalıklar, inflamatuvar barsak hastalığı, romatoid artrit, multipl skleroz, diyabet, kalp hastalıkları, osteoporoz, enfeksiyöz hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalıkta etkili olduğu gösterilmiştir (Hollick MF. ve diğerleri, 2004; Hollick MF. ve diğerleri, 2005; Deluca HF. ve diğerleri, 2004) . Ayrıca VDR gen polimorfizmlerinin etnik gruplara göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (Sinaga BY ve diğerleri, 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalar Vitamin D eksikliğinin, kardiyovasküler sisteminin de içinde bulunduğu bir çok organ sisteminin fonksiyonunda önemli olduğu ileri sürülmüştür. Vitamin D eksikliğinin kardiyovasküler hastalık (KVH) riskini artırdığı bilinmektedir ve KVH 'nın diyabet, sol ventrikül hipertrofisi ve kronik vasküler enflamasyonu gibi bilinen risk faktörleri arasında yerini almıştır (Veysel K., 2013). D vitamin eksikliğinin immün sistem üzerindeki etkisinin azalması bu tür hastalıklara yakalanma sıklığını artırmaktadır.

İnsanlarda D vitamini iki şekilde bulunmaktadır. Bunlar 28 karbon molekülü içeren vitamin D2 (ergokalsiferol) ve 27 karbon molekülü içeren vitamin D3 (kolekalsiferol) dır. Vitamin D3, deride güneş ışınları ile 7-dehidrokolesterolden sentezlenmektedir. Güneşin 290-315 nanometre dalga boyundaki ultraviyole B (UVB) ışınları ile 7-dehidrokolesterol önce previtamin D3'e ve ardından izomerizasyon ile vitamin D3'e dönüştürölür. Vitamin D3 ve Vitamin D2 ince bağırsakta absorbe edilmekte ve safra asitlerinin varlığında emilimi gerçekleşmektedir (Şekil 2.1).

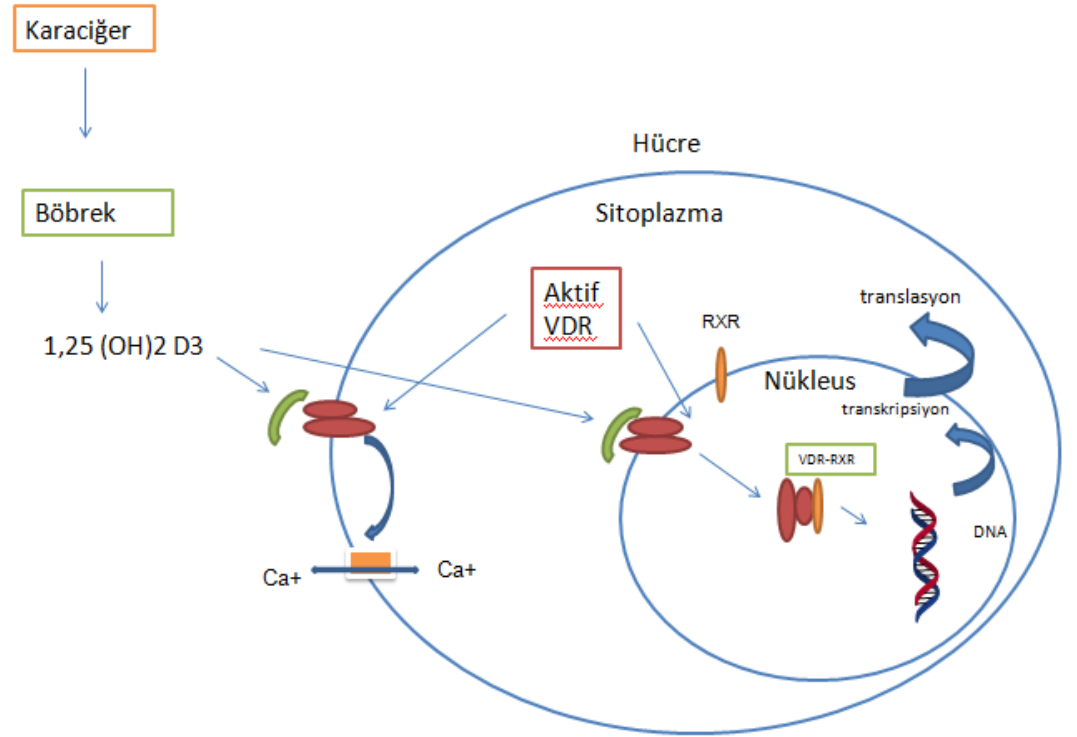
Vitamin D yağda eriyen vitaminler grubundan olmasına rağmen ciltte üretildikten sonra çeşitli organlar yardımıyla aktif formuna dönüştürölerek kan dolaşımına katılmasından dolayı 'feedback' etkisi nedeni ile vitaminden çok steroid yapılı bir hormon olarak da gösterilmektedir (Dursun A. ve diğeri, 2007).



Şekil 2.1: Vitamin D Metabolizması (Behzat Ö ve diğerleri, 2011). Vitamin D vücuda deriden veya besinler yardımı ile girerek karaciğere geçer. Vitamin D nin iki formu da (D2 ve D3) karaciğere geldikten sonraki yolları aynıdır. D3 vitamini deride 7-dehidrokolesteroleden türemektedir. Deriden geçen vitamin D karaciğerde sentezlenen DVBP ile taşınarak, 25- hidroksilaz tarafından 25(OH)D3 formuna dönüşür. Daha sonra karaciğerdeki kalsidiol böbreğe taşınır ve buradan aktif formu olan 1,25-(OH)2 D3 formuna dönüşür. 1,25 (OH)D'nin kanda yeterli düzeyde olması durumunda 25(OH)D'nin bir kısmı daha az aktif olup katabolize edilen 24,25 (OH)D'ye dönüştürülür (Dursun A. ve diğerleri, 2007; Bringhurst FR ve diğerleri. 2002).

VDR, 25-hidroksivitamin D (25-D) tarafından aktif formu olan 1,25-dihidroksivitamin D (1,25-D) ye dönüşene kadar inaktif halde tutulur.

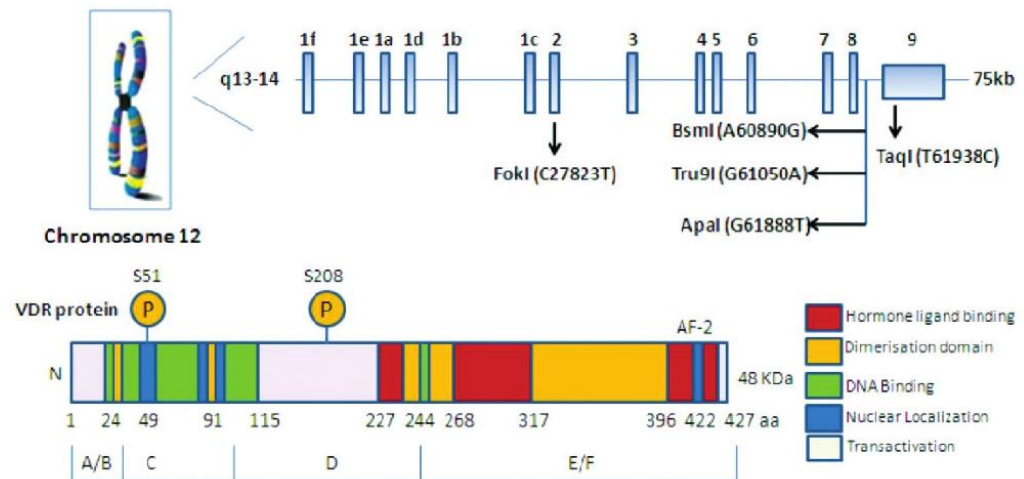
Vitamin D reseptörü 36'dan fazla dokuda tanımlanmıştır. Bu mekanizma sadece vücut için gerekli olacak kadar 1, 25 vitamin D üretilmesini sağlamak için VDR transkripsiyonunu düzenler (Şekil 2.2). VDR uygun transkripsiyonel aktivasyonu yoluyla sadece gerektiği ölçüde 1,25 vitamin D üretilmesini kontrol eder (Norman AW ve diğerleri, 2011). VDR aktif olduğunda, 1,25-Vit D' nin inaktif metabolitlere dönüşmesini sağlayan gen transkripsiyonunda kullanılan CYP24A1 enzimini artırır.



Şekil 2.2: Vitamin D'den VDR'ye giden yolak: Vitamin D'nin aktif formu olan 1,25(OH)2D3 hücreye girer ve VDR' ye bağlanır. RXR ile heterodimer oluşturur. Oluşan heterodimer yapı VDR-RXR-1,25(OH)2D3'ün sitoplazmadan nükleusa geçebilmesini sağlamaktadır. Nükleusa geçen bu kompleks yapı VDRE'yi aktif hale getirir ve transkripsiyon translasyon gerçekleşir. DBP'ler ile dokulara taşınarak hücre içine girerek retinoik asit reseptörleri gibi DNA'dan RNA transkripsiyonunu düzenleyen VDR ile kompleks oluşturarak belirli DNA bağlanma bölgelerine bağlanır ve bir yandan osteokalsin, kalsiyum bağlayıcı protein, vb. genlerin transkripsiyonunu artırırken diğer taraftan İnterlökin-2 ve İnterlökin-12 gibi genlerin de transkripsiyonunu azaltmaktadır (Bringham F.R. ve diğerleri, 2003; Mizwicki MT. ve diğerleri, 2009; Szodoray P. ve diğerleri, 2008).

2.2 VDR Geni ve Polimorfizmleri

İlk kez 1969 yılında tanımlanan VDR geni (Norman AW ve diğerleri,2006) 75 kb büyüklüğünde olup 11 ekzondan (1A, 1B, 1C ekzonları) ve 5 DNA promotör bölgesinden (5'UTR bölgesinde) oluşmakta ve 12q12-14 kromozom bölgesinde yer almaktadır. VDR geni ekspresyonu vücudumuzun birçok dokusunda; örneğin endotel, kalp kası, deri, kas, akciğer, beyin, prostat, kalın bağırsak, meme, monositler, makrofaj ve böbrek hücrelerinde; gösterilmiştir (2.5) (Nemere I. ve diğerleri,1998; Norman A.W. ve diğerleri, 1998; De Luca H.F. ve diğerleri., 2001). TaqI, Apal ve BsmI enzimleri için 3' ucunda, FokI için ise 2. ekzonda transkripsiyon başlangıç noktasında enzim kesiminin yapıldığı polimorfik bölgeler bulunur (2.3) (Zhou H. ve diğerleri., 2009; Zmuda J.M. ve diğerleri., 2000; Audi L. ve diğerleri.,1999; Kocatürk Sel ve diğerleri, 2011).



Şekil 2.2: VDR geni polimorfizmleri: VDR genindeki dört önemli polimorfizm olan FokI, BsmI, ApaI ve TaqI'in gen üzerindeki dağılımlarının şematik görünümü. Sırası ile FokI (rs2228570) T/C polimorfizmi ekzon 2'de, BsmI (rs1544410) A/G polimorfizmi Ekzon 7/ Intron 8'in kesişme noktasında, ApaI (rs7975232) A/C polimorfizmi intron 8'de ve TaqI (rs731236) C/T polimorfizmi 9. ekzonunun 352. kodonunda yer almaktadır (Parmeet K ve diğerleri, 2012).

VDR ile gen transkripsiyon kontrolü, retinoik asit X reseptörün (RXR) ve vitamin D cevap elemanına (VDRE) bağlanarak gerçekleşir (Şekil 2.4) (Mithal A. ve diğerleri., 2014).

VDR geni polimorfizmlerinden en önemlileri N terminal bölgede yer alan FokI, C terminal bölgede yer alan BsmI, ApaI, TaqI, TruI, PstI A mikrosatellit ve 5' promotor bölgede çok sayıda bulunan Cdx-2 polimorfizmleridir. FokI polimorfizmi (rs17881966) ekzon 2'de bulunur. (Dayangaç D. ve diğerleri., 2001; Zmuda J.M. ve diğerleri., 2000; Uitterlinden A.G. ve diğerleri., 2004; Denzer N. ve diğerleri., 2011; Valdivielso ve diğerleri., 2006). FokI (rs17881966) polimorfizmini belirlemek için FokI restriksiyon enzimi kullanılmaktadır (Dayangaç D. ve diğerleri., 2001; Zmuda J.M. ve diğerleri., 2000; Uitterlinden A.G. ve diğerleri., 2004; Denzer N. ve diğerleri., 2011; Valdivielso ve diğerleri., 2006). FokI polimorfizmi (rs17881966) varsa transkripsiyon ilk ATG dizisinden, yoksa ikinci ATG'den başladığından, ikinci transkript daha kısadır, ama yine fonksiyoneldir. 13. başlangıç kodonu olan ATG'de bulunan T→C değişimi sonucunda ATG, ACG'ye dönüşür ve translasyon ikinci ATG'den başlar. Bunun sonucunda 424 aminoasit uzunluğunda VDR proteini sentezlenir. T→C değişimi olmadığı durumda ise translasyon ilk ATG'den başlar ve 3 aminoasit daha uzun olan (427 aminoasit, T alleli) VDR proteini sentezlenir. Bunun nedeni, FokI'de iki farklı başlangıç yeri ve bunlara ait 2 farklı başlangıç kodon polimorfizmi (start codon polymorphism, SCP) bulunur. Birincisi, uzun formu ('T' allel veya 'f' allel) ya da M1 (metionin 1. formda) formu olarak bilinir. Diğeri ise kısa form yani 3 aminoasit kısaltılmış M4 (metionin 4. formda) formu ('F' allel olarak görülen 'C' allel) formudur. Şimdiye kadar VDR polimorfizmi ile ilgili yapılan çalışmalarda mekanizması bilinen ve detaylı olarak çalışılan tek protein polimorfizmi FokI dır (Andre G. ve diğerleri, 2004). VDR geninde 8.intronun 5'ucundan 1280 bp ilerde olan ApaI polimorfizmini (rs 17879735) belirlemek için ise ApaI restriksiyon enzimi kullanıldı. Diğeri bir polimorfizm olan TaqI (rs17880019) polimorfizmi 9. ekzonda bulunur ve T→C değişimi sonucunda ATT kodonu ATC'ye dönüşmesine sebep olur. İzolösin, normal ATT ve değişim sonucunda oluşan ATC kodonu (352. kodon) tarafından kodlandığından bu polimorfizm sessiz polimorfizm oluşturmaktadır (Zmuda JM. ve diğerleri, 2000; Dayangaç D. ve diğerleri, 2001). Dördüncü polimorfizm olan BsmI (rs1544410) polimorfizmi ise, ApaI gibi intron 8 sonu

ile ekzon 9 arasında bulunmakta ve kodlanan proteinde amino asit dizisini değiştirmeyen Taql gibi sessiz ve tek nükleotid polimorfizmidir (SNP).  nceki alışmalarda, Bsml polimorfizminin mRNA stabilitesini düzenleyerek gen ekspresyonunu etkileyebileceği belirtilmiştir (Denzer N. ve diğerleri., 2011).

VDR geninin 3'UTR bölgesindeki Taql, Apal ve Bsml polimorfizmlerine ait alleller birbirlerine çok yakın dağılımlarından dolayı aralarında kuvvetli bir bağlantı eşitsizliği (Linkage Disequilibrium, LD) söz konusu iken, FokI polimorfizminin gen üzerindeki yerlesiminden dolayı diğer üç polimorfizm ile arasında bir LD bulunmamaktadır (Zmuda J.M. ve diğerleri., 2000).

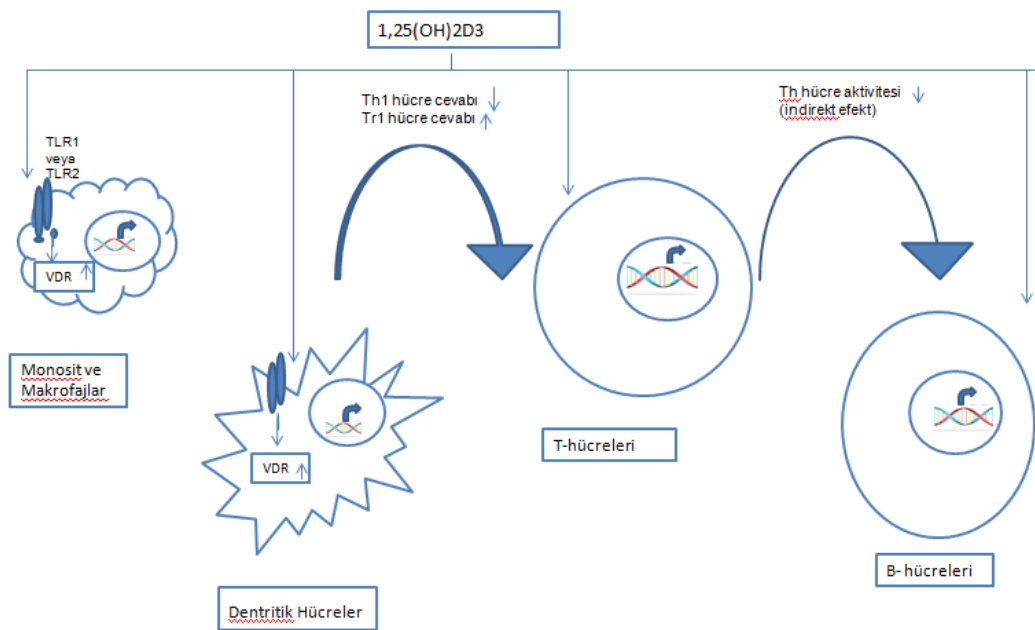
VDR gen transkripsiyonunda, dolaşımdaki aktif D vitamini hücre duvarı ve sitoplazmayı geçerek nükleusa ulaşır ve VDR'ye bağlanır. Daha sonra bu kompleks retinoik asit X reseptörüne (RXR) ve daha sonra DNA üzerinde bulunan vitamin D cevap elemanı (VDRE) olarak bilinen bölgeye bağlanır. Sonuç olarak 1,25(OH)2D-VDR-RXR-VDRE etkileşimi ile gende DNA transkripsiyonu gerçekleşir. Bu aktivite koaktivatör ve koresept rlerle kontrol edilir (Ibhar Al Mheidi ve diğerleri, 2013).

2.3 Vitamin D, VDR ve İmmun Sistem

1,25 (OH)₂D₃ VDR üzerine bağlanarak etkinlik kazanmaktadır. Günümüzde vitamin D'nin birçok metabolik yolak için önemli olduğu, hastalığın progresyon ve seyrinin yavaşlatılmasına neden olduğu bilinmektedir. Otoimmün hastalıklar, inflamatuvar barsak hastalığı, romatoid artrit, multipl skleroz, diyabet, kalp hastalıkları, osteoporoz, enfeksiyöz hastalıklar ve kanser gibi birçok hastalık da etkili olduğu (Hollick MF. ve *diğerleri*, 2004; Hollick MF. ve *diğerleri*, 2005; Deluca HF. ve *diğerleri*, 2004) ve ayrıca VDR gen polimorfizmlerinin etnik gruplara göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (Sinaga BY ve *diğerleri*, 2014). Bu hastalıkların önemli ortak noktaları immün sistem bozukluğundan kaynaklanmalarıdır. İmmün sistem bozuklukları riski ise ya VDR gen polimorfizmi nedeni ile oluşan direnç ya da vücuttaki vitamin D eksikliği nedeniyle artmaktadır. Özellikle hem VDR gen polimorfizmi nedeni ile oluşan direnç hem de vitamin D eksikliğinin ikisinin birlikte görüldüğü durumlarda bu olasılık çok daha fazla artmaktadır (Özkan B ve *diğerleri*, 2011).

1.25(OH)₂VD₃'ün makrofajlar, monositler, dentritik hücreler, T hücreleri ve B hücreleri, kısacası immün sistemi oluşturan pek çok eleman üzerinde etkisi vardır (J.Rodrigo Mora ve *diğerleri*, 2008). Monositler ve dentritik hücrelerde bulunan TLR1 veya TLR2 tarafından yönetilen sinyaller VDR ekspresyonunu artırır. VDR, TLR2 reseptörü tarafından yabancı maddeleri tanır. Vücut D vitamini metabolitleri düzenlenmesi yoluyla VDR aktivitesini kontrol eder (Norman AW ve *diğerleri*, 2011). Monositler IL-1'i indükleyerek, P450 proteini ve CYP27B1'i artırarak VDR ekspresyonunu artırır. Ayrıca monositler hücredeki proliferasyonu da artırmaktadır (2.4). Dentritik hücrelerden dolayı Vitamin D olgunlaşması azalmaktadır. Bu durum, MHC Class II ekspresyonunun regülasyonunun artmasını engeller ve dentritik hücreler tarafından üretilen IL-2 üretimini azaltıp, IL-10'u artırır. T helper (Th) 2 hücreleri vitamin D tarafından uyarılarak IL-4, IL-5, IL-10, TGF beta sitokinlerini artırır, ayrıca Th 17, Th1 hücrelerini inhibe ederek de IL-2, IL-3, IFN gama ve TNF alfa'nın üretimini azaltmaktadır. Ayrıca Vitamin D'nin

aktif formu B hücrelerinin farklılaşmasını önleyerek, dentritik hücrelerin gelişimini inhibe etmektedir (Chen S ve diğerleri, 2007). Aktif D vitamini, CD4 T hücrelerinin regülatör (Treg) ve supresör T hücrelerine dönüşümünü artırmaktadır. Olası D vitamini eksikliği durumunda Treg aktivitesi azalır ve otoimmun diyabet, barsak hastalıkları ve alerjik otoimmun hastalıkların gelişimi artar (Şekil 2.4) (Penna G ve diğerleri, 2000; Adorini L ve diğerleri, 2005).



Şekil 2.4: VDR'nin immün sistemdeki rolü: 1,25(OH)2VD3'ün marrofajlar, monositler, dentritik hücreler, T hücreleri ve B hücreleri üzerinde etkisi vardır. Dolayısıyla VDR geni bu yollar ile bağlantılıdır (J. Rodrigo Mora ve diğerleri, 2008).

Vitamin D3, B hücre proliferasyonunu, plazma hücre farklılaşmasını ve immunglobulin üretimini engeller (J Rodrigo ve diğerleri, 2008).

Vitamin D3, ağızdan beslenilerek ya da deriden sentezlenerek vücuda girer. Karaciğerde hidroksillenerek (25OH Vitamin D3), daha sonra birçok sistemik etkiye sahip kan dolaşımına katılır ve P450 proteini CYP27B1 ile böbreklerde hidroksillenir. İmmün sistem hücrelerinden makrofajlar, dentrik

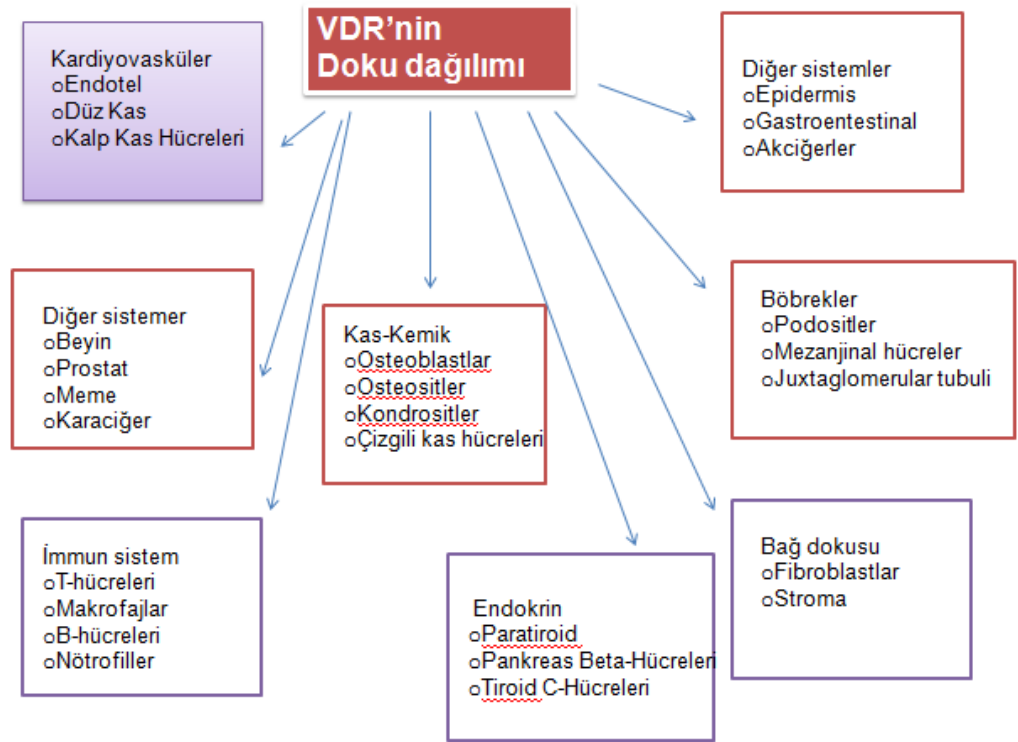
hücreler, T ve B hücreleri CYP27A1 ve CYP27B1'i eksprese eder ve 25(OH)VD3'ü 1,25(OH)VD3 ve 1,25(OH)2VD3 e çevirir ve VDR'ye bağlanarak otokrin ve parakrin gibi bağışıklık hücreleri üzerinde hareket eder (Şekil2.4).

