T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMA ve UYGULAMA MERKEZİNE BAŞVURAN TİP II DİYABETLİ HASTALARDA eNOS 4 a/b GEN POLİMORFİZMİNİN DİYABETİK NEFROPATİ GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Süleyman İPEK

Referans no: 10069644

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK ARAŞTIRMA ve UYGULAMA MERKEZİNE BAŞVURAN TİP II DİYABETLİ HASTALARDA eNOS 4 a/b GEN POLİMORFİZMİNİN DİYABETİK NEFROPATİ GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Yüksek Lisans Tezi)

Süleyman İPEK

Destekleyen Kurum :

Tez No :

EDİRNE – 2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Prof. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'ın danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Süleyman İPEK tarafından tez başlığı **"Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezine Başvuran Tip II Diyabetli Hastalarda eNOS 4a/b Gen Polimorfizminin Diyabetik Nefropati Gelişimine Etkisinin Araştırılması"** olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 22/01/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

T.Ü. TIP FAKÜLTESİ

İmza

JÜRİ BAŞKANI(Danışman)

İmza

JÜRİ ÜYESİ

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

İmza

JÜRİ ÜYESİ

Dr. Öğr. Üy. Suat GAKINA

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ

TEŞEKKÜR

Tezim süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. TevfikGÜLYAŞAR'a, Biyofizik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. TammamSİPAHİ'ye, Yüksek Lisans eğitimim boyunca birlikte olmaktan mutluluk duyduğum tüm değerli arkadaşlarıma, istatistiksel hesaplamaları yapan Prof.Dr. Necdet SÜT'e, hasta materyali sağlayarak çalışmama katkıda bulunan Prof. Dr. Sedat ÜSTÜNDAĞ başta olmak üzere tüm Endokrinoloji ve Nefroloji birimi çalışanlarına teşekkürlerimi borç bilirim. Ayrıca; Yüksek lisans eğitimim boyunca hiçbir özveriden kaçınmayarak bana destek olan sevgili eşim Canan KAHRİMAN İPEK'e,

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım…

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1

GENEL BİLGİLER 3

DİYABETES MELLİTUSUN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI 3

DİYABETİK NEFROPATİ 5

DİYABETİK NEFROPATİNİN PATOGENEZİ 6

DİYABETİK NEFROPATİNİN EVRELERİ 7

NİTRİK OKSİT (NO) 9

NİTRİK OKSİD SENTAZ (NOS) VE GÖREVLERİ 11

eNOS GEN POLİMORFİZMLERİ 13

GEREÇ VE YÖNTEM 17

BULGULAR 23

TARTIŞMA 28

SONUÇLAR 31

ÖZET 32

SUMMARY 33

KAYNAKLAR 34

ŞEKİLLER LİSTESİ 39

ÖZGEÇMİŞ 41

EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ADP	:	Adenozin Difosfat
Asp	:	Aspartat
AT II	:	Anjiyotensin II
bç	:	Baz Çifti
DM	:	Diyabetes Mellitus
DN	:	Diyobetik Nefropati
eNOS	:	Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz
FAD	:	Flavin Adenin Dinükleotit
GFR	:	Glomerül Filtrasyon Hızı
Glu	:	Glutemat
iNOS	:	İndiklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
kD	:	Kilo Dalton
NADPH	:	Nikotironid Adenin Dinükleotit
nNOS	:	Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	:	Nitrik Oksit
NOS	:	Nitrik Oksit Sentaz
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SBDY	:	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
UV	:	Ultraviyole
VKİ	:	Vücut Kitle Endeksi
AKST	:	Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları

GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetes Mellitus (DM) yetişkin dönemin en sık görülen kronik hastalıklarından biri olup, kontrol altında tutulmazsa vücuttaki diğer tüm sistemleri olumsuz yönde etkileyerek günümüzde halk sağlığı açısından en büyük sağlık sorunları arasında ilk sıralarda yer almaya adaydır. DM protein, karbonhidrat ve lipit metabolizmalarınının bozukluğu ve kan şekeri yüksekliği ile karakterize kronik bir hastalıktır (1). Yaşam boyu devam eden, hemen her yaştaki bireyi ve çevresini doğrudanetkileyen, geriye dönüşümü olmayan ve kronik hasarlarından dolayı maddi anlamda yük getiren, kişisel aktiviteleri etkileyen bir hastalıktır (2,3).

Kan glikoz düzeyinin yüksek olması sonucu; diyabetin kronik komplikasyonları olarak kabul gören nefropati, nöropative retinopati gibi mikrovasküler problemlerden kaynaklanan sorunlara neden olabilmektedir. Makrovasüler komplikasyonları ise miyokardiyal, serebral, periferik damar hastalıkları gibi rahatsızlıklardır (4).

Diyabetik nefropati diyabetin dört klinik tiplerinden tip 1 ve tip 2 diyabette son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) en büyük nedenlerinden biri olan mikrovasküler komplikasyonudur. Diyabetik nefropati özellikle Tip 2 diyabetin morbidite ve mortalitesinden esas sorumlu olan, birçok organı tutabilen, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve erken ölümle sonuçlanabilen en önemli komplikasyonudur(5,6).

Tip 2 diyabetes mellitus'un gelişmesinde birçok gen bölgesinin rolü vardır. Çok yönlü bir hastalık olan Tip 2DM' de genler kendi aralarında etkileşmekte olup, bunun yanında çevresel faktörlerle de etkileşirler. (7).DM'nin kişilerde görülme riskini artıran ve azaltan faktörler arasında, gen ve gen bölgelerinin olduğu bilinmektedir (8).

Nitrik oksit sentaz enzimi l-arjinin ve oksijen molekülünden NO sentezlenmesinde rol oynar. Bu enzimi kodlayan genlerin polimorfizmlerinin bazal NO düzeylerini etkilediği gösterilmiştir (9). İmminolojik ve genetik çalışmalar ile yeni bilgiler kazanılırken Tip 2 Diyabetik hastalarda nefropati gelişiminde önlenebilmesi için çalışmalar halen devam etmetedir. DM'de rol oynayan genetik faktörlerin belirlenmesi, erken tanı ve tedavi tedbirlerinin alınmasıyla sağlanabilir.

Bu nedenlerle, bu çalışmada Tip 2 Diyabetes Mellitus tanısı konmuş hastalarda eNOS geni 4 a/b polimorfiziminin diyabetik nefropati gelişmesi üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DİYABETES MELLİTUSUN TANIMI VE SINIFLANDIRILMASI

Diyabetes Mellitus

DM dünyadaki obezite pandemisine bağlı prevalansı en hızlı artan endokrin hastalıklardandır. İnsülin salınımı, insülin etkisi ya da her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanabilir. Dünya Sağlık Teşkilatı'nın 1997 ve Amerikan Diyabet Birliği'nin 2006 tanı kriterlerine göre aşağıda verilen dört yöntemden herhangisi birisi ile diyabet tanısı konulabilir.

1- Herhangi bir zamanda bakılan kan örneğinde glikoz düzeyinin 200 mg/dl'den fazla olması ve hastada diyabet semptonlarının varlığı
2- 10-12 saat süren açlık sonrası kan glikoz düzeyinin 126 mg/dl'den fazla olması
3- Hemoglabin A1C düzeyinin %6,5 üzerinde gelmesi
4- 75 gram glikoz yükleme testi sonrası bakılan kan örneğinde glikoz düzeyinin 200 mg/dl'den fazla olması (9,10).

Diyabetes Mellitus Tipleri

Diyabetes Mellitus'un sınıflandırılması; Tip 1 DM, Tip 2 DM, gestasyonel DM, diğer spesifik tipler olarak tanımlanmıştır. (11).

Tablo 1: Diyabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması (12-15)

I. Tip 1 DM: Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β hücre yıkımı vardır A-İmmün aracılıklı B-İdiyopatik
II. Tip 2 DM: İnsülin direnci ile beraber rölatif insülin eksikliği veya insülin salgı bozukluğuyla beraber insülin direnci
III. Gestasyonel DM: Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet
IV. Diğer spesifik tipler: Endokrinopatiler, pankreasın ekzokrin bozuklukları, insülin etkisindeki genetik defektler, ilaç ve kimyasallar, enfeksiyonlar

Tip 2 Diyabetes Mellitus'un Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Tip 2 Diyabetes Mellitusun gelişme nedenleri hala bilinmemesine rağmen, önemli kabul edilen bazı risk faktörleri mevcuttur. Bunlar; obezite, kötü beslenme, fiziksel aktivite azlığı, ileri yaş, aile öyküsü, ırk, hamilelik süresince yüksek kan şekeri nedeniyle anne karnındaki bebeğin etkilenmesidir (16). Tip 2 diyabet obezitenin artışına, fiziksel aktivenin azalmasına paralel olarak daha hızlı bir artış göstermektedir (11).VKI ≥25 kg/m^2 olan kişiler de riskli grupta sayılmaktadır (17). Tip 2 diyabet görülme sıklığı yaşla beraber artış göstermektedir. Yetişkin diyabetli nüfusun çoğunluğu ise 40-59 yaş aralığındadır ve bu yaş grubundaki kişiler daha çok düşük ve orta gelirli ülkelerde yaşamaktadır. Türkiye'de ise 20 yaş ve üzeri yetişkinlerde DM görülme sıklığı TURDEP-I çalışmasında 1997-98 yılında %7.2 iken (18) 2010 senesinde bu oran TURDEP-II çalışmasında %13.2' ye yükselmiştir (19). Bu sonuçlar Diyabetes Mellitusun önümüzdeki yıllarda ülkemizde çok daha öncelikli bir sağlık sorunu olacağını ortaya koymaktadır.

Türkiye' de ve Dünya'da Tip 2 diyabetli bireylerin sayısı hızla artış göstermektedir. Bu artış, ekonomik kalkınma, yaşam sürelerinin giderek uzaması, kentselleşmenin artması, beslenme değişiklikleri, fiziksel aktivitenin azalması ve diğer yaşam tarzı durumlarının değişmesiyle ilişkilidir.

Uluslararası Diyabet Federasyonunun 2017 verilerine göre dünya çapında Diyabetes Mellitus425 milyondan fazla insanı etkilediği tahmin edilmektedir. Bu hastaların üçte biri 65 yaş üstü hastalardır. Eğer gereken tedbirler yeterli ölçüde alınmazsa 2045 yılında bu sayının 629 milyon ulaşacağı düşünülmektedir.Aynı zamanda, bozulmuş glukoz toleranslı olan 352 milyon kişi diyabet gelişimi açısından yüksek risk altındadır (20).