2.4 VDR Geni Polimorfizmlerinin Hastalıklarla İlişkisi

Asya populasyonlarında BsmI polimorfizmine ait 'b' alleli, Avrupa kökenli popülasyonlarda ise 'B' alleli daha baskındır. Japonlar'da Bb genotiplerinin bb'ye göre, vitamin D'ye daha fazla cevap verdiği bulunmuştur (Guofeng W ve diğerleri, 2014). Genelde Asyalılar vitamin D metabolitlerine Avrupalılardan (Caucasian) daha fazla yanıt vermektedir (b alleli yaygın) (Guofeng W ve diğerleri, 2014). Ancak VDR genotipleri ile BMD (Becker's Muscular Dystrophy) arasındaki bağlantı ilişkisi kalsiyum alımına orantılı olarak değişiklik göstermektedir. Guofeng W ve diğerleri kalsiyum ve vitamin D takviyesi alan yaşlılar arasında BB genotipine sahip kişilerin bel bölgesindeki omurlarda kemik kaybının Bb ve bb genotipine sahip bireylere göre daha fazla olduğunu ileri sürerken Cooper ve arkadaşlarının kemik mineral densitesi ve VDR polimorfizmi arasındaki bağlantıya baktıkları çalışmada böyle bir ilişkinin varlığı gösterilmemiştir (Cooper GS ve diğerleri, 1996).

VDR gen polimorfizminin birçok hastalık ile ilişkisi son yıllarda önem kazanmış ve yaygın bir şekilde araştırılmaktadır. Çeşitli çalışmalar VDR geni polimorfizmleri ile kronik hastalıklar ve birçok metabolik hastalık, kemik mineral yoğunluğu, enfeksiyonlar (tüberküloz), nefrolitiazis, diyabet ve bazı otoimmün hastalıklar (lupus, otoimmün hepatit, siroz, Crohn hastalığı, multipl skleroz, Graves hastalığı gibi) arasındaki bağlantıyı ortaya koymuşlardır (Şekil 2.5) (Valdivielse J.M. ve diğerleri., 2006; Tokita A. ve diğerleri., 1996; Abbas S., 2008; Utterlinden A.G. ve diğerleri., 2004; Obara W. ve diğerleri., 2007).

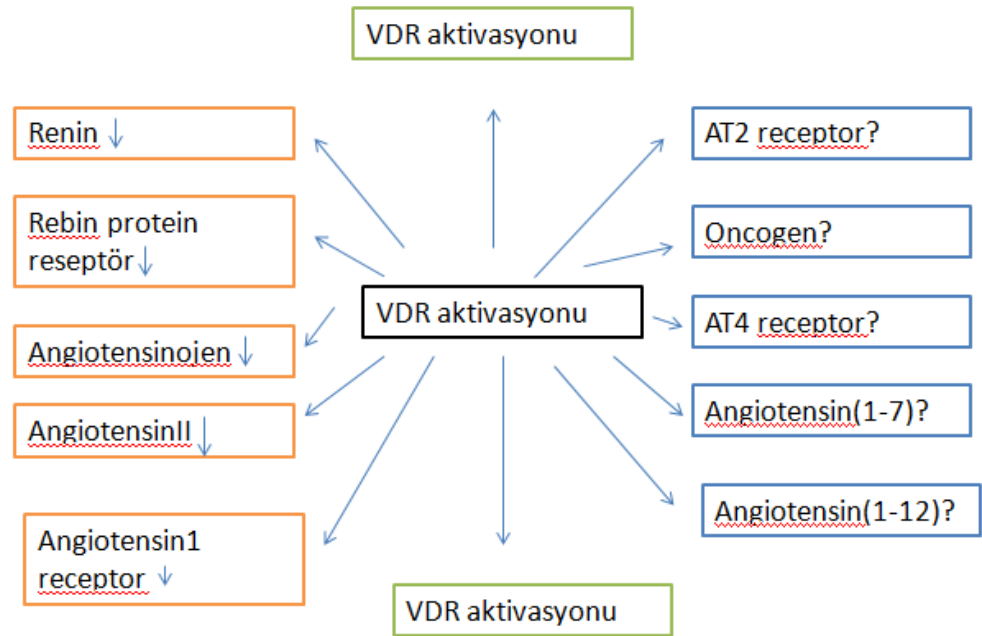
Literatürde VDR gen polimorfizmlerinin Behçet Hastalığına yatkınlığa sebep olabileceği bildirilmektedir (Tizaoui K ve diğerleri,2014;Karray EF ve diğerleri,2011).



Şekil2.5:VDR geni polimorfizminin bağlantılı olduğu farklı dokular(Helen L. Henry, 2011).

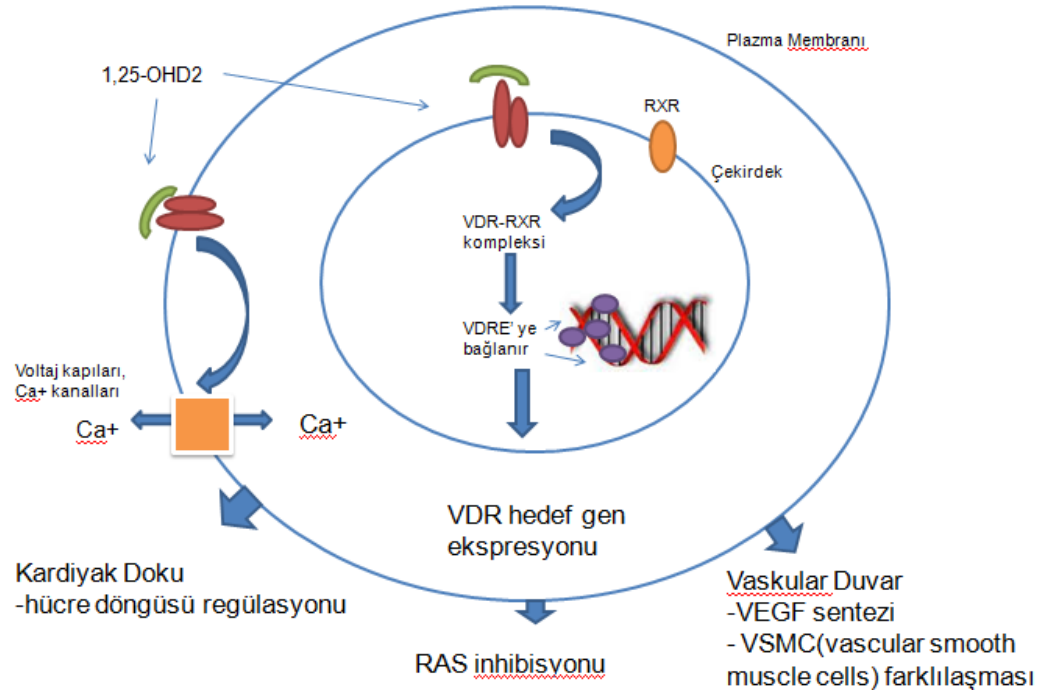
Klinik çalışmalarda kalp hastalığı, kalp yetmezliği ve koroner damar hastalıklarına sahip olan kişilerin vitamin D yönünden fakir oldukları, ayrıca bu hastalıkların VDR geni polimorfizmleri ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Veysel ve diğerleri., 2013). Pilz ve diğerleri 1- α hidroksilaz ve VDR aktivitesini miyokard ve damar duvarında göstermişlerdir. VDR'nin 1- α hidroksilaz eksikliği nedeniyle miyokard hipertrofisi, yüksek renin-anjiyotensin-aldosteron miktarı ve bozulmuş sistolik fonksiyonunun farelerde kasılmayı

arttırdığı ve RAAS aktivasyonunu artırdığı gösterilmiştir (Pilz S ve diğerleri.,2011). VDR BsmI polimorfizminin yüksek kan basıncı ve kardiyovasküler risk faktörleri gibi istenmeyen lipid profili ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Muray S. ve diğerleri., 2003; Filus A. ve diğerleri., 2008). Ayrıca BsmI polimorfizmi artmış sol ventrikül hemodiyaliz hastalarında (Testa A. ve diğerleri., 2010) karotis arter intimal medial kalınlaşması (Kammerer C.M. ve diğerleri., 2004; Renate T de Jongh ve diğerleri., 2011) ile bağlantılıdır (Şekil 2.6- Şekil 2.7).



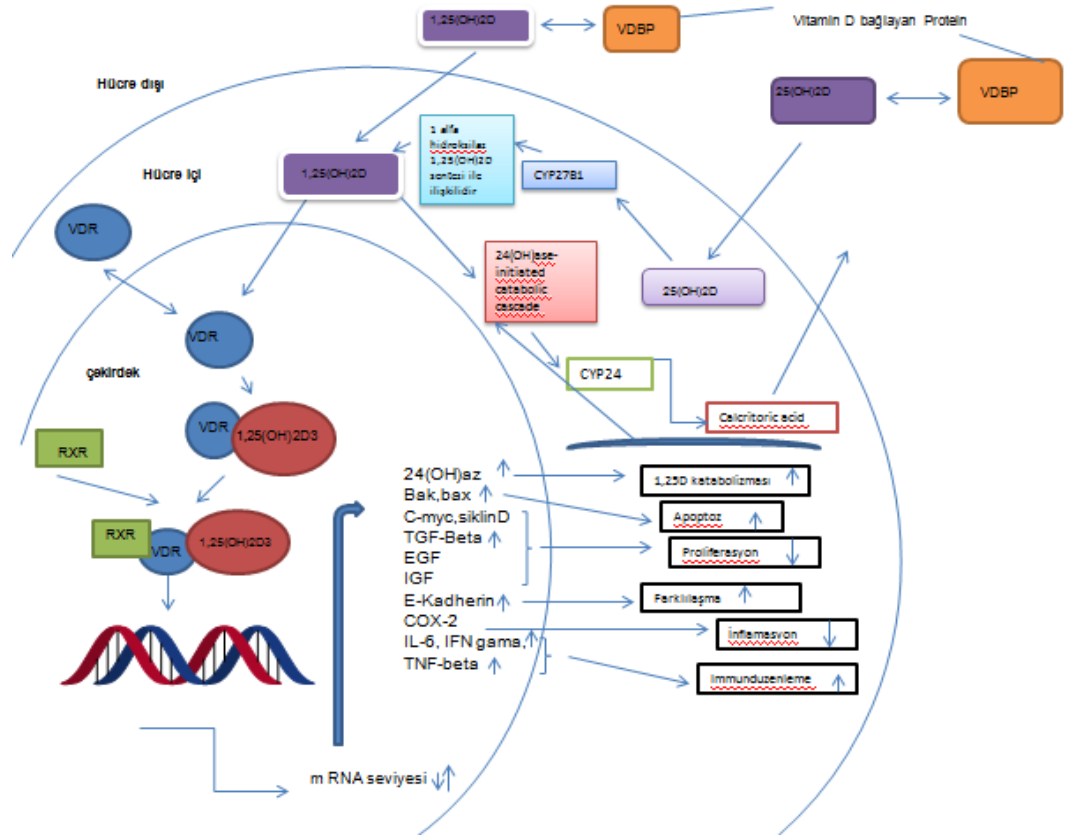
Şekil 2.6:VDR aktivasyonunun renin-angiotensin sistemi üzerindeki etkileri. VDR aktivasyonunda Renin, Renin protein reseptörü, angiotensinojen, angiotensinII ve angiotensinI reseptör aktivitesinin arttığı bulunmuş olup, Angiotensin2 reseptör, onkogen, AT4 reseptör, angiotensin(1-7) ve angiotensin(1-12) aktivitesi hakkında henüz net bir bilgi bulunamamıştır (Takayoshi T ve diğerleri, 2010).

Doğuştan VDR eksikliğinin nadir bir hastalık olan D vitaminine dirençli raşitizm Tip II hastalığına sebep olduğu bilinmektedir. Sık görülen VDR gen polimorfizmlerinde tek-gen polimorfizmlerinde olduğu gibi bir gen eksikliği yoktur. Gende yapısal değil fonksiyonel bozukluk görülür (Helen L. Henry, 2011).



Şekil 2.7: VDR' ye bağlı kardiyovasküler risk oluşumu şekli. VDR-RXR ile dimerizasyon yaparak ortak bir kompleks yapı oluşturarak transkripsiyon faktörü olarak işlev görür. Bu kompleks yapı, Vitamin D cevap elementlerine (VDREs)'e bağlanarak bir çok genin ekspresyonunu modüle eder. Diğer hormon reseptörleri gibi hedef gene özgü ligand'lı ve ligandsız VDR aktivitesi için ortam belirlerler. Nükleer olmayan, zara bağlı VDR kardiyomiyositlerde dahil olmak üzere çeşitli hücrelerde tespit edilmiştir ve genomik olmayan fonksiyonlara katkıda bulunur. Bu çalışmalar, nükleer VDR aktivasyonu ile modüle edilmiş ve voltaj geçişli kalsiyum kanallarındaki iyon geçişinin kontrol ve düzenlenmesini modüle eder (Zhou G ve diğerleri, 2010; Farech Carson MC ve diğerleri, 1998).

VDR gen polimorfizmleri ile farklı kanser tiplerinin gelişimi ve metastazı arasında da ilişki olduğu gösterilmiştir. VDR polimorfizmleri ve prostat kanseri arasında anlamlı bir bağlantı bulunurken (Ntais ve diğerleri, 2003) Apal 'a' allelinin risk faktörü olabileceği ileri sürülmüştür. Diğer taraftan Taql polimorfizmi ile meme kanseri arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (Dunning AM ve diğerleri,1999; Newcomb PA ve diğerleri,2002). Bazı çalışmalar Taql polimorfizmi ile metastaz riski arasında bir bağlantı olmadığını gösterirken (Dunning AM ve diğerleri,1999; Newcomb PA ve diğerleri,2002), bazıları da Taql ile metastaz riski arasında anlamlı bir bağlantı olduğunu göstermiştir (Lundin AC ve diğerleri, 1999; Schondorf T ve diğerleri, 2003; Curran JE,1999). Kolon kanseri ile BsmI polimorfizmi arasındaki anlamlı bir bağlantı olduğu belirtilirken (Speer G, ve diğerleri, 2000; Kim HS ve diğerleri, 2001), bir diğer çalışmada ise FokI ile arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (Ingles SA ve diğerleri, 2001; Peters U, ve diğerleri, 2001). FokI polimorfizmi CC genotipine sahip bireylerin malign melanom riskinin TT genotipine göre daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 2.9) (Hutchinson P.E., ve diğerleri., 2000).

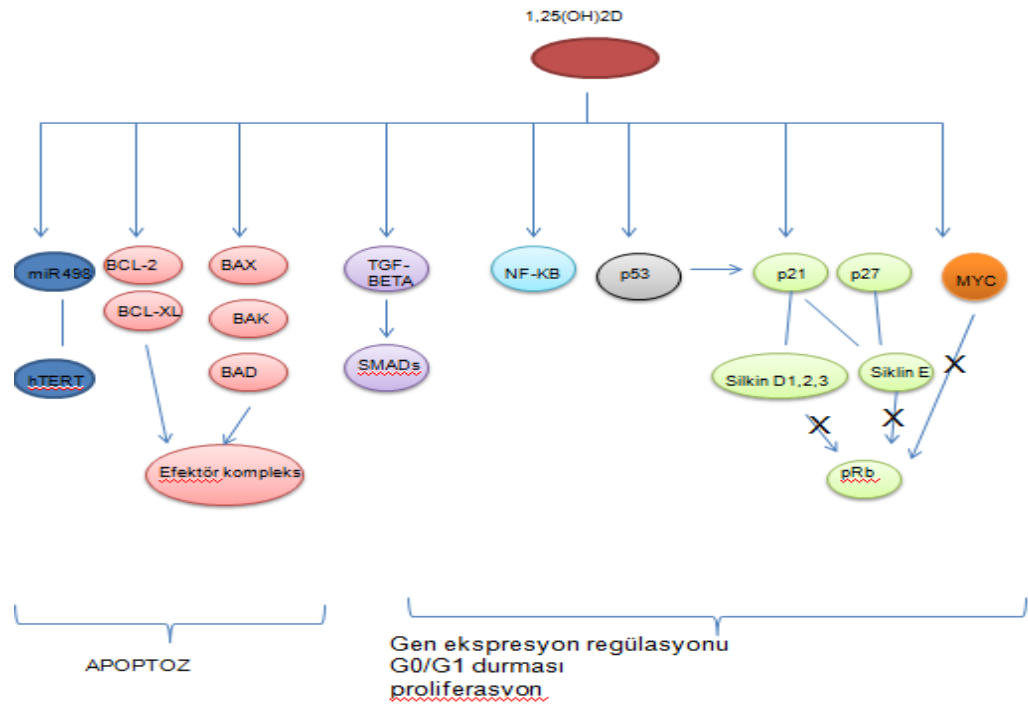


Şekil 2.8: Hedef hücreler içinde 1,25 (OH) 2 D faaliyet mekanizması. 1,25 (OH) 2 D vitamini bağlanan reseptörü (VDR) ve retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimerleri oluşturmaktadır. Bu kompleks Vitamin D reseptör elementine (VDRE) bağlanarak hedef genlerin (karsinogenez ilişkin VDREs ile, apoptoz, proliferasyonunu, farklılaşma, inflamasyon, regülasyon ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesi) ekspresyonunu indükler. VDR, 1α, 25 (OH) 2D₃ kalsiyum ve fosfor dengesi, bağışıklık fonksiyonu, üreme, kalp-damar, merkezi sinir sistemi, inflamasyon, anjiyogenez ve hücrenin çoğalması, farklılaşması ve apoptoz dahil olmak üzere memelilerde 200'den fazla genin fonksiyonunu düzenler. Normal hücre fenotipleri ve işlevleri 1α, 25 düzenlenmesinde çok yönlü rolü olduğu ve (OH) 2D₃'ün bir anti-kanser madde olduğu ortaya çıkarılmıştır. (*Reproduit de Davis and Milner: J Nutrigenet Nutrigenomics 2011;4:1–11; McCullough ML ve diğerleri,).*

Bunların yanısıra, renal karsinoma ile Taql arasında da anlamlı bir bağlantı olduğu saptanmış olmasına rağmen (Ikuyama T. ve diğerleri., 2002), diğer birçok kanser tipi ile VDR polimorfizmleri ilişkisini araştıran çalışmaların sayısı yeterli olmaktan uzaktır. Kanserın yanı sıra Türk populasyonunda sedef hastalarında, Taql polimorfizmi ile vitamin D eksikliği arasında anlamlı bir bağlantının var olduğu bildirilmiştir (Dayangaç E.D. ve diğerleri., 2007)(Şekil 2.8).

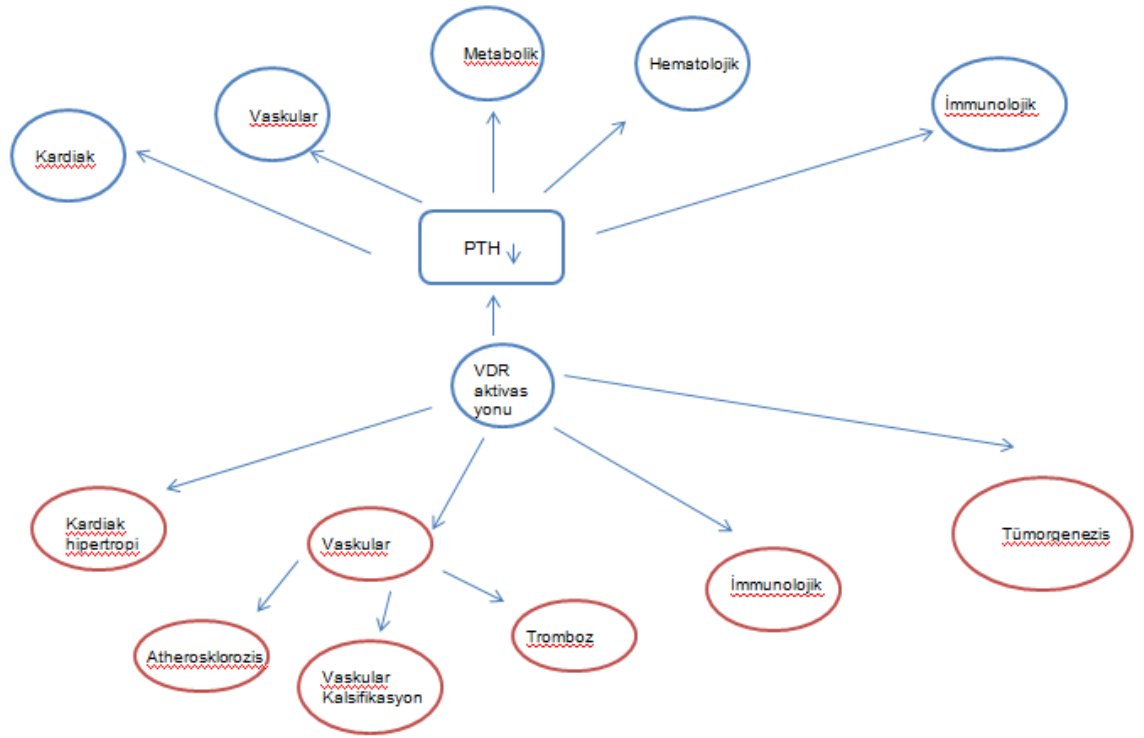
VDR'deki BsmI polimorfizminin ise kas kuvveti ile ilişkisi olduğu bulunmuştur (Jose M.V., ve diğerleri, 2006). Ayrıca, Japon ve Çin populasyonlarında yapılan çalışmalarda, Lupus erytematosus sendromu ve VDR geni BsmI polimorfizmi 'B' alleli arasında da bir bağlantı bulunmuştur (Ozaki ve diğerleri., 2000; Huang ve diğerleri., 2002).

Hiperglisemi, büyüme faktörü-beta (TGF-beta) ve diğer sitokinler gibi proteinüri transforme intrarenal renin-anjiyotensin sistemini (RAS) ve oluşumunu teşvik eder. TGF-beta epiteliyal-için-mezenkimal geçiş ve profibrotik sinyallerin uyarılmasına neden olur. Artan RAS aktivitesi hemodinamik değişikliklere neden olur. Aktif D vitamini metabolitleri, D vitamini reseptörü (VDR) bağlanır ve RAS uyarılmasını ve mezankimal hücre proliferasyonunu inhibe ederler. Buna ek olarak, aktif vitamin D, büyüme faktörü aktivasyonu yoluyla, dolaylı olarak, TGF-beta ile fibrojenize dengelemektedir. Sonuç olarak, etkin vitamin D metabolitleri glomeruloskleroz tübülointerstisyel fibrozis'i azaltır (Şekil 2.10).