Tip 2 Diyabet Komplikasyonları

Diyabet komplikasyonları akut ve kronik olmak üzere iki grupta incelenmektedir.

Tablo 2. Tip 2 Diyabet Komplikasyonları (12-22)

KRONİK KOMPLİKASYONLAR		AKUT KOMPLİKASYONLAR
MİKROVASKÜLER KOMPLİKASYONLAR ➢ Diyabetik nefropati ➢ Diyabetik nöropati ➢ Diyabetik retinopati ➢ Diyabetik ayak	**Makrovasküler komplikasyonlar** ➢ Koroner arter hastalığı ➢ Periferik vasküler hastalık ➢ Serebrovasküler hastalık	➢ Diyabetik ketoasidoz ➢ Hiperosmolar non ketotik koma ➢ Laktik asidoz ➢ 4. Hipoglisemi

Kronik komplikasyonun gelişme riski genellikle hiperglisemi süresine bağlı olarak artmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarının çoğu uzun ve semptomsuz bir hiperglisemi dönemi geçirdikleri için, tanı konduğunda sıklıkla kronik komplikasyonlardan bir veya daha fazlası gelişmiş olabilir (20).

DİYABETİK NEFROPATİ (DN)

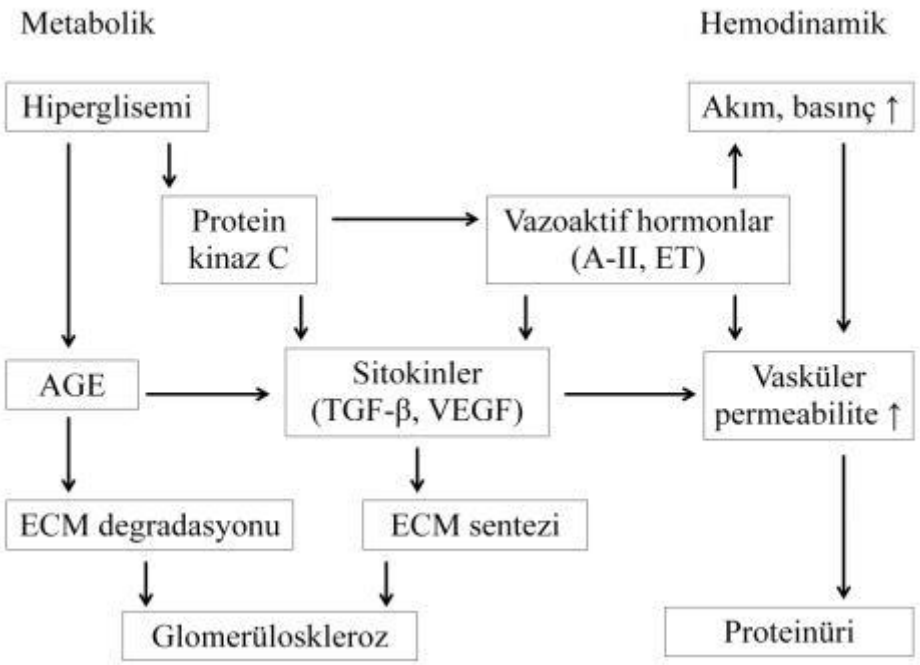
Gelişmiş ülkelerde gün geçtikçe artan sayıda hastanın son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) geliştirmesinde en sık nedeni diyabetik nefropatidir ve diyaliz uygulanan hastaların büyük bir bölümünü diyabetlilerden oluşmaktadır. Ülkemizde diyalize giren hastalar arasında yapılan araştırmada SDBY sebepleri arasında her 100 kişiden 35 kişi ile DM ilk sırada yer almıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde 1995 rakamlarına göre, tip 2 diyabetli hastalarda nefropati prevelansının tanı sırasında %5-10, diyabetin 20. yılında olduğunda ise %25-60 olduğunu göstermektedir. Diyabetik nefropati tanısına sahip hastaların yarısından fazlası Tip 2 diyabetes mellitus tanısına da sahiptirler. Diyabetik nefropatinin gelişiminde en önemlisi hastalığın süresi olmak üzere birçok risk faktörü tanımlanmıştır. DN gelişimini etkileyen risk

faktörleri; hipoksi, obezite, hipertansiyon, aile öyküsü, sigara kullanımı, hiperglisemi, sistemik kan basıncı artışı ve genetik etkenlerdir (22,23).

Diyabetik nefropati (DN), Tip 1 ve Tip 2 DM'nin en çok karşılaşılan komplikasyonudur. Son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) gelişim riskinin diyabet hastalığı olmayanlara oranla Tip 1 DM'de 33 kat, Tip 2 DM'de 7 kat fazla olduğu bildirilmektedir (24). Yirmi yıllık izlem sonucunda Tip 1 DM'de %30-40, Tip 2 DM'de %15-25 oranında DN geliştiği gözlenmiştir (25). Genetik yatkınlık, ırk, cinsiyet, diyabetin başlama yaşı, hastalığın süresi DN gelişimini etkileyen risk faktörleridir (26). Glisemi kontrolunun bozukluğu, hipertansiyon, hiperlipidemi, yüksek proteinli diyetle beslenme, sigara kullanımı ve albuminüri varlığı prognozu kötüleştirmektedir (27).Kalıtımın DN gelişiminde aktif role sahip olduğu düşünülmektedir (28,29).

DİYABETİK NEFROPATİ PATOGENEZİ

Hiperglisemiyle birlikte sistemik hasar diyabetik nefropati gelişmesinde etkili en önemli faktörlerden biridir. Diyabetik nefropatinin patogenezinde hiperglisemi yanında hemodinamik değişkenlerin de büyük rolü vardır.



Şekil 1. Diyabetik Nefropatinin Patagonezi

Hemodinamik değişiklik olarak glomerüler bazal membranda, tübüler bazal membranda ve bowman kapsülünde kalınlaşma olmaktadır. Sonrasında mezenşimal hücrelerde hipertrofi ve bunun sonucunda da ekstrasellüler matrikste artış görülür. Mezengial matrikste artma nedeni ile glomerüler kapiller yüzey alanında azalma olur. Diyabetik nefropatide temel olarak glomerülde hastalık oluşmasına rağmen ilerleyen dönemlerde tübülointerstisyel alan da etkilenir. Son aşamada glomerüloskleroz görülür. Diyabette aynı zamanda nodüler glomerüloskleroz da görülmektedir. Bu süreç gelişirken filtrasyonda ve nefron sayısında azalma, geriye kalan nefronlarda daha fazla kapiller kan akıma yol açar. Bunun sonucunda glomerül içi basınç artışı, hiperfiltrasyon ve bazal membrandaki aktivite değişiklikleri ile ilerleyici proteinüri oluşur. Bu proseste; hipertansiyon, efferent arteriyollerde vazokonstrüksiyona neden olan anjiyotensin II seviyesinin artışı, renal vazodilatasyona ve glomerül içi basıncın yükselmesine neden olur. Bundan başka böbrek fonksiyonları hasar gördükçe sistemik ve glomerüler hipertfiltrasyon artarak kısır döngüye girer. Hastalarda genellikle temel olarak glomerüler değişiklikler sonucunda proteinüri meydana gelsede uzun dönemli etkilerine renal sistemdeki intersitisyumdaki olaylarla karar verilir (30-32).

DİYABETİK NEFROPATİNİN EVRELERİ

Diyabetin başlangıcından SDBY gelişimine kadar ki süre yaklaşık 15–30 yıldır. Böbrek yetmezliği gelişen Tip 1 ve Tip 2 DM'li hastalarda böbrek hastalığının doğal seyri oldukça iyi belirlenmiştir.

Tablo3. Diyabetik Nefropatinin Evreleri ve Özellikleri

Evreler	Özellikleri
Evre I (Tanı öncesi diyabet olmaksızın klinik tanı)	Normal serum kreatinin ve yüksek GFR (ancak tip 1 diyabetteki ölçüde değil). Esansiyel hipertansiyon metabolik sendrom ve tip 2 diyabetle ilişkili olabileceği için kan basıncı yükselebilir.
Evre II "Sessiz evre"	Hipergliseminin tanı ve tedavisinden sonra anormal albuminüri genellikle görülmez. Daha iyi bir glisemi kontrolü ile GFR hafifçe düşebilir. Kan basıncı yükselme eğilimindedir.
Evre IIIa	Yıllarca diyabet tanısının koyulamadığı durumlarda klinik tanıda mikroalbuminüri saptanabilir.
Evre IIIb	Diyabetle yaşadıktan bir süre sonra kan basıncı yükselmesi ve glisemi kontrolü nedeniyle normoalbuminüriden tipik şekilde mikroalbuminüri gelişebilir. Böyle hastalarda hipertansiyon sıktır. GFR hala normaldir.
Evre IV Aşikar diyabetik nefropati	Diyabetten 10-15 yıl sonra tipik proteinüri metabolik kontrol ve kan basıncına bağlı olarak GFR değişken derecelerde azalır. Kardiyovasküler hastalık sıktır. Biyopside bu hastalarda tipik lezyonlar söz konusudur nadiren başlangıçta hastalar değişiklik göstermez.
Evre V	Geç evre, böbrek yetmezliği veya hemen öncesi

Proteinüri patofizyolojisi: Diyabetik nefropatinin glomerüler kaynaklı albümin atılımının artışına bağlı olduğuna inanılır. Albumin endotel hücrelerini, glomerüler bazal membran ve glomerüler epitel hücresi ya da podosit yapısını içeren filtrasyon bariyerini geçtikten sonra atılmaktadır. İntraglomerüler basınç artışı, negatif yüklü glikozaminoglikanların kaybı, bazal membrandaki porların boyutundaki artış albuminüriye katkıda bulunur. Bazal membrandaki heparan sülfat kaybı, anyonik yük kaybına ve albuminüriye yol açar. Diyabetik nefropatili hastalarda heparan sülfat kaybı gösterilmiştir. Heparan sülfat glomerüler albümin filtrasyonunu önler, porların boyutuna katkıda bulunur. Bu nedenle heparan sülfat kaybı GBM'nin mikro yapısının bozulmasına yol açar. Aynı zamanda mezengial hücre büyümesini ve mezengeal genişlemeyi önler. Sonuç olarak diyabet heparan sülfat metabolizmasını etkiler ve heparan sülfat kaybına yol açar. Son zamanlarda podositlerin de proteinüriyi arttırdığı ileri sürülmüştür. Diyabetlilerde podosit morfolojisi de anormal

bulunmuştur (33).Dokularda metabolik gereksinimlere göre sekresyonu değişen bir diğer madde nitrik oksittir. Nitrik oksitin hem vazodilatasyon yoluyla renal akımı arttırdığı hemde dokulardaki oksijen tüketimini düşürdüğü tespit edilmiştir. Böylece doku oksijenasyonunun artışında rol oynar. Son dönemlerde diyabetis mellitus ve diyabetik nefropti gelişiminde rol oynayan patogenetik proseslerde nitrik oksit metabolizmasının bozukluklarının etkili değerlendirilmektedir.