Şekil 2.9: VDR'nin farklı yollar ile bağlantısı aktif D vitamininin VDR'ye bağlanarak hücre proliferasyonundan sorumlu çeşitli genleri regüle ederek kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder. Aktif D vitamini; hücre döngüsü inhibitörleri p21, p27 ekspresyonunu ve hücre adezyon molekülü ekaderin ekspresyonunu uyararak, â-katenin'in transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder. Keratinositlerde aktif D vitamininin UVR'nin yol açtığı DNA hasarının tamirini artırdığı, apoptozu azalttığı, p53'ü artırdığı gösterilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar kanserlerin önlenmesinde yeterli D vitamini alımının önemini ortaya koymaktadır ancak, VDR polimorfizminin de erken tanıda belirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürülmektedir.

Taq polimorfizminin TT genotipinin Afrika popülasyonunda tüberküloza karşı bir koruma olduğu bulunmuş olup (Bellamy R. ve diğerleri, 1999), bu bağlantının sadece bu popülasyonda kadınlar üzerinde anlamlı olduğu gösterilmiştir (Selvaraj ve diğerleri., 2000). Ancak, Lewis ve ark. (2005) tarafından yapılan sistematik inceleme çalışmaları ve meta-analiz hesaplamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilememiştir (Lewis SJ, ve diğerleri, 2005).

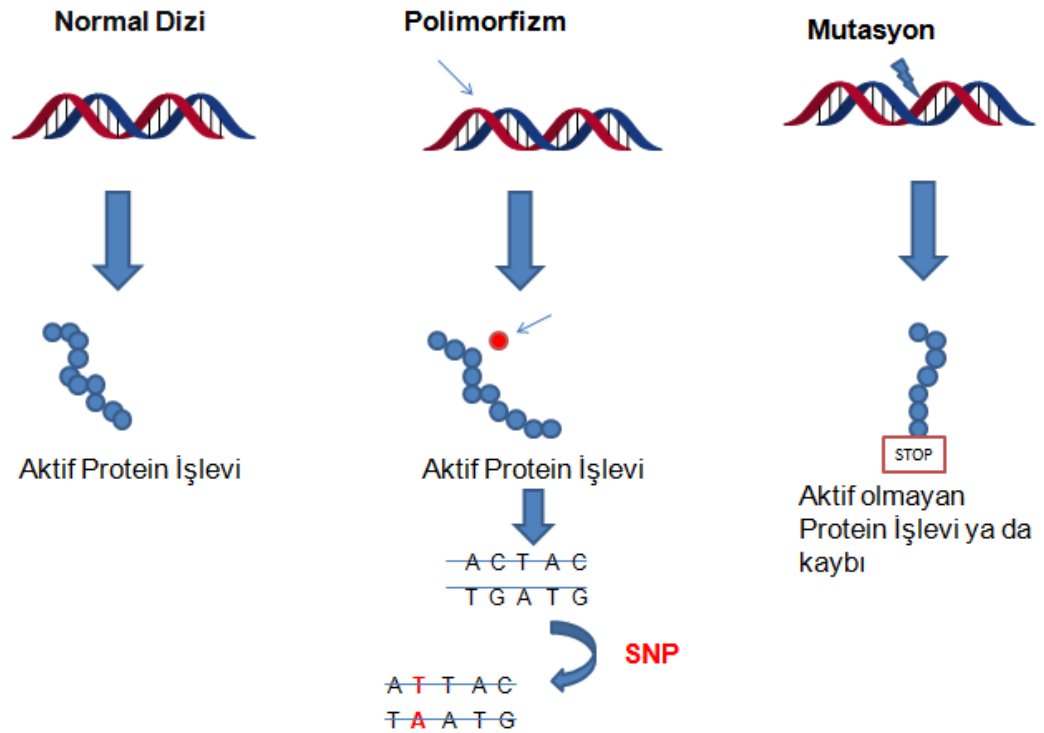


Şekil 2.10: VDR ve etkileri. VDRA (VDR aktivasyonu) aktivasyon durumuna göre PTH seviyesi değişmektedir. VDR'nin PTH seviyesinin düşmesine neden olduğu durumlarda, yükseltilmiş PTH sol ventriküler hipertrofi, kardiyovasküler (kalp fibroz, miyokard kontraktile, artan vasküler ve kapak azalma kireçlenme,) metabolik (insülin duyarlılığını ve lipid metabolizması bozuklukları), hematolojik (kemik iliği fibrozisi azalmış ve eritrosit azalmış,) vazodilatasyon azalmış, ve immünolojik anormalliklere neden olmaktadır (CP Kovesdy ve diğerleri, 2008).

Ayrıca son yapılan çalışmalarda, Fokl allelik varyantlarının BMD'de (Becker's Muscular Dystrophy) ırk, yaş, menopoz durumu ve kalsiyum alımı gibi çevresel faktörlerden de etkilendiği bulunmuştur (Gerard L ve diğerleri, 1999).

2.5 Mutasyon ve Polimorfizm

Aynı atadan gelen iki bireyin DNA dizisine bakıldığı zaman %99,9 oranında benzerlik gösterir. Geriye kalan bireyler arasındaki farklılığı sağlayan % 0,1' lik orandaki değişikliğin ana nedenlerinin başında tek nükleotid değişimleri gelmektedir (SNP). Populasyondaki genetik varyasyonlar mutasyon ve polimorfizm olarak ikiye ayrılmaktadır. Mutasyon ve Polimorfizm terimleri benzer olsa da aslında birbirinden farklı genetik değişimlerdir. Mutasyon, populasyonda nadir görülen %1'den daha az olan varyantlardır. Mutasyonlar, aktif enzimlerin yapısını değiştiren DNA hasarı onarımındaki genetik farklılıklar ve özellikle olası kanser riskindeki artışa neden olabilen genetik çeşitliliklerdir. Polimorfizm ise, populasyondaki görülme sıklığı %1 veya daha fazla olan genetik varyasyonlardır. İnsan genomunda görülme sıklığı en fazla olan polimorfizm tek nükleotid değişimleridir (Şekil 2.11) (Richard Tyuyman, 2003).



Şekil 2.11: Normal dizi, Polimorfizm ve Mutasyon'un şematik görünümü. Normal dizide, protein normal fonksiyonunu yapıyor. Polimorfizmde, belirli bir bazda oluşan tek nükleotid değişikliktir. Mutasyon, genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülünde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Mutasyon sonrası proteinin yapısı ve enzim görevi değişmektedir (Richard Tyuyman, 2003).

2.6 Polimorfizmleri tanımlama teknikleri

Polimorfizmler farklı moleküler teknikler ile analiz edilebilir. Bunların içinde restriksiyon enzim kesim reaksiyonu (RFLP), dizileme ve SNP arrayler yer alır.

RFLP reaksiyonunda, restriksiyon endonükleazlar (RE) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılan çift zincirli DNA'yı iki yönlü simetri oluşturan polindromik bölgelerden keserek farklı enzim kesim sistemleri ile farklı polimorfizmlerin analiz edilmesine olanak verir (Şekil 2.13). RFLP ve dizileme reaksiyonlarından önce PZR ile istenilen DNA bölgesi *in vitro* olarak çoğaltılır. PZR işlemi farklı sıcaklıklarda üç döngüden oluşan (denatürasyon;

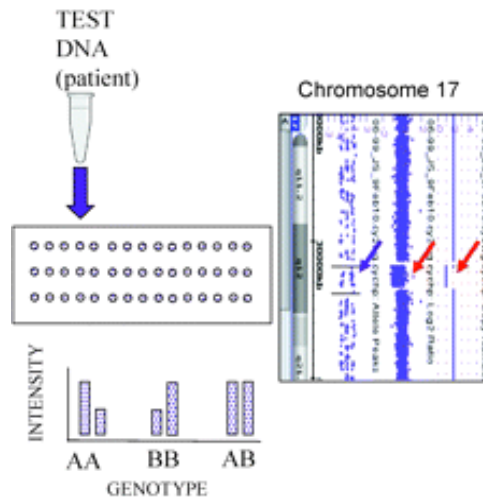
bağlanma (annealing) ve uzatma (extension)) DNA'nın istenilen bir bölgesinin çoğaltılması esasına dayanır. Daha sonra PZR ürünü istenilen polimorfizmi tanıyan bir restriksiyon enzimi ile kesilerek agaroz jelde polimorfizm tayini yapılır.



Şekil 2.12: RFLP-PCR uygulamalarının şematik resmi.

Dizileme yöntemi PZR işleminden sonra çoğaltılan bölgenin nukleotit bazlarının sırasını belirleme işlemidir. İstenilen DNA fragmenti çoğaltıldıktan sonra dizileme yöntemi ile elde edilen DNA dizisi veritabanları (NCBI veya Ensembl) ile karşılaştırılarak polimorfizm tayini yapılır. Bu yöntemle birden fazla polimorfizm aynı anda analiz edilebilir ve RFLP yöntemine göre daha hassas bir tekniktir.

Son yıllarda gelişen SNP arrayleri insan genomunda bulunan 10000 ve 500000 SNP'i inceler (Şekil 2.14). Bu arrayler test edilmek istenen örnek DNA ve referans DNA'nın floresan yoğunluklarını karşılaştırarak hibridizasyon yoluyla bilgi sağlar ve veriler biyoinformatik analizler ile değerlendirilir. SNP arraylerin avantajları tüm genomdaki SNP'lere tek bir reaksiyonda bakılabilmesi bağlantı (linkage) analizlerinin yapılabilmesidir.



Şekil 2.13: SNP array uygulamalarının gösterilmesi (Evica R. ve diğerleri, 2012)

Son yıllarda yapılan genetik çalışmalarda VDR polimorfizmi çalışmaları artmıştır. Tam olarak bütün yollar henüz tamamlanamamış olsa da yapılan çalışmalar bu polimorfizmlerin dolaylı veya doğrudan hücre yaşlanma (senescence), hücre ölümü (apoptoz), hücre çoğalması (proliferasyon), vb gibi farklı yanıtların oluşumunda rolü olduğu gösterilmiştir. VDR'nin, iskelet sisteminin yanı sıra immunomodülatör özellik göstermesi nedeniyle bu çalışmalar birçok kanser tipi, immun sistem, allerji ve kardiyovasküler hastalıklar gibi farklı yollar üzerine ışık tutmuştur (Şekil 2.10) (Ayşe Tellioğlu ve diğerleri, 2013).

Çalışmamızda, VDR polimorfizmlerinin (FokI, TaqI, BsmI ve ApaI), kardiyovasküler hastalıklara olan yatkınlığın belirlenmesinde, biyomarker olarak kullanılıp kullanılmayacağının araştırması amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 GEREÇ

3.1.1 Kullanılan Gereçler

Bu projede hassas terazi, otomatik pipetler, etüv, otoklav, buzdolabı (+4⁰C), derin dondurucu (-20⁰C), santrifuj, ısı bloğu, pH metre, mikrodalga fırın, jel görüntüleme sistemi, Polimeraz Zincir Reaksiyonu makinesi, ve laminar kabin kullanıldı.

3.1.2 Kimyasallar

3.1.2.1 Enzimler

FokI (FD2144, Thermo Scientific) , *TaqI* (FD0674, Thermo Scientific), *Mva 1269I* (FD0965, Thermo Scientific) ve *Apal* (FD1414, Thermo Scientific) kesim enzimleri Metabion'dan temin edilmiştir. PZR'de kullanılmak üzere Thermo Scientific firması tarafından üretilen *Taq polimeraz* (FD0964, Thermo Scientific) enzimleri kullanıldı.

3.1.2.2 Moleküler Belirteçler

Thermo Scientific GeneRuler 100 bç (SM0241, Thermo Scientific), 100 – 1000 bç DNA Ladder, DNA'yı boyutlandırma ve agaroz jelde PZR ürünlerinin büyüklüklerinin doğruluklarını karşılaştırmak için kullanıldı.

3.1.2.3 Oligonukleotidler

Metabion (Planegg / Steinkirchen, Germany) firması tarafından sentezlenmiştir. Tablo 3.1'de primerlerin açık dizisi gösterilmektedir.

FokIF FokIR	5' -AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' 5'-ATGGAAACACCTYGCTTCTTCTCCCTC-3'
TaqIF TaqIR	5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'
BsmIF BsmIR	5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' 5'- AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG-3'
ApalIF ApalIR	5'-CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA-3' 5'-CACTTCGAGCACAAGGGGCGTTAGC-3'

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan VDR gen polimorfizmlerinin primer (FokI, TaqI, Apal ve BsmI) listesi (Bid ve diğerleri., 2005; Bid ve diğerleri, 2009; Kostner ve diğerleri., 2009).

3.1.2.4 Standart Solüsyonlar

Standart solüsyonlar; Yakın Doğu Üniversitesi Genetik Laboratuvarı'nda hazırlanmıştır. Bu solüsyonların hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir.

10 X TBE : 100 gr Tris, 55 gr borik asit ve 40 ml 0.5 M EDTA distile su içinde çözüldü, sodyum hidroksit ile pH'sı 8'e ayarlandı ve hazırlanan tampon, otoklav kullanarak sterilize edildikten sonra, oda sıcaklığında saklandı.

1 XTBE: 500 mL 1X TBE stok hazırlamak için, 10 X TBE'den 50 mL alınarak 450 mL distile su eklenerek seyreltili ve hazırlanan çözelti, otoklav ile sterilize edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA: 46,53 gr EDTA 250 ml distile su içinde çözüldü ve pH'sı sodyum hidroksit kullanılarak pH 8.0'e ayarlandıktan sonra, otoklav ile sterilize edildikten sonra, oda sıcaklığında saklandı.

RBC lizis solüsyonu: 4,15 gr NH_4Cl (Amonyum Klorür), 0,5 gr KHCO_3 (Potasyum Bikarbonat) ve 100 μl 0,5 M EDTA çözeltisi, 500 ml distile su içinde çözöldü ve çözeltinin pH'sı sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.4'e ayarlanıp hazırlanan solüsyon otoklavlanarak sterilize edilip $+4^\circ\text{C}$ de saklanır.

Lizis solüsyonu: 10 mM Tris (Hydroxymethyl aminomethane), 1 mM EDTA, 150 mM NaCl ve 50 μl % 10'luk SDS 1lt distile su içinde çözöölür. Tampon sodyum hidroksit kullanılarak pH 10.5'e ayarlanmıştır. Hazırlanan tampon steril edilip $+4^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

TE tamponu: 100 mM Tris HCl (MW 157.56), 10 mM EDTA (MW 292.24) ve 500 ml distile su içinde çözöölür, sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.4'e ayarlanarak hazırlanır. Hazırlanan çözelti oda ısısında muhafaza edilmiştir.

6M NaCl: 87,66 gr NaCl 250 ml distile suda çözöölür. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklanır.

% 10 SDS: 10 gr SDS, 100 ml distile su içinde çözöölür, sodyum hidroksit kullanılarak pH 7.2'e ayarlanarak hazırlanır. Hazırlanan çözelti 0.22 μm filtreden geçirilerek sterilize edilir ve oda ısısında muhafaza edilmiştir.

3.1.3 Çalışma Grubu

Bu çalışma için sadece kardiyovasküler hastalık geçmişi olduğu bilinen ve her hangi başka bir kronik hastalığı olmayan rastgele seçilmiş 321 Kıbrıslı Türk gönüllüden kan örnekleri toplandı. Çalışılan popülasyonun ortalama yaşı 42.2 ± 4.3 olup, araştırmamıza katılan 144 kişi (%38.62) daha önce kardiyovasküler hastalık (KVH) tanısı almış “çalışma grubu” nu oluşturmakta, aynı gruptan 18 kişi ise (%12.50) ayrıca tip iki diabet (T2DM) tanısı taşımaktadır. Kontrol grubu ise (177 kişi) KVH veya T2DM tanısı almamış rastgele seçilmiş gönüllü katılımcılardan oluşmaktadır. Çalışmada DNA izolasyonu için EDTA'lı tüpe 2ml kan alınmıştır. Gönüllülere çalışmanın detaylı bilgilendirilmesi yapıldı ve bireylere onam formları (Ek 4.1) imzalatıldı.. Kanlardan elde edilen DNA örneklerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) çalışmaları, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla %70'lik alkol ile temizlenmiş ve ultraviyole (UV) ile steril edilmiş Laminer kabinde yapılmıştır. DNA hazırlığı için kullanılan bütün çözeltiler, otoklavlanmış su ile hazırlanıp olası DNA aerosol kontaminasyonunu azaltmak için her çalışmadan önce ultraviyole (UV) ışınlarına tabi tutulmuştur.

3.1.4 Çalışmada Kullanılan Biyokimyasal Parametreler

Çalışmaya dahil edilen çalışma grubu ve kontrol grubundaki tüm gönüllülerin total serum kolesterol, HDL-C (yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol), LDL-C (düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol), trigliserid (TG) ve serum glukoz değerleri DNA izolasyonu için kan topladığı gün alınarak çalışmaya dahil edildi. Biyokimya sonuçları Yakın Doğu Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı, Kuzey Kıbrıs Devlet Hastanelerine Biyokimya Laboratuvarları ve diğer özel biyokimya laboratuvarlarından alındı.

3.2 YÖNTEMLER

3.2.1 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu , Serakıncı ve diğerlerinin daha önce yayınladığı yöntemde ufak değişiklikler yapılarak DNA izolasyonu aşağıdaki protokol kullanılarak yapılmıştır (Serakıncı, N. ve diğerleri, 2004).

Temiz bir falkon tübe 5 ml alyuvar parçalama solüsyonu (RBC) ve 2.5 ml periferik kan eklendi ve 30 dk. 4⁰C'de inkübe edildi. Süre dolduğu zaman falkon tüp 2000 g'de 15 dk. 4⁰C'de santrifuj edildi. Santrifuj sonrası süpernatant kısmı atılarak pellet 2 kez 5 ml alyuvar parçalama solüsyonu (RBC) ile yıkandı. Bu işlemler sonrası süpernatant alınarak üzerine 0.5 ml lizis çözeltisi eklendi. Sonrasında 100 µg proteinaz K eklenerek 55⁰C'de 2 saat bekletildi. Proteinaz K aşaması sonrasında 500 µl 6 M NaCl (w/v) eklenerek 15 dk. karıştırıldı ve 5 dk. 12000g 4⁰'de santrifuj edildi. Süpernatant alınarak tekrar 12000 g'de 5dk. 4⁰C'de santrifuj edildi. Süpernatant temiz bir tüpe alınarak üzerine 2 ml %100'lük etanol eklenip -80⁰C'de 20 dk. bekletildi. Sonrasında 5 dk. 12000 g'de çevirildi ve süpernatant tekrar alınarak üzerine %70 alkol eklenerek DNA çöktürüldü. Elde edilen DNA alkol ile kuruduktan sonra, 50 - 100 µl TE tamponu içinde çözüldü.

3.2.2 DNA Konsantrasyonu

DNA izolasyonu sonrası, DNA konsantrasyonu nanodrop UVS-99 device (ACT gene, USA) cihazında 260 ve 280 nm'de ölçüm alınarak yapıldı. DNA konsantrasyon yoğunluğu 25 ng ve üzeri olan yoğunluktaki örnekler çalışmaya dahil edilerek her bir PZR reaksiyonu için 10ng DNA kullanıldı.

3.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA izolasyon işlemi sonrası ayrılan genomik DNA'lar, VDR geni üzerinde bulunan (Bölüm 2.3) dört farklı polimorfizm (FokI, Apal, BsmI ve TaqI) bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır. PZR karışımı toplamı 25 µl ye göre hazırlanmıştır. PZR sonrası FokI polimorfizmi için 265 bç, TaqI polimorfizmi için 500 bç, BsmI polimorfizmi için 825 bç ve Apal polimorfizmi için de 2000 bç lık gen bölgeleri çoğaltılmıştır. PZR sonrası çoğaltılan FokI, TaqI, BsmI ve Apal polimorfizm bölgeleri etidyum bromür içeren %2'lik agaroz jelde analiz edildi.

3.2.3.1 VDR genindeki FokI polimorfizmi için kullanılan PZR protokolü

Tablo 3.2 ve 3.3 te gösterilmiştir

PZR karışım içeriği	Reaksiyondaki son konsantrasyon
Forward (ileri) primer	2 µg
Reverse (geri) primer	2 µg
Taq polimeraz (KCl) tamponu (Thermo Scientific, EP0402)	1X
MgCl ₂ (25Mm ,Thermo Scientific)	1.5 mM
dNTP karışımı (10 Mm each, Thermo Scientific, R0191)	200mM
Taq polimeraz (5U/µl)	1.5 unit
DNA	10 ng

Tablo 3.2. FokI polimorfizm PZR karışım içeriği ve konsantrasyon bilgileri.

PZR döngüsü	Döngü sayısı	PZR sıcaklık koşulları	İnkübasyon zamanı
Denatürasyon	1	94 ⁰ C	5 dk
Denatürasyon	35	94 ⁰ C	30 sn
Bağlanma (annealing)		61 ⁰ C	30 sn
Uzama (elongation)		72 ⁰ C	1 dk
Tamamlanma	1	72 ⁰ C	7 dk

Tablo 3.3 FokI polimorfizm PZR döngü, döngü sayısı, sıcaklık koşulları ve zaman ayrıntıları.

3.2.3.2 VDR genindeki Taq polimorfizmi için kullanılan PZR protokolü Tablo 3.4 ve 3.5 te gösterilmiştir.

PZR karışım içeriği	Reaksiyondaki son konsantrasyon
Forward (ileri) primer	1,5 µg
Reverse (geri) primer	1,5 µg
Taq polimeraz (KCl) tamponu (Thermo Scientific)	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	1.5 mM
dNTP karışımı (Thermo Scientific)	200mM
Taq polimeraz (Thermo Scientific)	1.5 unit
DNA	10 ng

Tablo 3.4. Taq polimorfizm PZR karışım içeriği ve derişim bilgileri.

PZR döngüsü	Döngü sayısı	PZR sıcaklık koşulları	İnkübasyon zamanı
Denatürasyon	1	94 ⁰ C	3 dk
Denatürasyon	35	94 ⁰ C	60 sn
Bağlanma (annealing)		63 ⁰ C	60 sn
Uzama (elongation)		72 ⁰ C	2 dk
Tamamlanma	1	72 ⁰ C	5 dk

Tablo 3.5. Taq polimorfizm PZR döngü, döngü sayısı, sıcaklık koşulları ve zaman ayrıntıları

3.2.3.3 VDR genindeki Apal polimorfizmi için kullanılan PZR protokolü Tablo 3.6 ve 3.7 te gösterilmiştir.

PZR karışım içeriği	Reaksiyondaki son konsantrasyon
Forward (ileri) primer	2 µg
Reverse (geri) primer	2 µg
Taq polimeraz (KCl) tamponu (Thermo Scientific)	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	1.5 mM
dNTP karışımı (Thermo Scientific)	200mM
Taq polimeraz (Thermo Scientific)	1.5 unit
DNA	10 ng

Tablo 3.6. Apal polimorfizm PZR karışım içeriği ve derişim bilgileri.

PZR döngüsü	Döngü sayısı	PZR sıcaklık koşulları	İnkübasyon zamanı
Denatürasyon	1	94 ⁰ C	4 dk
Denatürasyon	35	94 ⁰ C	30 sn
Bağlanma (annealing)		65 ⁰ C	30 sn
Uzama (elongation)		72 ⁰ C	2 dk
Tamamlanma	1	72 ⁰ C	4 dk

Tablo 3.7. Apal polimorfizm PZR döngü, döngü sayısı, sıcaklık koşulları ve zaman ayrıntıları.

3.2.3.4 VDR genindeki BsmI polimorfizmi için kullanılan PZR protokolü

Tablo 3. 8 ve 3.9 te gösterilmiştir.

PZR karışım içeriği	Reaksiyondaki son konsantrasyon
Forward (ileri) primer	1,5 µg
Reverse (geri) primer	1,5 µg
Taq polimeraz (KCl) tamponu (Thermo Scientific)	1X
MgCl ₂ (Thermo Scientific)	1.5 mM
dNTP karışımı (Thermo Scientific)	200mM
Taq polimeraz (Thermo Scientific)	1.5 unit
DNA	10 ng

Tablo 3.8. BsmI polimorfizm PZR karışım içeriği ve derişim bilgileri.

PZR döngüsü	Döngü sayısı	PZR sıcaklık koşulları	İnkübasyon zamanı
Denatürasyon	1	94 ⁰ C	5 dk
Denatürasyon	35	94 ⁰ C	30 sn
Bağlanma (annealing)		65 ⁰ C	30 sn
Uzama (elongation)		72 ⁰ C	130 sn
Tamamlanma	1	72 ⁰ C	5 dk

Tablo 3.9. BsmI polimorfizm PZR döngü, döngü sayısı, sıcaklık koşulları ve zaman ayrıntıları .

3.2.4 Restriksiyon Enzim Kesimi Reaksiyonu (RFLP)

VDR polimorfizminin 2. ekzonundaki *FokI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *FokI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD2144), 9. ekzonundaki *TaqI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *TaqI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD0674), 8. intronun 5' ucundan 1280 bç ilerde olan *ApaI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *ApaI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD1414), polimorfizminin intron 8 ile ekzon 9 arasında bulunan *BsmI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *Mva1269I* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD0964) kullanılmıştır. Her bir polimorfizm için restriksiyon enzim kesimi koşulları ve içeriği aşağıda belirtildiği gibidir.

3.2.4.1 *FokI* polimorfizmi Restriksiyon enzim kesimi işleminin koşul ve içeriği

VDR polimorfizminin 2. ekzonundaki *FokI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *FokI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD2144) ile 5'...G G A T G(N)92↓...3' gen bölgesinde kesim yapıldı. Bu enzim kullanılarak 37⁰C'de 5 dk ve 65⁰C'de 5dk.'da kesim işlemi yapıldı. PZR'de çoğaltılan 265 bç'lik gen bölgesi *FokI* enzimi ile kesildiğinde, bireyler FF genotipe (wildtype/homozigot normal) sahipse 265bç'lik ürün, ff genotipe (homozigot mutant) sahipse 196 ve 69 bç'lik iki ürün ve Ff genotipine (heterozigot) sahipse 265, 196, 65bç olarak üç kesim ürünü elde edildi.

3.2.4.2 TaqI polimorfizmi Restriksiyon enzim kesimi işleminin koşul ve içeriği

VDR polimorfizminin 9. ekzonundaki TaqI genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *TaqI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD0674) kullanılarak 5'... T↓C G A...3' gen bölgesinden kesim yapıldı. Bu enzim kullanılarak 37⁰C'de 5 dk ve 65⁰C'de 5dk.'da kesim işlemi yapıldı. PZR'de çoğaltılan 500 bç'lik gen bölgesi TaqI enzimi ile kesildiğinde, bireyler TT genotipine (wildtype/homozigot normal) sahipse 500 bç'lik tek ürün, tt genotipine (homozygote mutant) sahipse 290 ve 205 bç'lik iki ürün ve Tt genotipine (heterozigot) sahipse 501, 290, 205bç olarak üç kesim ürünü elde edildi.

3.2.4.3 ApaI polimorfizmi Resrriksiyon enzim kesimi işleminin koşul ve içeriği

VDR polimorfizminin 8. intronun 5' ucundan 1280 bç ilerde olan *ApaI* genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *ApaI* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD1414) kullanılarak 5'-GGGCC↓C-3' gen bölgesinden kesim yapıldı. Bu enzim kullanılarak 37⁰C de 20 dk ve 65⁰C'de 5dk.'da kesim işlemi yapıldı.PZR'de çoğaltılan 2000 bç'lik gen bölgesi ApaI enzimi ile kesildiğinde, bireyler AA genotip (wildtype/homozigot normal) sahipse 2000bç'lik ürün, aa genotipine (homozigot mutant) sahipse 1700 ve 300 bç'lik iki kesim ürünü ve Aa genotipine (heterozigot) sahipse 2000, 1700, 300 bç olarak üç kesim ürünü elde edildi.

3.2.4.4 BsmI polimorfizmi Restriksiyon enzim kesimi işleminin koşul ve içeriği

VDR polimorfizminin intron 8 ile ekzon 9 arasında bulunan BsmI kodlanan proteinde amino asit dizisini değiştirmeyen sessiz bir SNP'dir. BsmI polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi için Fast Digest *Mva1269I* kesim enzimi (Thermo Scientific, FD0964) 5'...G A A T G C N↓...3' gen bölgesinden kesim yapıldı. Bu enzim kullanılarak 37⁰C'de 10 dk. kesim işlemi yapıldı. Enzim kesimi reaksiyonu sonucunda ürünün 10 µl'si %2'lik agaroz jele yüklendi ve 50 dk 70 volt da yürütüldü. PZR'de çoğaltılan 825 bç'lik gen bölgesi BsmI enzimi ile kesildiğinde, bireyler bb genotipine (wildtype/yabanıl tip) sahipse 825bç'lik ürün, Bb genotipe (homozigot) sahipse 650 ve 175 bç'lik iki ürün, BB genotipine (heterozigot) sahipse 825, 650, 175 bç olarak üç kesim ürünü elde edildi.

3.2.5 Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme İşlemi

Restriksiyon enzim kesimi sonrası oluşan gen bölgelerine ait bantların görüntülenmesi için %2'lik agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz (Invitrogen, 15510-027) 1X TBE tamponunda eritilip 100ml'lik %2'lik jel hazırlandı. Eritilen agaroz-TBE tamponuna 0.5 µg/ml etidyum bromür eklenip karıştırılarak tarakları yerleştirilmiş jel tepsisine sıvı haldeki agaroz karışımı dökülmüştür. 45 dk agaroz jelin donması beklenmiştir. Hazırlanan %2'lik agaroz jel 1XTBE içeren elektroforez tankına yerleştirildi (BIO-RAD). %2'lik agaroz jelin elektroforez tankına yerleştirilmesi esnasında PZR ürünlerinin yükleneceği kuyuların agaroz jelin negatif kutbuna yakın şekilde yerleştirilmesine dikkat edilmiştir. 5 µl enzim kesim ürünü 1 µl yükleme boyası (loading dye, Thermo Scientific, R0611) ile karıştırılarak kuyulara yüklendi. Jelin en sonundaki kuyuya ise TaqI, Apal ve BsmI polimorfizmleri belirlenmesi için 100bç-1000bç, FokI polimorfizminin belirlenmesi için de 50bç-1000bç arasında bantlar içeren 3 µl'lik DNA Ladder yüklendi. Daha sonra jele yüklenen örnekler 80 volt elektrik akımı ile 45 dk veya 90 volt da 45 dk yürütüldü. İşlem sonunda jel UV altında kamera ile görüntülendi (UVStar, biomedra). Jel görüntüleri bilgisayara aktarılarak kaydedildi.

3.2.6 Biyoistatistik Değerlendirme

Öncelikle gen frekanslarının dağılımı için polimorfizmler açısından *Hardy-Weinberg* dengesine uyup uymadığına bakılarak değerlendirilmiştir. Kantitatif değerler ortalama $\pm$ standart sapma (ss) ile ifade edilerek, değişkenler *Student t-testi* ve *ANOVA* ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değerler yüzde (%) olarak ifade edilmiş olup *ki-kare* testi ile karşılaştırılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. Ayrıca popülasyondaki dağılım hesaplaması ile genotip dağılım hesaplaması yapılmıştır. Tüm istatistiksel hesaplamalar GraphPad Prism v6 programı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Anket sonuçları

Çalışma, Mart 2014- Eylül 2014 tarihleri arasında Yakın Doğu Üniversitesi, Yakın Doğu Üniversitesi Hastanesi, Genetik laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmaya yaş aralığı 18-73 arasında değişen kardiyovasküler hastalık ve T2DM olmayan 177 kişi ile, kardiyovasküler hastalık tanısı konmuş 144 kişi olmak üzere toplam 321 gönüllü katılmıştır. Ayrıca çalışmaya katılan her gönüllünün sağlık bilgileri alınmış, tansiyonu ölçülmüş ve detaylı doldurmaları için bilgilendirme formları verilip onayları alınmıştır (EK 4.1). Çalışmada gönüllülerden 2 ml kan potasyum etilen diamin tetra asetik asitli (K_2 -EDTA'lı) tüplere alınmıştır (Bkz 3.1.4 ve 3.1.5).

4.2 Biyokimyasal sonuçlar:

Çalışılan populasyonun yaş ortalaması 42.2 ± 4.3 olup, araştırmamıza katılan 144 kişi (%38.62) daha önce kardiyovasküler hastalık (KVH) tanısı konmuş, ayrıca KVH tanısı konmuş 144 katılımcıdan 18 kişiye (%12.50) tip iki diabet (T2DM) tanısı da konmuştur. 177 (%61.38) kişi ise bu hastalıkları daha önce geçirmemiş kişilerden oluşan kontrol grubunu oluşturmaktadır. Çalışmada toplam 321 gönüllü katılımcı yer almaktadır. Anket sonuçlarına göre her hangi bir KVH veya T2DM geçirmemiş kişilerden oluşan gönüllü katılımcılar (grup I), KVH geçmişi olan gönüllüler (grup II) ve T2DM (grup III) olarak belirlenmiştir. Grup II ve grup III de ki katılımcıların glukoz, kolesterol, HDL-K, LDL-K ve trigiliserid değerlerinin bu hastalıkları daha önce geçirmemiş kişilerden oluşan grup I'e göre daha yüksek olması beklenmektedir. Bu öngörüye uygun olarak daha önce KVH hastalıklarından birini geçiren katılımcıların ortalama HDL-K değerleri diğer iki gruptan daha yüksek iken, T2DM'li kişilerin glukoz, total kolesterol ve LDL-K değerleri grup I'e göre istatistiksel olarak daha anlamlı bir fark oluşturmuştur (Tablo 4.1).

Parametreler	Grup II	Grup III	Grup II + III	F-test	P-değeri
Olgu sayısı	(n = 124)	(n = 18)	(n = 142)		
Yaş (yıl)	47.2 ± 2.8	39.8 ± 6.2	46.2 ± 2.9	9.047	0.000
Cinsiyet (Male)	54 (43.5%)	4 (20%)	58 (40.2%)	0.511	0.478
Cinsiyet (Female)	70 (56.5%)	16 F (80%)	86 (59.8%)	2.904	0.884
G (mg/dl)	99.4 ± 4.9	108.6 ± 36	100.5 ± 5.9	8.459	0.011
TK (mg/dl)	205 ± 7.9	209.4 ± 21	205.0 ± 9.4	3.127	0.026
HDL-K (mg/dl)	53.2 ± 3.4	49 ± 6.1	52.7 ± 3.0	1.674	0.172
LDL-K (mg/dl)	125.9 ± 8.1	141.9 ± 19.4	127.9 ± 7.3	3.119	0.026
TG (mg/dl)	126.1 ± 30.2	141.9 ± 20.4	122.4 ± 26.0	0.372	0.773

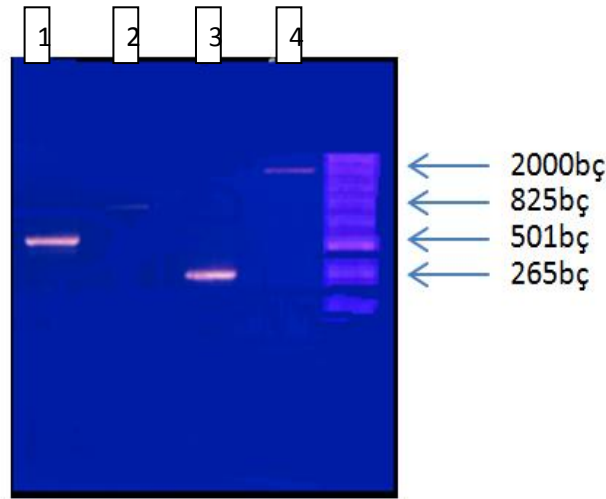
(Değişkenler hakkındaki sayısal veriler ortalama ± standart sapma olarak belirtilmiştir)

TABLO 4.1 Populasyonda rastgele seçilmiş gönüllü bireyler (Grup1), kardiyovasküler hastalığa sahip bireyler (Grup II) ve diyabet bireyler (Grup III) arasındaki metabolik verilerin genel olarak *Fisher-Kesinlik testi* ve *P-değerine* bakılarak karşılaştırılması: (G, Glukoz; TK, Total kolesterol; HDL-K, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol; LDL-K, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol; TG, Trigliserit)

4.3 Moleküler Genetik Analizler

4.3.1 *VDR* gen polimorfizm bölgelerinin PZR yöntemi kullanılarak çoğaltılması

Çalışılan gruplarda *VDR* gen polimorfizmlerinin PZR-RFLP yöntemiyle genotiplemesinin yapılmadan önce dört farklı gen bölgesi PZR yöntemiyle (Bölüm 3.2.3) gerekli primerler (Tablo 3.1) kullanılarak çoğaltılmıştır. Daha sonra elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezinde (Bölüm 3.2.5) yürütülerek amplifikasyon işleminin doğru bir şekilde yapıldığı her bir katılımcı için doğrulanmıştır (Şeki 4.1).



ŞEKİL 4.1. *VDR* gen polimorfizmlerinin PZR amplifikasyon sonrası agaroz jel elektroforez sonrası UV ışığı altındaki görünümü. Her bir polimorfizm bölgesinin kesim enzimlerinin kestiği noktalar göz önünde bulundurularak PZR ile çoğaltılan bölgeleri farklılıklar göstermektedir.(1: TaqI için 501 bç, 2: BsmI için 825 bç, 3: FokI için 265 bç'lık, 4: Apal için 2000 bç).

4.3.2 VDR gen polimorfizmlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu – Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP) ile Genotiplenmesi

4.3.2.1.FokI

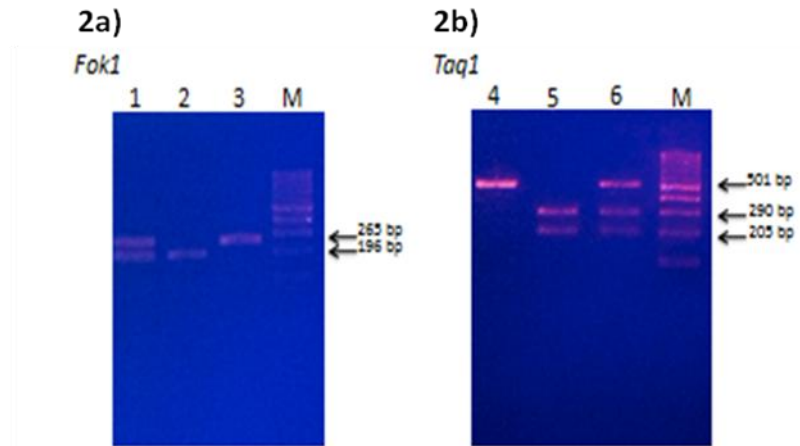
VDR geni FokI polimorfik bölgesinde 2. ekzondaki ATG'de bulunan T→C değişimi olur ve bunun sonucunda ATG, ACG'ye dönüşür. Böylece translasyon ikinci ATG'den başlar ve bu değişim sonrası *FokI* restriksiyon enzimi için kesim bölgesi ortaya çıkar. Bunun sonucunda FokI enzimi; 5'...G G A T G(N)92↓...3' ve 3'...C C T A C(N)13↑...5' DNA dizilerini tanıyıp kesim yapar (Dayangaç D. ve diğerleri., 2001; Zmuda J.M. ve diğerleri., 2000; Uitterlinden A.G. ve diğerleri., 2004; Denzer N. ve diğerleri., 2011; Valdivielso ve diğerleri., 2006).

FokI polimorfizmi için Sitozinden → Timine (T>C) nükleotit değişimi olmayan TT genotipi (FF) homozigot normal, TC genotipi (Ff) heterozigot ve CC genotip (ff) homozigot mutantdır. TT genotipli homozigot normal bireylerde 265 bç'lik tek bant, heterozigot bireylerde 265,196, 69 bç'lik üç bant, her iki allelinde değişim görülen homozigot mutant bireylerde 196,69 bp lik iki bant görüldü (Şekil 4.2a).

4.3.2.2 TaqI

VDR genindeki polimorfik değişim sonrası 9. ekzondaki T→C değişimi sonucunda ATT kodonu ATC'ye dönüşmesine sebep olur. İzolösin, normal ATT ve değişim sonucunda oluşan ATC kodonu (352. kodon) tarafından kodlandığından bu polimorfizm sessiz polimorfizm oluşturmaktadır (Zmuda JM. ve diğerleri, 2000; Dayangaç D. ve diğerleri, 2001). Bu değişim sonrasında 501 bç uzunluğundaki TaqI polimorfizm bölgesinin genotiplenmesi *TaqI* restriksiyon enzimi kullanılarak yapıldı. Bu enzim 5'... T↓C G A...3' be 3'...A G C↑ T...5' DNA dizisi üzerinden kesim yapmaktadır. Kesim enzimini tarafından tanınmayan ve Timin →Sitozin (T>C) nükleotit değişimi olmayan bireylerde elde edilen 501 bç'lik tek bant homozigot normal

TT (TT) genotipli bireyleri belirlerken, heterozigot TC genotipini (Tt) taşıyan birerlerde 501, 290, 205 bp'lık üç bant, her iki allelinde de değişim görülen homozigot bireyler ise CC genotipli (tt) bireylerde ise 290 ve 205 bp'lık iki bant görüldü (Bid ve diğerleri., 2005; Bid ve diğerleri, 2009; Kostner ve diğerleri., 2009) (Şekil 4.2b).



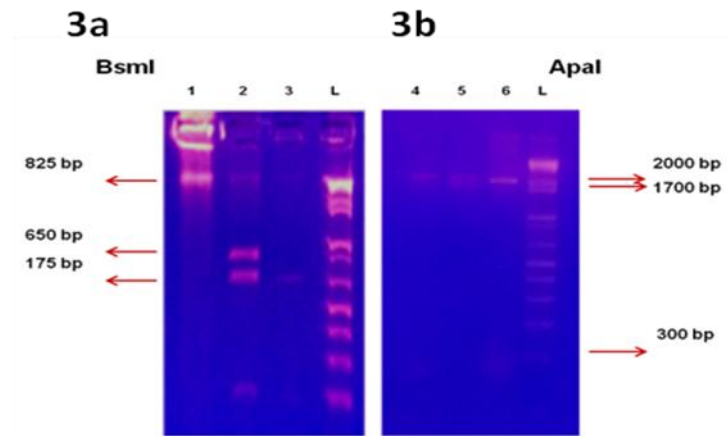
ŞEKİL 4. 2. PZR-RFLP yöntemi kullanılarak *VDR* geni *FokI* ve *TaqI* polimorfizm bölgelerinin genotiplendirilmesi a) *FokI* polimorfizm bölgesi olası üç genotipi sırası ile 1: Ff = TC (265 bp, 196 bp, 69 bp), 2: ff = CC (196 bp, 69 bp), 3: FF = TT (265 bp). b) *TaqI* polimorfizmi için sırasıyla olası üç genotip, 4: TT = TT (501 bp), 5:) tt = CC (290 bp, 205 bp), 6: Tt = TC (501 bp, 290 bp, 205 bp (M:1000 bp'lık DNA Ladder)

4.3.2.3 *Apal*

VDR polimorfizminin 8.intronun 5'ucundan 1280 baz çifti ilerde olan *Apal* polimorfizminin genotiplenmesi için *Apal* kesim enzimi kullanılarak, çoğaltılan bölgelerdeki DNA üzerinde 5'-GGGCC↓C-3' ve 3'-C↑CCGGG-5' dizilerini tanıyarak kesim işlemini gerçekleştirildi. PZR-RFLP işlemi sırasında çoğaltılan ve kesilen ürünlerde AA homozigot normal bireyler (AA) 2000 bp'nde tek bant, CC homozigot (aa) bireylerde 1700 bp ve 300 bp'inde iki bant ve bu polimorfizme göre heterozigot (Aa) AC bireyler ise 2000, 1700, 300 bp'lerinde üçlü bant görüldü (Şekil 4.3b) .

4.3.2.4 BsmI

VDR polimorfizminin intron 8 ile ekzon 9 arasında bulunan ve kodlanan proteinde amino asit dizisini değiştirmeyen TaqI gibi sessiz ve tek nükleotid bir polimorfizmidir (SNP). BsmI polimorfizm bölgesi, kodlanan proteinde amino asit dizisini değiştirmeyen sessiz bir tek nükleotid polimorfizmidir (SNP). BsmI polimorfizminin genotiplerinin belirlenmesi için *Mva1269I* kesim enzimi kullanıldı. Bu enzim PZR ürünlerini 5'...G A A T G C N↓...3' ve 3'...C T T A C↑ G N↓...5' dizilerini tanıyan yerlerde kesmektedir. PZR'de çoğaltılan 825 bç'lik gen bölgesi AA genotipli homozigot normal (bb) bireylerde tek bant, GG homozigot (BB) bireylerde iki bant (650 bç ve 175 bç), AG heterozigot (Bb) bireylerde ise genotipleme 825, 650, 175 bç'lerinde üçlü kesim noktası şekline görüldü (şekil 4.3a).



şEKİL 4.3. PZR-RFLP yöntemi kullanılarak *VDR* geni BsmI ve ApaI varyasyonlarının genotiplenmerinin gösterilmesi. a) BsmI polimorfizm bölgesi olası üç genotipi sırası ile 1: bb =AA (825 bç), 2: Bb = AG (825 bç, 650 bç, 175 bç), 3: BB = GG (650 bç, 175 bç). b) ApaI restriksiyon enzimi ile uygulamadan sonra oluşan üç genotip sırası ilke, 4: AA = AA (2000 bç), 5: Aa = AC (2000 bç, 1700 bç, 300 bç), 6: aa = CC (1700 bç, 300 bç). (M:1000 bç'lik DNA Ladder)

4.4 VDR gen polimorfizmlerinin populasyondaki genotip dağılımlarının Hardy Weinberg eşitliğine göre doğrulanması

Öncelikle VDR gen polimorfizm genotiplerinin Kuzey Kıbrıs populasyonda Hardy-Weinberg Eşitliğine uyumluluğu ve tek nükleotid polimorfizmine (SNP) bakılarak ardından, *two-tailed* t-testiyle istatistiksel olarak anlamlılıklarına bakılmıştır.

Yapılan her iki test sonucunda da ortaya çıkan genotiplemenin populasyonda gözlenen ve tahmini değerleri karşılaştırıldığında bazı parametrelerde anlam saptanmıştır (Tablo 4.2). Tablo 4.2’de her bir SNP’in Kuzey Kıbrıs populasyonu için allel frekansları da gösterilmiştir.