NİTRİK OKSİT (NO)

Nitrik oksit (NO), bir nitrojen ve bir oksijen atomundan oluşan, yarı ömürü çok kısa olan son derece toksik bir gaz olan, serbest radikal, yağda çözünebilme özelliğine sahip, membranlardan rahatlıkla geçebilen ve renksiz bir gazdır. Azot merkezli radikal olarak bilinen NO diğer radikal türlerinin aksine, paylaşılmamış elektron nitrojen atomu üzerinde yerleşik değil; oksijen ve azot atomlarının üzerinde delokalize bir biçimde bulunur. Nitrik oksitserbest radikalinin bu karekteristiği kendi reaktivitesini baskılar, stabilitesini yükselterek biyolojik şartlarda sentezlendiği noktadan uzak mesafelere difüzyonunun kolaylaşmasını sağlar (34).

Vücutta birçok dokuda NO sentezlenmektedir. Nitrik oksit endojen L-arjininden nitrik oksit sentaz enzimi tarafından sentezlenir. Bu sentezleme işlemi sonrasında NO oldukça hızlı bir şekilde okside edilerek inaktif bileşikler olan nitrat ve nitrit gibi ürünlere dönüşür. Hemoglobin NO'yu inaktive eder. Nitrik oksitin en önemli fizyolojik hedefi, çözünebilir guanilat siklaz enziminin hem grubudur. Düz kas hücresine geçen NO, guanilat siklazı uyararak, guanozin trifosfatın cGMP'ye dönüşümünü sağlamaktadır. İyon kanallarıvecGMP de protein kinazı aktif hale dönüştürür. Hücre dışına çıkarılma ve sekestrasyon yoluyla hücre içi kalsiyum azalır. Bu prosesin sonunda gevşeme sağlanır. cGMP'nin fizyolojik etkisi ise 3'5' bağının fosfodiesteraz enzimi tarafından hidrolize edilmesi ile sonlandırılır (35).

Nitrik oksitin sentezinin hem azalması hem de artması birçok yan etkiye yol açar(Tablo 4)(36).

Tablo 4. Endojen NO'nin Artması ve Azalmasının Etkileri

Nitrik Oksitin Azalması	Nitrik Oksitin Artışı
Vazodilatasyonun azalması	Vazodilatasyon
Sistemik hipertansiyon	Septik şokta hipotansiyon
Pulmoner hipertansiyon	Vazopressör sensitivitede azalma
Ateroskleroz	İnotropik etkinin azalması
Anjioplasti sonrası restenoz	Romatoid artrit
Angina pektoris	Renin salınımı
İskemi-reperfüzyon hasarı	Dializ sırasında hipotansiyon
Subaraknoid kanama sonrası vazospazm	Diabetik nefropati
Hipertrofik pilor stenozu	Diabetik retinopati
	Serebral iskemi
	İnme
	Renal allogreft atılımı

Radikal bir molekül olarak isimlendirilmesine rağmen, NO diğer serbest radikallerden farklı olarak her konsatrasyonda zararlı olmayıp, düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde görev yapmaktadır. Nitrik oksit sentezi insanda vasküler tonüs düzenlenmesinde, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahiptir. NO vasküler endotelyal hücrelerde oluşan önemli bir vazodilatördür (37).

Artmış nitrik oksit üretimi romatoid artrit, osteoartrit, sepsis, sitokin kemoterapisi ve ülserif kolit gibi hastalıklarda görülür. Bu durum serebral iskemiden beyin hasarına kadar birçok olaya neden olabilir.

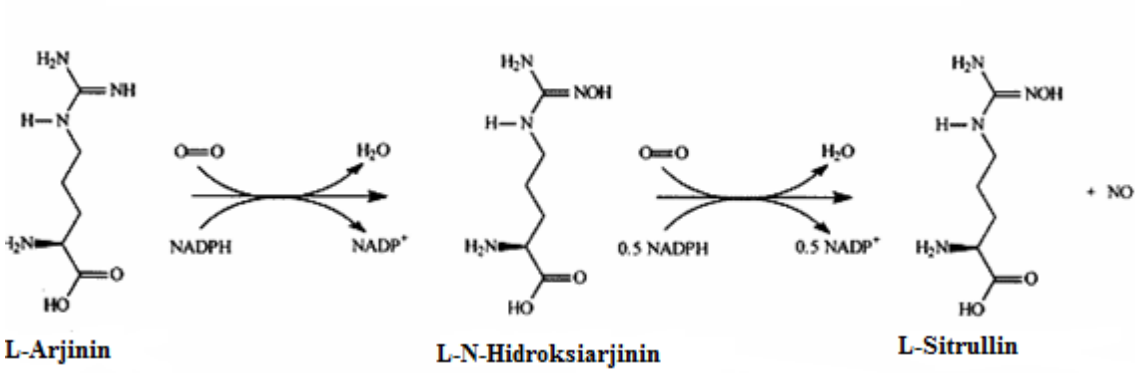
Septik şokta endotoksin, TNF ve IL-1 iNOS'u uyararak aşırı miktarda NO üretimine neden olur. Sonuçta vazodilatasyon, vazopressör tedaviye azalmış veya beta azalmış miyokard kontraktilitisine bağlı olarak hipotansiyona yol açar. Aşırı NO, hemodializ sırasında hipotansiyona, renal allogreftin rejeksiyonuna, diyabetik nefropati ve retinopatiyede neden olabilir(36).

NİTRİK OKSİT SENTAZ (NOS) VE GÖREVLERİ

Nitrik oksit sentaz enzimleri ilk olarak 1989 yılında tanımlanmasından sonra 1991-1994 yıllarında major izoformları ve 1998-1999 yıllarında ise kristal yapıları belirlenmiştir (38).

NO, pek çok hücrede sitokrom p-450 redüktazın homoloğu nitrik oksit sentaz (NOS) enzim ailesi tarafından, endojen bir aminoasit olan L-argininin terminal guanidin grubunun NO'ya çevrilmesiyle sentezlenir (39). Bu reaksiyon sırasında moleküler O_2 ile kofaktör olarak nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin mononükleotit (FMN), tetrahidrobiyopterin (BH4) ve hem kullanılır.

NO sentezi iki basamakta gerçekleşir. Birinci basamak, L-argininin NG-hidroksi-L-arginine hidroksilasyonudur. İkinci basamak ise, NG-hidroksi-L-argininin, L-sitrüllin ve NO'e oksidasyonudur (40). Sentez sonunda NO, nötralize edilerek çok kısa sürede nitrit ve nitrata dönüştürülür (41) Şekil 2' de NO'nun sentezi gösterilmiştir.



Şekil2. Nitrik Oksit Sentezi (40)

Asetilkolin, histamin, trombin, serotonin, ADP, bradikinin, norepinefrin, substant P ve izoproterenol gibi çeşitli agonistler, endotelden NO sentez ve salınımını arttırabilmektedirler (42). Bununla birlikte, NO salınımı için en fizyolojik agonist, süregelen shear stresdir (43).

NO, böbrek kan akımının ve glomerüler filtrasyonun düzenlenmesi, böbreğin otoregülasyonu, renin salgılanması ve tuz ıtrahı gibi böbrek fonksiyonlarının kontrol edilmesinde görev alan önemli bir moleküldür. NOS enzim sentezinin uyarılması böbrekte vazodilatasyona neden olurken sentezinin bloke edilmesi ise renal kan akımının ve sodyum

ıtrahının azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca NO anjiyotensin II'nin fizyolojik antagonisti olarak kabul edilmektedir (44).

Renal sisteme etkileri; glomerüller, makula densa, toplayıcı kanallar ve periferik damarlarda NOS mevcuttur. Afferent arteriollerde perfüzyon basıcının artması, NO salınmasına ve renal otoregülayonda önemi olan vazodilatasyona yol açar. NO, ayrıca renin salınımı ve sodyum atılımılıyla da ilişkidir.

İndüklenebilir NOS tarafından üretilen NO'nun kalp böbrek ve kemik iliği transplantının atılımında rol oynadığı ileri sürülmektedir (36).

NOS'un üç farklı izoformu tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi yapısal, diğeri ise sitokin ve diğer bileşikler tarafından uyarılabilen formudur. Yapısal izoformlarından biri endotelyal NOS (eNOS veya NOS3), diğeri ise nöronal NOS (nNOS veya NOS1) olarak adlandırılmıştır (39). İndüklenen izoformu (iNOS veya NOS2) ise hücrede infeksiyon ve inflamasyon gibi anormal durumlarda uyarılır (45). NOS türleri hem bulundukları hücre tipleri hem de NO'in miktarı, moleküler hedefleri ve işlevleri bakımından farklılıklar gösterirler. Nitrik oksit sentaz izoenzimlerinin hepsinin ortak ürünü NO'dur (46).

Endotelyal NOS (eNOS veya NOS 3): Yedinci kromozomda lokalizedir. İlk olarak vasküler endotelyal hücrelerde tanımlanmıştır. Endotelyal NOS kardiyovasküler sistemde vasküler düz kas gevşemesi, damar tonüsünün düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun inhibe edilmesi gibi fizyolojik olaylarda görev almaktadır (38,47). Diğer 2 NOS enzimlerinden farklı olarak hücresel membranda partiküler subselüler fraksiyonda özellikle de plazmalemmal kaveola'da bulunmaktadır. Nöronal NOS gibi Ca^{+2} ve kalmoduline bağımlı aktivite gösteren bir enzim olup kısa süreli ve pikomolar konsantrasyonlarda NO sentezini katalizlemektedir. Endotelyal NOS'un aktivasyonu sonucu oluşan NO, difüzyonla düz kas hücrelerine geçerek guanilat siklazı aktive etmektedir. Bunun sonucunda cGMP düzeyinde artma ve düz kaslarda gevşeme meydana gelmektedir.