SNP Genotip	Beklenen	Gözlenen				
TT (FF)	175	178	Allel Frekansı		P değeri	0.391
TC (Ff)	119	113	T	74.68%		
CC (ff)	20	23	C	25.32%		
TT (TT)	127	120	Allel Frekansı		P değeri	0.088
TC (Tt)	138	152	T	64.70%		
CC (tt)	38	31	C	35.31%		
GG (BB)	164	160	Allel Frekansı		P değeri	0.148
GA (Bb)	96	105	G	77.27%		
AA (bb)	14	10	A	22.73%		
AA (AA)	121	123	Allel Frekansı		P değeri	0.703
AC (Aa)	135	132	A	64.29%		
CC (aa)	38	39	C	35.71%		

Tablo 4.2. VDR gen polimorfizmlerinin genotiplerinin Hardy-Weinberg Eşitliği ve *ki-kare* testine göre istatistiksel olarak anlamlılığına bakılması. Her bir polimorfizmin iki alleli için gözlenen ve beklenen değerler arasında fazla fark olmadığında, *P-değerlerinde* istatistiksel olarak bir anlam bulunmamıştır ($p > 0.005$). Ayrıca, her bir polimorfizmin her bir alleli için Kuzey Kıbrıs populasyonundaki allel frekansları da hesaplanmıştır.

4.5 VDR gen polimorfizmleri ile biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki

Genotipleme yapılan başlıca dört VDR gen polimorfizmleri ile hastalıkların ön tanısında ve KVH veya T2DM hastalıklarında birer belirteç olarak kullanılan Glukoz, Total Kolesterol, HDL-K, LDL-K ve Trigiliserid gibi biyokimyasal parametreler arasında olası bir bağlantının olup olmadığına bakıldı. Anket sonuçlarına göre biyokimya değerlerinden Glukoz ve LDL yüksekliği ön plana çıkmaktaydı. Bu nedenle verilerin hesaplanmasında öncelikle iki değer kullanılarak *two-tailed* t test yöntemi ile istatistiksel olarak anlamlılıklarına bakıldı (p-değer> 0.05). İstatistiksel anlamlılık testi, her bir parametre ile FokI, TaqI, BsmI ve ApaI VDR gen polimorfizmlerinin tüm çalışma grupları ile karşılaştırılmasını kapsamaktadır.

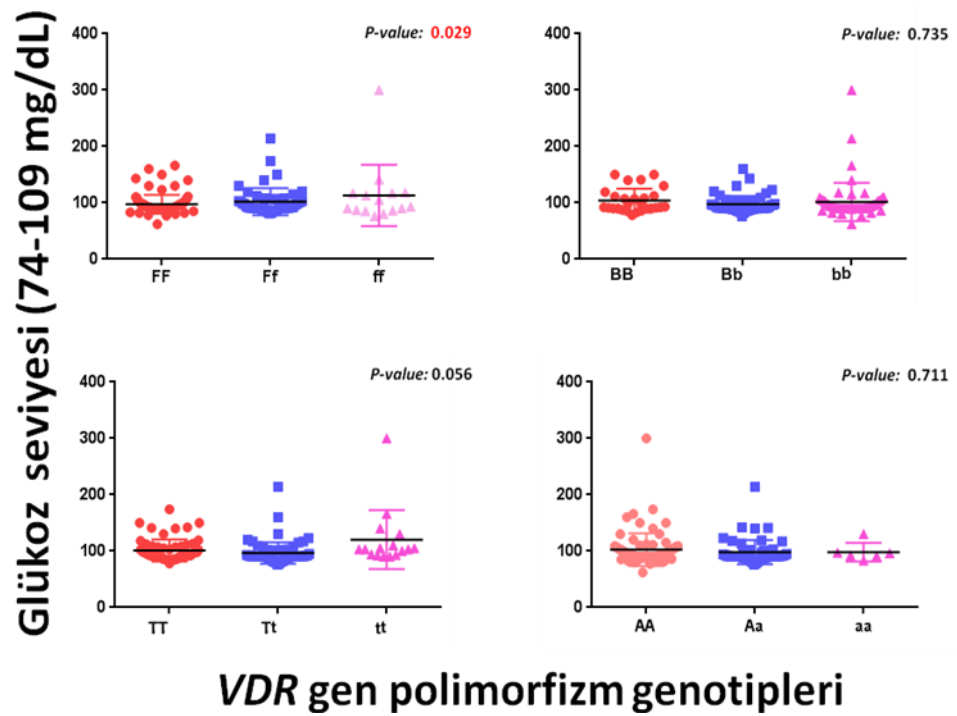
4.5.1 VDR gen polimorfizmleri ile glukoz seviyesi arasındaki olası bağlantı

Kandaki glukoz seviyesi (mg/dl) ile FokI polimorfizmlerinin genotip dağılımlarına bakıldığı zaman, FokI CC homozigot bireylerler daha önce KVH geçmiş olan ve buna ek olarak T2DM tanısı konulan katılımcıların, kandaki insulin seviyelerini dengeleyen ilaç kullanmalarına rağmen glukoz seviyelerinin rastgele seçilmiş topluluğa oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (*P-değeri*: 0.011). Kuzey Kıbrıs'da toplam 321 katılımcının glukoz değerleri ile FokI polimorfizm allellerini karşılaştırdığımız zaman ise genetik olarak T alleli taşıyan bireylerin daha düşük glukoz seviyesine sahip olduklarını, fakat FokI polimorfizm bölgesinde meydana gelen nükleotid değişikliğiyle C alleli taşıyan kişilerin glukoz seviyelerinde yükselme olduğunu saptadık (*P-değeri*: 0.024) (Tablo 4.3). Bu yanlış anlam polimorfizmi sonucu baskılayıcı C alleli metiyonin amino asidinden threonin amino asidine dönüştürür. Diğer yandan diğer üç VDR gen polimorfizm (TaqI, ApaI, BsmI) bölgesi ile kandaki serum glukoz seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantıya rastlanılmamıştır.

Fokl two tailed t-test	P-değeri	TaqI two tailed t-test	P- değeri	Bsml two tailed t-test	P- değeri	Apal two tailed t-test	P- değeri
TT vs CC	0,029	TT vs CC	0,112	GG vs AA	0,736	AA vs CC	0,712
TT vs TC	0,188	TT vs TC	0,220	GG vs GA	0,102	AA vs AC	0,352
TC vs CC	0,262	TC vs CC	0,056	GA vs AA	0,391	AC ve CC	0,983

Tablo 4.3. VDR gen polimorfizmleri allel dağılımları ile glukoz değerlerinin karşılaştırılması. Fokl C allelinin glukoz seviyesi üzerine bire bir doğrudan bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fakat diğer üç VDR gen polimorfizmi (TaqI, Bsml, Apal) ile kan serum glukozu seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunmamıştır.

VDR gen polimorfizmlerinin çalışma grubundaki genotipleri ile kişilerin glukoz seviyeleri arasındaki bağlantı Şekil 4.4’de gösterilmiştir. Fokl dışındaki diğer VDR gen polimorfizmlerine ait allellerin glukoz seviyeleri üzerindeki dağılımlarına bakıldığı zaman, allel dağılımlarının ve her bir polimorfik bölge için genotip dağılımlarının bir biriyle hemen hemen aynı olduğu gözlemlenmiş olup, yalnızca Fokl için bu durum C alleli lehindedir (*P-değeri*: 0.029).



Şekil 4.4. VDR gen polimorfizmlerine ait genotipler ile glukoz seviyesi dağılımının gösterilmesi. Her bir VDR gen polimorfizmine ait üç farklı genotipin glukoz seviyesine bağlı dağılımları grafiklerde gösterildiği gibidir. FokI polimorfizimdeki CC homozigotluğuna sahip bireylerin glukoz seviyesinin TT homozigot bireylere oranla daha yüksek olması istatistiksel olarak önem taşımaktadır (*P-değer*: 0.029). Diğer üç polimorfizm ile glukoz seviyesi arasında anlamlı bir bağlantı gözlenmemiştir.

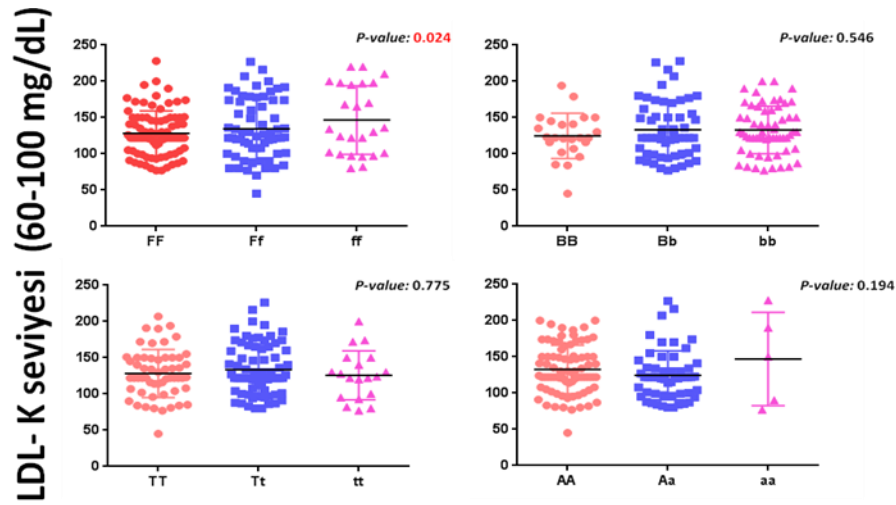
4.5.2 VDR gen polimorfizmleri ile LDL-K seviyesi arasındaki bağlantı

LDL-K seviyesi KVH ve T2DM tanısı konmuş gruplarda daha yüksek olarak ölçüldü. Buna ek olarak, kandaki serum glukoz seviyelerinde olduğu gibi düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL-K) parametresi ile VDR FokI polimorfizmi arasında da doğrudan bağlantı saptanmış olup bu durum istatistiksel olarak önem arz etmektedir (*P-değer*: 0.024) (Tablo 4.4). FokI polimorfizmine göre CC homozigot olan bireylerde LDL-K seviyesi daha yüksek ölçülmüştür. Sonuç olarak, CC fenotipinin FokI polimorfizmi için KVH geçmişi olan bireylerde daha sıklıkta olduğu saptanmış, bu SNP'in LDL-K seviyesinin artırmaya bağlı olarak kişilerde kardiyovasküler hastalık geçirme olasılığını artırdığı bulunmuştur.

<i>two tailed</i> t-test	P-değeri	<i>two tailed</i> t-test	P-değeri	<i>two tailed</i> t-test	P-değeri	<i>two tailed</i> t-test	P-değeri
TT vs CC	0,024	TT vs CC	0,775	GG vs AA	0,546	AA vs CC	0,381
TT vs TC	0,016	TT vs TC	0,384	GG vs GA	0,576	AA vs AC	0,165
TC vs CC	0,002	TC vs CC	0,085	GA vs AA	0,958	AC ve CC	0,194

Tablo 4.4. VDR gen polimorfizmleri allel dağılımları ile düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) değerlerinin karşılaştırılması. Fokl C allelinin LDL-K seviyesi üzerine bire bir doğrudan bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fakat Taql, BsmI ve Apal VDR gen polimorfizmleri ile LDL-K seviyesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır.

Şekil 4.5'de her bir VDR gen polimorfizminin genetik dağılımı ile LDL-K arasındaki bağlantı gösterilmiştir.



VDR gen polimorfizm fenotipleri

Şekil 4.5 VDR gen polimorfizmlerine ait genotipler ile düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-K) seviyesi dağılımının gösterilmesi. Her bir VDR gen polimorfizmine ait üç farklı genotipin LDL-K seviyesine bağlı dağılımları grafiklerde gösterildiği gibidir. Fokl polimorfizmdeki CC homozigotluğuna sahip bireylerin LDL-K seviyesinin TT homozigot bireylere oranla daha yüksek olması istatistiksel olarak önem taşımaktadır (*P-değer*: 0.024). Diğer üç VDR polimorfizmi (Taql, BsmI, Apal) ile glukoz seviyesi arasında anlamlı bir bağlantı gözlenmemiştir.

4.5.3 VDR Gen Polimorfizmleri ile Diğer Biyokimyasal Parametreler Arasındaki Bağlantı

Çalışılan popülasyonda VDR gen polimorfizmleri ile glukoz ve LDL-K seviyeleri dışında diğer biyokimyasal parametrelerden olan kolestrol, HDL-K ve trigliserid seviyeler arasındaki bağlantılara da bakıldı. Genotipleme yapılan dört VDR polimorfizmi ile (FokI, TaqI, BsmI ve ApaI) bu parametreler arasındaki istatistiksel olarak hiçbir bağlantı saptanmamıştır (Ek 1.1). Ayrıca Ek 1.2'de VDR gen polimorfizm genotiplerinin kolestrol, HDL-K ve trigliserid parametrelerine göre dağılımları gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre KVH ve T2DM geçmişi olan gruplar ile bu biyokimyasal parametrelerin (kolesterol, HDL-kolesterol ve trigliserid) VDR gen polimorfizmleri yönünden anlamlı bir bağlantısı bulunmamaktadır.

4.6 FokI rs2228570 C > T ve TaqI rs731236 C > T Polimorfizmleri Arasındaki Bağlantı Eşitliliği

4.6.1 Glukoz ve LDL-K Seviyeleri Arasındaki Genotip Etkinin Ölçülmesi

VDR geninde meydana gelen allel değişikliklerinin biyokimyasal bulgular üzerindeki etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için, bağlantı eşitliliği olduğu düşünülen aynı haplotip üzerinde bulunan allellerin etkilerine ve VDR geni genotip ve biyokimyasal bulgular arasındaki ilişki analizlerine bakıldı (Bölüm 4.4). VDR FokI C alleli taşıyan kişilerin hem kandaki serum glukoz seviyesinin hem de LDL-K seviyelerinin FokI T alleli taşıyan kişilere göre daha yüksek olduğu görüldü (*P-değeri*: 0.029). Ayrıca VDR TaqI C alleli taşıyan kişilerde (istatistiksel açıdan anlamlılığa yakın olduğu için) glukoz seviyesinin TaqI T alleli taşıyan kişilere göre daha yüksek olduğu görüldü. Dolayısı ile, FokI ve TaqI polimorfizmleri arasındaki olası bağlantının anlaşılması ve bu polimorfizmlere ait glukoz ve LDL-K seviyelerini artıran baskılayıcı favori C allelleri arasındaki etkileşimin daha iyi anlaşılabilmesi için, aynı haplotip üzerinde bulunan allellerin bağlantı eşitliliklerine bakıldı.

Kıbrıs popülasyonunda, FokI ve TaqI genotiplerinin istatistiksel anlamlılıklarının karşılaştırılması sonucunda çalışılan FokI C allelinin TaqI C allelinden bağımsız kendi başına LDL-K seviyesinin artmasında etkili olduğu ve LDL-K kararsızlığında major allel olduğu saptandı. Bununla birlikte VDR FokI CC homozigotluğunun LDL-K yolağı üzerindeki etkisinin VDR FokI TC heterozigotluğu'ndan daha güçlü olduğu saptandı (*P-değeri*: 0.048). Tablo 4.5'de VDR FokI ve Taq1 polimorfik bölgelerine ait allellerinin oluşturdukları genotipler ve olası bağlantı eşitliklerinin istatistiksel değerlendirmesini göstermektedir. EK 1.3'de glukoz ve LDL-K parametrelerinin olası dokuz genotipe göre hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve standart hataları gösterilmektedir.

	LDL-K	Glukoz		LDL-K	Glukoz
Bağlantı eşitliliği olan genotipler	<i>P-değeri</i>	<i>P-değeri</i>	Bağlantı eşitliliği olan genotipler	<i>P-değeri</i>	<i>P-değeri</i>
TTTT vs TTTC	0.205	0.331	TCTT vs CCTT	0.264	0.421
TTTT vs TTCC	0.802	0.791	TCTC vs CCTT	0.048	0.871
TTTC vs TTCC	0.277	0.33919	TCCCvs CCTT	0.055	0.844
TTTT vs TCTT	0.245	0.970	TTTT vs CCTC	0.502	0.806
TTTC vs TCTT	0.783	0.345	TTTC vs CCTC	0.189	0.782
TTCC vs TCTT	0.339	0.82209	TTCC vs CCTC	0.704	0.745
TTTT vsTCTC	0.008	0.811	TCTT vs CCTC	0.271	0.779
TTTC vs TCTC	0.056	0.123	TCTC vs CCTC	0.058	0.599
TTCC vs TCTC	0.052	0.811	TCCC vs CCTC	0.704	0.326
TCTT vs TCTC	0.256	0.567	CCTT vs CCTC	0.911	0.438
TTTT vs TCCC	0.245	0.277	TTTT vs CCCC	0.863	0.194
TTTC vs TCCC	0.746	0.048	TTTC vs CCCC	0.888	0.054
TTCC vs TCCC	0.251	0.581	TTCC vs CCCC	0.819	0.430
TCTT vs TCCC	0.939	0.279	TCTT vs CCCC	0.870	0.156
TCTC vs TCCC	0.406	0.731	TCTC vs CCCC	0.607	0.498
TTTT vs CCTT	0.540	0.414	TCCC vs CCCC	0.720	0.467
TTTC vs CCTT	0.188	0.102	CCTT vs CCCC	0.590	0.428
TTCCvs CCTT	0.751	0.710	CCTC vs CCCC	0.597	0.215

Tablo 4.5. VDR FokI ve TaqI polimorfik bölgelerine ait allellerin (her ikisi içinde allel T ve C) oluşturdukları genotiplerin olası bağlantı eşitliklerinin ve istatistiksel değerlerinin gösterilmesi. Bu sonuçlara göre VDR geni FokI C alleli hata-onarımı sırasında favori allel olarak seçilmektedir ve bu da LDL-K yolağı üzerinde etkili olmakta ve LDL-K kararsızlığı yaratmaktadır. Bununla birlikte FokI CC homozigotluğu diğer TC heterozigotluğundan daha güçlü bir etkiye sahiptir. Kuzey Kıbrıs popülasyonunda FokI polimorfik bölgesi aksine TaqI C allelinin, düşünüldüğü gibi, ne LDL-K yolağında ne de kan serum glukoz yolağında bir etkisi yoktur.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, D Vitamini Reseptör (VDR) geninin metabolik hastalıklara olan yatkınlığın belirlenmesinde bir biyomarker olarak kullanılıp kullanılamayacağını belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti toplumunda en sık görülen metabolik hastalıklarından olan kalp - damar hastalıklarının VDR polimorfizmi ile bağlantısının incelendiği ilk araştırma olma niteliğindedir. Çalışmamızda VDR gen varyantlarının aktivite baskılayıcı allellerinin, diyabet ve kardiovasküler hastalıklar gibi metabolik hastalıklarda önemli rol oynayan glukoz, total kolesterol ve LDL-kolesterol seviyelerini artırıcı bir rolü olduğu gösterilmiştir.

Vitamin D reseptör (VDR) geni bir çok farklı dokularda ekspre edilebilir (Şekil 2.5) (Helen L. Henry, 2011). VDR gen polimorfizmi ve D vitamini eksikliğinin, daha önce obezite gibi bir çok metabolik sendrom ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür. Bu kapsamda çalışmamız VDR geni polimorfizmi ve metabolik hastalıklar arasındaki bağlantı üzerine yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır.

Çalışmamızda daha önce kardiyovasküler hastalıklar (KVH) tanısı konmuş 144 kişi ve bu hastalıkları daha önce geçirmemiş 177 kişiden oluşan gönüllülük esasına göre rastgele seçilmiş toplam 321 katılımcıdan oluşmaktadır. Toplam 321 bireyde VDR geni FokI, TaqI, ApaI ve BsmI polimorfizmlerinin allel ve genotip, frekansları hesaplanmış, 'Hardy-Weinberg' dengesine uyup uymadığına bakmak amacıyla χ^2 testi kullanılmıştır. 'Hardy-Weinberg' ve χ^2 testleri sonucunda FokI, TaqI, ApaI ve BsmI polimorfizmlerinin dengede olduğu saptanmıştır.

Kuzey Kıbrıs Türk populasyonunda BsmI (p:0.273) ve Apal (p:0.103) polimorfizmleri ile glukoz, total kolesterol, HDL-kolesterol, trigliserid ve LDL-kolesterol seviyeleri istatistiksel bir anlamlılık saptanmazken sonuçlarımız FokI CC homozigotluğunun KVV risk faktörleri arasında yer alan glukoz, total kolesterol ve LDL-kolesterol değerlerini etkilediği ve CC homozigot bireylerinde KVV'nin olan yatkınlığının belirlenmesinde önemli bir belirteç olabileceğini ileri sürmesi açısından önem arz etmektedir. LDL - kolesterol ve FokI arasında anlamlı bir bağlantı bulunmuş olup, FokI CC genotipi taşıyan bireylerde LDL-kolesterol değerlerinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar FokI CC genotipinin LDL-profilinde rol oynayabileceğini ve dolayısı ile LDL yüksekliğine bağlı kardiyovasküler hastalıklar ve damar hastalıklarına yakalanma risklerinin artmış olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız sonucunda, HDL-kolesterol, trigliserid ile VDR gen polimorfizmleri arasında bir ilişki gözlenmezken, VDR gen polimorfizmleri, glukoz, total kolesterol, LDL-kolesterol arasında doğru orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır.

VDR geni FokI CC ve TaqI CC homozigot polimorfizmi taşıyan bireylerde glukoz, total kolesterol ve LDL-kolesterol yüksek olduğu gözlenmiş olup FokI CC ve TaqI CC homozigotluğunun KVV yatkınlığını artırıcı bir etkisi olduğu saptanmıştır. Sonuçlarımız, FokI ve TaqI polimorfizmlerinin yüksek kolesterol ve glukoz düzeyi ile KVV yakalanma riskini 2 kat artırdığını ortaya koymaktadır. Bu sonuç göz önünde bulundurularak, bu polimorfizmlerin KVV yatkınlığı için bir biyomarker olarak kullanılabileceğini ileri sürmekteyiz (Tablo 4.5).

Kardiyovasküler hastalıklar açısından bakıldığı zaman, Karayi populasyonunda FokI polimorfizmi ile trigliserid ve HDL kolesterol arasında anlamlı bir bağlantı bulunmasına rağmen, BsmI ve TaqI polimorfizmleri arasında bir bağlantı görülmemiştir (Skaaby T, 2015). Bizim çalışmamız sonucunda ise çalışılan VDR geni FokI, TaqI, Apal ve BsmI polimorfizmleri ile

HDL- kolesterol arasında bir bağlantı bulunmamıştır. Böylelikle bu konu üzerindeki farklı görüşlere bir katkı da bu çalışma ile yapılmıştır.

Fleck A ve diğerlerinin gerçekleştirdikleri ekolojik çalışmalarda ekvatordan uzaklaştıkça hipertansiyon ve kardiyovasküler hastalık (KVH) oranlarının arttığı bildirilmiş (Fleck A.,ve *diğerleri*, 1989) olup vitamin D düşüklüğünde arteriyel hipertansiyon insidansı ve prevalansı arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (Burgaz a., ve *diğerleri*, 2010). Birçok çalışmada kan lipidleri (total kolesterol, HDL kolesterol, LDL- kolesterol, trigliserid) ve koagülasyon parametreleri (PT/INR) gibi kardiyovasküler risk faktörleri ile D vitamini ilişkisi araştırılmıştır, fakat kesin sonuca varabilmek için elimizde bulunan veriler hala yetersizdir (Pilz S.,ve *diğerleri*,2011).

Son yıllarda yapılan çalışmalar da VDR geni ve tip1 diyabet arasında bir bağlantı olduğu gösterilmiştir *Al-Daghri NM ve diğerlerinin* yaptıkları çalışmada Asya popülasyonunda FokI ve BsmI polimorfizmlerinin tip1 diyabet ile, Doğu Asya popülasyonunda BsmI polimorfizm ile Tip1 diyabet, Batı Asya popülasyonunda ise FokI polimorfizmleri ile Tip 1 diyabet arasında bağlantı olduğu gösterilmiştir (*Al-Daghri NM ve diğerleri*, 2011). Çalışmamızda metabolik hastalıklarda etkili olan biyokimyasal bulgulara bakıldığı zaman BsmI polimorfizminin BMI (body mass index) ve FokI polimorfizminin ise insülin duyarlılığı ve HDL kolesterol düzeyi ile bağlantılı olduğu saptanmıştır.

Kuzey kürede yaşayan bireylerde Tip 1 DM'un daha sık görülmesi ve Tip 1 DM'un mevsimsel özellik göstermesi, bu hastalığın patofizyolojisinde Vitamin D'nin olası rolünü düşündürmüştür. Tüm dünyada 51 ülkede 1990-1994 yılları arasında 14 yaş altında Tip 1 DM insidansı araştırılmış ve UV-B ışını alan bölgelerde insidansın oldukça düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, UV-B ışınının ciltte 7 dehidrokolesterolü D vitaminine dönüştürdüğü ve otoimmüniteye karşı koruyucu olduğu bilinmektedir (Cantorna MT, ve *diğerleri*, 2004).

Tip 1 DM patogenezinde genetik yatkınlık da oldukça önemlidir. 1- α -Hidroksilaz ve VDR gen polimorfizmlerinin Tip 1 DM gelişiminde rol oynayabileceği bilinmektedir. 1- α -Hidroksilaz gen polimorfizmi ile enzimin bölgesel ekspresyonu azalmakta ve dolayısıyla aktif hormon düzeyi düşmektedir. Farklı popülasyonlarda gerçekleştirilen çalışmalarda VDR gen polimorfizmi ve Tip 1 DM arasındaki ilişki araştırılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir (Chang J. ve diğerleri, 2000; Guo SW. ve diğerleri., 2006).

Hindistan, Almanya, Japonya ve Tayvan'da yapılan meta analiz çalışmalarında VDR gen polimorfizmi ile DM (Diabetes Mellitus) arasında anlamlı bir ilişki saptandığı bildirilmiş olup (Chang J. ve diğerleri, 2000)(Guo SW. ve diğerleri., 2006) Finlandiya, Portekiz ve İngiltere'de yapılan popülasyon çalışmalarında ise bir ilişki bulunamamıştır (Valdivielso JM. ve diğerleri, 2006; Lemosm C ve diğerleri., 2008).

Kocabaş ve diğerlerinin Türkiye'de 90 Tip 1 DM hastasının VDR polimorfizmi açısından incelendiği çalışmada kontrol grubu ile hasta popülasyonu arasında polimorfizm açısından fark gösterilememiştir (Kocabaş A ve diğerleri., 2010)Öte yandan VDR polimorfizmleri ile Tip 2 DM arasındaki ilişkiyi destekler şekilde Apal polimorfizmi Tip 2 DM ile Bsml polimorfizmi ise insülin direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Uitterlinden AG, ve diğerleri., 2004). Genç erişkinlerde yapılan bir çalışmada, düşük fiziksel aktive ve Bsml polimorfizminin daha yüksek açlık kan glukozu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dilmeç ve diğerlerinin yaptığı çalışmada ise Tip 2 DM ile VDR gen polimorfizmleri arasında ilişki olduğu gösterilememiştir (Dilmeç F, ve diğerleri, 2010). Danimarka ve Yunanistan popülasyonlarında yapılan araştırma sonucunda da T2DM ie VDR arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. (Vasilopoulos Y. ve diğerleri, 2013). Kuzey Hindistan popülasyonunda Arjumand ve diğerlerinin yaptıkları çalışmada Bsml (FFBbtt) genotipi ile T2DM arasında anlamlı bir bağlantı bulmuştur. Hemant Kumar BID ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, Caucasian popülasyonunda Bsml polimorfizmi ile T2DM, Asya popülasyonunda Apal polimorfizmi ile T2DM arasında anlamlı bağlantı bulunurken, Polonya popülasyonun da VDR

polimorfizmleri ile metabolik hastalıklar arasında herhangi bir bağlantı bulunmamıştır (Hemant K BID,2005).

Bu çalışmada, glukoz seviyesi (mg/dl) ile Fokl polimorfizmlerinin genotip dağılımlarına baktığımız zaman, Fokl homozigot bireyler daha önce KVH geçmişi olan ve T2DM tanısı konulan katılımcıların, kandaki insulin seviyelerini dengeleyen ilaç kullanmalarına rağmen glukoz seviyelerinin rastgele seçilmiş topluluğa oranla daha yüksek olduğu gösterilmiştir (*P-değeri*: 0.011). Toplam 321 katılımcıdan oluşan çalışma grubumuzun glukoz değerleri ile Fokl polimorfizm allellerini karşılaştırdığımız zaman ise T alleli taşıyan bireylerin daha düşük glukoz seviyesine sahip olduklarını, fakat Fokl bölgesinde meydana gelen nükleotid değişikliğiyle C alleli taşıyan kişilerin Glukoz seviyelerinde yükselme olduğunu saptanmıştır (*P-değeri*: 0.024). Diğer üç VDR gen polimorfizmine bakıldığı zaman ise (Taql, Apal, Bsml) kandaki serum glukoz seviyesi istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemiştir. Farklı etnik popülasyonlarda Fokl ve Taql polimorfizmleri ile T2DM arasındaki ilişki üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen farklı sonuçlar henüz olayın patofizyolojik mekanizmasını açıklamak için yeterli değildir.

Vitamin D'nin insülin salgılanmasını modüle ettiği ve bundan dolayı da T2DM gelişiminde VDR varyantlarının katkısı olabileceği birçok çalışmada ifade edilmiştir. T2DM gelişiminde glukoz düzeyi ve VDR gen polimorfizmi arasındaki bağlantının hastalık takibi ve hastalığın erken tanısında bir biyobelirteç olarak değerlendirilebileceği bildirilmektedir (Palomer X, ve diğerleri, 2008).

Hirai ve diğerlerinin yaptığı çalışmada VDR polimorfizminin sağlıklı ve normal glukoz değerine sahip olan beyaz ırkta insülin sensitivitesi ile ilişkili olup glukoz metabolizmasını da etkilediği bildirilmiştir (Hirai M ve diğerleri, 2001).

VDR deki genetik değişiklik veya değişiklikler, tip 2 diabetes mellitus patogenezi, kalsiyum metabolizması, adiposit fonksiyonunun modülasyonu

ayrıca, insülin salgılanması ve sitokin ekspresyonunun değiştirilmesi olarak en az 4 yolak üzerinden etki edebilir (Christakos ve diğerleri, 2003). D vitamini, aktive edilmiş T lenfositleri tarafından üretilen interlökin ekspresyonunu inhibe etmektedir (Mahon ve diğerleri, 2003). Bu nedenle, vitamin D kendi reseptörü ve sonrasındaki sinyal yolağının inhibisyonunu ve sitokin salgılama profilini değiştirebilmektedir. Bu konunun aydınlatılması genom çalışmaları ve büyük verilerle ileri kohort çalışmalar ve tetkikler gerektirmektedir.

Türk popülasyonunda Vitamin D ve metabolik hastalıkların görülme sıklığının yüksek olması, metabolik sendrom ve etkenlerinin önemli bir role sahip olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Erken yaşta metabolik hastalığı olan bireyleri belirlemek önemli olmakla birlikte yoğun yaşam tarzı ve buna bağlı kardiyometabolik hastalık riskini azaltmak için bu çalışma sonuçları bir risk faktörü belirlemelemede yol gösterici olarak kullanılabilir. Bu hipotezin daha geniş bir hasta popülasyonu ile yapılacak çalışmalar ile doğrulanmasıda sonuçları güçlendirecektir. Buna ilavetten, yapılacak geniş genom çalışmaları ile metabolik hastalıklar ve VDR polimorfizmleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi gerekmektedir. Epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda D vitamini eksikliği ile kardiyovasküler hastalıklar arasında önemli bir bağlantı olduğu gösterilmiş ve D vitamini eksikliğinin kalp ve damar hastalıklarına yatkınlığı artırdığı gösterilmiştir.

Tablo 5.1 VDR geni polimorfizmi ve çeşitli hastalıklar arasındaki ilişkinin araştırıldığı çalışmalar.

Araştırmacı	Etnik Grup	Çalışılan Polimorfizmler	Çalışılan Hastalık	İlişki
Amal M.H.Mackawy ve Mohammed E. H Badawi, 2014	Mısır Populasyonu	FokI ve BsmI	T2DM	FokI polimorfizm TT genotip ile anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Malecki ve diğerleri, 2003	Polonya Populasyonu	FokI, TaqI, BsmI ve ApaI	T2DM	İlişki bulunamamıştır.
Bid ve diğerleri, 2009	Kuzey Hint Populasyonu	FokI, TaqI, BsmI ve ApaI	T2DM	İlişki bulunamamıştır.
Jose M. V ve diğerleri, 2006	Beyaz Irk	TaqI, BsmI ve ApaI	Prostat Kanseri	ApaI polimorfizmi 'a' alleli risk faktörü oluşturduğu bulunmuştur.
Veysel ve diğerleri, 2013	Beyaz Irk	FokI, TaqI, ApaI ve BsmI	Kalp ve Damar Hastalıkları	VDR polimorfizimleri ile anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Ozaki ve diğerleri, 2000	Japon ve Çin populasyonu	FokI, TaqI, BsmI ve ApaI	Lupus erytematosus ta sendromu	BsmI polimorfizmi 'B' alleli ile bağlantı bulunmuştur.
Bellamy R ve diğerleri, 1999	Afrika populasyonu	TaqI	Tüberküloz	TaqI Polimorfizminin TT genotipinde tüberküloza karşı bir koruma olduğu bulunmuştur.
Lundin AC ve diğerleri, 1999;Schondorf ve arkadaşları, 2003;Curran J ve diğerleri,1999	Australia populasyonu	TaqI, BsmI ve ApaI	Meme kanseri	TaqI polimorfizmi ile meme kanseri metastazı arasında anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Speer G ve diğerleri, 2000	Beyaz Irk	BsmI	Kolon kanseri	Kolon kanseri ve BsmI polimorfizmi arasında anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Swapna N ve diğerleri, 2011	Indian populasyonu	FokI	Hipertansiyon	Anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Agnieszka Kempinska ve diğerleri, 2012	Polonya populasyonu	TaqI, ApaI ve BsmI	Primer Safra Sirozu	BsmI polimorfizmi ile anlamlı bağlantı bulunmuştur.
Yi Zhao ve diğerleri, 2014	Kuzey Çin populasyonu	FokI, TaqI, BsmI ve ApaI	Kardiyovasküler hastalıklar ve T2DM	BsmI polimorfizmi 'BB' genotipi ile anlamlı bağlantı bulunmuştur.

Amal ve diğerlerinin Mısır populasyonundaki VDR polimorfizmi ve metabolik sendrom çalışmasında metabolik sendroma sahip diyabet hastaları ile VDR 2228570 C>T (FokI) polimorfizmi arasında anlamlı bağlantı bulunmuş ve özellikle FokI polimorfizmi TT genotipine sahip bireylerde bu durumun çok daha önemli olduğu bildirilmiş olup anlamlı olarak bulunan gruptaki biyokimyasal parametrelere bakıldığında zaman yüksek trigliserid, LDL kolesterol ve düşük HDL kolesterol değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Diğer yandan VDR A>G (BsmI) alleleri ile Metabolik Sendromdaki diyabet arasında bağlantı bulunamamıştır. Çalışmanın devamı olarak lipid profili ile VDR polimorfizmi FokI ve BsmI arasında total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol ve trigliserid parametreleri açısından değerlendirildiğinde zaman da bir bağlantı gözlenememiştir (Amal MH, 2014). Amal ve diğerlerinin yapmış olduğu çalışmanın sonuçlarını Cantorna (2010) ve Schuch ve diğerlerinin (2013) çalışmaları desteklemektedir. Buna karşın Bid ve diğerlerinin (2009) Kuzey Hint populasyonu ve Malecki ve diğerlerinin (2003) Polonya polpulasyonundaki VDR polimorfizmleri (FokI, BsmI, ApaI ve TaqI) ile diyabet arasındaki çalışmalarda anlamlı bir bağlantı bulunamamıştır. Ortlepp ve diğerlerinin (2003) yapmış olduğu çalışmada BsmI VDR polimorfizmi ve glukoz arasında ise anlamlı bir bağlantı bulunmuştur. 321 katılımcının glukoz değerleri ile FokI polimorfizm allellerini karşılaştırdığımız zaman ise genetik olarak T alleli taşıyan bireylerin daha düşük glukoz seviyesine sahip olduklarını, fakat FokI polimorfizm bölgesinde meydana gelen nükleotid değişikliğiyle C alleli taşıyan kişilerin glukoz seviyelerinde yükselme olduğunu saptadık (*P-değeri*: 0.024). Diğer yandan diğer üç VDR gen polimorfizm (TaqI, ApaI, BsmI) bölgesi ile kandaki serum glukoz seviyesi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir bağlantıya rastlanılmamıştır. VDR polimorfizmlerinin birbirleri ve diğer gen varyantları arasında bulunan çok farklı sonuçların nedeni toplumlar arasındaki genetik varyasyon (polimorfizm) ya da maruz kalınan çevresel faktörler (UV, alkol, sigara) olarak açıklanabilir.

VDR geninin, glukoz üzerinde baskılayıcı allel olarak önemli bir etkisi olduğu ve diyabet, kalp-damar hastalıkları, metabolik hastalıklar olarak bilinen biyokimyasal parametrelerden total kolesterol ve LDL-kolesterol düzeyleri üzerindeki artan rolü kanıtlanmıştır. Çalışmamızda, CC fenotipi FokI polimorfizmi için KVH geçmişi olan bireylerde daha sıklıkta olduğu saptanmış olup, bu SNP'in LDL-K seviyesinin artırmaya bağlı olarak kişilerde kardiyovasküler hastalık geçirme olasılığını artırdığı bulunmuştur. Bu bulgular, VDR geninin FokI CC homozigot mutasyonunun metabolik sendromda risk faktörü açısından önemini ortaya koyan önemli bir faktördür. Metabolik hastalıkların erken tanısında FokI polimorfizmi CC homozigot bireyleri etkileyerek biyokimyasal parametreler (Glukoz, Total Kolesterol, HDL Kolesterol, LDL Kolesterol, Trigliserid) biyomarker olarak değerlendirilebilir. Bu çalışmanın sonucunda bu durum bir gösterge olarak ayrıca tavsiye edilmektedir. Ayrıca, bulunan sonuçlar doğrultusunda yapılan istatistiksel hesaplama sonuçları diğer populasyonlar arasındaki farklı bağlantılar ve çalışmalar ile birlikte tutarlı bulunmaktadır.

VDR polimorfizmlerinden biri olan FokI polimorfizmi ile glukoz ve LDL- kolesterol arasında bulunan anlamlı ve güçlü korelasyon bunun bize erken tanıda biyomarker olarak kullanılmasının yararlı olabileceğini göstermiştir. Ancak, aynı dokuda farklı hücreler tarafından verilen D vitamini cevabının çok heterojen olduğu da bilinen bir gerçektir.

Çalışılmış populasyonların yanı sıra farklı çalışma grupları, Taq I polimorfizmi ve diyabet arasında anlamlı bir bağ olduğunu göstermiştir (Hemant Kumar BID ve diğerleri, 2009). Kandaki glukoz seviyesi ile TaqI arasında güçlü ve anlamlı bir bağlantının olduğu bulunmuştur. Bu bulgu da, Taq I polimorfizminin etki mekanizmasını farklı yollar aracılığıyla yaptığını akla getirmektedir (Wei-Zhen Ye ve diğerleri, 2001).

Bizim çalışma sonuçlarımıza bakıldığı zaman, VDR geni FokI C alleli hata- onarımı sırasında baskın allel olarak seçilmekte ve bu durumda LDL-K yolağı üzerinde etkili olup LDL-K kararsızlığı yarattığı bulunmuştur. Bununla birlikte FokI CC homozigotluğu diğer TC heterozigotluğundan daha güçlü bir

etkiye sahiptir. Bizim çalışmamızın sonuçları, TaqI C allelinin LDL-K ve kan serum glukoz yolağında bir etkisi olmadığını göstermiştir.

Vücutta, pankreasta insulin salgısı arttığı zaman buna bağlı olarak glukoz seviyesi de değişmektedir. VDR geni FokI polimorfizmi genotipi, insulin seviyesi azaldığı zaman glukoz seviyesinin artması durumunda glukoz homeostazı ve insülin salgılanma mekanizmasına etki etmektedir (Heather M Ochs-Balcom, ve diğerleri, 2011). VDR polimorfizminin bu mekanizmada önemli bir rol oynadığı düşünülmekte olup bizim sonuçlarımızda da VDR'nin insülin salgılanmasını etkilediğini işaret eder yöndedir.

Bulgularımız çalışılan biyokimyasal parametreler (Total kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, trigliserid, glukoz) ile VDR gen varyantı aktivitesinin ilişkili olduğunu ileri sürmektedir. VDR gen polimorfizmlerinin glukoz ve LDL-kolesterol arasında doğrudan bir bağlantı olduğu, HDL kolesterol, kolesterol, trigliserid düzeyleri arasında ise indirekt bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir.

bu verilerin daha fazla hasta ve Vitamin D Reseptör geninin tüm ekzon,intron ve promotor bölgeleri taranarak daha geniş çalışmalar yapılarak doğrulanması bu çalışmanın anlamlılığını artıracaktır.

Türk populasyonunda Vitamin D eksikliği ve metabolik hastalıkların görülme sıklığının yüksek olması, VDR gen polimorfizimlerinin metabolik hastalıklar ın molekülerpatogenetizinde önemli bir role sahip olabileceği ihtimalini akla getirmektedir. Erken yaşta metabolik hastalılara olan yatkınlığı belirlemek kardiyo-metabolik hastalıklar ile karşılaşma riskini azaltmak açısından önem arz etmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, VDR polimorfizmleri (FokI, TaqI, BsmI ve ApaI) bilinen bir kişiye ileriye yönelik hangi hastalık risk grubu içerisinde bulunduğu olası risk bilgisi verilebilecek ve VDR polimorfizmi erken dönemde bir biyomarker olarak kullanılabilecektir. Böylelikle önceden risk grubunu bilerek yaşam tarzı ve beslenmede yapılacak değişikliklerle kişi kendisine daha kaliteli bir yaşam oluşturabilecektir.

VDR polimorfizmlerinden biri olan Fok I polimorfizmi ile glukoz ve LDL kolesterol arasında bulunan anlamlı ve güçlü korelasyon Fok I polimorfizminin diyabet yatkılığı için bir biyomarker olarak kullanılarak yararlı olabileceğini göstermiştir. Çalışmış popülasyonları yanı sıra farklı çalışma grupları, Taq I polimorfizmi ve diyabet arasında anlamlı bir bağ olduğunu göstermiştir. Glukoz ile TaqI arasında güçlü ve anlamlı bağlantı vardır. Taq I polimorfizminin etki mekanizmasını farklı yollar aracılığıyla yaptığını akla getirmektedir. Bilindiği gibi VDR geni polimorfizmlerinden FokI insülin pankreas salgısını artırıyor. Vücutta insülin salgılanması ile glukoz seviyesi değişmektedir. Azaldığı zaman buna uygun olarak glukoz seviyesi artmış olması durumunda VDR geni polimorfizmlerinden FokI genotipi glukoz homeostazında ve insülin salgılanmasında etki etmektedir .VDR polimorfizm mekanizmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir.

Bu sonuçlar doğrultusunda hastalık risk grubunda bulunan bir kişinin yaşam koşullarına (örneğin düzenli beslenme, sigara, alkol alışkanlığı ve stres faktörlerine) dikkat etmesi gerekmektedir. Bu koşullara dikkat ederek yaşam tarzındaki değişiklikler ile de yaşam kalitesi standartlarını yükseltmek mümkün olabilecektir.

6. KAYNAKLAR

A. Falchetti, C. Sferazza, C. Cepollaro, A. Gozzini, F. Del Monte ve diğeri (2007) Fokl polymorphism of the VDR gene correlates with parameters of bone mass and turnover in a female population of the Italian Island of Ispalpa, Calcif Tissue Int, 80:15-20. DOI:10.1007/s00223-005-0295-1.

Abbas S, Nieters A, Linseisen J ve diğeri (2008) Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes and postmenopausal breast cancer risk, Breast Cancer Res 10: P31.

Adorini L. (2005) Intervention in autoimmunity: the potential of vitamin D receptor agonists, Cell Immunol ; 233: 115-124

Al-Daghri NM, Al-Attas os, ve diğeri (2014) Association of VDR gene variants with factors related to the metabolic syndrome, type 2 diabetes and vitamin D deficiency, Gene, Jun 1;542(2):129-33.

Ambrish Mithal,MD, DM, Rebecca Shweta Gladwin, MD, Gurgaon, India, (2014) Vitamin D and Cardiovascular Health, Volume 3, Apr 2014. J Clin Prev Caridiol;3(2):49-54.

Andre G. Uitterlinden, Yue Fang, Joyce B, J, van Meurs, Huibert A. P. Pols, Johannes P. T. M. Van Leeuwen (2004) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms, Gene 338, 143-156.

Arash Hossein-Nezhad, Seyede Mahdieh Eshaghi, Zhila Maghbooli, Khadijeh Mirzaei, Mahmood Shirzad, Bryon Curletto and Tai C. (2014) The Role of Vitamin D Deficiency and Vitamin D Receptor Genotypes on the Degree of Collateralization in Patients with Suspected Coronary Artery Disease. BioMed Research International. Volume 2014 , Article ID 304250, 8 pages.

Audi L, Ramirez MG , Carrascosa A. (1999) Genetic determinants of bone mass. *Horm Res.* 51, 501-123.

Ayşe Tellioğlu ,Sibel Başaran (2013) Vitamin D in the Light of Current Knowledge . *Archives Medical Review Journal.*

Barbara Angel, Jose Luis Santos, Elena Carrasco, Cecilia Albala & Francisco Perez- Bravo (2004) *European Journal of Epidemiology* 19:1085-1087.

Baker AR, McDonnell DP, Hughes M, Crisp TM, Mangelsdorf DJ, Haussler MR, Pike JW, Shine J and O'Malley BW (1988) Cloning the expression of full length cDNA encoding human vitamin D receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3294-3298.

Barbara J. Boucher (2012) Is Vitamin D status relevant to metabolic syndrome?, *Dermato Endocrinology* 4:2, 212-224;April/May/June.

Belkız Öngen, Ceyda Kabaroğlu, Zuhail Parıldar (2008) Biochemical and laboratory evaluation of vitamin D. *Türk klinik biyokimya Derg*; 6(1):23-31.

Bellamy R, Ruwende C, Corrah T, ve diğerleri (1999) Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. *J Infect Dis* ;179(3):721–4.

Bibiana García-Bailo, MSc; Laura A. Da Costa, MSc; Paul Arora, MSc; Mohamed Karmali, MD; Ahmed El-Sohemy, PhD; Alaa Badawi, PhD, (2013) Plasma Vitamin D and Biomarkers of Cardiometabolic Disease Risk in Adult Canadians, 2007–2009. Volume 10 — June 06.

Bid HK, Konwar R, Aggarwal CG, Gautam S, Saxena M, Nayak VL, Banerjee M (2009) Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms and type 2 diabetes mellitus: a North Indian study. *Indian J Med Sci.* May;63(5):187-94. doi: 10.4103/0019-5359.53164.

Brighurst FR, Demoy MB, Kronenberg HM (2003) Vitamin D. *Williams Textbook of Endocrinology* (Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS ed). Tenth edition. Philadelphia, Saunders Elsevier; 1317-1323,

Cantorna MT, Mahon BD (2004) Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence. *Exp Biol Med*; 229:1136–42

Cantorna MT (2011) Why do T cells express the vitamin D receptor? *Ann N Y Acad Sci*; 1217:77-82.