Nöronal NOS (nNOS veya NOS 1): 12. kromozomda lokalize olarak bulunan ilk izoformdur. Esas olarak santral sinir sisteminde ve periferik sinirlerde bulunan, nörotransmiter / nöromodülatör olarak görev yapan, Ca^{+2} kalmoduline bağımlı olarak aktivite gösteren ve çözünür formda bulunan sitozolik bir enzimdir.

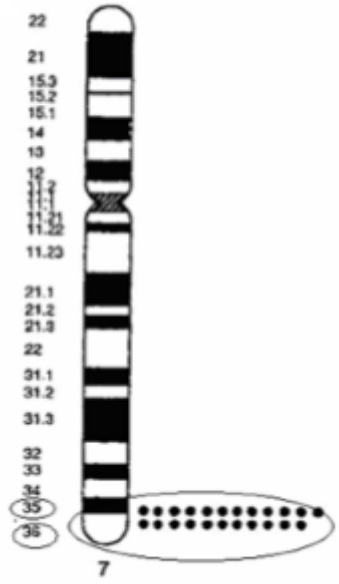
İndüklenebilir NOS (iNOS veya NOS 2): 17. kromozomda lokalizedir. Makrofajlar, tip 2 alveolar epitel hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, nötrofiller ve kondrositlerde yoğun olarak bulunan ve aktivitesi kalsiyuma bağlı olmayan bir enzimdir. İndüklenebilir NOS tümör

nekroz faktör-α (TNF- α), endotoksin, interferon-γ ve interlökin-1β gibi proinflamatuvar sitokinler ile indüklenmektedir. Sitozolik bir enzim olan iNOS, indüklenmesinden birkaç saat sonra (saatler, günler) uzun süre devam edebilen nanomolar konsantrasyonlarda proinflamatuvar NO salınımı sağlamaktadır (48).

eNOS GEN POLİMORFİZMLERİ

Organizmalar aynı türde olmalarına rağmen genellikle farklı fenotip gösterirler. Bu farklılıklar genetik olarak tespit edilmiştir vepolimorfizm olarak adlandırılmıştır.Pek çok gen lokusunda iki allel bulunmaktadır.Çoklu allellerin mevcut olması mutasyonların fenotipe farklı yansımalarının nedenidir.Popülasyondagenetik olarak belirlenmis, birbirinden farklı allelere bağlı, iki ya da daha fazla fenotipin görünmesi genetik polimorfizmdir.

Nitrik oksit sentaz izoformları farklı genler tarafından kodlanmaktadır (Tablo 5) (38). Endotelyal Nitrik Oksid Sentetaz (eNOS); 134 kD'lik iki benzer monomerden oluşan bir dimerdir ve fonksiyonel olabilmesi için dimerik formda olması gerekir. Monomerleri kodlayan gen 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunur ve 21 kb'lik 26 ekson taşır.



Şekil 3. Kromozomda eNOS Geninin Yerleşimi

eNOS geni 1203 tane amino asitten meydana gelen eNOS enziminin transkripsiyonundan ve sentezinden sorumludur.Bu gende meydana gelecek polimorfizm NOS'de üretim aşamasında bir bozukluğa yol açar ve devamında bir hastalık süreci gelişir.

Tablo 5. NOS İzoformlarını Kodlayan Genler ve Özellikleri

NOS İzoformları	Gen Yapısı ve Büyüklüğü	Kromozomal Yerleşim	Aminoasit Sayısı, Protein Büyüklüğü
nNOS	29 ekzon	12q24.2	1434 aa
	28 intron	12q24.3	161 kDa
	> 200kb		
iNOS	29 ekzon	17 cen-q11.2	1153 aa
	25 intron		131 kDa
	37 kb		
eNOS	26 ekzon	7q35-7q36	1203 aa
	25 intron		133 kDa
	21-22 kb		

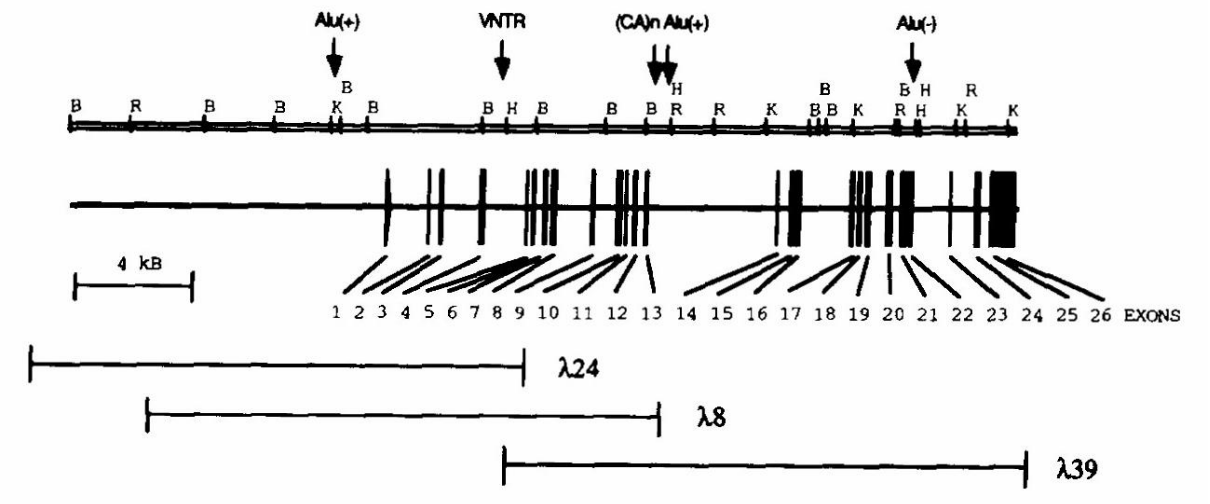
İnsanda eNOS geninin intron, ekzon ve promoter bölgede olmak üzere 3 değişik polimorfizm varyasyonu bulunmaktadır.

1-İntron bölgesindeki polimorfizm: 18. intronda; Ala27Cys ve 23. intronda; Glu10Thr, tek nükleotid değişiminin olduğu bunun yanında 4. 12. ve 23. intronlarda değişken tekrarların olduğu polimorfizmler bulunmaktadır.

2- Ekzon bölgesindeki polimorfizm: Ekzon 7'nin açık okuma bölgesinde, Glu298Asp değişiminin olduğu polimorfizm saptanmıştır. Bu polimorfizm eNOS enziminin protein dizisinde değişiklik yapan tek polimorfizmdir. Bu durum proteinin primer yapısını bozarak, enzimde fonksiyonel değişiklikler meydana getirmektedir. eNOS geninin ekzon 7'deki bu polimorfizmi enzim yapısında bulunan 298 numaralı glutamatın (Glu) aspartata (Asp) dönüşmesine neden olmaktadır.

3-Promoter bölgedeki polimorfizm: Promoter bölgede 3 tekli nükleotid değişimi saptanmıştır.

Bunlar; Thr786Cys, Ala922Gly ve Thr1468Ala polimorfizmleridir. Bu polimorfizmlerin, transkripsiyonu ve dolayısıyla enzim seviyelerini değiştirebildiği belirtilmektedir.



Şekil 4. eNOS Geninin Yapısal Organizasyonu

Plazma NO düzeylerinin her kişinin genetik özelliklerine göre farklılık gösterdiği belirtilmektedir. İnsanda yapılan birçok çalışmada, eNOS gen polimorfizmlerinin plazma NO düzeylerindeki değişikliklerin genetik kontrolünden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir.

İnsan 7. kromozomun 4. intronunda bulunan eNOS genindeki polimorfizmin a ve b olmak üzere iki alleli bulunmaktadır. a allelinde 4, b allelinde ise 5 ardışık 27 baz çiftlik tekrarlar vardır ve intron 4'teki eNOS gen polimorfizminin aa, ab ve bb olmak üzere üç genotipi vardır (49).

eNOS gen polimorfizmleri ile çeşitli hastalıklar arasında ilişki olup olmadığıfarklı hasta gruplarında çalışılmıştır. Böbrek hastalıklarında ise özellikle Tip 1 veya Tip 2 diyabetik veya non diyabetik son dönem böbrek yetmezliği hastalarında(SDBY) eNOS geni intron 4a/b polimorfizmi ve Glu298Asp polimorfizmi çeşitligruplar tarafından çalışılmıştır. Kronik glomerulonefrit (KGN), diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, lupus nefriti, vaskulit, reflü, obstruktif nefropati, otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı (ADPKD) ve interstisyelnefrit gibi böbrek hastalıkları sonucu SDBY gelişen ve hemodiyalize giren hastalardaGlu298Asp mutasyonu kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu

çalışmalarla diyabet ve nefropatisi olan hastalar için Glu298Asp polimorfizminin kötü prognoz ve SDBY'ye gidiş için bir risk oluşturduğu (50,51), benzer şekilde eNOS intron 4 AKST polimorfizmi a allelinin diyabetik ve non diyabetik hastalar, kronik glomerülonefrit, membranoz nefropati ve lupus nefriti gibi böbrek patolojilerinde hastalığın prognozu ve SDBY'ye gidiş için olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (52-55).

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada eNOS geniintron 4'de 27 bazlık tekrarlardan oluşan Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları (AKST) genindeki insersiyon/delesyon polimorfiziminin diyabetik nefropati ile ilişkisinin araştırılması amacıyla "Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" izni alındı. İlgili belge Ek-1'de sunulmuştur. Tip 2 Diyabetes Mellitus tanısı konulmuş ve Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji ve Endokrinoloji Bilim dalları izleminde olan hastaların gizli, açık diyabetik nefropatisi veya diyabetik nefropati nedeni ile diyalize girmek durumu olan toplam 58 hasta (Nefropati grubu) ile diyabetik nefropatisi olamayan 55 Tip 2 diyabet hastası (Nefropati olmayan grup) birey alınarak çalışma grubuna dahil edilmiştir. Hasta grubunun yaş ortalaması ve standart sapması 55,86±6,37olup, yaş aralığı 38-64'dir. Kontrol grubunda ise yaş ortalaması ve standart sapması 53,78±6,35 olup, yaş aralığı 38-64'dir.

Polikliniklerde yapılan görüşme ve muayene sonucu hastaların yaş, cinsiyet, kilo, boy, sigara ve alkol kullanımı, diyabet ve aile öyküsü sorgulandı ve çalışmaya alınma kriterlerini karşılayan bireyler çalışmaya davet edilmişler ve kan örneği vermeleri istenmiştir. Bilgilendirilmiş onay işlemi ardından gönüllü bireylerden, EDTA'lı tüplere 2 ml kan örnekleri alınmıştır. DNA izolasyonu kandan, DNA izolasyon kiti ile yapılmıştır. Elde edilen DNA'lar analiz edilinceye kadar +4 °C'de saklanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) kullanılarak izole edilen DNA'ların eNOS geniintron 4'deki AKSTgenbölgesi çoğaltıldı. PZR sonucu oluşan ürünler etidyum bromür ile hazırlanmış %2'lik agaroz jele yüklenerek UV ışık altında ürünün oluşup oluşmadığına bakıldı.

KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER

Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler

- Agaroz (BioMax)
- Borik Asit (Sigma)
- EDTA (Sigma)
- Tris (Bio Basic)
- Etanol %100 (Riedel)
- Etidyum Bromür (EtBr) (Sigma)
- 100 bç DNA marker (Fermantas)
- dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermantas)
- Primerler (Fermantas)
- Taq DNA polimeraz Seti (Fermantas)
- B*se*DI Restriksiyon Enzimi (Fermantas)
- B*sh*NI Restriksiyon Enzimi (Fermantas)

Çalışmada Kullanılan Cihazlar

- Agaroz Elektroforez Tankı (Bio-Metra)
- Güç Kaynağı (Bio-Metra)
- Derin Dondurucu (Arçelik)
- Buzdolabı (Arçelik)
- Manyetik Karıştırıcı (Wisestir)
- Otoklav (Nüve)
- Otomatik Mikro Pipetler (Dragon, Thermo Scientific)
- Santrifüj (Beckman Coulter)
- Terazi (AND)

- Thermal Cycler (Techne)
- Vortex (VELP)
- ETÜV (Heraeus)
- Termo-Shaker (Boeco)

ÇÖZELTİLER

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda (PZR) Kullanılan Çözeltiler

PZR 10X Tampon, PH: 8.3

750 mM Tris-HCl (25℃'de PH=8.8)

200 mM$(NH_4)_2SO_4$

% 0.1 Tween 20

Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Çözeltiler

10X(TEB)

108 gr Tris

7.44 gr EDTA

55 gr Borik Asit

1lt distile su içerisinde çözündürüldü.

%2'lik Agaroz Jel

0.6gr Agaroz, 30ml 0.5XTEB çözeltisi içinde kaynatıldı ve kaynayıp biraz beklendikten sonra EtBr eklendi.

YÖNTEMLER

DNA İzolasyonu

DNA izolasyon yöntemi aşağıdaki adımlar uygulanarak gerçekleştirildi.

1) 200 ml kana 20 µl Proteinaz K eklendi.

2) Elde edilen örneğe 20 µl RNAse A eklendi, vortekslendi ve 2 dk inkübasyon yapıldı.

3) 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen oluncaya kadar vortekslendi.

4) 550C'de 10 dk inkübe edildi.

5) 200 µl etanol eklendi ve 5 saniye vortekslendi.

6) Örnek, kolona alındı.

7) 10.000 x g'de 1dk santrifüj edildi.

8) 500 µl Wash Buffer 1 eklendi ve 10.000 x g'de 1dk santrifüj edildi. 41

9) 500 µl Wash Buffer 2 eklendi ve 10.000 x g'de 3dk santrifüj edildi.

10) Kolon steril ependorfa alındı.

11) 200 µl Elution Buffer eklendi, 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

12) 10.000 x g'de maksimum hızda 1dk santrifüj edildi.

Tüm bu işlemlerden sonra saf DNA'lar elde edildi

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

eNOS4 a/b için PZR Uygulaması

PCR' da kullanılan Primer Dizileri

eNOS geniintron 4'de 27 bazlık tekrarlardan oluşan Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları (AKST) genindeki insersiyon/delesyon polimorfiziminin kodlayan genlerin amplifikasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR, Polymerase Chain Reaction) yöntemiyle özgün primerler kullanılarak çoğaltılmaya başlanmıştır.

PZR'de kullanılan Primer Dizileri:

eNOS4 a/b :

eNOS 4 a/bForward: 5'-AGGCCCTATGGTAGTGCCTT-3'

eNOS 4 a/b Reverse: 5'-TCTCTTAGTGCTGT GGTCAC-3'

eNOS 4 a/b için PZR karışımı, aşağıdaki ürünler kullanılarak 200 µl'lik PZR tüpleri içerisinde hazırlandı.

3.5 µl MgCl2 (25mM)

1.5 µl PCR Tampon (10XTaq Buffer ile$(NH)_2SO_4$)

0.5 µl dNTP (5mM)

0.5 µl T174M Primer F (10pmol/µl)

0.5 µl T174M Primer R (10pmol/µl)

0,25 µl Taq Polimeraz enzimi (5u/µl)

16.25 µl dH_2O

2 µl DNA

Toplam hacim: 25 µl

eNOS4 a/b için PZR Döngüsü

eNOS 4 a/b' nin PZR protokolü 94ºC'de 1 dakika başlangıç denatürasyonuyla başladı. Bunu 38 döngüden oluşan 25 saniye 95ºC' de denatürasyon; 35 saniye 56ºC' de bağlanma; 40 saniye; 72ºC' de uzama takip etti ve sonunda 72ºC' de 5 dakika son uzama aşaması ile tamamlandı.

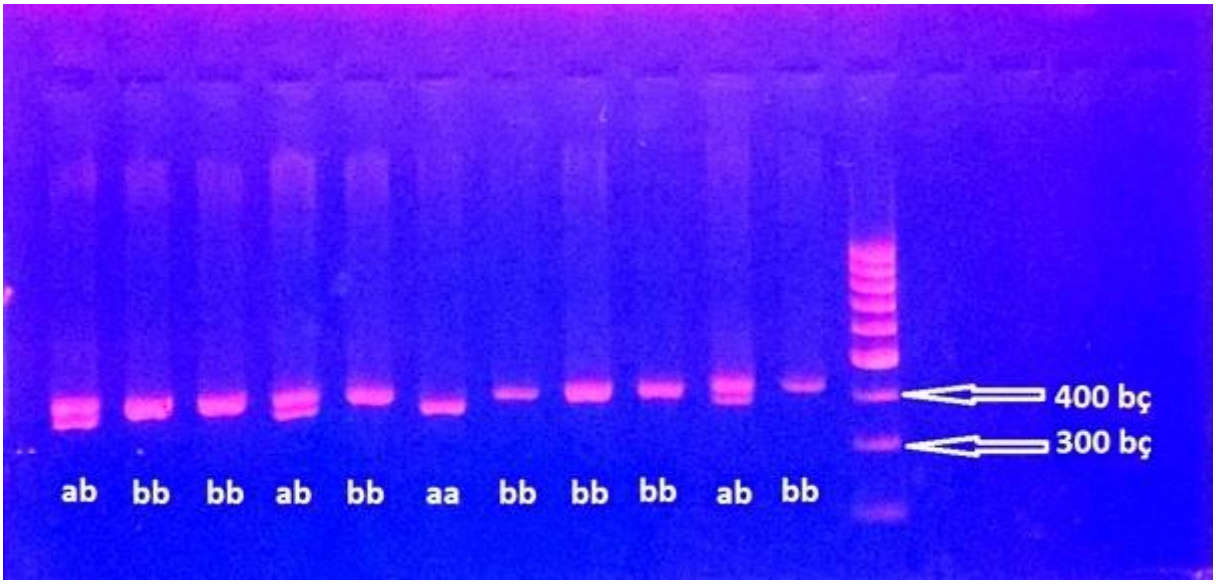
Başlangıç: 94ºC, 1 dakika

95ºC, 25 saniye

56ºC, 35 saniye — 38 döngü

72ºC, 40 saniye

Sonlanma: 72ºC, 5 dakika



Şekil 5. eNOS geni 4. introndaki 4a/b polimorfizmi için PZR jel elektroforez görüntüsü, M: 100 bç ladder, bç: baz çifti. bb:421 bç, ab: 394 bç ve 421 bç, aa: 394 bç

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistics Package of Social Science) v20 (Lisans No:10240642) istatistik paket programı kullanılarak gerçekleştirildi.Sonuçlar sayı (yüzde) veya ortalama ± std. sapma olarak ifade edildiler. Yaş ve vücut kitle indeksi(VKİ) değişkenlerinin gruplar arasında karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı. eNOS 4 a/bgeninin genotipleri, cinsiyet, sigara ve aile öyküsünün gruplar arası karşılaştırmalarında pearson ki-kare testi kullanıldı. $P<0.05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. HDL-C, LDL-C, Hba1c ve diyabet süresi değerlerinin karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarında allel dağılımları için Hardy-Weinberg testi kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya, eNOS geni intron 4'de 27 bazlık tekrarlardan oluşan Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları (AKST) genindeki insersiyon/delesyon polimorfizimini kodlayan gen bölgesi için; diyabetik nefropati tanısı almış Tip 2 diyabetli(DN) 58 hasta (32erkek, 26 kadın) ve diyabetik nefropatitanısı almamış Tip 2 diyabetli(NDN) 55 kontrol (12 erkek, 43 kadın) olacak şekilde toplamda113 kişi dahil edildi. Diyabetik nefropatili grubun yaş ortalaması 55.86±6.37 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 53.78±6.35 olarak hesaplandı. Çalışmaya katılan gruplara ilişkin demografik ve klinik bulgular incelendi. Gruplar istatistiksel açıdan karşılaştırılırken, kategorik değişkenler için Pearson ki-kare testi, sayısal değişkenler için ise Student t-testi kullanıldı ve normal olmayan dağılım gösteren verilerin karşılaştırılmasında, gruplar arasındaki farkı bulmak için Mann-Whitney U testi uygulandı. Uygulanan bütün testlerde anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak alındı. Normal olmayan dağılım gösteren veriler ortanca (minimum–maksimum / aralık) olarak verildi. Bulgular Tablo 7'de verilmiştir. Elde edilen bulgular çerçevesinde cinsiyet, sigara içme durumu, aile öyküsü ve diyabet süresi diyabetik nefropati ile ilişkili bulundu. Bulgular aşağıdaki tablolarda özetlenmiştir (Tablo 6-10).

Tablo 6.Diyabetik Nefropatili Hasta Ve Kontrol Gruplarındaki Cinsiyet, Sigara İçme Durumu Ve Aile Öyküsü Ve Risk Oranları

		Hasta	Kontrol	p değeri
		n(%)	n(%)	
Cinsiyet	**Kadın**			0,001
	Gruplar arası	26(37,7%)	43(62,3%)	
	Grup içi	26(44,8%)	43(78,2%)	
	Erkek			
	Gruplar arası	32(72,7%)	12(27,3%)	
	Grup içi	32(55,2%)	12(21,8%)	
Sigara	**Var**			0,037
	Gruplar arası	15(75,0%)	5(25,0%)	
	Grup içi	15(25,9%)	5(9,1%)	
	Yok			
	Gruplar arası	43(46,2%)	50(53,8%)	
	Grup içi	43(74,1%)	50(90,9%)	
Aile Öyküsü	**Var**			0,030
	Gruplar arası	43(59,7%)	29(40,3%)	
	Grup içi	43(74,1%)	29(52,7%)	
	Yok			
	Gruplar arası	15(36,6%)	26(63,4%)	
	Grup içi	15(25,9%)	52(47,3%)	

*p-değerleri Pearson ki-kare testi sonucunda elde edilmiştir.

Tablo 7. Diyabetik Nefropatili Hasta ve Kontrol Gruplarındaki Yaş, VKİ, HDL, LDL, Hba1c, Diyabet Süresi ve Risk Oranları

	Hasta (n=58)	**Kontrol (n=55)**	**p değeri**
Yaş	55.86±6.37	53.78±6.35	0.085*
VKİ	32,38 ± 5,64	31,83 ± 6,004	0.618*
HDL-C	46,16 ± 14,193	49,39 ± 15,35	0,694ˣ
LDL-C	113,252 ± 38,584	107,51 ± 31,90	0,395ˣ
Hba1c	7,1574 ± 1,30178	8,94 ± 11,341	0,795ˣ
Diyabet Süresi	10,534 ±6,1707	7,804 ±4,8511	0,016ˣ

VKİ: Vücut kitle indeksi; **HDL-C:** HDL kolesterol;**LDL-C:**LDL kolesterol;**Hba1c:**Hemoglobin A1c

*p-değerleri Student-t testi sonucunda elde edilmiştir. ˣp-değerleri Mann-Whitney U testi sonucunda elde edilmiştir.

DN(hasta) ve NDN (kontrol) grubundaki hastaların kategorik değişkenlerinin, eNOS geni intron 4'de 27 bazlık tekrarlardan oluşan Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları (AKST) genindeki polimorfizminin anlamlılık açısından karşılaştırılmasında pearson ki kare testi kullanılmıştır. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edilmiştir.

eNOS geni intron 4'de 27 bazlık tekrarlardan oluşan Ardışık Kopya Sayısı Tekrarları (AKST) gen bölgesindeki genotip dağılımları Tablo 8'de özetlenmiştir. eNOS4 a/b gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için aa=%8,6, ab=%27,6 ve bb=%63,8 ve kontrol grubu için aa=%12,7, ab=%41,8 ve bb=%45,5 olarak bulundu. Hasta grubunun bb genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, aa genotipleri daha düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati ile eNOS genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. eNOS 4 a/bGen Polimorfizminin Hasta Ve Kontrol Gruplarına Göre Genotip Dağılımı

		GRUP		TOPLAM	p* DEĞERİ
		HASTA	KONTROL		
eNOS 4 a/b	aa SAYI	5	7	34	p=0,147
	%Gruplar arası	41,7%	58,3%	100,0%	
	%Gruplar içi	8,6%	12,7%	10,8%	
	ab SAYI	16	23	39	
	% Gruplar arası	41,0%	59,0%	100,0%	
	%Gruplar içi	27,6%	41,8%	34,5%	
	bb SAYI	37	25	62	
	% Gruplar arası	59,7%	40,3%	100,0%	
	%Gruplar içi	63,8%	45,5%	54,9%	
TOPLAM SAYI		58	55	113	
% Gruplar arası		51,3%	48,7%	100,0%	
%Gruplar içi		100,0%	100,0%	100,0%	

*p-değerleri Pearson ki-kare testi sonucunda elde edilmiştir.

eNOS 4 a/b Hardy-Weinberg testi için uygun olup olmadığı kontrol edildi. Grupların dağılımının Hardy-Weinberg testine uygun olduğu gözlendi. Bu yüzden eNOS 4a/b gen polimorfizmi hastalığa sebep olmamaktadır (Tablo 9,10).

Tablo 9.Hasta Grubu Allel Dağılımı

Hasta Allel Dağılımı	a	b
n=116	26	90
Frekans	0,2241	0,7759
HW p	0,1295	

Tablo 10. Konrol Grubu Allel Dağılımı

Kontrol Allel Dağılımı	a	b
n=110	37	73
Frekans	0,3364	0,6636
HW p	0,7618	

TARTIŞMA

Diyabetik nefropati diyabetin dört klinik tiplerinden tip 1 DM ve tip 2 DM'nin en çok görülen mikrovasküler komplikasyonudur. DN'nin özellikle tip 2 diyabetin morbidite ve mortalitesinden esas sorumlu olan, birçok organı tutabilen, hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve erken ölümle sonuçlanabilen en önemli komplikasyonudur (5). DN diyabetin en ciddi mikrovasküler komplikasyonlarından biridir ve genel olarak böbrek yetmezliğinin önde gelen nedenlerinden biridir(6).

Tip 2 diabetes mellitusun ortaya çıkışı birçok gen lokusuna bağlı olup ve tümünün az da olsa etkileri vardır. Multifaktöriyel bir hastalık olan Tip 2 diyabetes mellitusta genler sadece kendi aralarında etkileşmez. Bununla beraber çevresel etmenlerle de etkileşir ve kendini gösterir (7).Bazı genlerin veya gen olasılıklarının mevcut olmasıda, bir kişinin hastalığa yakalanma riskini olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir (8).Polimorfizm, ırklara ve etnik kökenlere göre farklı etkiler göstermektedir yani kişisel farklılıkların ortaya çıkmasına neden olan bir durumdur.

Nitrik oksit ve nitrik oksit sentaz enzimince L-Argininden sentezlenir. NO sentaz enziminin nöronal, indüklenebilir ve endotelyal olmak üzere üç farklı izoformu vardır. eNOS canlı ortamda ve laboratuar şartlarında sürekli sentez edilen tek nitrik oksit sentaz izoformudur. Bu gene ait çeşitli polimorfizmler üzerinde çalışılmıştır. Çalışmamızda eNOS gen polimorfizmi ile diyabetik nefropati arasında ilişki olup olmadığını ortaya çıkarmak amacıyla 58 diyabetik ve 55 kontrol bireyde kandan eNOS gen polimorfizmi analiz edildi. eNOS geni 21 kilo baz uzunluğunda 7q35-36 kromozomunda lokalizedir. eNOS intron 4

AKST tekrarlanan bölgesi, 4 veya 5 kez tekrarlanmaktadır. Bu bölgenin 5 tekrarı (b), 4 tekrarı ise (a) olarak genotiplendirir (56).

Böbrek hastalıklarında ise özellikle Tip 1 veya Tip 2 diyabetik veya non diyabetik son dönem böbrek yetmezliği hastalarında (SDBY) eNOS geni intron 4a/b polimorfizmi ve Glu298Asp polimorfizmi çeşitli gruplar tarafından çalışılmıştır. Kronik glomerulonefrit (KGN), diyabet, hipertansiyon, polikistik böbrek hastalığı, lupus nefriti, vaskulit, reflü, obstruktifnefropati, otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı (ADPKD) ve interstisyel nefrit gibi böbrek hastalıkları sonucu SDBY gelişen ve hemodiyalize giren hastalarda Glu298Asp mutasyonu kontrollere göre belirgin olarak yüksek bulunmuştur. Bu çalışmalarla diyabet ve nefropatisi olan hastalar için Glu298Asp polimorfizminin kötü prognoz ve SDBY'ye gidiş için bir risk oluşturduğu (50,51), benzer şekilde, eNOS intron 4 AKST polimorfizmi a allelinin diyabetik ve non diyabetik hastalar, kronik glomerülonefrit, membranoz nefropati ve lupus nefriti gibi böbrek patolojilerinde hastalığın prognozu ve SDBY'ye gidiş için olası bir prognostik faktör olduğu gösterilmiştir (52-55).

Galanakis ve arkadaşları tarafından intron 4 a/b polimorfzmi ve diyabetes mellitus arasında bir ilişki olduğu tanımlanmıştır (57).

Rahimi Z. ve arkadaşları tarafından eNOS 4a allel frekansının DN hastalarda, normoalbüminürik hastalara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak Tip 2 DM ve DN gelişiminde eNOS 4 a/b gen varyantları risk faktörü olarak tanımlanmamıştır.

Ezzidi ve arkadaşları Kuzey Afrika Tunusluların dahil edildiği çalışmada eNOS 4 a/b geni ve Tip 2 DN gelişimi arasında bir ilişki tanımlamış fakat DN ile arasında bir ilişki bulamamıştır.

Ahluwalia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada eNOS 4 a/b gen polimorfizimine sahip bireylerde DN gelişim riskinin daha yüksek olduğunu tanımlamıştır.

Bellini ve arkadaşları son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) ve eNOS 4 a alleli arasında güçlü bir ilişki tanımlamıştır (58).

Tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetik nefropati eNOS 4 a/b polimorfizmi arasındaki olası ilişkiyi araştırdığımız çalışmamızda ilk önce hasta ve kontrol gruplarının yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, aile öyküsü ve sigara kullanımı özellikleri sorgulandı. Hastaların yaşlarının ortalama 38–64 arasında olması nedeniyle kontrol grubu oluşturulurken bireylerin özellikle benzer yaş grubu aralığında olmasına dikkat edilmiştir. Kontrol grubu yaşları 38 ile 64 arasında değişen 55 kişiden oluşmaktadır. Yaş aralığı benzer olmakla birlikte

çalışmamızda hasta ve kontrol grubunda yaş ortalaması açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır. Hasta grubu yaş ortalaması 55,86 iken kontrol grubunda 53,78 olarak bulunmuştur.

Vücut kitle indeksleri, yaş, HDL-C, LDL-C ve Hba1c sonuçları açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Cinsiyet, sigara kullanımı, diyabet süresi ve aile öyküsü risk faktörleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlıbir fark bulunmuştur.

eNOS 4 a/b gen polimorfizminin genotip dağılımına bakıldığında, diyabetik nefropatili hasta grubu için aa=%8,6, ab=%27,6 ve bb=%63,8 ve kontrol grubu için aa=%12,7, ab=%41,8 ve bb=%45,5 olarak bulundu. Hasta grubunun bb genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, aa genotipleri daha düşük bulunmuştur. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM'lilerde diyabetik nefropati ile eNOS genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.($p = 0,0147$)

Sonuç olarak; gerçekleştirdiğimiz çalışmada cinsiyet ($P=0,001$), sigara kullanımı ($P=0,037$), diyabet süresi ($P=0,016$) ve aile öyküsü ($P=0,030$) DN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulundu ($P<0.05$).

Sonuç olarak gen polimorfizmi çalışmaları çalışmanın yapıldığı topluma özgüolup bu tip çalışmalarda incelenen parametreleri yalnızca araştırılan polimorfizmin tek başına etkilemediğine dikkat edilmelidir. Kişilerin içinde bulundukları çevresel faktörler, kullandıkları ilaçlar, sigara vb. maddeler araştırılan polimorfizmin etkilediği enzimin fonksiyonlarında değişiklikler yapabilmekte ve farklı sonuçların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir.

SONUÇLAR

"Trakya Üniversitesi Sağlık ve Uygulama Merkezine başvuran Tip II Diyabetli hastalarda eNOS 4 a/b Gen Polimorfizminin Diyabetik Nefropati gelişimine etkisinin araştırılması" başlıklı tez çalışmamızın sonuçları aşağıda verilmiştir. Bu çalışmamızda Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Nefroloji bilim dalları izleniminde olan ve yapılan tetkikler sonucunda Tip 2 DM tanısı almış toplam 55 hasta kontrol grubu ile Tip 2 DM tanısı almış bunun yanında diyabetik nefropatisi olan 58 kişi hasta grubu olmak üzere planladık. Kontrol grubunun 43'ü kadın, 12'si erkek ve hasta grubunun 26'sı kadın 32' si erkek kişilerden oluşmaktadır. Hasta grubumuzun yaş ortalaması 55,86±6,37 ve kontrol grubunun yaş ortalaması 53,78±6,35 olarak hesaplandı. Trakya Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalında; DNA izolasyonu, PZR ve agaroz jel teknikleri kullanılarak DN ile eNOS4a/b gen polimorfizmi arasındaki ilişki incelendi.

Çalışmamızda öncelikle belirlenen risk faktörleri; cinsiyet, yaş, aile öyküsü, diyabet süresi, sigara içme durumu, allel dağılımlar, HDL-LDL, VKİ, Hba1c için analizler gerçekleştirildi. Yapılan analizler sonucunda ha1c değerleri, HDL-LDL seviyeleri, VKİ, yaş ve allel dağılımlarDN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulunmadı. Cinsiyet, diyabet süresi, sigara içme durumu ve aile öyküsü faktörleri açısından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur.

eNOS 4a/b gen polimorfizminin genotip frekansı dağılımına bakıldığında diyabetik nefropatili hasta grubu için aa=%8,6, ab=%27,6, bb=59,7 ve kontrol grubu için =%17,7, ab=%41,8, bb=45,5 olarak bulundu. Ayrıca eNOS 4a/b gen polimorfizminin Tip 2 Diyabetli DN ile ilişkili olmadığı sonucuna varıldı.

ÖZET

Bu çalışmada amaç eNOS 4 a/b gene polmorfizmi ile diyabetik nefropati arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir. Çalışma DN tanısı konmuş 58 hasta (26 kadın, 32 erkek) ve klinik yöntemlerle Tip 2 diyabetes mellitus olduğu belirlenen 55 kontrol (43 kadın,12 erkek) üzerinde yapıldı. Spesifik primerler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemleri kullanılarak jel elektroforezinde gözlemlendi.

Endotelyal nitrik oksit sentaz 4 a/b genotip frekansları aa, bb, ab için DN grubunda sırasıyla %8,6, %59,7, %27,6 ve kontrol grubunda ise sırasıyla %12,7 , %45,5 %41,8 olarak hesaplandı.

Sonuçlar hasta-kontrol grupları ile eNOS 4a/b gen polimorfizimi arasında anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir. Cinsiyet, sigara kullanımı, aile öyküsü ve diyabet süresi DN ile ilişkili risk faktörleri olarak bulundu.

Anahtar Kelimeler: Tip 2 diyabet, diyabetik nefopati, eNOS,4 a/b, polimorfizm

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF eNOS 4a/b GENE POLYMORPHISM IN DEVELOPING DIABETIC NEPHROPATHY IN TYPE II DIABETIC PATEINTS IN THE APPLICANT OF TRAKYA UNİVERSITY HEALTH CENTER FOR MEDICAL RESEARCH AND PRACTICE SUBJECTS

SUMMARY

In this work, the aim was to assess the relationship between eNOS 4 a/b gene polymorphisms with diabetic nephropathy. The study has been performed on 58 patients (26 Women, 32 Man) and 55 inviduals (43 Women, 12 Man) proven to have Tip 2 DM with clinical diagnosis. The technique will use a polymerase chain reaction and specific primers, followed by gel electrophoresis.

The frequencies of eNOS gene 4 a/b genotypes were found to be %8,6 for aa, %59,7 for bb and %27,6 for ab, in the DN group and %12,7 for aa, %45,5 for bb and %41,8 for ab in the control group.

The results showed no significant difference between eNOS 4 a/b gene polymorphism with patient-control group. Gender, smoking, family DM history and duration of diabetes were found to be associated with DN.

Keywords: Type 2 diabetes, diabetic nefropati, eNOS, 4 a/b, Polymorphism

KAYNAKLAR

1. World HealthOrganization/International DiabetesFederation (WHO/IDF). Definition and diagnosis of diabetesmellitusandintermediatehyperglycemia. Report ofa WHO/IDFconsultation. 2006

2. Düzöz GT, Çatalkaya D, Uysal DD. Tip 2 DiabetesMellituslu Hastaların Öz-Bakım Gücünün Değerlendirilmesi. Yeni Tıp Dergisi 2009;26 (4):210-213

3. Özdemir İ, Hocaoğlu Ç, Koçak M, Ersöz HÖ. Tip 2 diyabetesmellituslu hastalarda yaşam kalitesi ve ruhsal belirtiler. Düşünen Adam Psikiyatri ve Nörolojik Bilimler Dergisi, 2011;24:128-138

4. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği **(**TEMD). Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu, 2018

5. Dinneen SF, Gerstein HC. The association of microalbuminuria and mortality in non-insulin-dependent diabetes mellitus. A systematic overview of the literature. Arch Intern Med. 1997 ;157(13):1413-8.

6. Parving HH. Diabetic nephropathy: prevention and treatment. Kidney Int 2001;60:2041 55.

7. DiagnosisandClassification of Diabetes Mellitus. DiabetesCare. 2006, 29: s.43-s.48

8. Grant, R.W., Moore, A.F., & Florez, J.C. (2009). Genetic architecture of type 2diabetes: recent progress and clinical implications. Diabetes care, 32(6),1107-1114.

9. Hypertens J. The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitricoxide. 2002;20(10):2023-7.

10. AmericanDiabetesAssociation. Report of theexpertcommittee on thediagnosisandclassification of diabetesmellitus. DiabetesCare. 1997, 20: 1183-1197.

11. Satman İ, İmamoğlu Ş, Yılmaz C, ve ark. Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi Ve İzlem Kılavuzu. Miki Matbacılık: Türkiye Endokrinoloji Ve Metabolizma Derneği; 2014. s.15-25.

12. Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL. Harrison's principles of internal medicine. New York. 2005:1467-8.

13. İliçin G BK, Süleymanlar G, Ünal S. İç hastalıkları. Güneş Kitabevi. 2003:2311-31.

14. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, (2015). Diabetes Mellitus Çalışma ve Eğitim Grubu, Satman İ. Yılmaz C. İmamoğlu Ş. (Editörler), Diyabetes mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu, Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım, Ankara.

15. M Ö. Endokrinoloji Metabolizma. İstanbul Tıp Kitabevi Yayıncılık TicLtdŞti 2011:543-64, 601-8

16. International Diabetes Federation (IDF). Diabetes Education Modules. 2011. https://d-net.idf.org/en/library/178-diabetes-education-modules-2011.html

17. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2009. Diabetes Care 2009;32:13-61.

18. Satman I, Yilmaz T, Sengul A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care 2002; 25:1551-6.

19. Satman İ, Alagöl F, Ömer B, Kalaca S, Tütüncü Y, Çolak N. Türkiye diyabet, hipertansiyon, obezite ve endokrinolojik hastalıklar prevalans çalışması-II.(TURDEP II). 2011.

20. International DiabetesFederation (IDF). Diabetes Atlas, 8th edition. 2017. http://diabetesatlas.org/resources/2017-atlas.html

21. Goldman L, Ausiello D, Ünal S. Cecil Textbook of Medicine: Türkçe 22. baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 2006, pp 1424-52.

22. Atasoy A, Atay A, Ahbab S, Hanedar M, Yenigün M. Diyabetik nefropati'ye genel bir bakış. Haseki Tıp Bülteni, 2015; 53: 16-19

23. Olgun N, Aslan FE, Coşansu G, Çelik S. Diabetes Mellitus. Karadakovan A, Aslan FE (editörler). Dahili ve Cerrahi Hastalıklarda Bakım. Adana: Nobel Kitabevi; 2011.s.817-852.

24. Bakris GL, Whelton P, Weir M, Mimran A, Keane W, Schiffrin E. The future of clinical trials in chronic renal disease: outcome of an NIH/FDA physician specialist conference. Evaluation of clinical trial endpoints in chronic renal disease study group. J Clin Pharmacol 2000;40:815–25.

25. Orhan Y. Diabetes mellitus. Sencer E (Editör). Endokrinoloji, metabolizma ve beslenme hastalıkları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s.246-51.

26. Altıparmak MR, Apaydın S. Diyabetik nefropati. Yenigün M (Editör). Her yönüyle diabetes mellitus. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2001. s.383-99.

27. Earle KA, Porter KK, Otsberg J, Yudkin JS. Variation in the progression of diabetic nephropathy according to racial origin. Nephrol Dial Transplant 2001;16:286-90.

28. Merta M, Reiterova J, Rysavá R, Kmentová D, Tesar V. Genetics of diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant 2003;18(5):24-5.

29. Cooper ME. Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy. Lancet 1998;352:213-9.

30. Lewis EJ, Hunsicker LG, Clarke WR ve ark. Renoprotective effect of the angiotensinreceptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. N Engl J Med. 2001,20;345(12):851-60.

31. Agodoa L. United States Renal Data System (USRDS). Nefrologia. 2000; 20 Suppl 5:13-6.

32. Foggensteiner L, Mulroy S, Firth J. Management of Diabetic Nephropathy. Journal of the Royal Society of Medicine 2001; 94:210-217

33. Parchwani DN, Upadhyah A. Diabetic Nephropathy: Progression and Pathophysiology. International Journal of Medical Science and Public Health 2012;Vol 1,Issue 2

34. Kılınç K, Kılınç A. Nitrik Oksit biyolojik fonksiyonları ve Toksik Etkileri. Ankara: Palme Yayıncılık, 2003.

35. Nathan C, Xie QW. Nitricoxidesynthases. Roles, tollsandcontrols. Cell 1994; 78:915-918.

36. Karakaya, D, Barış, S , Tür, A . "Nitrik Oksit". Journal of Experimental and Clinical Medicine 17 (2010). http://dergipark.gov.tr/omujecm/issue/20379/216149

37. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitricoxide-an endothelial cellsurvivalfactor. Cell DeathDiffer 1999;6: p.964-968.

38. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitricoxidesynthases: structure, functionandinhibition. Biochem J 2001; 357:593-615.

39. Marin J and Rodríguez-Martínez MA Role of vascular nitric oxide in physiological and pathological conditions, Pharmacol Ther., 1997;75(2):111-34.

40. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. J Pathol 2003;199(1):8-17.

41. Juan PC, Gianpiero LC, Leonelo EB, Liam S, Steve EH, Hingorani AD. Endothelial nitric oxide synthase gene Polymorphism and cardiavascular disease. Am J Epidemiol, 2006; 164: 921-35.

42. Cannon RO 3rd. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: focus on the endothelium. Clin Chem 1998; 44(8):1809-19.

43. Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. J Mol Cell Cardiol 1997;29(1):55- 65.

44. Majid DS, Kopkan L. Nitricoxideandsuperoxide interactions in thekidneyandtheirimplication in the development of salt-sensitive hypertension. ClinExpPharmacolPhysiol. 2007 Sep;34(9):946-52.

45. Wang HG, Wang JL, Chang P, Cao FL, Liu XC, Ma YB, Zhai GX, Gao HQ. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and essential hypertension in Han Chinese. Genet Mol Res. 2010 Sep 21;9(3):1896-907.

46. Mansur T. Deri Biyolojisinde ve Tedavisinde Nitrik Oksit. T klin Dermatoloji. 2002;12(5):143-8.

47. Kendall HK, Marshall RI, Bartold PM. Nitric oxide and tissue destruction. Oral Dis 2001; 7:2-10.

48. Ortega MA, Amaya AA. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. Pharmacol Res 2000; 42:421-427.

49. Amasyalı S. Endotelyal nitrik oksit sentaz gen polmorfizminin yüzeyel mesane kanseri klinik bulguları ile ilişkisi (tez). İstanbul:İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi;2010

50. Suzuki H, Nagase S, Kikuchi S, Wang Y, Koyama A. Association of a missense Glu298Asp mutation of the endothelial nitric oxide synthase gene with end stage renal disease. Clin Chem 2000; 46(11):1858-1860.

51. Persu A, Stoenoiu MS, Messiaen T, Davila S, Robino C, El -Khattabi O, et al. Modifier effectof ENOS in autosomal dominant polycystic kidney disease. Hum Mol Genet 2002;11(3):229-241.

52. Nagase S, Suzuki H, Wang Y, Kikuchi S, Hirayama A, Ueda A, et al. Associ ation of eNOS gene polymorphisms with end stage renal diseases. Mol Cell Biochem 2003; 244(1-2):113- 118.

53. Buraczynska M, Ksiazek P, Zaluska W, Nowicka T, Ksiazek A. Endothelial nitric oxide synthase gene intron 4 polymorphism in patients with end -stage renal disease. Nephrol Dial Transplant 2004; 19(9):2302-2306.

54. Stratta P, Bermond F, Guarrera S, Canavese C, Carturan S, Dall'Omo A, et al. Interaction between gene polymorphisms of nitric oxide synthase and renin - angiotensin system in the progression of membranous glomerulonephritis. Nephrol Dial Transplant 2004; 19(3):587 –595

55. ATEŞ K. Diyaliz hastalarında aterosklerozis ve enos geninin glu298asp polimorfizmi(tez).Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2009

56. Necchi D., Virgili M., Monti B., Contestabile A. and Scherini E.: Regional alteration of the NO/NOS system in the aging brain; a biochemical, histochemical and immunochemical study in the rat. Brain Res. 933: 31–41, 2002.

57. Galanakis, E., Kofteridis, D., Stratigi, K., Petraki, E., Vazgiourakis, V., Fragouli, E., Mamoulakis, D., Boumpas, D. T., Goulielmos, G. N. (2008) Intron 4 a/b polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with both type 1 and type 2 diabetes in a genetically homogeneous population. Hum. Immunol. 69, 279-283.

58. Rahimi Z, Shahvaisi-Zadeh F, Sadeghei S, Vessal M, Yavari N. eNOS 4a/b polymorphism and its interaction with eNOS G894T variants in type 2 diabetes mellitus: modifying the risk of diabetic nephropathy. Dis Markers (2013) 34(6):437–43. doi:10.3233/DMA-130988

ŞEKİLLER LİSTESİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Diyabetik Nefropatinin Patogenezi 11

Şekil 2. Nitrik Oksit Sentezi……..……..…..…….…….……..……...11

Şekil 3. Kromozomda eNOS Geninin Yerleşimi 13

Şekil 4. eNOS Geninin Yapısal Organizasyonu..... 15

Şekil 5. eNOS geni 4. introndaki 4a/b polimorfizmi için PZR jel elektroforez görüntüsü, M: 100 bç ladder, bç: baz çifti. bb:421 bç, ab: 394 bç ve 421 bç, aa: 394 bç 22

TABLOLAR

Tablo 1. Diyabetes Mellitus'un Etiyolojik Sınıflaması 4

Tablo 2. Tip 2 Diyabet Komplikasyonları……..……..…….……...5

Tablo 3. Diyabetik Nefropatinin Evreleri ve Özellikleri 8

Tablo 4. Endojen NO'nin Artması ve Azalmasının Etkileri..... 10

Tablo 5. NOS İzoformlarını Kodlayan Genler ve Özellikleri..... 14

Tablo 6. Diyabetik Nefropatili Hasta Ve Kontrol Gruplarındaki Cinsiyet, Sigara İçme Durumu Ve Aile Öyküsü Ve Risk Oranları..... 24

Tablo 7. Diyabetik Nefropatili Hasta Ve Kontrol Gruplarındaki Yaş, VKİ, HDL, LDL, Hba1c , Diyabet Süresi ve Risk Oranları..... 25

Tablo 8. eNOS 4 a/b Gen Polimorfizminin Hasta Ve Kontrol Gruplarına Göre Genotip Dağılımı 26

Tablo 9. Hasta Grubunun Allel Dağılımı..... 27

Tablo 10. Konrol Grubunun Allel Dağılımı 27

ÖZGEÇMİŞ

Süleyman İPEK

Doğum Tarihi: 22.10.1989

EĞİTİM:

1995-2000 İzmir, Osman Faruk Verimer İlköğretim Okulu

2000-2003 İzmir, Alsancak Melih Özakat İlköğretim Okulu

2003-2007 İzmir, Bayraklı Lisesi

2007-2012 Van, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Eğitim Fakültesi Fizik Bölümü

2012- Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisansı

EKLER

EK 1. TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURUL İZNİ

T.C. TRAKYAÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU Edirne, Türkiye

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYIBAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTF-BAEK 2015/20	
	PROTOKOL ADI	Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezine Başvuran Tip II Diyabetli Hastalarda eNOS 4a/b Gen Polimorfizminin Diyabetik Nefropati Gelişimine Etkisinin Araştırılması	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ		
	DESTEKLEYİCİ		
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	Tek Merkez Ulusal	Çok Merkez Uluslararası
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 02/12**	**Tarih:21.01.2015**	
	Fakültemiz Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŞAR'ın sorumluluğunda yapılması planlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Süleyman İPEK'in tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda gerçekleştirilmesinde etik bilimsel standartlar açısından sakınca bulunmadığına mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ			
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu, TÜTF-BAEK Yönergesi		

ÜYELER

Ünvan/Ad/ Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki(*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ülfet VATANSEVER ÖZBEK Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Başkan Yardımcısı	Tıp Tarihi ve Etik	T.Ü.T.F. Tıp Tarihi ve Etik A.D.	K	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Ç. Hakan KARADAĞ Üye	Tıbbi Farmakoloji.	T.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	E	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. F. Nesrin TURAN Üye	Biyoistatistik	T.Ü.T.F. BiyoistatistikA.D.	K	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi TOZKIR Üye	Tıbbi Genetik	T.Ü.T.F. Tıbbi Genetik A.D.	E	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Hasan ÜMİT Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Selma Arzu VARDAR Üye	Fizyoloji	T.Ü.T.F. Fizyoloji A.D.	K	HAYIR	EVET	Mazeretli
Doç. Dr. Salim DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	T.Ü.T.F. İç Hastalıkları A.D.	E	HAYIR	EVET	Mazeretli
Prof. Dr. Muzaffer ESKİOCAK Üye	Halk Sağlığı	T.Ü.T.F. Halk Sağlığı A.D.	K	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Koray ELTER Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	T.Ü.T.F. Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D.	E	HAYIR	EVET	
Yrd. Doç. Dr. Rugül KÖSE ÇINAR Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	T.Ü.T.F. Ruh Sağ. ve Has. A.D.	K	HAYIR	EVET	
Doç. Dr. Sevtap HEKİMOĞLU ŞAHİN Üye	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	E	HAYIR	EVET	Mazeretli
Doç. Dr. Atakan SEZER Üye	Genel Cerrahi	T.Ü.T.F. Genel Cerrahi A.D.	E	HAYIR	EVET	
Prof. Dr. Berkan DEMİRAL Üye		T.Ü. İktisadi ve İdari Bilimler Fakültesi	E	HAYIR	EVET	Mazeretli
Avukat Baki KURNAZ Üye		T.Ü. Rektörlüğü	E	HAYIR	EVET	B. Kurnaz

*Araştırma ile ilişki
**Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Recep YAĞIZ
Dekan