Chang TJ, Lei HH, Yeh JI, ve diğerleri (2000) Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)*, May;52(5):575-80

Chang TJ, Lei HH, Yeh JI , ve diğerleri (2000) Vitamin D receptor gene polymorphisms influence susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Taiwanese population. *Clin Endocrinol (Oxf)*; 52:575-80.

Chantal Mathieu and Klaus Badenhoop (2005) Vitamin D and type 1 diabetes mellitus: state of the art. Doi:10.1016/j. Tem.2005.06.004.

Chen S, Sims GP, Chen XX, Gu YY, Chen S, Lipsky PE (2007) Modulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on human B cell differentiation. *J Immunol*; 179: 1634-1647.

Cheng JB, Levine MA, Bell NH (2004) Genetic evidence that the human CYP2R1 enzyme is a key vitamin 25-hydroxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* ;101: 7711-7755.

Cindy D. Davis John A. Milner (2011) Vitamin D and Cancer Prevention. J Nutrigenet Nutrigenomics 2011;4:1–11.

Cooper GS, Umbach DM (1996) Are vitamin D receptor polymorphisms associated with bone mineral density? A meta-analysis. J Bone Miner Res. Dec;11(12):1841-9.

CP Kovesdy and K Kalantar-Zadeh (2008) Vitamin D receptor activation and survival in chronic kidney disease.

Curran JE, Vaughan T, Lea RA, Weinstein SR, Morrison NA, Griffiths LR (1999) Association of a vitamin D receptor polymorphism with sporadic breast cancer development. Int J Cancer 10-12-1999;83(6):723–6.

Dayangaç Erden D, Karaduman A, Erdem yurter H. (2007) Polymorphisms of vitamin D receptor gene in Turkish familial psoriasis patients, Arch Dermatol Res. Dec;299(10):487-91, Epub 2007 Sep 1.

De Boer IH, Tinker LF, Connelly S, ve diğerleri, 2008, Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of incident diabetes in the Women's Health Initiative. Diabetes Care; 31:701-707.

DeLuca HF, Cantorna MT (2001) Vitamin D: its role and uses in immunology. FASEB J 2001; 15: 2579-2585.

DeLuca HF (2004) Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. J J Clin Nutr; 80: 1689-1696 1.

Denzer N, Vogt T, Reichrath J. (2011) Vitamin D receptor (VDR) polymorphisms and skin cancer: A systematic review. Dermato-Endocrinology; 3(3): 205-210.

Devaraj S, Jialal G, Cook T, ve diğerleri. (2011) Low vitamin D levels in Northern American adults with the metabolic syndrome. Horm Metab Res ;43:72-74.

Didem Dayangaç, ve diğerleri (2002) Sağlıklı Türk populasyonunda vitamin D Reseptör (VDR) gen polimorfizm analizi, Türk biyokimya dergisi, Cilt 27, Sayı:1

Diego Garcia , BARBARA Angel, Elena Carrasco, Cecilia Albala, Jose Luis Santos, Francisco Perez- Bravo (2007) VDR polymorphisms influence the immune response in type 1 diabetic children from Santiago, Chile, vol. 77, No:1, pp. 134-140

Dilmec F, Uzer E, Akkafa F, Kose E, van Kuilenburg AB. (2010) Detection of VDR gene Apal and TaqI polymorphisms in patients with type 2 diabetes mellitus using PCR-RFLP method in a Turkish population. J Diabetes Complications;24:186-91.

Dunning AM, McBride S, Gregory J. (1999) No association between androgen or vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of breast cancer. Carcinogenesis ;20(11):2131–5.

Dursun A. (2007) D vitamininin kemik metabolizması dışındaki etkileri. Beslenme Yenilikler I-II, Katkı Pediatri Dergisi;28: 225-234.

Evica Rajcan-Separovic (2012) Chromosome microarrays in human reproduction, Hum. Reprod. Update (September/October) 18 (5):555-567.

Farach-Carson MC, Ridall AL. Dual (1998) 1,25-dihydroxyvitamin D3 signal response pathways in osteoblasts: cross-talk between genomic and membrane-initiated pathways. *Am J Kidney Dis*; 31:729–742.

Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-plaksej J ve diğerleri (1998) Relationship between vitamin D receptor BSMI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. Aging male. Sep;11(3):134-9. Doi:10.1080/13685530802273426.

Filus A, Trzmiel A, Kuliczowska-Plaksej J, Tworowska U, Jedrzejuk D, Milewicz A & Medras M. (2008) Relationship between vitamin D receptor BsmI and FokI polymorphisms and anthropometric and biochemical parameters describing metabolic syndrome. *Aging Male* 11 134–139. (doi:10.1080/13685530802273426)

Fleck A. (1989) Latitude and ischaemic heart disease. *Lancet*:1:613.

Fuat Dilmeç, Elmas Uzer, Feridun Akkafa, Mehmet Nuri Turan (2012) Association of Vitamin D receptor gene BsmI G>A polymorphisms in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Harran üni. Tıp fakültesi dergisi* cilt9, sayı1.

Fuat DİLMEÇ, Abdullah ÖZGÖNÜL, Feridun AKKAFA, Ali UZUNKOY, André B.P. van KUILENBURG (2009) Determination of ApaI and TaqI Polymorphisms of VDR Gene in a Group of Turkish Patients with Colorectal Cancer. 18 UHOD Sayı / Number: 1 Cilt / Volume: 19 Yıl / Year.

García-Bailo B, Jamnik J, Da Costa LA, Badawi A, El-Sohemy A. (2013) Genetic variation in the vitamin D receptor, plasma 25-hydroxyvitamin D, and biomarkers of cardiometabolic disease in Caucasian young adults. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2013;6(4-5):256-67. doi: 10.1159/000354729. Epub Sep 27.

García-Bailo B, Josse AR, Jamnik J, Badawi A, El-Sohemy A. (2013) Positive association between 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein is confounded by hormonal contraceptive use. *J Womens Health (Larchmt)*. May;22(5):417-25. doi: 10.1089/jwh.2012.4046.

Grundberg E, Brändström H, Ribom EL, Ljunggren O, Mallmin H, Kindmark A. (2004) Genetic variation in the human vitamin D receptor is associated with muscle strength, fat mass and body weight in Swedish women., *Eur J Endocrinol.*, Mar;150(3):323-8.

Guo SW, Magnuson VL, Schiller JJ , ve diğerleri (2006) Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and type 1 diabetes: a HuGE review of genetic association studies. *Am J Epidemiol*; 164:711-24.

Guofeng Wang, Qingqing Zhang, Ning Xu ve diğerleri (2014) Associations between two polymorphisms (FokI and BsmI) of vitamin D receptor gene and Type 1 diabetes mellitus in Asian population:A meta-analysis. March 06, DOI:10.1371/journal.pone.0089325.

H. C. Vural and E. Maltas (2012) RT-Qpcr assay on the vitamin D receptor gene in type2 diabetes and hypertension patients in Turkey, *Genetics and Molecular Research* 11(1):582-590.

H. K. Bid, R. D. Mittal (2003) Study of vitamin D receptor (VDR) gene start codon polymorphism (FokI) in healthy individuals from North India. *Indian Journal of Human Genetics* July-December Volume 9 Issue 2.

Hannu Turpeinen, Robert Hermann, ve diğerleri (2003) Vitamin D receptor polymorphisms:no association with type 1 diabetes in the Finnish population. *European Journal of Endocrinology* 149 591-596.

Haussler MR, Mangelsdorf DJ, Komm BS, Terpening CM, Yamaoka K, Allegretto EA, Baker AR, Shine J, McDonnell DP and Hughes M. (1998) Molecular biology of vitamin D hormone. *Recent Prog Horm Res* 44: 263-305.

Heather M Ochs-Balcom, Raj Chennamaneni, Amy E Millen, Peter G Shields, Catalin Marian, Maurizio Trevisan, and Jo L Freudenheim (2011) Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr*; 93:5–10. Printed in USA.

Helen L. Henry (2011) Regulation of vitamin D metabolism. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.beem.05.003>

Heist RS, Zhou W, Wang Z, Liu G, Neuberger D, Su L, Asomaning K, Hollis BW, Lynch TJ, Wain JC, Giovannucci E, Christiani DC (2008) 25-hydroxyvitamin D, VDR polymorphisms, and survival in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 1;26(34):5596-602. doi: 10.1200/JCO.18.0406. Epub 2008 Oct 20.

Hemant K Bid , Dhruva K Mishra, Rama D Mittal (2005) Vitamin-D Receptor (VDR) Gene (Fok-I, Taq-I and Apa-I) polymorphisms in Healthy Individuals from North Indian Population, *ASIAN Pasific Journal of cancer Prevention*, Vol 6.

Hemant Kumar Bid, Rituraj Konwar, ve diğerleri (2009) Vitamin D receptor (FokI, BsmI and TaqI) gene polymorphisms ant type 2 diabetes mellitus:a north indian study. *Indian J Med Sci*. Vol. 63 no:5. May.

Hirai M ve diğerleri (2001) *Jclin Endocrinol Metab*. 2000 may;85(5):1951-3; Chiu KC ve diğerleri.*BMC med Genet*; 2:2.

Holick MF (2005) Vitamin D: important for prevention of osteoporosis, cardiovascular heart disease, type 1 diabetes, autoimmune diseases, and some cancers. *South Med J*; 98: 1024-1027

Holick MF (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancer and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*; 80 : 1678- 1688.

Huang CM, Wu MC, Wu JY, Tsai FJ (2002) Association of vitamin D receptor gene BsmI polymorphisms in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*;11(1):31–4.

Huibert A.P. Pols (2004) Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation toVitamin D related disease states. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 89–90, 187–193.

Hutchinson PE, Osborne JE, Lear JT, ve diğerleri (2000) Vitamin D receptor polymorphisms are associated with altered prognosis in patients with malignant melanoma. *Clin Cancer Res*; 6(2):498–504.

Ibhar Al Mheid, Riyaz S. Patel, Vin Tangpricha, Arshed A. Quyyum (2013) Vitamin D and Cardiovascular Disease. *Eur Heart J.*; 34(48):3691-3698.

Ibrahim Acikbas, Berna Sanlı, Emre Tepeli, Seniz Ergin, Sebnem Aktan, and Huseyin Bagc (2012) Vitamin D receptor gene polymorphisms and haplotypes (Apa I, Bsm I, Fok I, Taq I) in Turkish psoriasis patients. *Med Sci Monit*; 18(11): CR661–CR666.

Ikuyama T, Hamasaki T, Inatomi H, Katoh T, Muratani T, Matsumoto T. (2002) Association of vitamin D receptor gene polymorphism with renal cell carcinoma in Japanese. *Endocr J*; 49(4):433–8.

Ingles SA, Wang J, Coetzee GA, Lee ER, Frankl HD, Haile RW (2001) Vitamin D receptor polymorphisms and risk of colorectal adenomas (United States). *Cancer Causes Control*; 12(7):607–14.

Jenifer M Brown, Kristina Secinaro, Jonathan S Williams, Anand Vaidya (2013) Evaluating Hormonal Mechanisms of Vitamin D Receptor Agonist Therapy in Diabetic Kidney Disease: The VALIDATE-D Study. *BMC Endocr Disord.*; 13(33)

Jian Huang, Zheng-Fu Vie (2012) Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: A meta-analysis of case-control studies. *Journal of the Neurological Sciences* 313 (2012) 79-85.

Jones G. Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*; 243:7-13

Jorde R, Sneve M, Emaus N, ve diğerleri (2010) Cross-sectional and longitudinal relation between serum 25-hydroxyvitamin D and body mass index: the Tromso study. *Eur J Nutr*; 49:401-407.

Jose C. E. Serrano, David De Lorenzo, Anna Cassanye, ve diğerleri (2013) Vitamin D receptor Bsm1 polymorphism modulates soy intake and 25-hydroxyvitamin D supplementation benefits in cardiovascular disease risk factors profile. *Genes Nutr*, 8:561-569.

Jose M. Valdivielso, Elvira Fernandez (2006) Vitamin D receptor polymorphisms and diseases, *Clinica Chimica Acta* 371, 1-12.

Joseph M. Zmuda, Jane A. Cauley, and Robert E. Ferrell (2000) *Molecular Epidemiology of Vitamin D Receptor Gene Variants*, Vol. 22, No. 2.

Kamen DL, Tangpricha V. (2010) Vitamin D and molecular actions on the immune system: modulation of innate and autoimmunity. *J Mol Med (Berl)*; 88:441-50.

Kammerer CM, Dualan AA, Samollow PB, Perisse AR, Bauer RL, MacCluer JW, O'Leary DH & Mitchell BD. (2004) Bone mineral density, carotid artery intimal medial thickness, and the vitamin D receptor Bsm1 polymorphism in Mexican American women. *Calcified Tissue International* 75 292–298. (doi:10.1007/s00223-004-0215-9) 12 Ortlepp JR, Krantz C, Kimmel

Katherine D. Crew, Elizabeth Shane, Serge Cremers, Donald J. McMahon, Dinaz Irani Dawn L. Hershman (2009) High Prevalence of Vitamin D Deficiency Despite Supplementation in Premenopausal Women With Breast Cancer Undergoing Adjuvant Chemotherapy, *American Society of Clinical Oncology*.

Keitaro Yokoyama, Akio Nakashima, ve diğerleri (2012) Interactions between serum Vitamin D levels and Vitamin D receptor Gene Fok/Polymorphism for Renal Function in Patients with Type 2 Diabetes, December Volume 7 .

Ken C Chiu, Lee-Ming Chuang and Carol Yoon (2001) The vitamin D receptor polymorphism in the translation initiation codon is a risk factor for insulin resistance in glucose tolerant Caucasians. *BMC Medical Genetics*, 2:2

Khanh vinh quốc Lương¹ and Lan Thi Hoàng Nguyễn (2013) The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms. *Nutr J.*; 12: 89. , Published online Jun 25, 2013. doi: 10.1186/1475-2891-12-89.

Kim KÖSTNER, Nicole DENZER, Cornelia S.L. MÜLLER, Rolf KLEIN, Wolfgang TILGEN and Jörg REICHRATH (2009) The relevance of Vitamin D Receptor(VDR) Gene Polymorphisms for Cancer: A review of the Literature, *Anticancer research* 29:3511-3536 .

Kim HS, Newcomb PA, Ulrich CM, ve diğerleri (2001) Vitamin D receptor polymorphism and the risk of colorectal adenomas: evidence of interaction with dietary vitamin D and calcium. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* ;10(8):869–74

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ and Evans RM (1992) Retinoic X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 355:446-449.

Kocabaş A, Karagüzel G, Imir N, Yavuzer U, Akçurur S. (2010) Effects of vitamin D receptor gene polymorphisms on susceptibility to disease and bone mineral density in Turkish patients with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab*;23:12 89-97.

Kocatürk Sel ve Kasap, Arşiv (2011).

Köstner K, Denzer N, Müller CS, Klein R, Tilgen W, Reichrath J. (2009) The relevance of vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms for cancer: a review of the literature. *Anticancer Res.*, Sep;29(9):3511-36.

Labuda M, Fujiwara TM, Ross MV, Morgan K, Garcia Heras J, Ledbetter DH, Hughes MR and Glorieux FH (1992) Two hereditary defects related to vitamin D metabolism map to the same region of human chromosome 12q13-14. *J. Bone Miner Res* 7: 1447-1453.

Lei Li, Bo Wu, Ji-Yong Liu, Li-Bo Yang (2013) Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms and Type 2 Diabetes: A Meta-analysis, Volume 44, Issue 3, Pages 235-241, April.

Lemos MC, Fagulha A, Coutinho E , ve diğerleri (2008) Lack of association of vitamin D receptor gene polymorphisms with susceptibility to type 1 diabetes mellitus in the Portuguese population. *Hum Immunol*; 69:134-8.

Lewis SJ, Baker I, Smith GD (2005) Meta-analysis of vitamin D receptor polymorphisms and pulmonary tuberculosis risk. *Int J Tuberc Lung Dis* ;9(10):1174–7.

London GM, Guerin AP, Verbeke FH, ve diğerleri (2007) Mineral metabolism and arterial functions in end-stage renal disease: potential role of 25-hydroxyvitamin D deficiency. *J Am Soc Nephrol*;18:613-620.

Lundin AC, Soderkvist P, Eriksson B, Bergman-Jungstrom M, Wingren S. (1999) Association of breast cancer progression with a vitamin D receptor gene polymorphism. *Cancer Res* 15-5-1999;59(10):2332–4.

M.A. Tawfeek, F.A. Habib and Entessar Emam Mouhamed Saultan (2011) Vitamin D receptor Bsm1 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus: a Saudi study. *British Journal of Medicine & Medical Research*, ISSN: 2231-0614, Vol.: 1, Issue.: 4 (October-December).

Mark P. Purdue, Qing Lan, Anne Kricker, Claire M. Vajdic ve diğerleri (2007) Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of non-Hodgkin's lymphoma, *Haematologica/ the hematology journal*. 2007;92(08) /1145.

McCullough ML, Bostick RM, Mayo TL (2009) Vitamin D gene pathway polymorphism and risk of colorectal, breast, and prostate cancer. *Ann Rev Nutr*;29:111–132.

McQuaid SE, Hodson L, Neville MJ, Dennis AL, Cheeseman J, Humphreys SM, Ruge T, Gilbert M, Fielding BA, Frayn KN, Karpe F. (2011) Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: a driver for ectopic fat deposition? *Diabetes.*, Jan;60(1):47-55. doi: 10.2337/db10-0867. Epub 2010 Oct 13.

Mehtap Kdır (2013) D vitamininin immune system, deri ve kanser ile ilişkisi. *S.D.Ü Tıp Fakültesi Derg.* 2013;20(4)/158-161.

MG Bianco, L Minicucci, MG Calevo and R Lorini (2004) Vitamin D receptor polymorphisms: are they really associated with type 1 diabetes?. *European Journal of Endocrinology*, 151 641-642.

Mısırlıoğlu M, Görgün S. (2007) Agresif periodontitis'li Türk hastalarda Vitamin D Reseptör geni Apa I ve Taq I polimorfizimlerinin görülme sıklığı. , *Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*: 31:79–84.

Mizwicki MT, Norman AW. (2009) The vitamin D sterol vitamin D receptor ensemble model offers unique insights into both genomic and rapid response signaling. *Sci Signal* 2009;2: re4. 59.

Mohammad Kazemi Arababadi, Hamid Abousaidi, Gholamhossein Hassanshahi, Ali Akbar , Pourfathollah, Saeed Daneshmandi, Vajihe Akbarpour, Hamid Hakimi, Derek Kennedy (2011) Polymorphisms within Exon 9, But Not Intron 8, of the Vitamin D Receptor Gene Are Associated with Asthma. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* Vol. 14, No. 3, May-June 2011, 225-230 Received: Apr 21, 2010; Accepted: July 21, 2010

Mohammed I Khan, Zofia F. Bielecka, Mohammad Z. Najm, Ewa Bartnik, Jerzy S. Czarnecki, Anna M Czarnecka and Cezary Szczylik (2013) Vitamin D receptor gene polymorphisms in breast and renal cancer: Current state and future approaches (Review), Received September 18; Accepted October 29, 2013.

Morrison NA, Yeoman R, Kelly PJ, Eisman JA. (1992) Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. *Proc Natl Acad Sci USA* ; 89: 6665-6669.

Murray S, Parisi E, Cardus A, Craver L & Fernandez E. (2003) Influence of vitamin D receptor gene polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D on blood pressure in apparently healthy subjects. *Journal of Hypertension*, 21 2069–2075. (doi:10.1097/00004872-200311000-00016)

Muszkat P, Camargo MB, Griz LH, Lazaretti-Castro M. (2010) Evidence-based non-skeletal actions of vitamin D. *Arq Bras Endocrinol Metabol*; 54:110-117.

Nasser M Al-Daghri, Omar S Al-Attas, Majed S Alokail, Khalid M Alkharfy, Mansour Yousef, Shaun Louie Sabico and George P Chrousos (2011) Diabetes mellitus type 2 and other chronic non-communicable diseases in the central region, Saudi Arabia (riyadh cohort 2): a decade of an epidemic. *BMC Medicine*, 9:76 doi:10.1186/1741-7015-9-76

Nasser M. Al-Daghri, Omar Al-Attas, ve diğerleri (2012) Vitamin D receptor gene polymorphisms and HLA DRB1-04 cosegregation in Saudi type 2 diabetes patients, *J Immunol*. 2012 Feb 1;188(3):1325-32. doi: 10.4049/jimmunol.1101954. Epub 2012 Jan 4.

Natielen Jacques Schuch, Vivian Cristina Garcia, Sandra Roberta Gouvea Ferreira Vívoló and Lígia Araújo Martini (2013) Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of

metabolic syndrome. Schuch ve diğerleri. *Nutrition Journal*, *Nutrition Journal* 2013, 12:96 doi:10.1186/1475-2891-12-96.

Nedime SERAKINCI, Per GULDBERG, Jorge S BURNS, Basem ABDALLAH, Henrik SCHRODDER, Thomas JENSEN and Moustapha KASSEM (2004) Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23, 5095-5098.

Nemere I, Carson F. (1998) Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamin D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Com*; 248:442-449.

Newcomb PA, Kim H, Trentham-Dietz A, Farin F, Hunter D, Egan KM. (2002) Vitamin D receptor polymorphism and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* ;11(11):1503–4.

Nibbelink KA, Tishkoff DX, Hershey SD, ve diğerleri (2007) 1,25(OH)₂Vitamin D₃ actions on cell proliferation, size, gene expression, and receptor localisation, in the HL-1 cardiac myocyte. *J Steroid Biochem Mol Biol* ;103:533-537.

Norman AW (2011) From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *Am J Clin Nutr*. 2008;88:491S-499S. 0.1016/j.jbspin.2011.06.003. Epub, Aug 5

Norman AW. (1998) Receptors for 1,25(OH)₂D₃: past, present and future. *J Bone Miner Res*;13:1360-1369.

Norman AW (2006) Vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147: 5542-5548.

Ntais C, Polycarpou A, Ioannidis JPA. (2003) Vitamin D receptor gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*;12(12):1395–402.

Nunlee-Bland G, Gambhir K, Abrams C, ve diğerleri (2011) Vitamin D deficiency and insülin resistance in obese AfricanAmerican adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab*;24:29-33.

O'Connell TD, Berry JE, Jarvis AK, ve diğerleri (1997) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulation of cardiac myocyte proliferation and hypertrophy. *Am J Physiol* ;272:H1751- H1758.

O'Connell TD, Simpson RU. (1995) 1,25-dihydroxyvitamin D₃ regulation of myocardial growth and c-myc levels in the rat heart. *Biochem Biophys Res Commun*; 213:59-65.

Oakley-Girvan I, Feldman D, Eccleshall TR, Gallagher RP, Wu AH, Kolonel LN, ve diğerleri (2004) Risk of early-onset prostate cancer in relation to germ line polymorphisms of the vitamin D receptor. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 13 (8): 1325-1330.

Obara W, Suzuki Y, Kato K, Tanji S, Konda R and Fujioka T. (2007) Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with increased risk and progression of renal cell carcinoma in a Japanese population. *Int J Urol* 14: 483-487.

Ochs-Balcom HM¹, Chennamaneni R, Millen AE, Shields PG, Marian C, Trevisan M, Freudenheim JL. (2010) Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with adiposity phenotypes. *Am J Clin Nutr*. 2011 Jan;93(1):5-10. doi: 10.3945/ajcn.2010.29986. Epub 2010 Nov 3.

Ortlepp JR, Lauscher J, ve diğerleri (2001) The vitamin D receptor gene variants is associated with the prevalence of type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *Diabet Med*. Oct;18(10):842-5.

Ortlepp JR, Metrikat J, ve diğerleri (2003) The vitamin D receptor gene variant and physical activity predicts fasting glucose levels in healthy young men. *Diabet Med.*, Jun;20(6):451-4.

Ozaki Y, Nomura S, Nagahama M, Yoshimura C, Kagawa H, Fukuhara S. (2000) Vitamin-D receptor genotype and renal disorder in Japanese patients with systemic lupus erythematosus. *Nephron*; 85(1):86–91.

Ömer ATEŞ, Bilgen DÖLEK, Levent DALYAN, Ayşegül Topal-SARIKAYA, (2011) Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms in Rheumatoid Arthritis, Volume 26, Number 2, Page(s) 145-149.

Özkan B, Döneray H. (2011) D vitamininin iskelet sistemi dışı etkileri . *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2011; 54: 99-119.

Parmeet Kaur Manchanda, Aaron J Kibler, Mei Zhang, Janani Ravi, Hemant K Bid. (2012) Vitamin D receptor as a therapeutic target for benign prostatic hyperplasia : 28 :Issue : 4 : Page : 377-381

Peelen E, Knippenberg S, Muris AH , ve diğerleri (2011) Effects of vitamin D on the peripheral adaptive immune system: a review. *Autoimmun Rev*; 10:733-43.

Penna G, Adorini L. (2000) 1a,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J Immunol*; 164: 2405-2411

Peters U, McGlynn KA, Chatterjee N, ve diğerleri (2001) Vitamin D, calcium, and vitamin D receptor polymorphism in colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*;10(12):1267–74.

Pilz S, Tomaschitz A, Drechsler C, de Boer RA. (2011) Vitamin D deficiency and heart disease. *Kidney International Supplements*;1:111-115.

Pittas AG, Chung M, Trikalinos T, ve diğ erleri. (2010) Systematic review: Vitamin D and cardiometabolic outcomes. *Ann Intern Med*;152:307-314.

Puttachandra Prabhakar, Rita Christopher, Dindagur Nagaraja (2014) Vitamin D Receptor (VDR) gene polymorphism and risk of ischemic stroke. Prabhakar ve diğ erleri. *Molecular Cytogenetics*, 7(Suppl 1):P33

Renate T de Jongh, Paul Lips, Kelly J Rijs, Natasja M van Schoor, Mark H H Kramer, Jan P Vandenbroucke and Olaf M Dekkers (2011) Associations between vitamin D receptor genotypes and mortality in a cohort of older Dutch Individuals, *European Journal of Endocrinology* 164 75-82.

Rosen CJ, Adams JS, Bikle DD, ve diğ erleri (2012) The Nonskeletal effects of Vitamin D: an Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews* ;33:456-492.

S. Bonakdaran, M.R. Abbaszadegan, E. Dadkhah and M. Khajeh-Dalouie (2012) Vitamin D receptor gene polymorphisms in type 1 diabetes mellitus: a new pattern from Khorasan province, Islamic Republic of Iran. *EMHJ*. Vol 18.No:6.

Sabriye Bolluk, Gamze Akbulut (2013) Vitamin D and Diabetes Mellitus. *Türkiye Klinikleri J Endocrin*; 8(2):65-72.

Savaş Gürsoy, Emin Erdal, Belgin Alaşehirli, Ali Aydeniz, Nuran Erdal (2008) TaqI polymorphism of the Vitamin-D Receptor Gene and Quality of life in Postmenopausal Turkish Women, *Turk J Med Sci*; 38 (1):21-26 Tübitak.

Schondorf T, Eisberg C, Wassmer G, ve diğ erleri. (2003) Association of the vitamin D receptor genotype with bone metastases in breast cancer patients. *Oncology*; 64(2):154–9.

Schuch NJ¹, Garcia VC, Vívolo SR, Martini LA. (2013) Relationship between Vitamin D Receptor gene polymorphisms and the components of metabolic syndrome. *Nutr J.* Jul 15;12:96. doi: 10.1186/1475-2891-12-96.

Selvaraj P, Narayanan PR, Reetha AM. (2000) Association of vitamin D receptor genotypes with the susceptibility to pulmonary tuberculosis in female patients and resistance in female contacts. *Indian J Med Res*;111:172–9.

Sözen T. (2011) D hormonu: Güncel gelişmeler. *Hacettepe Tıp Dergisi* ;42:14-27.

Speer G, Dworak O, Cseh K, ve diğerleri (2000) Vitamin D receptor gene BsmI polymorphism correlates with erbB-2/HER-2 expression in human rectal cancer. *Oncology*;58(3):242–7.

Stumpf WE, Sar M, Reid FA, Tanaka Y and DeLuca HF (1979) Target cells for 1,25-dihydroxyvitamin D₃ in intestinal tract, stomach, kidney, skin, pituitary and parathyroid. *Science* 209: 1189-1190.

Sung CC, Liao MT, Lu KC, Wu CC. (2012) Role of vitamin D in insulin resistance. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:634195. doi: 10.1155/2012/634195. Epub 2012 Sep 3.

Szodoray P, Nakken B, Gaal J, Jonsson R, Szegedi A, Zold E. (2008) The complex role of vitamin D in autoimmune diseases. *Scand J Immunol* , 68(3): 261-269.

Takayoshi Tsutamoto, Keizo Nishiyama, Masayuki Yamaji, Chiho Kawahara, Masanori Fujii, Takashi Yamamoto and Minoru Horie (2009) Comparison of the long-term effects of candesartan and olmesartan on plasma angiotensin II and left ventricular mass index in patients with hypertension. *Hypertension Research* (2010) 33, 118–122; doi:10.1038/hr.2009.192; published online 20 November 2009.

Testa A, Mallamaci F, Benedetto F, Pisano A, Tripepi G, Thadhani R & Zoccali C. (2010) Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphism is associated with left ventricular (LV) mass and predicts LVH progression in end stage renal disease (ESRD) patients. *Journal of Bone and Mineral Research* 25 313–319, doi:10.1359/jbmr.090717.

Tizaoui K, Kaabachi W, Ouled Salah M, Ben Amor A, Hamzaoui A, Hamzaoui K. (2014) Vitamin D receptor TaqI and Apal polymorphisms: a comparative study in patients with Behçet's disease and Rheumatoid arthritis in Tunisian population. *Cell Immunol.* 2014 Jul;290(1):66-71. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.05.002. Epub 2014 May 17.

Tokita A, Matsumoto H, Morrison NA, *ve diğerleri* (1996) Vitamin D receptor alleles, bone mineral density and turnover in premenopausal Japanese women. *J Bone Miner Res* 11: 1003-1009.

Toptaş B, Kafadar AM, Cacina C, Turan S, Yurdum LM, Yiğitbaşı N, Gökçe MO, Zeybek U, Yaylım I. (2013) The vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms in Turkish brain cancer patients., *Biomed Res Int.* 2013;2013:295791. doi: 10.1155/2013/295791. Epub 2013 Apr 17.

Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. (2004) Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene*, 338:143-56.

Valdivielso J M, Fernandez E. (2006) Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta*, 371:1–12. 37.

Valdivielso JM , Fernandez E. (2006) Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clin Chim Acta* 2006;371:1-12.

Vaselin Skrabic, Tatijana Zemunik, Marjan Situm, Janos Terzic (2003) Vitamin D receptor polymorphism and susceptibility to type 1 diabetes in the Dalmatian population. Volume 59, Issue 1, pages 31-35, January.

Velayoudom- Cephise FL, Larifla L, Donnet JP, ve diğerleri (2011) Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diabetes metab.*, Dec;37(6):540-6.

Velayoudom-Cephise FL, Larifla L, Donnet JP, Maimaitiming S, Deloumeaux J, Blanchet A ve diğerleri. (2011) Vitamin D deficiency, vitamin D receptor gene polymorphisms and cardiovascular risk factors in Caribbean patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab.* 2011 Dec; 37(6):540-5. Doi:10.1016/j.diabet.2011.05.005. Epub 2011 Jul 18.

Veysel Kıdır (2013) D vitamininin kardiyovasküler ve metabolik etkileri. 2013;4(3): 398-404.

Vimaleswaran KS, Cavadino A, Berry DJ, 2013, Genetic Investigation of Anthropometric Traits (GIANT) Consortium, Whittaker JC, Power C, Järvelin MR, Hyppönen E. Genetic association analysis of vitamin D pathway with obesity traits. *Int J Obes (Lond)*. (2013) Oct;37(10):1399-406. doi: 10.1038/ijo.2013.6. Epub 2013 Feb 5.

Wei-Zhen, Andre F Reis, Daniele Dubois-Laforgue, ve diğerleri (2001) Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *European Journal of Endocrinology*, 145 181-186.

Yavuz Selim Yıldırım, Tayfun Apuhan, Selma Dizenli, Ali Osman Arslan (2013) Otosclerosis and vitamin D receptor gene polymorphism. American Journal of Otolaryngology, doi.org/10.1016/j.amjoto.2013.03.016, Volume 34, Issue 5, Pages 454–457.

Ye WZ, Reis AF, Dubois-Laforge D, Bellanné-Chantelot C, Timsit J, Velho G. (2001) Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. Eur J Endocrinol. 2001 Aug;145(2):181-6.

Yi Zhao, Sha Liao, Jun He, Yanan Jin, ve diğerleri (2014) Association of vitamin D receptor gene polymorphisms with metabolic syndrome: a case control design of population based cross sectional study in North China. Lipids in health and diseases, 13:129, doi:10.1186/1476-511X-13-129.

Yoichi Tachi, Hitomi Shimpuku, Yasuhiro Nosaka, Tatsuya Kawamura, Mitsuko Shinohara, Masatoshi Ueda, Hisao Imai, Kiyoshi Ohura (2003) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. Life Sciences 73, 3313-3321.

Yong-Heng Bai, Hong Lu, Dan Hong, Cheng-Cheng Lin, Zhen Yu, and Bi-Cheng Chen (2012) Vitamin D receptor gene polymorphisms and colorectal cancer risk: A systematic meta-analysis. World J Gastroenterol. Apr 14,18(14): 1672–1679.

Yoshiko Motohashi, Satoru Yamada, Tatsuo Yanagawa, Taro Maruyama ve diğerleri (2013) Vitamin D receptor gene polymorphism affects onset pattern of type 1 diabetes, J Clin Endocrinol Metab., Jul;88(7):3137-40.

Zahra Mohammadi, Fateme Fayyazbakhsh, Mehdi Ebrahimi, Mahsa M Amoli, ve diğerleri (2014) Association between vitamin D receptor gene polymorphisms (FokI and BsmI) and osteoporosis: a systematic review.

Journal of Diabetes&Metabolic disorders, 13:98, doi: 10.1186/s40200-014-0098-x .

Zhao G, Simpson RU. (2010) Membrane localization, caveolin-3 association and rapid actions of vitamin D receptor in cardiac myocytes. *Steroids*; 75:555–559.

Zhou H, Xu C and Gu M. (2009) Vitamin D receptor (VDR) gene polymorphisms and Graves' disease: a meta-analysis. *Clin Endocrinol (Oxf)* 70: 938-945.

Zhou TB, Jiang ZP, Huang MF (2014) Association of vitamin receptor BSMI (rs 1544410) gene polymorphism with the chronic kidney disease susceptibility. *J recept Transduct Res.*, Jun 11:1-4.

Zhou TB, Jiang ZP, Huang MF, Su N. (2014) Association of vitamin D receptor FokI, TaqI and Apal gene polymorphism with the risk of chronic kidney disease., *Jun5*:1-5.

Zittermann A . (2006) Vitamin D and disease prevention with special reference to cardiovascular disease. *Prog Biophys Mol Biol* 92: 39–48.

Zmuda JM, Cauley JA and Ferrell RE. (2000) Molecular epidemiology of vitamin D receptor gene variants. *Epidemiol Rev* 22: 203-217.

EKLER

EK 1.1. VDR gen polimorfizmleri ile diğer biyokimyasal parametreler arasındaki bağlantının gösterilmesi

VDR polimorfizmleri ve total kolesterol seviyesinin karşılaştırılması

<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>
TT vs CC	0,120	TT vs CC	0,480	GG vs AA	0,274	AA vs CC	0,103
TT vs TC	0,109	TT vs TC	0,418	GG vs GA	0,171	AA vs AC	0,718
TC vs CC	0,050	TC vs CC	0,099	GA vs AA	0,658	AC ve CC	0,057

VDR polimorfizmleri ve HDL-K seviyesinin karşılaştırılması

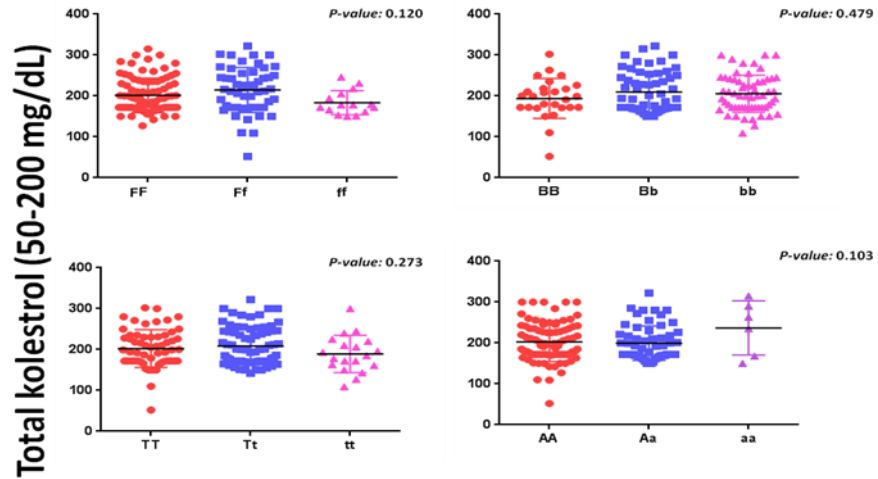
<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>
TT vs CC	0,542	TT vs CC	0,165	TT vs CC	0,909	TT vs CC	0,719
TT vs TC	0,334	TT vs TC	0,801	TT vs TC	0,981	TT vs TC	0,697
TC vs CC	0,212	TC vs CC	0,103	TC vs CC	0,904	TC vs CC	0,754

VDR polimorfizmleri ve HDL-K seviyesinin karşılaştırılması

<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>	<i>two tailed t-test</i>	<i>P-değeri</i>
TT vs CC	0,405	TT vs CC	0,609	TT vs CC	0,920	TT vs CC	0,773
TT vs TC	0,005	TT vs TC	0,651	TT vs TC	0,450	TT vs TC	0,489
TC vs CC	0,302	TC vs CC	0,240	TC vs CC	0,537	TC vs CC	0,384

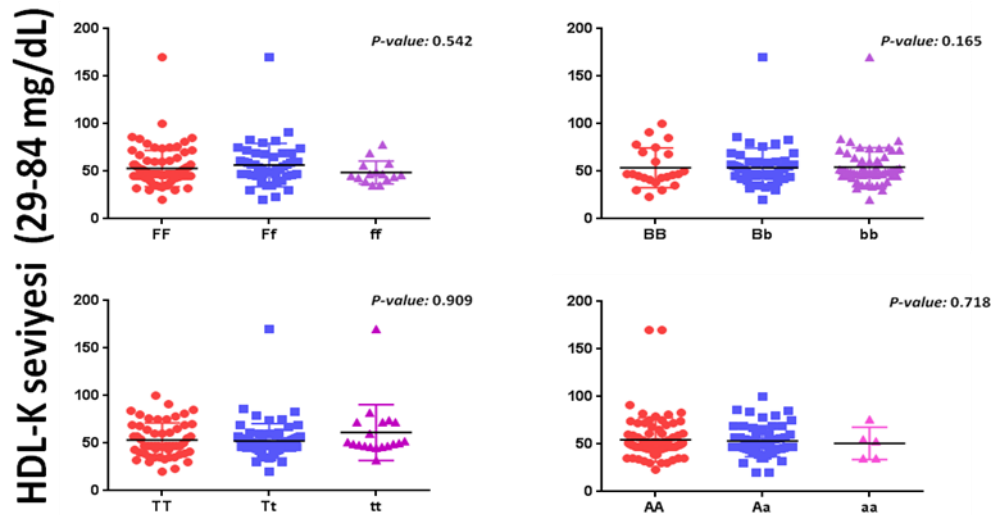
EK 1.2. Kuzey Kıbrıs popülasyonunda çalışılan grubun her bir VDR gen polimorfik bölgesine ait genotipler ve genotip dağılımları ile total kolesterol, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-K) ve trigliserid seviyeleri arasındaki bağlantıların gösterilmesi.

VDR polimorfik bölgelerinin genotipik dağılımları ve total kolesterol seviyesinin karşılaştırılması



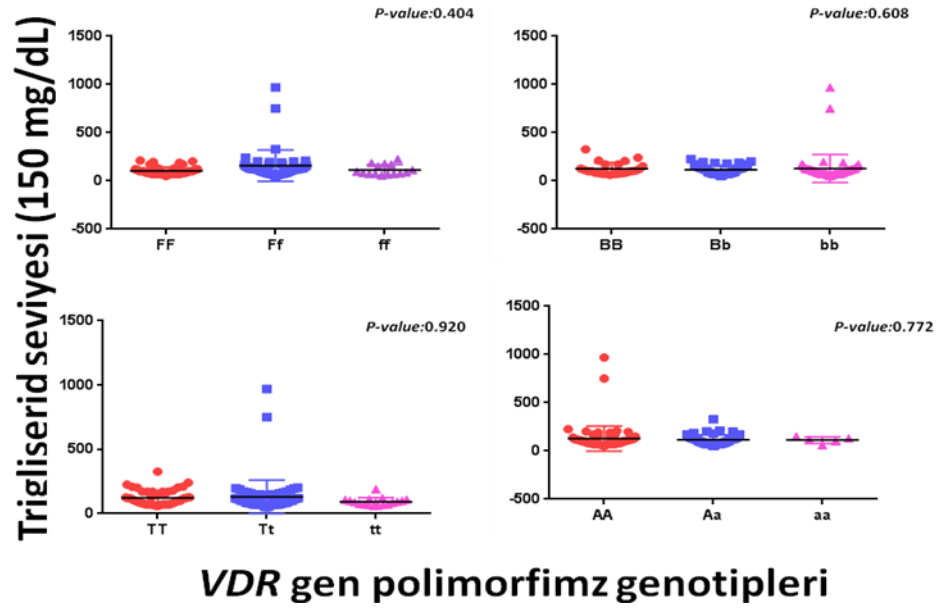
VDR gen polimorfizm genotipleri

VDR polimorfik bölgelerinin genotipik dağılımları ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-K) seviyesinin karşılaştırılması



VDR gen polimorfizm genotipleri

VDR polimorfik bölgelerinin genotipik dağılımları ve trigliserid seviyesinin karşılaştırılması



EK 1.3. Glukoz ve LDL-K parametrelerinin Kuzey Kıbrıs popülasyonunda çalışılan VDR Fokl ve Taql polimorfik bölgeleri için olası dokuz genotipe göre hesaplanan ortalama değer, standart sapma ve standart hataların gösterilmesi.

	LDL-K	Glukoz		LDL-K	Glukoz
TTTT			TCCC		
Ortalama	119	99	Ortalama	132.3	107.7
Standart Sapma	275	18.4	Standart Sapma	20.7	19.6
Standart Hata	5.2	3.4	Standart Hata	7.8	7.4
TTTC			CCTT		
Ortalama	128.3	95.2	Ortalama	112.2	105.5
Standart Sapma	30.7	14.3	Standart Sapma	19.2	20.3
Standart Hata	4.7	2.2	Standart Hata	7.2	7.6
TTCC			CCTC		
Ortalama	116.5	101.5	Ortalama	111	97
Standart Sapma	30.3	26.4	Standart Sapma	21.3	17.6
Standart Hata	9.5	8.3	Standart Hata	8.7	7.2
TCTT			CCCC		
Ortalama	131	99.2	Ortalama	124	124
Standart Sapma	41	16.2	Standart Sapma	0	0
Standart Hata	09.07	3.8	Standart Hata	0	0
TCTC					
Ortalama	146.2	103.6			
Standart Sapma	41.8	28.9			
Standart Hata	8.9	6.1			

FORMLAR

"ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN GÖNÜLLÜ ONAM FORMU"

"Kıbrıs Türk Popülasyonu'nda Kardiyovasküler Hastalıkların Genetik Epidemiyolojisi" adı altında yeni bir araştırma yapmaktayız. Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde yaşayan herkesi bu çalışmaya gönüllü katılmasını öneriyoruz. Bu çalışmaya katılıp katılmamakla serbestsiniz. Yapmış olduğumuz çalışma hakkındaki bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katkı koymak isterseniz formu lütfen imzalayınız. Bu araştırmanın yapılmasının amacı Dünya'da ve Ulus'umuzda birincil ölüm nedeni olan kardiyovasküler hastalıkların genetik yatkınlığının araştırılıp hastalığı geçirirmeden öncesinde önlem almak ve ülkemiz insanının yaşam kalitesini yükseltmektir. Genetik epidemiyolojik profil oluşturulurken, genetik çeşitliliğe sebep olan 36 farklı gen bölgesi ve bu bölgelerin vereceği cevaplar doğrultusunda kardiyovasküler ve metabolik hastalıklarla (diabet, vitamin D eksikliği vb gibi) olan yatkınlık ve bu yatkınlıkların ne derecede hastalıklarla bağlantısı olduğu araştırılacak, bu bilgileri kullanarak bireylerin yaşam koşullarında yapılacak değişiklikler ile bu hastalıkları önleyerek ve yaşam kalitelerini artıracak bilgiler sunmayı hedefliyoruz. Çalışmada ayrıca yaşam standartınızı daha da yükseltmek ve çıkacak olan sonucun daha iyi bir şekilde değerlendirilebilmesi için Vitamin D değerimize ücrete bağlı olarak bakılabilmektedir. Proje süresince, projemize katkı koyan bütün gönüllü katılımcılara kardiyovasküler hastalıklarla genetik yatkınlık raporu verilecektir. Bununla birlikte ülkemizde ani ölümlerinde nedenleri, kalp hastalıkları ön tanısı bu kardiak paneli sayesinde araştırılabilecektir. Ayrıca bu çalışma, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nde bu kadar geniş kapsamda yapılacak ilk genetik epidemiyolojik çalışmadır. Eğer araştırmayı kabul ederseniz izniniz onayınız ile kolunuzdan 2 ml kadar kan almamız gerekmektedir. Kardiyak Panelinde yer alan 36 gen bölgesi ücretsiz bakılırken, arzu edilirse 25-OH Hidroksi Vitamin D3 testi için 104 TL karşılığında daha detaylı yorum için

yapılabilecektir. Çalışmaya katılım için size ek bir ödeme yapılmayacaktır. Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir. Çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına sahipsiniz.

Adı ve Soyadı:

Doğum Yeri ve Tarihi:

Baba Adı:

Anne Adı:

Babanın Doğum Yeri ve Tarihi:

Annenin Doğum Yeri ve Tarihi:

Annenin Evlenmeden Önceki Soyadı:

Babanın Babasının Adı:

Adresi:

Telefon Numarası:

E-posta:

Aile Öyküsü: (Eğer genetik bir öykü varsa)

Sigara kullanıyor musunuz?

Kalp rahatsızlığı probleminiz var mı? Belirtiniz

Tansiyon probleminiz var mı?

Diyabet misiniz?

Birinci derece akrabalarınızda kalp, diyabet veya tansiyon rahatsızlığı var mı?

Vitamin D değeriime bakılmasını istiyorum/ istemiyorum.

Yapılan bilimsel çalışmaların sonuçlarının tarafıma ulaştırılmasını istiyorum.

EVET ☐ HAYIR ☐

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarla, kimlik bilgilerimin saklı olmak şartı ile söz konusu bilimsel araştırmada kullanılması için gönüllü olarak verdiğim biyolojik materyalin kullanılmasını kendi rızamla kabul ediyorum.

Gönüllü Vericinin Adı ve Soyadı:

İmza:

Tarih:

Araştırmacının Adı ve Soyadı

İmza:

Tarih:

Araştırma Merkezi Başkanının Adı ve Soyadı

İmza:

Tarih: