ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DİYABETLİ HASTALARDAKİ NEFROPATİ GELİŞİMİNDE BÖBREK YETMEZLİĞİNİN PROGNOSTİK BELİRTEÇLERİ OLARAK TÜMÖR NEKROZ ALFA GEN POLİMORFİZMİNİN (TNF-α) 308G/A VE MONOSİT KEMOATRAKTAN PROTEİNİ-1 (MCP-1) 2518G/A ROLÜ

Surri Faris Subhi HAYYAWI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Surri Faris Subhi Hayyawi tarafından hazırlanan **"Diyabetli Hastalardaki Nefropati Gelişiminde Böbrek Yetmezliğinin Prognostik Belirteçleri Olarak Tümör Nekroz Alfa Gen Polimorfizminin (TNF-α) 308G/A ve Monosit Kemoatraktan Proteini-1 (MCP-1) 2518G/A Rolü"** adlı tez çalışması adlı tez çalışması 16/06/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Filiz Sarıkaya PEKACAR

Eş Danışman : Prof. Dr. Ahmed Abbas Hasan AL ROKAN

Jüri Üyeleri:

Başkan : Doç. Dr. Müslüm KUZU
Beslenme ve Diyetetik Anabilim Dalı
Karabük Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Pınar ARSLAN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"Diyabetli Hastalardaki Nefropati Gelişiminde Böbrek Yetmezliğinin Prognostik Belirteçleri Olarak Tümör Nekroz Alfa Gen Polimorfizminin (TNF- α) 308G/A ve Monosit Kemoatraktan Proteini-1 (MCP-1) 2518G/A Rolü"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (01/01/2022).

Surri Faris Subhi HAYYAWI

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Diyabetli Hastalardaki Nefropati Gelişiminde Böbrek Yetmezliğinin Prognostik Belirteçleri Olarak Tümör Nekroz Alfa Gen Polimorfizminin (TNF-α) 308G/A ve Monosit Kemoatraktan Proteini-1 (MCP-1) 2518G/A Rolü

Surri Farıs Subhı Hayyawi

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Filiz Sarıkaya PEKACAR
Eş-Danışman : Prof. Dr. Ahmed Abbas Hasan AL ROKAN

Dünyada çok sayıda diabetes mellitus (DM) hastası vardır. Bunların yaklaşık %96'sı Tip 2 DM'dir. DM'nin komplikasyonları mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır. Mikrovasküler komplikasyonları; retinopati, nefropati ve nöropatidir. Makrovasküler komplikasyonları ise koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklardır. Diyabetik nefropati (DN), artan sayıda hastanın son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) geliştirmesinden dolayı önemli bir sağlık sorunudur. ABD'de yeni gelişen SDBY'nin %20 ile %40'ını DN oluşturmaktadır. Bu çalışma, bu mekanizmalarla ilgilenen genlerin ve diğer belirteçlerin bir özetini sunar. Oldukça dikkat çeken bir molekül, inflamatuar sitokin tümör nekroz faktörü-a'dır (TNF- α). TNF- α 'nın bu farklı sonuçları uyguladığı mekanizma bilinmemekle birlikte, TNF- α 'nın NOD farelerinde diyabete ilerleme üzerinde olumlu veya olumsuz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Diyabete bu hızlı ilerleme, adacıkların bağışıklık hücreleri ile daha erken ve daha agresif infiltrasyonu ve adacık antijen sunan hücrelerin adacıklarda T hücrelerine situ adacık antijen sunumunda bir artış ile ilgilidir. Son çalışmalar, düşük dereceli bir inflamatuar yanıtın da bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Renal hücreler tarafından üretilen güçlü bir kemokin olan Monosit Kemoatraktan Protein 1 (MCP-1), bu süreçte çok önemli bir oyuncu olarak ortaya çıkmıştır. Spesifik olarak, MCP-1'in diyabetik hayvanların böbreklerinde aşırı eksprese edildiği gösterilmiştir. TNF-α -308G/A ve Monosit Kemoatraktan Protein-1 Promoter 2518G/A, diyabetik hastalarda böbrek yetmezliğinin nefropati geliştirmesini öngören belirteçler olarak rol almaktadır. Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi (PCR-RFLP) tekniği kullanılmış ve amplifiye edilen DNA ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (Pvull. ve NcoI enzimleri) ile kesilmesi, belirli genotipleri ifade eden farklı moleküler boyutlarda fragmanlar vermiştir. MCP-1 2518G/A, yabanıl homozigot AA tipi, heterozigot GA ve homozigot GG tipi olmak üzere üç genotip ortaya çıkardı, bu genotiplerin sıklığı (sırasıyla hastalarda %60, %40,0 ve %0, kontrol grubunda %46.6 ,40% ,13,3%), MCP-1 2518G/A hastalarında, A alleli kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hastalarda önemli ölçüde fark kaydetmiştir. Tüm genotip gruplarında, cinsiyet gruplarına göre önemli farklılıklar vardır. İstatistiksel

olarak TNF-α-308 gen polimorfizmi, AA genotipinde %1,5, AG genotipinde ise %12,8 oranında ciddi bir farklılık saptanırken, GG genotipi sağlıklı grupla belirgin olmayan bir fark bulunmuştur. G aleli hastalarda ise %92.1 ile belirgin farklılık tespit edilmiştir. Sağlıklı grupla karşılaştırıldığında. TNF- α -308 geninde, hasta gruplarında genotipe göre belirgin farklılık bulunmazken, cinsiyet gruplarına göre ciddi farklılık vardır. TNF-α düzeyleri tüm hastalarda TNF- α -308 gen polimorfizm gruplarında (sırasıyla AA, AG ve GG genotiplerinde 37.78±7.83, 30.45±3.83 ve 32.64±5.81) önemli farklılık saptanmıştır. Sonuç olarak, bu çalışma AA AG genotipi ve TNF-gen-308 polimorfizminin G aleli ve MCP-1 2518G/A'nın A aleli diyabetik nefropatiye yatkınlığa katkıda bulunabilir.

2022, 88 sayfa

ANAHTAR KELİMELERİ: Nefropati, TNF-α -308G, MCP-1, Polimorfizmleri.

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ROLE OF TUMOR NECROSIS ALPHA GENES POLYMORPHISM TNF-A -308G/A AND MONOCYTE CHEMO ATTRACTANT PROTEIN-1 PROMOTER 2518G/A AS PREDICTIVE MARKERS FOR RENAL FAILURE TO DEVELOP NEPHROPATHY IN DIABETIC PATIENTS

Surri Faris Subhi Hayyawi

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Fılız Sarıkaya PEKACAR

Co- Advisor: Prof. Dr. Ahmed Abbas Hasan AL ROKAN

There are many diabetes mellitus (DM) patients in the world. About 96% of these are Type 2 DM. Complications of DM are divided into microvascular and macrovascular complications. Microvascular complications; retinopathy, nephropathy, and neuropathy. Macrovascular complications are coronary heart disease, peripheral vascular disease and cerebrovascular diseases. Diabetic nephropathy (DN) is an important health problem as an increasing number of patients develop end-stage renal disease (ESRD). Between 20% and 40% of the newly developing ESRD in the USA is DN. This study provides a summary of the genes and other markers involved in these mechanisms. One molecule that has received considerable attention is the inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α). Although the mechanism by which TNF- α exerts these different results is unknown, TNF- α has been shown to have a positive or negative effect on progression to diabetes in NOD mice. This rapid progression to diabetes is related to earlier and more aggressive infiltration of islets by immune cells and an increase in islet antigen presentation in situ by islet antigen presenting cells to T cells in islets. Recent studies suggest that a low-grade inflammatory response may also play a role. Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1), a potent chemokine produced by renal cells, has emerged as a crucial player in this process. Specifically, MCP-1 has been shown to be overexpressed in the kidneys of diabetic animals. Blood samples were collected from al groups, Serum samples separated for TNF-α levels and genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes for further molecular study to reveal any association between Tumor Necrosis alpha genes polymorphism TNF-α -308G/A and Monocyte

Chemo attractant Protein-1 Promoter 2518G/A as predictive markers for nephropathy in diabetic patients. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) technique was used for this purpose and digestion of the amplified DNA products by restriction endonuclease (PvuII.and NcoI enzymes) gave fragments with different molecular sizes which express certain genotypes. The distribution analysis showed that the mean age of patients were included in this study their 52.24±10.45years old for diabetic with nephropathy, (55.12±9.65, (24%) of patients without nephropathy. The genotyping of MCP-1 2518G/A revealed three genotypes; the wild homozygous AA type, the heterozygous GA & the mutant homozygous GG type, the frequency of these genotypes(60%,40%,0% in patients and 46.6%, 40%, 13.3% in controls group) respectively, the A allele also recorded significant different in patients when compare with control group.In MCP-1 2518G/A patients there are no significant different in patients with nephropathy and without nephropathy in all groups of genotype, but there are significant difference according to age groups. Polymorphism TNF-gene-308 gene recorded statically significant different in AA, AG genotype (1.5% ,12.8% respectively), while the GG genotype recorded high present with no significant with healthy group, G allele in patients recorded 92.1% with significant difference when compared with healthy group. In TNF-gene-308 gene there are no significant different in patients groups according to genotype, but there are significant difference according to age groups. The Levels of TNF- α recorded significant difference in all patients TNF-gene-308 gene polymorphism groups (AA,AG and GG. 37.78±7.83, 30.45±3.83 and32.64±5.81respectivelly. In conclusion, this study suggests that the AA, AG genotype and G allele of TNF-gene-308 polymorphism, and the A allele of MCP-1 2518G/A may contribute to the predisposition for diabetic nephropathy.

2022, 88 pages

Key Words: Nephropathy, TNF-α -308G, MCP-1, Polymorphism

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince, bilgi ve tecrübesiyle bana destek veren değerli tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Filiz Sarıkaya Pekacar' a, uzmanlık eğitimim süresince, eğitimime katkıda bulunan bilgisi ve tecrübelerini paylaşan başta Dr. Ahmed Abbas HASAN olmak üzere klinik şeflerime, hocalarıma ve uzmanlarıma, asistanlık sürecimin bana kazandırdığı çok sevgili çalışma arkadaşlarıma, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimize ve personellerimize teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca gösterdiği özveri ve sonsuz fedakarlıkla bu uzmanlık sürecini tamamlayabilmemin en büyük mimarı olan çok değerli annem ve desteğini hep hissettiren babama, teşekkür ederim. Eğitimime verdiği destek ve hayatıma kattığı tüm güzellikler için eşime ve huzur ve neşe kaynaklarıma özverileriyle hep en büyük destekçilerim oldukları için teşekkür ederim.

Surri Faris Subhi HAYYAWI

Çankırı, Ocak 2022

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ xiv

ÇİZELGELER DİZİNİ xvi

1. Giriş 1

2. KURAMSAL TEMELLER 5

2.1 Kronik böbrek hastalıkları 5

2.2 Etiyolojiler ve yaralanma mekanizmaları 7

2.3 Diabetes mellitus 8

2.4 Diabetes mellitusun sınıflandırılması 10

2.4.1 Tip 1 diyabetes mellitus 11

2.4.2 Tip 2 Diabetes Mellitus 11

2.4.3 Gestasyonel diyabetes mellitus 12

2.4.4 Diğer nadir DM türleri 12

2.5 Tip 2 Diyabet – etiyoloji, patofizyoloji ve uzun vadeli komplikasyonlar 13

2.6 Tip 2 Diyabette Bağışıklık Sistemi 16

2.7 Diyabetik nefropati 18

2.8 TNF-α 21

2.8.1 TNF- α geninin yeri 24

2.8.2 TNF- α genindeki polimorfizmler 25

2.8.3 Diyabette TNF - α G308A Polimorfizminin Rolü 26

2.8.4 TNF-Reseptörleri 27

2.9 Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1) 28

2.9.1 MCP-1/CCR2 sinyalizasyonu 29

2.9.2 MCP-1 polimorfizmi 31

2.9.3 MCP-1 Gen Polimorfizmleri ve Diyabetik Nefropati 32

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER 35

3.1 MATERYAL 35

3.1.1 Aletler ve Ekipmanlar: 35

3.1.2 Ticari kitler 36

3.1.3 İşaretleyici ve primerler 37
3.1.3.1 Primerler 37
3.1.4 Kimyasallar 38
3.1.4.1 Restriksiyon enzimi 38
3.2 Yöntemler 39
3.2.1 Numunelerin toplanması 39
3.2.2 Kan Örnekleri 40
3.2.3 ELISA yöntemi 40
3.2.3.1 TNF- α Testi 40
3.2.3.1.1Test prensibi 40
3.2.3.1.2 ELISA Tekniği için Maddelerin ve Çözümlerin Hazırlanması:- 41
3.2.3.1.3 Tahlil prosedürü 42
3.3 Biyokimyasal testler 42
3.4 Hematolojik çalışma 42
3.5 Moleküler Yöntemler 43
3.5.1 Genomik DNA ekstraksiyonu 43
3.5.2 Genomik DNA Profilleme 44
3.5.3 RFLP-PCR Tekniği 44
3.5.3.1 PCR ana karışım hazırlığı 44
2.5.3.2 PCR Programı 46
3.5.3.3 PCR ürün analizi 46
3.5.3.4 RFLP-PCR karışımı hazırlama 47
3.6 İstatistik analizi 48
4. BULGULAR 49
4.1 Örneklerin demografik dağılımı 49
4.2 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunun klinik ve biyokimyasal bulguları. 49
4.3 Genetik çalışma: 51
4.3.1 MCP-1 2518GA 51
4.3.1.1 DM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde MCP-1 2518G/A Genotip ve Alel Dağılımları. 56

4.3.1.2 MCP-1 2518G/A Nefropatili ve Nefropatisiz DM Hastalarında Genotip ve Alel Dağılımları. 58

4.3.1.3 MCP-1 Geninin Genotip ve Alel Frekanslarının Hasta Olgu ve Sağlıklı Gruplarda Cinsiyete Göre Dağılımı. 59

4.3.2 TNF-α −308 (G/A) Genotipi 61

4.3.2.1 TNF-α −308 (G/A) DM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde Genotip ve Alel Dağılımları. 61

4.3.2.2 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel dağılımı. 62

4.3.2.3 TNF-α gen polimorfizmlerine göre hasta ve Kontrol grubunda TNF-α serum düzeyleri. 64

4.3.2.4 Hasta ve kontrol grubunda TNF-gen-308 Gen polimorfizminin genotip ve alel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı. 66

5. Tartışma 64

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 69

6.1 SONUÇ ..... Error! Bookmark not defined.

6.2 ÖNERİLER ..... Error! Bookmark not defined.

7. Kaynaklar 70

8. ÖZGEÇMİŞ 88

KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
Ab	Antikor
ACE	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACEi	anjiotensin dönüştürücü enzim inhibitörü
Ag	Antijen
APC	antijen sunucu hücre
AP-1	aktivator protein-1
ARBs	anjiotensin reseptör blokerleri
B-lymphocytes	Kemik iliği (veya bursa) kaynaklı lenfosit
bp	Base pair
B_{reg}	Regulatory B-lymphocytes
BSA	Sığır Serum albümin
CAM -1	Hücresel Adezyon Moleküller
C-C	Chemokin
CCR	Kemokin Reseptör
CD	Farklılaşma Kümesi
CD	Kron Hastalığı
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CKD	Kronik böbrek hastalığı
CRDs	Sistein Zengin alanlar
DAG	Diaçil Gliserol
CSF	Beyin Omuriliği Sıvısı
DM	Diyabetes mellitüs
DN	Diyabetik nefropati
DNA	Deoksi Ribonükleik Asit
EAR	Erken Alerjik Yanıt
ECM	Hücre Dışı Matriks
ECP	Eozinofiller-kemotaktik Protein
EDTA	Etilen diamin tetra asetikasit
FDA	Gıda ve İlaç Dairesi
ELISA	Enzim-bağlı immunosorbent analiz
ESRD	Son Dönem Böbrek Yetmezliği
eGFR	Tahmini Glomerüler Filtrasyon Hızı
G-CSF	Granulosit koloni uyarıcı faktör
GDM	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
GFR	Glomerüler Filtrasyon hızı
GM-CSF	Granülosit Makrofaj Koloni Stimule edici Faktör
GWAS	Genom Ölçekli İlişkilendirme Çalışmaları
KDIGO	Böbrek Hastalıkları: Küresel Sonuçları İyileştirmesi
HLA	İnsan Lökosit Antijeni
HRP	Horseradish peroxidase
IBD	İnflamatuar Bağırsak Hastalığı

ICAM	Hücreler arası adezyon molekülü
IFN	İnterferon
Ig	İmmünglobulin
IgE	İmmünglobulin E
IgG1	İmmünglobulin subtip G 1
IgG2	İmmünglobulin G subtip 2
IgG3	İmmünglobulin G subtip 3
LADA	Erişkinde Gizli Otoimmun Diyabet
IP3	inositol triphosphate
IL	İnterlökin
IL-1	İnterlökin-1
IL-3	İnterlökin-3
IL-4	İnterlökin-4
IL-5	İnterlökin-5
IL-9	İnterlökin-9
ILC2s	Grup 2 doğuştan gelen lenfoid hücreler
IL-13	İnterlökin-13
LDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LPS	Lipopolisakkarit
LTA	Lenfotoksin Alfa
LTB	Lenfotoksin beta
mAbs	Monoklonal Antikorların
MCP-3	Monosit Kemoatraktan Protein-3
MHC	Büyük Doku Uygunluk Kompleksi
MODY	Gençlerde Görülen Olgunluk-Başlangıçlı Diyabet
NKC	Natural killer cells
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Acid
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
NK	Doğal Öldürücü Hücre
NSAIDs	Steroid Olmayan Antiinflamatuar İlaçlar
PBS	Tuzlu Fosfat Tamponu
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLAD	Ön-ligand bağlama düzeneği alanı
PLC	Fosfolipaz C
RAS	Renin-Anjiyotensin Sistemi
RCF	Rölatif santrifüj gücü
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
ROS	Reaktif oksijen türü
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
STAT	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü
T1DM	Tip1 Diyabetes mellitüs
T2DM	Tip2 Diyabetes mellitüs
TAE buffer	Tris asetik asit EDTA
TACE	Tümör Nekrozis Faktör Alfa Dönüştürücü Enzim
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNF-α	Tümör nekrosis faktör alfa
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TNFR1	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 1

TNFR2	Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü 2
UTR	Çevrilmemiş Bölgesini
W1	Yıkama tamponu 1
WBC	Beyaz kan hücreleri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Homeostatik koşullar altında böbrek anatomisi ve fizyolojisi (Lepore *et al.* 2014). 6

Şekil 2.2 Glikozun insülin ve glukagon hormonları tarafından düzenlenmesi (Rahul *et al.* 2022). 14

Şekil 2.3 TNF- α geni (Posch *et al.* 2003). 24

Şekil 2.4 TNFRI ve TNFRII Yoluyla Sinyal Verme (Aggarwal 1991). 28

Şekil 2.5 Bir kemokin reseptörüne bağlanan bir CC kemokinin genel şeması. Kemokin reseptörleri, transmembran G proteinine bağlı reseptörlerdir ancak aynı zamanda JAK/STAT sinyal yollarına da bağlıdırlar. Kemokin bağlanması, diğer işlevler arasında hücresel hareketlilik ve transkripsiyonel aktivite ile sonuçlanan çoklu aşağı akış sinyalleme kaskadlarının aktivasyonuna yol açabilir (Tao *et al.* 2020). 30

Çizelge 3.2 Ticari kitler 36

Şekil 4.1 hasta ve kontrol grubu dağılımı. 49

Şekil 4.2 MCP-1 2518GA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. bazı kan hasta numunelerinden (şerit 1-5) ve sağlıklı kontrol numunesinden (şerit 5-10). Burada M: işaretleyici (2000-100bp), şerit (1-10) 930 bp PCR ürün boyutunda pozitif gen amplifikasyonu(100-2000). 51

Şekil 4.3 PvuII kullanılarak MCP-1 2518GA'nın RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Restriksiyon enzimi. Burada M: işaretleyici (50-1000 bp), şerit (AG) heterozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 930-708- ve 222-bp bantlarına sindirilen ürün, şerit (GG) homozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 708- ve 222-bp bantları ve 930 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü. 52

Şekil 4.4 sağlıklı grupları ve hastalar için PvuII kullanılarak MCP-1 2518GA'nın RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Restriksiyon enzimi. Burada M: işaretleyici (50-1000 bp), şerit (AG) heterozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 930-708- ve 222-bp bantlarına sindirilen ürün, şerit (GG) homozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 708- ve 222-bp bantları ve 930 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü. 53

Şekil 4.5 Bazı kan hasta örneklerinden(şerit 1-5) ve sağlıklı kontrol örneğinden(6 -10) Burada M: işaretleyici (2000-100bp), şerit (1-10) 107bp PCR ürün boyutunda (100-2000) pozitif gen amplifikasyonu. 53

Şekil 4.6 NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır. 54

Şekil 4.7 sağlıklı grupları ve hastalar için NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır. 55

Şekil 4.8 hastalar için NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır 56

Şekil 4.6 Diyabetik hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda monosit Kemoatraktan protein-1 (MCP-1) 2518G/A gen polimorfizminin alel frekansları 58

Şekil 4.7 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin alel frekansları 59

Şekil 4.8 Hasta ve kontrol grubunda MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin cinsiyete göre alel frekansları 61

Şekil 4.9 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunda TNF-gen-308 gen polimorfizminin alel frekansları 62

Şekil 4.10 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 64

Şekil 4.6 Hasta ve kontrol grubundaki TNF- α seviyeleri 65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Aletler ve Ekipmanlar 35
Çizelge 3.2 Ticari kitler 36
Çizelge 3.4 Marker and primers 37
Çizelge 3.5 Dizileri ve amplikon boyutları ile Multiplex PCR primerleri 38
Çizelge 3.6 Kimyasal maddeler 38
Çizelge 3.7 Restriksiyon enzimi 39
Çizelge 3.8 PCR karışımı 45
Çizelge 3. 9 TNFa -308 G/A'nın amplifikasyon koşullar 46
Çizelge 3.10 MCP-1 (-2518G/A) geninin amplifikasyon koşulları 46
Çizelge 3.11 TNFa -308 G/A genotipi için karışım 47
Çizelge 3.12 Restriksiyon enzimleri ve DNA Fragmanları boyutu 48
Çizelge 4.1 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunun klinik ve metabolik özellikleri 50
Çizelge 4.2 Diyabetik hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda monosit kemoatraktan protein 1 (MCP-1) 2518G/A gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 57
Çizelge 4.3 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 58
Çizelge 4.4 Hasta ve kontrol grubunda MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin cinsiyete göre genotip ve alel frekansları 60
Çizelge 4.5 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunda TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 62
Çizelge 4.6 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 63
Çizelge 4.7 TNF- α gen polimorfizmlerine göre hasta ve Kontrol grubunda gözlenen çözünür TNF-α serum seviyeleri(ng/dl) 65
Çizelge 4.8 Cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda TNF-gen-308 Gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları 66

1. Giriş

Böbrek yetmezliği, diabetes mellitusun (DM) en önemli ciddi komplikasyonlarından biridir. Diyabetli hastaların yaklaşık %30'u ila %40'ında diyabetik nefropati (DN) gelişir ve DM, Birleşik Devletler'deki son dönem böbrek hastalığı (SDBY) vakalarının %30 ila %50'sinin sebebidir (Umanath and Lewis 2018). DN, diyabetik hastaların yaklaşık %40'ında gelişir. DN, tipik olarak ilerleyici proteinüri, hipertansiyon ve azalan glomerüler filtrasyon hızı (GFH) ile klinik prezentasyonla karakterize edilen ve son evre böbrek hastalığı (SEBR) gelişimi ile sonuçlanan kronik bir hastalıktır (Molitch *et al.* 2015). DN, daha yüksek mikroanjiyopati, kardiyovasküler olaylar ve mortalite insidansına yol açar. Hiperglisemi, akut böbrek hastalığı, hipertansiyon ve obezite DN için risk faktörleridir. Bu risk faktörleri arasında en bilinenleri hiperglisemi ve hipertansiyondur (Alicic *et al.* 2017).

İnflamasyonun, DN gelişimi ile bağlantılı yeni bir mekanizma olduğu öne sürülmüştür (Srivastava *et al.* 2019). Çeşitli dokularda makrofaj infiltrasyonu, hem tip 2 DM hem de DN'nin karakteristik bir özelliğidir. Makrofaj birikimi, reaktif oksijen türlerinin (ROS), sitokinlerin ve proteazların üretimi yoluyla DN'nin ilerlemesinde kritik bir rol oynar. Ayrıca böbrek fibrozu, böbrekte bağışıklık hücrelerinin, inflamatuar hücrelerin, değiştirilmiş kemokinlerin ve sitokinin infiltrasyonunun neden olduğu ECM birikiminden kaynaklanır (Srivastava *et al.* 2019). İnflamasyonun karmaşıklığı göz önüne alındığında, belirli inflamatuar yolakları, DN'nin potansiyel terapötik hedefleri olarak belirlemek önemlidir. İnflamasyondan sorumlu iki ana sistem vardır: sitokin ve kemokin sistemleri. Son beş yılda artan sayıda çalışma proinflamatuar sitokinlere odaklanmış olsa da, kemokinlerin DN'deki mekanik rolü tam olarak bilinmemektedir.

Sitokinler, çoğu pleiotropik etkiler olmak üzere geniş bir fizyolojik etki spektrumuna sahip moleküllerdir. Sitokinler, bu Etkilerini arttırmak ve daha sonra gerekirse diğer sitokinlerin sentezini veya ekspresyonunu indüklemek için eylemleri birleştirme kapasitesine sahiptirler.

1991 yılında diyabetik farelerden, glomerüler zarlardaki makrofajlardan bu moleküllerin yüksek üretiminin gösterilmesiyle, DN gelişiminde inflamatuar etkileri olan sitokinlerin rolü ilk kez dikkat çekmiştir (Navarro-González *et al*. 2009).

Şu anda inflamatuar sitokinlerin DN'de önemli bir rol oynadığını biliyoruz, ancak DM'nin diğer mikroanjiyopatik komplikasyonlarının gelişiminde de etkisinin olduğu belirlenmiştir (Navarro-González and Mora-Fernández 2008).

Enfeksiyona karşı konak savunmasının bir parçası olarak tümör nekroz faktörü (TNF) sitokini üretilir. Bu sitokin, çoklu inflamatuar ve immün yanıtlarda yer alır ve birçok otoimmün ve enfeksiyöz hastalığın patogenezinde rol oynar. TNF geni, majör histo-uyumluluk kompleksinin (MHC) sınıf III bölgesinde kromozom 6'da bulunur ve lenfotoksin 'a' ve 'b' genleri ile çevrilidir. TNF geni, transkripsiyon seviyesinde sıkı bir şekilde düzenlenir (Tsai *et al.* 1996, Tsytsykova and Goldfeld 2002).

Sitokinleri kodlayan genlerin promotör bölgelerindeki DNA dizisi varyasyonu, enfeksiyona duyarlılığı etkiler ve çok sayıda komplex hastalık ile ilişkilendirilmiştir. Raporlar, genin 5' düzenleyici bölgesindeki polimorfizmin birçok bulaşıcı ve inflamatuar hastalıkla ilişkili olduğunu göstermiştir (Van Heel *et al.* 2002, Asghar *et al.* 2004). Polimorfizm rs361525, insülin direnci sendromu ve obezite ile (Rasmussen *et al.* 2000), ve rs1800629, çeşitli inflamatuar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (Mizuki *et al.* 1995, Wilson *et al.* 1995). Polimorfizm (rs1799964, rs1799724, rs1800630) ile romatoid artrit ve Crohn hastalığı (CD) gibi immün aracılı hastalıklar arasındaki ilişkiler bulunmuştur (Wilson *et al.* 1992, Negoro *et al.* 1999). Varyantların (rs1800629 ve rs361525) sitokin üretiminin düzenlenmesinde rol oynadığını gösteren sınırlı raporlar mevcuttur (Koch *et al.* 2000).

KBH olan hastalarda tümör nekroz faktörü-α (TNF-α) gibi belirgin yüksek sitokin seviyeleri vardır (Rao *et al.* 2007, Lim and Tesch 2012). TNF-α esas olarak monositler, makrofajlar ve T hücreleri tarafından üretilir. Bununla birlikte, yerleşik böbrek hücreleri, mesanjiyal, glomerüler, endotelyal, dendritik ve renal tübüler hücreler dahil olmak üzere TNF- α üretebilir. TNF-α'nın etkileri arasında, lokal reaktif oksijen türlerinin (ROS) teşvik edilmesi, albümin geçirgenliğinin artması ve sitotoksisite, apoptoz ve nekrozun indüklenmesi bulunmaktadır. TNF-α, monosit-makrofajların

alımında ve hemodinamik değişikliklerle GFR'nin azaltılmasında, ayrıca endotelyal geçirgenliğin değiştirilmesinde rol oynar. Deneysel verilere göre, tip 2 diyabetli hastalarda, diyabetik olmayan hastalara göre 3-4 kat daha yüksek TNF-α serum seviyeleri vardır ve bu seviyeler, mikroalbüminürili diyabetli hastalarda normo albüminüri olanlara göre daha yüksektir (Navarro-Gonzalez and Mora-Fernandez 2008, Navarro-González *et al.* 2011, Lim and Tesch 2012).

Bu moleküller böbrekte inflamatuar hücrelerin toplanmasında aktif rol oynar ve böbrek hasarının her aşamasında etkileri vardır (El Mesallamy *et al.* 2012).

DN'deki inflamatuar yanıtta birçok kemokin yer alır, monosit kemoatraktan proteini (MCP-1) ilk olarak aterosklerozun erken evrelerindeki işleviyle tanımlanmıştır (Takebayashi *et al.* 2006). MCP-1, makrofajlarda monositlerin dönüşümünü teşvik edebilir ve dahası IL-6 ve TNF- α gibi çeşitli sitokinler üretir, her ikisi de damar duvarlarında hastalığın ilerlemesine neden olan ateroskleroz değişikliklerini indükler. Aterosklerotik plaklarda ekspresyonu bozulmuş plaklara göre daha yüksek olduğundan, bu kemokin ile DN belirteçleri arasındaki ilişkiyi göstermek için birçok çalışmada sistemik MCP-1 ölçülmüştür (Takebayashi *et al.* 2006), idrar albümin atılımı olan hastaların, bu değişiklik olmayan hastalara göre daha yüksek dolaşım MCP-1 seviyeleri olduğu bulunmuştur.

Tüm bu bulgular, MCP-1'in sadece vasküler duvarda, aterosklerotik plaklarda değil, aynı zamanda tübüler epitel hücrelerinde de üretilen protein olarak DN patogenezinde önemli bir rol oynadığını düşündürebilir.

Bu çalışmada, TNF-α -308G/A ve MCP-1-2518G/A'da polimorfizm varlığı nedeniyle kişilerin nefropatiye yatkınlığının saptanması, RFLP PCR kullanılarak TNF-α -308G/A ve MCP-1-2518G/A gen polimorfizminin belirlenmesi, nefropatili hastaların serumlarındaki TNF- α düzeylerini ELISA testi ile araştırılması amaçlanmıştır.

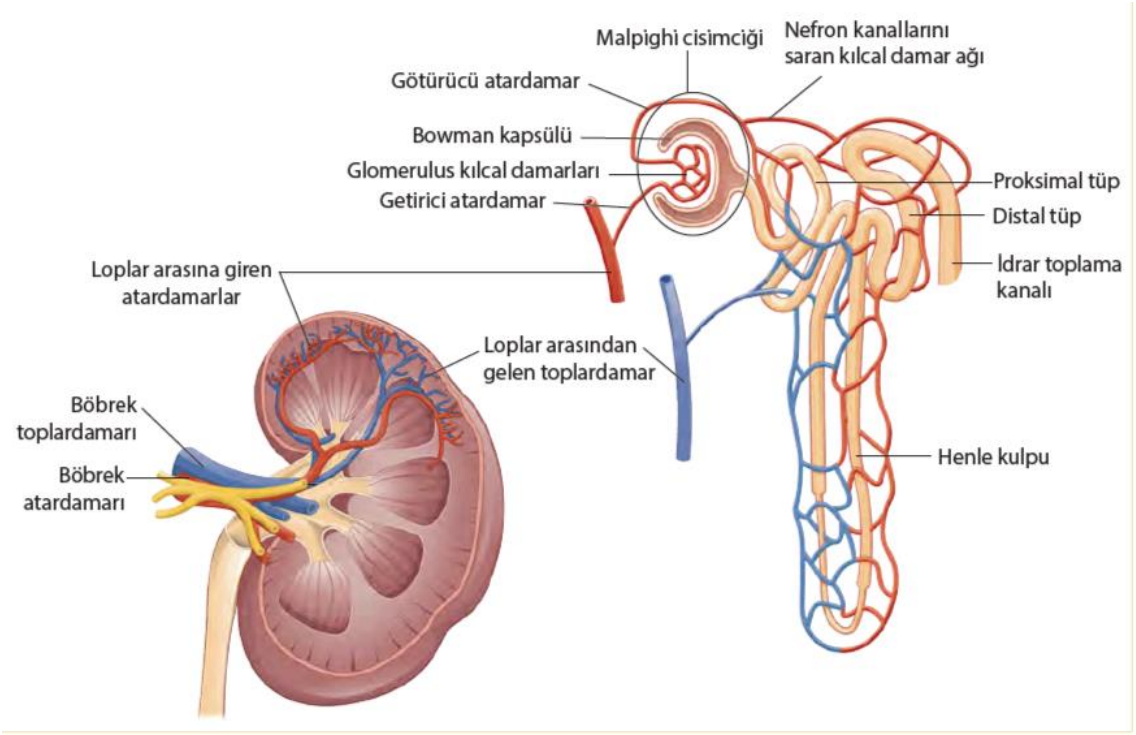
2. KURAMSAL TEMELLER

2.1 Kronik böbrek hastalıkları

KBH, böbrek yapısında ve işlevinde kalıcı değişiklikler içeren karmaşık bir sendromdur (Şekil 1.1). Böbrek Hastalığı Küresel Sonuçları İyileştirme (KDIGO) girişimi tarafından tanımlanan en son KBH sınıflandırması, 3 aydan fazla devam eden böbrek yapısı veya işlevindeki anormalliklere dayanmaktadır (Rosenkranz *et al.* 2000).

KBH tedavisi zordur çünkü ilerleyici kronik böbrek yetmezliği olan hastalar çoğunlukla asemptomatiktir ve bu nedenle koruyucu tedaviler için çok geç olana kadar tıbbi tedavi talep etmezler. Mevcut tıbbi tedaviler özgünlükten yoksundur ve halihazırda hasar görmüş böbrek yapısına hiçbir tedavi sunmamaktadır. KBH tedavisinin terapötik amacı, mevcut böbrek fonksiyonunu korumak ve son dönem böbrek hastalığının (ESKD) ilerlemesini geciktirmektir (Savransky *et al.* 2006).

KBH tedavisi üç aşamaya ayrılabilir: erken, geç ve böbrek replasman tedavisi (KRT). KBH tek bir süreç olmadığından ve böbrek hasarları çeşitli kaynaklardan gelebileceğinden, erken tedavi, hastalığı başlatan etmenlere veya altta yatan böbrek bozukluğuna karşı hedeflenir. Buna karşılık, geç evre KBH'nin bütünsel tedavisi daha yaygın olmuştur, çünkü hastalığın başlamasından bağımsız olarak, nihai ESRD gelişimi ile KBH'nin ilerlemesinin altında ortak bir fizyolojik yol vardır. KBH ESKD'ye ilerlediğinde tek tedavi seçeneği KRT'dir (diyaliz veya böbrek nakli). KRT, böbreklerimizin tüm işlevlerini yerine getiremez. Yaşam beklentisini uzatır, ancak yaşam kalitesinin düşmesine ve sağlık komplikasyonlarının artmasına da neden olur (Hochegger *et al.* 2007).



Şekil 2.1 Homeostatik koşullar altında böbrek anatomisi ve fizyolojisi (Lepore *et al.* 2014)**.**

Böbrekler, metabolik atık atılımı, besin tutma, hormon salgılanması ve sıvı ve biyokimyasal homeostaz konusunda uzmanlaşmış bir çift fasulye şeklindeki organdır. Karın boşluğunda vertebral kolonun her iki yanında bulunurlar ve fibröz bir kapsül ile çevrelenirler. Bu muhafazanın altında, bir dış korteks ve bir iç medullaya bölünmüş böbrek parankimi bulunur. Yetişkin böbreği, böbreğin fonksiyonel birimleri olan yaklaşık 1,5 milyon nefrondan oluşur. Her nefron iki bölmeden oluşur: glomerulus ve renal tübüller. Glomerüler kompartman, Bowman kapsülü adı verilen kese benzeri bir yapı ile çevrelenen kılcal halkalardan oluşan bir yataktan oluşur. Tübüler bölme Bowman kapsülünün bir uzantısıdır ve proksimal tübül, Henle halkası, distal tübül ve toplama kanalını içerir.

Nefron tarafından kan süzülme süreci, kortekste bulunan glomerulus içinde başlar. Glomerüler filtrat proksimal tübüle akar ve medullaya doğru hareket eder. Glikoz, amino asitler, mineraller ve vitaminler gibi besinlerin çoğu, bu aşamada yüksek oranda metabolik proksimal tübüller tarafından aktif olarak emilir. Ultrafiltrat daha sonra suyun yeniden emilmesini destekleyen konsantrasyon gradyanlarının yaratılmasından sorumlu

olan Henle döngüsüne akar. Kalan ultrafiltrat daha sonra kortekse doğru ilerler ve pH ve su düzenlemesinin meydana geldiği distal tübüllerden geçer. Distal tübül, kortekste çok sayıda nefronun toplayıcı kanalı oluşturmak üzere birleştiği bir noktaya kadar uzanır. Son olarak, konsantre idrar oluşturmak için toplama kanalı sisteminde daha fazla su emilimi meydana gelir (Peterfalvi *et al.* 2008, Lepore *et al.* 2014).

2.2 Etiyolojiler ve Yaralanma Mekanizmaları

Sağlıklı böbreğin yaralanması ve iltihaplanması, doku onarımını ve normal fizyolojinin restorasyonunu sağlayan hücresel tepkileri yönlendirir. Bununla birlikte, yaralanmaya yanıt uygun değilse veya sorunlar çözülmezse, işlevsiz nefron, kalan nefronları aşırı strese sokarak, bir yaralanma döngüsüne sebep olabilir. Bu durum, tubulointerstitium içinde oksijen difüzyonunun azalmasına (renal hipoksi) ve başarısız onarıma yol açarak genel böbrek fonksiyonuna müdahale edebilir. Böbrek hasarı ve istenmeyen hücresel tepkilerin sonucu, böbrek fonksiyonunda kronik bir düşüş, ilerleyici nefron kaybı ve dolayısıyla KBH meydana gelebilir (Reantragoon *et al.* 2013).

CKD progresyonu minimal böbrek hasarından (CKD evre 1) başlayan ESKD'ye (CKD evre 5) kadar uzanan çoklu aşamalara ayrılır. KBH evrelerinin sınıflandırılması, böbrek bariyeri işlev bozukluğunun kapsamı ve böbrek boşaltım işlevinin performansı ile belirlenir. Bunlar sırasıyla albüminüri seviyeleri ve tahmini glomerüler filtrasyon oranları (eGFR) ile ölçülür ve KBH sonuçlarının güvenilir göstergeleridir (Hochegger *et al.* 2007).

KBH heterojen bir hastalık grubudur ve tek bir nedeni yoktur (Kitching *et al.*1999). Böbrek hasarı ve onu takip eden KBH gelişimi, çeşitli koşullar ve faktörler tarafından başlatılabilir:

- Diabetes mellitus
- Hipertansiyon
- Genetik bozukluklar
- Bulaşıcı hastalıklar

- Maligniteler
- Otoimmün rahatsızlığı
- İdrar yolu tıkanıklığı
- Böbrek toksinleri

Bununla birlikte, tüm KBH için hastalık/yaralanmanın altında yatan, uyumsuz yanıtı başlatan ortak patofizyolojik süreçler vardır. Bunlar arasında özelleşmiş böbrek tübüllerinin düşmesi (renal tübüler atrofi), mononükleer hücrelerin birikmesi ve tubulointerstitiumda fibrozis gelişimi yer alır (Kitching *et al.* 1999, Ikezumi *et al.* 2003). Renal fibrozisin patogenezi çok boyutlu bir süreçtir.

2.3 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus (daha sonra diyabet olarak anılacaktır), artan kan şekeri, hiperglisemi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Diyabet adı, hastalıkta aşırı miktarda idrara çıkılmasından gelir ve Latince'de 'bal ile tatlandırılmış' anlamına gelen melitus, diyabetik kişinin idrarındaki şekerleri ifade eder. İdrardaki bu tat, eski Mısırlılar tarafından zaten bir teşhis aracı olarak kullanılıyordu. 1674'te Thomas Willis, diyabetik hastalarının idrarının tatlı olduğunu keşfetti ve bir asır sonra Matthew Dobson, şekerin bu tadın nedeni olduğunu ve bu fenomenin kandaki şekerden önce geldiğini ve eşlik ettiğini gösterdi. Diyabet, yüksek konsantrasyonlarda kan şekeri olan bir hastalık olarak tanımlansa da, idrara glikoz sızmasını tespit etmek için hızlı ve kolay daldırma çubuğu testleri yaygın olarak kullanılır (Bolodeoku and Donaldson 1996, Karamanou *et al.* 2016).

Normalde yemekten sonra kandaki glikoz seviyesi yükselir ve bu da insülinin üretildiği pankreas bezindeki “Langerhans Adacıkları”ndaki β-hücrelerinden insülin salınımını tetikler. İnsülin, kas ve yağ hücrelerini, glikozu glikoliz yoluyla kandan uzaklaştırması için ve karaciğeri, glikozu metabolize etmesi ve glikojenez yoluyla glikojen olarak depolaması için uyarır. Bu şekilde kan normal bir glikoz seviyesine ulaşır (Ueki *et al.* 2006).

İnsüline bağımlı diyabet olarak da adlandırılan tip 1 diyabette, insülin salgılayan β hücrelerinin otoimmün yıkımı vardır. Tip 1 diyabetin başlangıcı genellikle 20 yaşından öncedir ve hayatta kalmak için günlük dozlarda insülin gerektirir. Tüm diyabet hastalarının %85-90'ını oluşturan tip 2 diyabette, vücut insüline karşı direnç gösterir ve buna yüksek insülin seviyeleri eşlik eder ve daha sonraki aşamalarda pankreas β-hücrelerinden salgılanan insülin üretimi azalır. Tip 2 diyabetin nedeni tam olarak açık değildir, ancak insülin direnci, yani normal insülin konsantrasyonlarına yanıt verememe, hem çevresel hem de genetik faktörlerden kaynaklanmaktadır. Daha önce tip 2 diyabet genellikle obez ve yaşlı kişilerde görülürken, günümüzde çocuk ve ergen prevalansında çarpıcı bir artış gözlemlenmektedir. Roadboard, 18 yaşın altındaki diyabetli hastaların neredeyse %50'sinin tip 2 diyabetli olabileceğini ve bu hastaların %80 kadarının tanı anında obez olduğunu iddia ediyor (Polonsky *et al.* 1996).

Diyabet gelişimi için risk faktörleri aile öyküsü, fiziksel hareketsizlik, ırk/etnik köken (Afrikalı Amerikalılar, Hispanik Amerikalılar ve Yerli Amerikalılarda diyabet prevalansı Kafkas kökenli Amerikalılara göre daha yüksektir) ve hipertansiyondur. Obezite aynı zamanda, yukarıda bahsedildiği gibi, insülin direncinin yaygın bir nedenidir ve diyabet geliştirme riskidir (Baptiste-Roberts *et al.* 2007).

Daha sonra tip 2 diyabet geliştirecek kişilerde kaslardaki insülin direnci, saptanabilen ilk kusurdur. Dahası, çalışmalar hiperglisemi gelişmeden önce β-hücre fonksiyonunun işlevsel olarak kusurlu olması gerektiğini göstermiştir. Bu değişiklikler diyabet tanısı konmadan yaklaşık on yıl önce ortaya çıkar (Ashcroft and Rorsman 2012).

Plazma lipid paternindeki değişiklikler insülin direnci ile ilişkilidir. Bu, tip 2 diyabet ile yalnızca glikoz yükselmelerinin ilişkili olmadığını, aynı zamanda bir lipid profilinin de başlangıcı olarak öngörebileceğini öne sürmektedir (Ashcroft and Rorsman 2012). Özellikle nefropatisi olan Tip 2 diyabetik hastalar, diyabetik olmayanlara göre, kaslarda ve karaciğerde trigliserit birikmesi ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) konsantrasyonlarının azalmasına rağmen düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol konsantrasyonları aynı seviyede kalan farklı bir lipid paternine sahiptir (Lara-Castro and Garvey 2008).

Diyabetin diğer bir sonucu da insülin eksikliğine bağlı olarak enerji metabolizmasının bozulmasıdır. Bu, mitokondride yağ asitlerinin β-oksidasyonunda anahtar rol oynayan karnitin döngüsü gibi endojen süreçlerde kendini gösterir (Bene 2018).

Diyabete özgü mikrovasküler hastalıklar, diyabetin uzun vadeli sonuçlarıdır ve körlük, böbrek yetmezliği ve sinir hasarının önde gelen nedenidir. Ayrıca diyabetle ilişkili ateroskleroz, miyokard enfarktüsü, felç ve uzuv amputasyonu riskini artırır (Brownlee 2001).

ABD'de diyabet, teşhis edilen kronik böbrek hastalığı (KBH) vakalarının %36,8'inden sorumludur. Bu vakaların çoğuna (%31.1) tip 2 diyabet neden olurken, tip 1 sadece %5,7'sinden sorumludur (Renal 2007). Genetik faktörler, glisemi kontrolü, hipertansiyon, dislipemi, sigara içme, mikroalbüminüri veya proteinüriye ilerleme gibi etmenlerin bu yüzdeleri etkileyebilmesine rağmen, tip 1 DM hastalarının %15'ine ve tip 2 DM hastalarının %20-40'ına kadarının diyabetin evrimsel seyrinde böbrek problemleri geliştireceği düşünülmektedir. Tüm bu faktörler nefropatinin oluşumunu belirleyecektir (Martínez-Castelao *et al.* 2005).

2.4 Diabetes mellitusun sınıflandırılması

Geleneksel görüş, T1DM ve T2DM'nin çok farklı patofizyoloji ile farklı koşulları karakterize ettiği yönündedir. Öte yandan, her iki türün de özelliklerine sahip diyabetlilerin oranında kayda değer bir artış vardır (Tuomi 2005, Pozzilli and Buzzetti 2007). Alternatif olarak, hastalık sürekliliği açısından bir uçta geleneksel otoimmün T1DM ve diğer uçta geleneksel metabolik T2DM'nin daha fazla düşünülmesi önerilmiştir (Van Deutekom *et al.* 2008). Bununla birlikte, mevcut pratik sınıflandırma kılavuzları, T1DM ve T2DM'nin tamamen farklı, ancak henüz belirlenememiş mekanizmalara atfedilebilen iki farklı koşul olduğu şeklindeki geleneksel görüşü uygulamaktadır.

2.4.1 Tip 1 diyabetes mellitus

T1DM, esas olarak otoimmün aracılı bir reaksiyon nedeniyle pankreasın insülin üreten hücrelerinin yıkımından kaynaklanır ve mutlak insülin eksikliği ile sonuçlanır. Bunun meydana gelmesinin nedeni tam olarak anlaşılamamıştır. Genel olarak, hastalık her yaşta teşhis edilir, ancak en sık çocukluk ve ergenlik döneminde gelişir.

T1DM çocukluk çağında en sık görülen endokrin ve metabolik durumlardan biridir ve hızla ilerler. Erişkinlerde latent otoimmün diyabet (LADA), diyabetle ilişkili otoantikor pozitifliği ve LADA'yı klasik T1DM'den ayıran tanı olan insülin bağımsızlığı ile karakterize edilen, yavaş ilerleyen bir otoimmün diyabet formudur (Fourlanos *et al.* 2005). T1DM'li kişiler genellikle insüline bağımlıdır ve kan şekerlerini kontrol etmek ve hayatta kalmak için günlük insülin enjeksiyonlarına ihtiyaç duyarlar. Ayrıca, T1DM'de, otoimmün süreç, büyük ölçüde kalıtsal varyasyon tarafından belirlenir (Pociot *et al.* 2010). İnsan lökosit antijeni (HLA) genleri ile T1DM arasında güçlü bir ilişki vardır. HLA varyantları, hastalığa karşı yüksek risk veya koruma sağlar. Şu anda, 40'tan fazla genetik lokusun T1DM riskini etkilediği gösterilmiştir (Barrett *et al.* 2009). T1DM insidansı artmaktadır, bunun nedenleri belirsizdir, ancak otoimmüniteyi başlatabilecek veya halihazırda devam eden beta hücre yıkımını hızlandırabilecek çevresel risk faktörlerindeki değişikliklere bağlı olabilir.

2.4.2 Tip 2 Diabetes Mellitus

Diyabetin en yaygın şeklidir ve dünya çapındaki tüm diyabet vakalarının %90'ından fazlasını oluşturur (González *et al.* 2009). T2DM, diyabetin klinik olarak ortaya çıktığı anda mevcut olabilen insülin direnci ve göreceli insülin eksikliği ile karakterizedir. T2DM genellikle 35-40 yaşından sonra ortaya çıkar, ancak özellikle diyabet prevalansının yüksek olduğu popülasyonlarda daha erken teşhis edilebilir. T2DM uzun yıllar boyunca saptanmadan (asemptomatik) kalabilir ve tanı genellikle ilişkili komplikasyonlardan veya tesadüfen yapılan kan veya idrar şekeri testi yoluyla konur.

T2DM, her zaman olmasa da sıklıkla, obezite gibi, insülin direncine neden olabilen ve yüksek kan şekeri seviyelerine yol açabilen metabolik anormalliklerle ilişkilidir. T1DM'nin aksine, T2DM'li kişiler mutlak olarak eksojen insüline bağımlı değildir, ancak hipergliseminin kontrolü tek başına diyetle veya oral hipoglisemik ajanlarla sağlanamazsa insüline ihtiyaç duyulabilir. T2DM'nin güçlü bir ailesel bileşeni vardır ve en az 50 genetik varyantın tip 2 diyabete yatkınlığı etkilediği bildirilmiştir (McCarthy 2010) .

2.4.3 Gestasyonel diyabetes mellitus

Gestasyonel diyabetes mellitus (GDM), gebeliğin en yaygın tıbbi komplikasyonlarından biridir (ADA 2015), ve gebelik sırasında başlayan veya ilk kez fark edilen herhangi bir derecede glukoz intoleransı olarak tanımlanır. Bu, hamilelik sırasında ilk kez tespit edilen teşhis edilmemiş diabetes mellitus'u içerir (Nankervis *et al.* 2010). GDM genellikle doğumdan sonra düzelse de, kadın ve çocuğu için hem perinatal hem de uzun vadede önemli morbiditelerle ilişkilidir (Tieu *et al.* 2014). Bu tip, hamilelik sırasında, esas olarak hamileliğin 24 ila 28 haftaları arasında teşhis edilir. GDM'si olan kadınların ileriki yaşamlarında diyabet geliştirme riski daha yüksektir (Löbner *et al.* 2006) . Ayrıca, GDM'li kadınların çocuklarında çocukluk ve yetişkin obezitesi riski ve glukoz intoleransı riski daha çoktur (Boney *et al.* 2005) .

2.4.4 Diğer nadir DM türleri

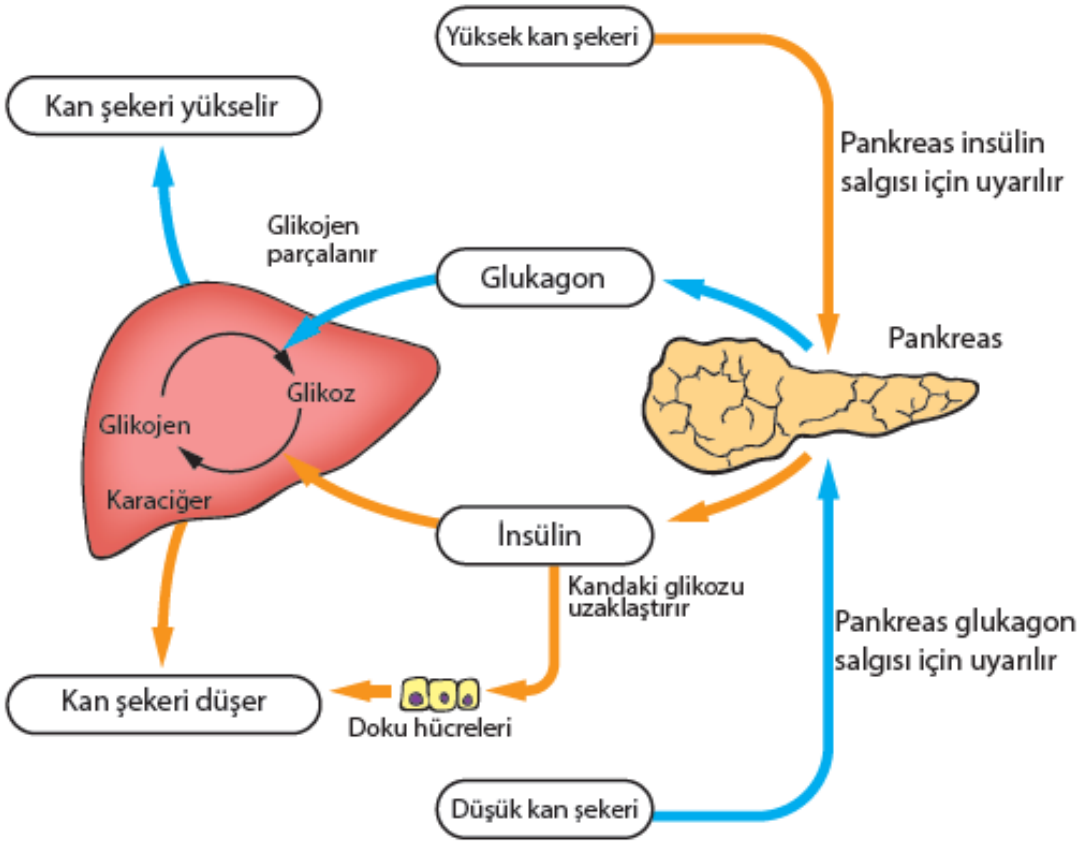
Diyabetik durumun çeşitli formları, β-hücre fonksiyonundaki tek gen (monojenik) kusurları ile ilişkilendirilebilir. Ergenlikte başlayan diyabet hastalıkları (MODY), klasik olarak ergenlik döneminde veya genç erişkinlerde 25 yaşından önce ortaya çıkan, otozomal dominant geçişli, insüline bağımlı olmayan diyabet formu ile karakterize monogenik bir bozukluk grubudur. MODY, diyabetin nadir bir nedenidir (tüm vakaların %1'i) ve sıklıkla T1DM veya T2DM olarak yanlış teşhis edilir. MODY'li kişiler genellikle fazla kilolu değildir ve T2DM için yüksek tansiyon veya anormal kan yağ seviyeleri gibi başka risk faktörlerine sahip değildirler (Anık *et al.* 2015). Ek olarak, diğer hastalıklara, travmaya, cerrahiye veya ilaçların etkilerine sekonder olarak bilinen

etiyolojisi olan başka spesifik diyabet türleri de vardır. Örnekler, hemokromatoz, ekzokrin pankreas hastalığı veya belirli ilaç türlerinin (örneğin, uzun süreli steroid kullanımı) neden olduğu diyabetleri içerir.

2.5 Tip 2 Diyabet – etiyoloji, patofizyoloji ve uzun vadeli komplikasyonlar

T2DM'nin etiyolojisi tam olarak anlaşılmamıştır, ancak muhtemelen, diyabetojenik bir yaşam tarzı (yani aşırı kalori alımı, yetersiz kalori harcaması, obezite) duyarlı bir genotip ile konjugasyon halinde hareket ettiğinde T2DM gelişir. T2DM gelişen hastaların çoğu obezdir (Eckel *et al.* 2011). Bununla birlikte, bir risk faktörü olarak enerji yoğun diyetin, T2DM gelişimi için temel obeziteden bağımsız olduğu gösterilmiştir (Wang *et al.* 2008). Ayrıca, bazı durumlarda T2DM'nin çevresel kirleticilerden kaynaklandığı öne sürülmüştür (Hectors *et al.* 2011). T2DM'nin gelişme nedenleriyle ilgili bazı farklılıklar olsa da, çoğu doktor ve bilim adamı, T2DM gelişimi için başlıca bağımsız risk faktörlerinin şunlar olduğu konusunda hemfikirdir: obezite (Anderson *et al.* 2003, Schulze *et al.* 2006), T2DM'ye sahip aile geçmişi (birinci derece akraba) (Pierce *et al.* 1995), etnik köken (bazı etnik gruplar daha yüksek diyabet prevalansına sahiptir) (Shai *et al.* 2006), geçirilmiş IGT veya IFG geçmişi (Nichols *et al.* 2007), hipertansiyon veya dislipidemi (Chehade *et al.* 2013), fiziksel hareketsizlik (Hu *et al.* 2001), gebelik diyabeti geçmişi (Kim *et al.* 2002), *Rahim içi* ortamın bir sonucu olarak düşük doğum ağırlığı (Whincup *et al.* 2008), insülin direncine yol açan polikistik over sendromu (Legro 2006) ve son olarak, ilerleyen yaşa bağlı olarak insülin sekresyonunda azalma (Group 2003). Yakın zamana kadar, T2DM'nin yetişkinlikle sınırlı bir hastalık olduğu düşünülürdü, 40 yaşın altındaki bireylerde nadiren görülür, ancak klinik temelli raporlar ve bölgesel çalışmalar, çocuklarda ve ergenlerde T2DM'nin artık daha sık teşhis edildiğini göstermektedir (Bloomgarden 2004). Bu durum, yüksek obezite seviyeleriyle yetişkinliğe giren çocukların artan sayısını yansıtmaktadır. T2DM'ye öncelikle obezite, karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusundaki insülin direnci ve pankreas β-hücresi tarafından göreceli bir insülin salgılama kusuru neden olur (Alberti and Zimmet 1998).

İnsülin, pankreatik β-hücreleri tarafından üretilen bir hormondur ve kan şekerinin düzenlenmesi için anahtar hormondur. Hormon, kas ve yağ dokusunda kandan glikoz alımını, karaciğer ve kas hücrelerinde glikojen olarak glikozun depolanmasını ve yağ asitlerinin adipositlerde alımını ve esterleşmesini uyarır. Ayrıca insülin, proteinlerin parçalanmasını, trigliseritlerin hidrolizini ve amino asitler, laktat ve gliserolden glikoz üretimini engeller. Endokrin pankreas tarafından da salgılanan glukagon, insüline zıt etkilere sahiptir. Hormon, karaciğerin depolanmış glikojeni glikoza dönüştürmesine ve böylece kan şekerini yükseltmesine neden olur. Ayrıca glukagon, insülin sekresyonunu uyararak glukozun insüline bağımlı dokular tarafından kullanılabilmesini sağlar. Bu nedenle, glukagon ve insülin, kan şekerini doğru seviyede tutan bir geri bildirim sisteminin parçasıdır (Guariguata *et al.* 2014).



Şekil 2.2 Glikozun insülin ve glukagon hormonları tarafından düzenlenmesi (Rahul *et al.* 2022).

T2DM'nin meydana gelmesi için insülin etkisi ve salınımı arasındaki dengeli ilişkinin bozulması gerekir. Başka bir deyişle, T2DM, esas olarak insülin direncini telafi etmek için insülin salgısını yeterince artıramayanlarda gelişir. İnsülin direnci, kısmen obezite ile ilgili erken bir fenomen olmasına rağmen, pankreas β-hücre fonksiyonu, klinik hipergliseminin başlangıcından önce, zaman içinde kademeli olarak azalır. Bu iki kusur için çeşitli mekanizmalar önerilmiştir (Guariguata *et al.* 2014). İnsülin direnci, yüksek seviyelerde serbest yağ asitlerine (Boden 1996), inflamatuar sitokinlere (Wei *et al.* 2008), adipokinlere (Rabe *et al.* 2008) ve mitokondriyal işlev bozukluğuna (Kim *et al.* 2008) atfedilirken, glukoz toksisitesi (Robertson *et al.* 2003), lipotoksisite (Robertson *et al.* 2003), ve amiloid oluşumu (Hull *et al.* 2004) β-hücre disfonksiyonu için temel mekanizmalar olarak öne sürülmüştür (Stumvoll *et al.* 2005).

T2DM'nin tıbbi ve sosyoekonomik yükü genellikle hastalığın ilişkili komplikasyonlarından kaynaklanır. T2DM'ye eşlik eden ciddi komplikasyonlar çoğunlukla mikrovasküler (örn. retinopati, nöropati ve nefropati) ve makrovasküler hastalıklar olup, yaşam kalitesinin düşmesine ve son dönem böbrek yetmezliği ve kardiyovasküler hastalıktan (KVH) kaynaklanan morbidite ve mortalitenin artmasına neden olur. Hiperglisemi, muhtemelen daha önceki hiperglisemi oluşumlarının bir sonucu olarak, iyileştirilmiş glukoz kontrolüne rağmen sıklıkla devam eden ve ilerleyen vasküler komplikasyonların gelişmesinde ve ilerlemesinde merkezi bir rol oynar. Bununla birlikte, muhtemelen insülin direncinin etkileri nedeniyle artan kardiyovasküler risk, yüksek olasılıkla açık hiperglisemi gelişmeden önce başlamaktadır. Bu fenomen, saatin mikrovasküler risk için hipergliseminin başlangıcında ve makrovasküler risk için bir önceki noktada, yani başlangıçla birlikte işlemeye başladığı, başka bir deyişle insülin direncinin başlamasıyla, komplikasyonların başlaması "tikleyen saat" hipotezi olarak tanımlanmıştır (Haffner *et al.* 1999). Kan şekeri düzeyleri iyi kontrol edilen kişilerde diyabetes mellitusun uzun vadeli komplikasyonlarının çok daha az yaygın ve daha az şiddetli olduğu genel olarak kabul edilmektedir (Nathan *et al.* 2009). Bununla birlikte, T2DM hastalarında kan şekerini düşürmede büyük başarı elde eden, ancak kardiyovasküler hastalıktan ölümleri azaltmada başarılı olmayan bazı yeni yollar, diyabetik komplikasyonların ana nedeni olarak hiperglisemi teorisine karşı çıkmaktadır (Taubes 2008). Diyabetik komplikasyonların derecesi ve tipinin ailesel kümelenmesi,

genetiğin diyabetik komplikasyonlara neden olmada rol oynayabileceğini göstermektedir (Monti *et al.* 2007). Tam olarak anlaşılmamasına rağmen, diyabetin bu komplikasyonlara yol açtığı karmaşık mekanizmalar, hiperglisemi ve küçük kan damarlarının hem fonksiyonel hem de yapısal anormalliklerinin yanı sıra sigara, yüksek kolesterol seviyeleri, obezite, yüksek tansiyon ve düzenli egzersiz eksikliği gibi hızlandırıcı faktörleri içerir (Milicevic *et al.* 2008).

2.6 Tip 2 Diyabette Bağışıklık Sistemi

Yerleşik T2D, enfeksiyon riskinin artmasıyla ilişkilidir ve bağışıklık sisteminin bozulması, hem hiperglisemiye bağlı hem de ondan bağımsız olarak tanımlanmıştır (Marhoffer *et al.* 1992). Aynı zamanda, çoğu bağışıklık hücresi, kronik sistemik düşük dereceli bir iltihaplanma süreci ile ilişkili aktifleştirilmiş bir fenotip sergiler (Cottam *et al.* 2002). Bu kronik aşırı aktivasyonun ve bozulmuş bağışıklık tepkisinin altında yatan mekanizma tam olarak bilinmemektedir.

İnsan bağışıklığı iki savunma sürecinden oluşur: doğuştan gelen ve uyarlanabilir bağışıklık sistemi. Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, enfeksiyöz hücre dışı ajanlara hızla saldırır ve birinci basamak yanıttır. Hücresel bileşenleri makrofajlar, dendritik hücreler, nötrofiller ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden oluşur. Nötrofiller ve makrofajlar, içeri giren mikroorganizmaları fagositoz ve hücre içi sindirim yoluyla yok ederek doğrudan etki edebilirler. Ek olarak, makrofajlar ve dendritik hücreler, hücre yüzeylerinde yakalanmış ve parçalanmış antijenleri adaptif bağışıklık sisteminin hücrelerine geçirerek antijen sunan hücreler (APC) olarak hizmet edebilir. NK hücreleri, virüsler gibi hücre içi patojenler için önemli bir doğuştan gelen bağışıklık savunmasıdır. NK hücrelerinin enfekte hücrelerin delinmesi ve parçalanması olayındaki ölümcül etkisi, Fc-reseptörünün NK hücreleri tarafından tanındığı ve sitotoksik saldırıyı tetiklediği bu hücrelerin yüzeyine bağlanan antikorlara bağlıdır (Janeway 2001).

Buna karşılık, B- ve T-lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden oluşan adaptif bağışıklık sistemi, immünolojik belleğe dayalı antijene özgü tanıma için tasarlanmıştır ve aynı antijene yeniden maruz kalındığında bağışıklık tepkisinin hızını ve kalitesini

artırır. Doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkileri arasındaki karmaşık etkileşim ve APC ile T- ve B lenfositleri arasındaki sıkı etkileşim hala tam olarak anlaşılamamıştır ancak yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Thauland *et al.* 2008).

Önceki çalışmalar, T2D'de doğuştan gelen bağışıklık sisteminin aktivasyonunu göstermiştir (Cottam *et al.* 2002). Bu çalışmalar, monositler üzerinde aktivasyon belirteci ve yapışma molekülü CD11b'nin artan ekspresyonu ve nötrofiller üzerinde hem CD11b hem de degranülasyon belirteci CD66b gibi doğuştan gelen bağışıklık sistemi hücrelerinin artan aktivasyonunu açıklar. Bu ortamda adaptif bağışıklık sisteminin ve özellikle T hücrelerinin katkısı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Obezitede T hücrelerinin aktivasyonu daha önce tarif edilmiştir (Stentz and Kitabchi 2003), ancak kronik inflamasyon sürecindeki ve T2D patogenezindeki rolleri bilinmemektedir. Diğer gruplar, T2D hastalarından elde edilen bağışıklık hücrelerinde insülin direncinin varlığını, ancak bozulmuş glukoz metabolizmasını göstererek ispatlamıştır (Buffington *et al.* 1990). Bununla birlikte, insülin direnci ve obezitenin dolaşımdaki bağışıklık hücrelerinin düzenlenmesine ilişkin katkısı belirsizliğini korumaktadır.

Obezitede beyaz yağ dokusuna artan makrofaj infiltrasyonu diğer gruplar tarafından tespit edilmiş ve dolaşımdaki sitokinlerin ana kaynağı oldukları ve insülin direncinin gelişimine katkıda bulundukları öne sürülmüştür (Mohamed-Ali *et al.* 1997, Weisberg *et al.* 2003). Şiddetli obezitede ATM sayısının arttığı ve adipozite belirteçleri ile yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir. Fare obezite modellerinde, obezite durumunda makrofajların proinflamatuar veya klasik olarak aktive fenotip M1'e farklılaştığı ve bunun da Tümör Nekroz Faktörü- α (TNF- α), IL- 6 ve MCP-1 salgısının artmasına neden olduğu gösterilmiştir (Lumeng *et al.* 2007). Bu makrofaj farklılaşmasını neyin yönlendirdiği tam olarak anlaşılmamıştır, ancak son zamanlarda peroksizom proliferatörle aktive olan reseptör-(PPAR-)'ın önemli bir rol oynadığı öne sürülmüştür (Odegaard *et al.* 2007). Ne yazık ki, ATM fenotipleriyle ilgili insan verileri, hayvan verileriyle tutarlı değildir. Yakın zamanda, insan ATM'sinin bir anti-inflamatuar fenotip gösterdiği, ancak uyarı üzerine aşırı bir pro-inflamatuar tepki verebildiği açıklanmıştır (Zeyda *et al.* 2007). Bu fenotipleri ayırt etmek için kullanılan hücre yüzey oluşturucuları, hayvan çalışmalarında tarif edildiğinden farklı görünmektedir.

Adaptif ve doğuştan gelen bağışıklık sistemlerinin yakından etkileştiği iyi bilinmektedir ve bunların işlevlerini ve fenotiplerini spesifik sitokin sinyallemesi ile etkiledikleri gösterilmiştir (Thauland *et al.* 2008). Bununla birlikte, adaptif bağışıklık sisteminin aracıları olarak T hücrelerinin, makrofaj aktivasyonunda ve yağ dokusuna alınmasında nasıl yer aldığı hala tam olarak anlaşılamamıştır. Çok yakın zamanda yayınlanmış bir insan ve hayvan çalışması, CD4+ T hücreleri tarafından insülin direncinin ve yağ dokusu infiltrasyonunun, makrofajların daha geç aktivasyonuna yol açan birincil bir olay olduğunu göstermektedir (Kintscher *et al.* 2008). Yazarlar, her ikisi de zaten 3 haftalık aşırı beslenmeden sonra meydana gelen insülin direncinin ve yağ dokusuna T hücre sızmasının çok daha erken gelişiminin aksine, makrofaj infiltrasyonunun sadece 8 haftalık yüksek yağlı beslenmeden sonra meydana geldiğini gösterebildiler. Bu sonuçlar, insülin direncinin ve T hücre aktivasyonunun, makrofaj infiltrasyonundan önceki birincil olaylar olduğunu ve makrofajların, sitokinlerin artan salgılanmasıyla insülin direncine daha sonra katkıda bulunduğunu göstermektedir.

2.7 Diyabetik nefropati

Böbrekler, diyabetten etkilenecek kilit organlardan biridir ve ilk kez 1936'da K.immelstiel ve Wilson tarafından tanımlanan diyabetik nefropati, TlDM'nin en ciddi, yaşamı tehdit eden, uzun vadeli komplikasyonu olmaya devam etmektedir. Böbreğin iç yapısı, bir kapsül içine alınmış bir korteks ve bir medulladan oluşur. Medulla, pelvis toplama sistemine akan piramitler içerir. Böbreğin histolojik ve fonksiyonel birimi nefrondur ve her böbrekte yaklaşık 1 milyon tane nefron bulunur. Her nefron bir glomerulus ve bir tübül sisteminden oluşur. Glomerulus, yuvarlak bir Bowmans Kapsülü oluşturan çok ince epitel hücreleri ile çevrili bir kılcal damar kümesidir. Nefronun ince duvarlı tübül bölgesi, yani Henle Döngüsü, bir proksimal ve bir distal kıvrımlı tübül, bir toplayıcı tübül ve bir toplayıcı kanaldan oluşur. İdrar, Bowmans Kapsülünün boşluğuna geçen ve böylece seçici emilim ve salgılama ile değiştirildiği tübül sistemine alınan glomerüler filtrattır. Diyabetten büyük ölçüde etkilenen ve nefropati başlığı altında sınıflandırılan bir dizi komplikasyona yol açabilen bu temel mekanizmadır.

25 yıllık diyabet süresinden sonra TlDM hastalarında renal komplikasyon insidansının %25-40 olduğu, hastaların %15-28'inde mikroalbüminüri olduğu bildirilmiştir (Andersen *et al.* 1983). Borch-Johnsen ve meslektaşları, proteinürinin, üremi ve kardiyovasküler hastalıktan ölümle güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu bildirdiler (Borch-Johnsen *et al.* 1985). T2DM'li Kafkasoid deneklerde ilerleyici böbrek hastalığı prevalansının genellikle TlDM deneklerinden daha düşük olduğu düşünülmüştür (Cowie *et al.* 1989). Ancak son kanıtlar, diyabetin başlangıcından proteinüriye kadar geçen süre ile proteinürinin başlangıcından itibaren böbrek hastalığının son aşamasına kadar geçen sürenin benzer olduğu iki diyabet tipinde böbrek riskinin eşdeğer olduğunu ileri sürmüştür (Ritz and Orth 1999). TIDM'de diyabetik nefropatinin ilerlemesini takip etmek için yürütülen geniş epidemiyolojik çalışmalar, tipik olarak diyabet tanısı anından nefropati gelişme insidansına kadar bir gecikme evresi olduğunu göstermiştir. Bunu takiben, 15-20 yıllık bir süreden sonra doruğa ulaşan ve daha sonra yılda %1'e düşen insidansta hızlı bir artış vardır. Bu nedenle 20 yıllık diyabet süresinden sonra nefropati gelişme olasılığı çok düşüktür (Krolewski *et al.* 1985). T2DM süjelerinde nefropatinin klinik ilerlemesi ve tezahürü, süjeler genellikle hastalığın klinik tezahüründen önce uzun bir diyabet süresine sahip olduğundan, daha az iyi tanımlanmıştır. Ancak, aşağıda açıklandığı gibi TIDM konularındakine benzer bir seyir izliyor gibi görünmektedir (Nelson *et al.* 1996). Normoalbüminüri veya mikroalbüminüri olan T2DM hastalarının böbrek fonksiyonlarında bozulma olabileceği ve kardiyovasküler risk faktörlerinin böbrek hasarı ile yakından ilişkili olduğu öne sürülmüştür. Sonuç olarak diyabetik nefropati ABD ve batı dünyasında muhtemelen hemodiyaliz tedavisi ve böbrek nakli için en yaygın endikasyondur ve sonuç olarak birey ve toplum üzerine çok yüksek sosyal ve ekonomik yük bindirmektedir.

Diyabetik nefropatinin klinik seyri, Mogensen 1984, 1985, 1996, 1997 ve Tuttle 1990 tarafından kapsamlı bir şekilde rapor edilen ve gözden geçirilen 5 ana aşamaya ayrılabilir. İlerleme oranında hastadan hastaya önemli farklılıklar vardır. Diyabetik nefropati, ancak böbrek yetmezliğinin ilerlemesi gibi belirli aşamalarda tahmin edilebilir (Jones *et al.* 1979). Nefropatinin 1. evresi, diyabetin başlangıcından kısa bir süre sonra ortaya çıkar ve ilk olarak böbreğin hiperfiltrasyon ve böbrek hipertrofisi gösterdiği glomerüler filtrasyonda bir artış olarak ortaya çıkar. Morfolojideki erken

yapısal glomerüler değişiklikler, glomerüler bazal membranın kalınlaşmasını ve hücre dışı matris bileşenlerinin birikmesini içerir (Ziyadeh 1993). 7 ila 15 yıl sürebilen 1. aşama, albüminin dolaşım sisteminde tutulduğu ve atılmadığı bir 'sessiz aşama'dır. Ancak bu evrede mezangial matriksin genişlemesi ve renal tübüler hasar gibi erken yapısal glomerüler değişiklikler meydana gelir (Yaqoob *et al.* 1994). Evre III, mikroalbüminüri belirgin hale geldiğinde, idrar albümin atılım hızı 20J.Lg/dk'dan fazla ve 200J.Lg/dk'ya eşit veya daha az olduğunda başlar. Art arda alınan 3 idrar örneğinden 2'sinde mikroalbüminüri saptandığında diyabetik nefropatinin başlangıcından şüphelenilir. Bu, yerleşik böbrek hasarının göstergesidir. Bir kez sabit mikroalbüminüri oluştuğunda ve klinik müdahale olmadıkça nefropatiye ilerleme kaçınılmazdır. Çalışmalar, mikroalbüminürisi olan hastaların yaklaşık %80'inin 10 yıl içinde aşikar nefropatiye ilerlediğini göstermiştir. Evre IV, aşikar diyabetik nefropatiden şüphelenildiğinde, maksimum 6 ay içinde toplanan 3 idrar örneğinden en az 2'si için idrar albümin atılımı 200J.Lg/dk'dan fazla olduğunda kurulur. Nefropatinin bu aşamasındaki hemen hemen tüm diyabetik hastalar ayrıca diyabetik retinopati sergileyecektir. Aşikar nefropati bir kez oluştuğunda, arteriyel basınçta artışla bağlantılı olarak böbrek fonksiyonunda amansız bir düşüş görülür. Bu aşamada, özellikle anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri ile anti-hipertansif tedavi, böbrek yetmezliğine ilerleme hızını azaltmada faydalı olabilir (Mogensen 1996). Son olarak, son evre böbrek hastalığı olarak da bilinen evre V, klinik olarak daha büyük plazma proteini olan B-2-mikroglobulinin atılımındaki artış ile genelleştirilmiş bir glomerüler kapanma ile diyaliz veya böbrek nakli gerektiren üremiye yol açan yaklaşık 1000 J.Lg/dk'lık bir albümin atılım oranı ile tanımlanır.

Diyabetik nefropatinin, renal mikrodolaşımdaki metabolik ve hemodinamik faktörlerin etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya çıktığı varsayılmıştır. DCCT (DCCT 1993, 1995, 1998) dahil olmak üzere önemli çalışmalar, yoğun kan şekeri kontrolü ve antihipertansif tedavinin idrar albümin atılımının ilerlemesi üzerindeki etkilerini göstermiştir. Bu, normoalbüminüriden mikroalbüminüriye ilerlemede zayıf glisemik kontrol ve hipertansiyon anlamına gelir. İdrar albümin konsantrasyonu normal aralığı (4 ± I mg/1) aştığında diyabetik nefropati gelişme riskinin arttığı öne sürülmüştür. 4 yıl boyunca izlenen 1200 TlDM deneği üzerinde yapılan büyük bir prospektif klinik temelli çalışma,

7,4 mg/1'lik bir idrar albümin konsantrasyonunun nefropati gelişimi için önemli bir risk artışına işaret ettiğini ileri sürmüştür (Royal College of Physicians of Edinburgh Diabetes Register Group 2000). Diyabetik deneklerin tedavisinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir ve popülasyona dayalı çalışmalar, muhtemelen iyileştirilmiş glisemik kontrol ve klinik müdahale nedeniyle böbrek hastalığının başlangıcında bir gecikme olduğunu göstermiştir (Bojestig *et al.* 1994). Çalışmalar ayrıca, sıkı glisemik kontrolün diyabetik nefropatinin ana önleyici faktörü olduğu TIDM'den farklı olarak, T2DM'de hipertansiyon, hiperlipidemi, obezite ve hiperürisemi kontrolünün önceliğe sahip olabileceğini göstermiştir (Molnár *et al.* 2000). İleri glikasyon son ürünlerinin (AGE'ler) birikimi, protein kinaz C (PKC) izoformlarının aktivasyonu ve poliol yolunun hızlanması, TlDM ve T2DM'de hiperglisemi ve nefropatinin etkilerinin açıklanmasını sağlayabilir. Bu nedenle normoalbüminüriden mikroalbüminüriye ilerlemeyi durdurmak için yönetim stratejileri tasarlanması ve bu tür risk altındaki hastaların erken tanımlanması hedeflenmelidir.

2.8 TNF-α

Tümör nekroz faktör alfa (TNF-α), inflamatuar sitokinlerin geniş TNF süper ailesinin en önemli üyesidir (Hehlgans and Pfeffer 2005). Protein ilk olarak 1970'lerde, çalışmalar bakteriyel endotoksin, lipopolisakkarit (LPS) tarafından indüklenen bir serum faktörünün farelerde tümör gerilemesine neden olabileceğini ortaya çıkardıktan sonra tanımlanmıştır (Carswell *et al.* 1975). O zamandan beri çok sayıda laboratuvar, bu pleiotropik proteinin hem fizyolojik koşullarda hem de patolojik hastalık durumlarındaki birçok rolünü araştırmaktadır. TNF-α'nın insanlardaki ana kaynağı monositler ve makrofajlardır (Parameswaran and Patial 2010), ancak doğal öldürücü hücreler (NKC'ler), B-lenfositleri (Aggarwal 2003), bağışıklık dışı hücreler, endotel hücreleri, nöronlar ve fibroblastlar dahil olmak üzere diğer bağışıklık hücreleri de TNF-α salgılayabilirler (Wajant *et al.* 2003). TNF-α başlangıçta, metalloproteinaz enzimi, tümör nekroz faktörü-a-dönüştürücü enzim (TACE) tarafından bölünmeden önce hücre zarı boyunca trimerize biçimde ifade edilen 26 kilodalton (kDa) bir protein (233 amino asit) olarak üretilir. Elde edilen çözünür sitokinin moleküler ağırlığı 17 kDa (157 amino asit) vardır ve iki reseptöründen herhangi birine bağlanmak için tekrar bir trimer

oluşturur (Black *et al.* 1997). Membran eksprese edilen TNF-α'ya yaygın olarak pro-TNF- α olarak atıfta bulunulmasına rağmen, bu form hücre içi sinyal yollarını kendi başına aktive edebilir (Horiuchi *et al.* 2010). İki TNF- α reseptörü, tümör nekroz faktörü alfa reseptörü 1 (TNFR1) ve TNFR2 olarak bilinir. TNFR1 insanlarda çoğu hücre tipinde bulunurken, TNFR2 lökositler ve vasküler endotelyal hücrelerle sınırlıdır (Aggarwal 2003). TNFR1'in yaygın varlığı, bu sitokin esasen hemen hemen her hücre tipinde hücre içi sinyal olaylarını tetikleyebildiğinden, TNF- α 'nın indükleyebileceği geniş ve çeşitli etki yelpazesini açıklar.

Tarihsel olarak TNF- α 'nın tamamen proinflamatuar bir sitokin olduğuna inanılmasına rağmen son yıllarda TNF- α 'nın rolünün daha karmaşık olduğu, proinflamatuar ve profibrotik etkileri ve ayrıca iltihap sınırlayan ve çözen işlevleri daha net anlaşılır hale gelmiştir. Bu etkiler, farklı reseptör aktivasyonu ve her hastalık sürecinde yer alan spesifik organ gibi tam olarak anlaşılmamış çeşitli faktörlere bağlıdır (Wajant *et al.* 2003, Van Hauwermeiren *et al.* 2011).

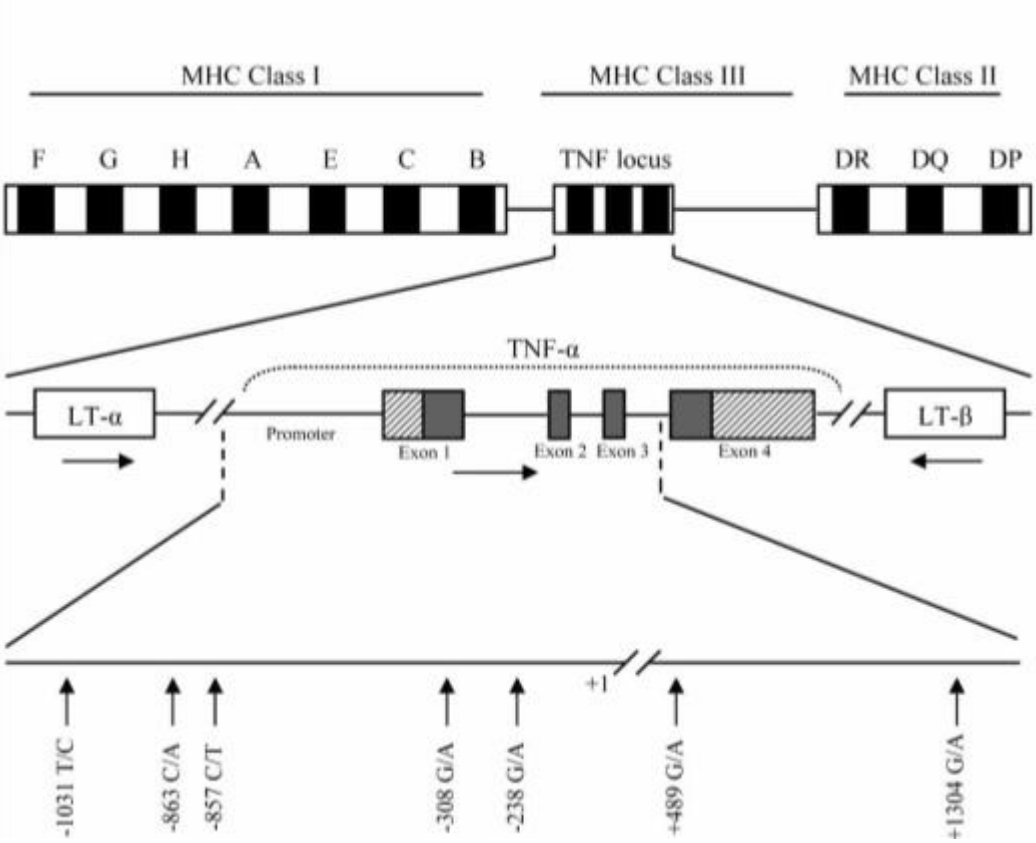
Erken faz sitokin olarak TNF-α, bulaşıcı ajanlara veya hücre hasarına maruz kaldığında hızla yukarı regüle edilir (Parameswaran and Patial 2010). Bunu takiben TNF- α reseptör ligasyonu, nükleer faktör kappa B (NFκB) ve aktivatör protein-1 (AP-1) gibi transkripsiyon faktörlerinin efektör hücrelerde çekirdeğin yer değiştirmesini indükleyebilir ve bu da interlökin 6 (IL-6), IL-1β ve IL-8 gibi proinflamatuar sitokinlerin/kemokinlerin transkripsiyonuna yol açar (Hoffmann *et al.* 2002, Blüml *et al.* 2012). Böylece TNF- α, gerekli sitokin ortamını ve inflamatuar efektör hücrelerin hem bakteriyel (Sheehan *et al.* 1995) hem de viral enfeksiyon (Zhang *et al.* 1998) bölgelerine hareketini koordine etmede hayati bir rol oynar. Sitokin, vasküler endotelyal hücreler ve lökositler üzerindeki yapışma moleküllerini yukarı doğru düzenleyerek doğrudan inflamatuar hücre akışını teşvik eder (Gane and Stockley 2012). TNF-α, reaktif oksijen türleri (ROS) gibi toksik ürünleri serbest bırakmak için nötrofillerin hazırlanmasında rol oynar ve nötrofillerin rastgele hareketini artırabilir (Berkow *et al.* 1987, Sapey *et al.* 2010). TNF-α sinyali, mikobakterilerin neden olduğu hücre içi enfeksiyonu kontrol etmek için tam işlevli granülom oluşumunu teşvik etmede önemlidir (Flynn *et al.* 1995). Ayrıca TNF-α, bazı senaryolarda hücresel apoptozu

indükleyebilir ve bu nedenle normal bireyde inflamasyonun nihai olarak sonlandırılması için bir kontrol mekanizması görevi görür (Harper *et al.* 2003, Micheau and Tschopp 2003).

TNF-α aynı zamanda romatoid artrit, inflamatuar bağırsak hastalığı (IBD), ankilozan spondilit ve sedef hastalığı da dahil olmak üzere birçok kronik inflamatuar hastalıkta önemli bir sitokindir ve TNF-α proteinini bu koşullarda canlı hedef alan monoklonal antikorların (mAb'ler) klinik etkinliği ile kanıtlanmıştır (Akobeng and Zachos 2003, Yost and Gudjonsson 2009). Bununla birlikte, nadiren, anti-TNF- α tedavisi, multipl skleroz (Group 1999), vaskülit ve lupus benzeri sendromlar gibi otoimmün hastalıkları kötüleştirebilir veya indükleyebilir (Ramos-Casals *et al.* 2008). Bu nedenle, TNF- α proteininin genelleştirilmiş blokajı, bir dizi kronik inflamatuar hastalığı olan tüm hastalarda yanıt vermemesine ragmen bu hastalıkların tedavisinde devrim yaratmıştır. Bazı hastalarda yanıt alınamamasının nedenleri henüz kesin değildir, ancak bu durum, belirli patolojilerde iki TNF- α reseptörünün farklı rolleriyle ilgili olabilir.

2.8.1 TNF- α geninin yeri

TNF- α, TNF- α proteinini kodlayan gen, 6p21.3 pozisyonunda kromozom 6'nın kısa kolunda bulunur (Hajeer and Hutchinson 2000) ve majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) genlerinin sınıf III bölgesinde yer alır. Sınıf III genler, insan lökosit antijeni (HLA)-A, B ve C antijenlerini (tüm çekirdekli hücrelerde ve CD8 T hücrelerinde bulunan antijen sunan moleküller) kodlayan sınıf I bölgesi ile HLA-DP, DQ ve DR antijenlerini kodlayan sınıf II bölgesi arasında bulunur (dendritik hücreler gibi klasik APC'lerde bulunan ve CD4 T hücrelerinde bulunan antijen sunan moleküller). Kromozomun MHC bölgesi 4 mega baz çifti (bp) uzunluğundadır, yüksek derecede genetik varyasyona sahiptir ve belirli genlerin mayoz bölünmede rastgele ayrılmadığı ve bu nedenle sıklıkla kalıtsal olduğu genişletilmiş bir haplotip olarak bağlantı dengesizliğine maruz kaldığı iyi bilinmektedir (Hajeer and Hutchinson 2000). Şekil 2.3, TNF- α lokusunu göstermektedir.



Şekil 2.3 TNF- α geni (Posch *et al.* 2003).

TNF- α geninin, MHC genlerinin sınıf III bölgesi içinde lenfotoksin beta (LTB) ve lenfotoksin alfa (LTA) genleri (ölçeksiz) arasında yer aldığı gösterilmiştir. TNF- α geni 4 ekzon ve yaklaşık 3 kilobaz çiftini kapsayan bir promotör bölge içerir. Ekzon 1, genin 5' çevrilmemiş bölgesini (UTR) kodlayan nükleotitlerle başlar ve ekzon 4, 3' UTR'yi kodlayan nükleotitlerle biter, kalan ekzon nükleotitleri ise gerçek TNF- α proteinini kodlar. Genişletilmiş bölge, genin promotör bölgesini vurgular. Konum 0, ekzon 1'deki ilk nükleotit ile ilgilidir ve bunun promotör bölgesindeki yukarı akış yönündeki bp'ye, bu nükleotitten uzaklıklarına bağlı olarak negatif sayılar atanır. Bp -1 ila -200, promotör bölgesinin yakın kısmını oluşturur. (Posch *et al.* 2003).

2.8.2 TNF- α genindeki polimorfizmler

SNP'ler, bir gen dizisindeki bir pozisyonda bulunan olağan nükleotidin diğer üç olası nükleotitten (A-adenin, T-timin, C-sitozin, G-guanin) biri tarafından yerine konulandır. SNP'ler, bir bireyin taşıdığı genin bir (heterozigot) veya her iki (homozigot) kopyasını etkileyebilir. 6.kromozom üzerindeki MHC kompleksi, diğer herhangi bir kromozomdan daha fazla genetik çeşitlilik gösterdiğinden (Hajeer and Hutchinson 2000) TNF- α geninin birden fazla SNP'ye sahip olduğunun tanımlanması şaşırtıcı değildir. Bunların çoğunluğu (on) genin promotör bölgesinde bulunur. Bununla birlikte, bunlardan dokuzu, gen transkripsiyonunu etkilemedeki rolü daha az iyi belirlenmiş bir bölge olan bp -1 ila -200'ün yukarısında, yüksek oranda korunmuş proksimal promotörün ötesinde yer almaktadır. Diğerleri intronlarda veya ekzonlarda bulunur ve biri transkriptin 3' UTR'si için ekzon kodlaması içindedir (Posch *et al.* 2003). SNP'lerin, promotör bölgeye bağlanan ve gen transkripsiyonunu kolaylaştıran transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yeteneklerini değiştirebileceği ve dolayısıyla genin mRNA ekspresyonunu olumlu veya olumsuz yönde etkileyebileceği ve bunun da hastalık fenotiplerini değiştirebileceği tahmin edilmektedir. Bu amaçla, vaka kontrollü veya aile temelli genetik ilişki çalışmaları ve daha yakın zamanda gerçekleştirilen genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), çok sayıda hastalıkta birçok SNP'yi araştırmıştır.

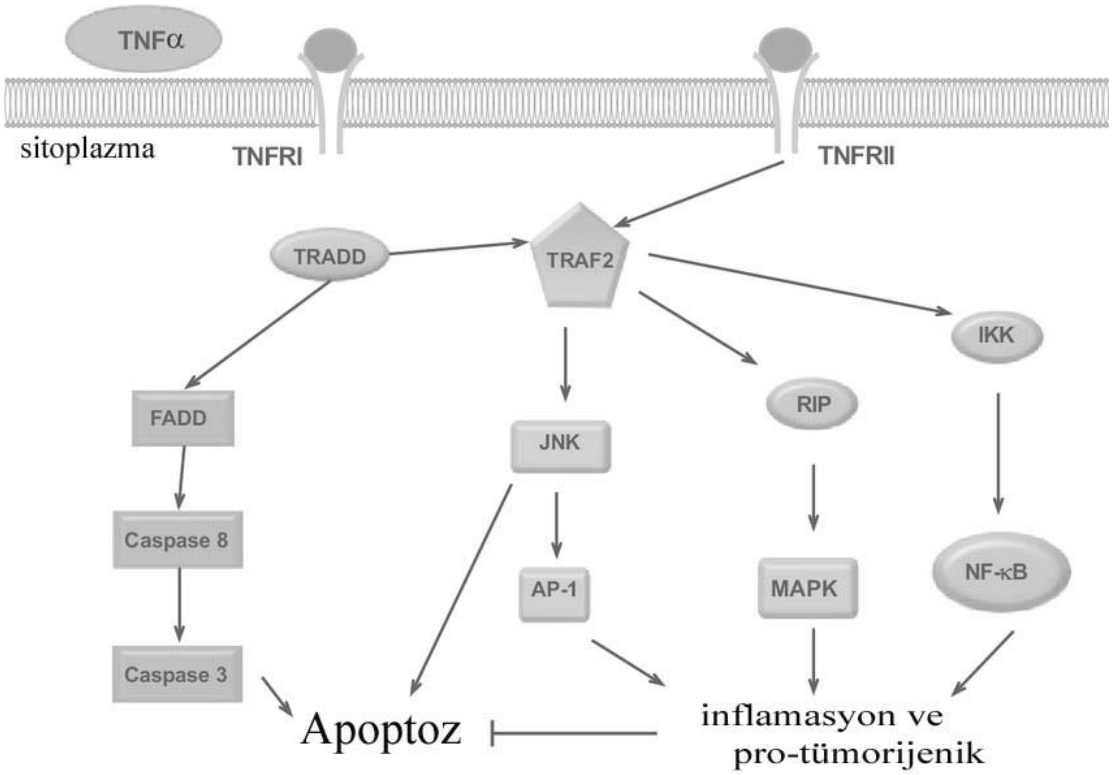
2.8.3 Diyabette TNF-α G308A Polimorfizminin Rolü

Tümör Nekroz Faktörü α (TNF-α), sepsis durumunda olduğu gibi akut inflamasyon açısından lipid metabolizması üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yüksek TNF-α üretiminin, obezitenin neden olduğu insülin direnci ve tip 2 diyabetin patogenezi ile güçlü bir şekilde ilgili olduğu gözlemlenmiştir. Obez insanlardan veya kemirgenlerden alınan yağ dokuları üzerinde deneyler yapılmıştır. Sonuçlar, TNF-α'nın hayvanlara eklenmesinin insülin direncini kırabileceğini, TNF- α 'nın nötralizasyonunun ise insülin duyarlılığını artırabileceğini göstermektedir. TNF-α veya reseptörlerinden yoksun olan nakavt farelerden elde edilen belirgin şekilde aynı çıkan sonuçlar, TNF-α'nın in vivo insülin duyarlılığını düzenlemede bir rolü olduğunu göstermiştir, diğer yandan farelerde TNF- α eksikse, obezitenin neden olduğu insülin direncine karşı sadece kısmi koruma gözlemlenmiştir. Normal insülin fonksiyonu için genlerin aşağı regülasyonu dahil olmak üzere birçok mekanizma, TNF- α 'nın insülin sinyalini daha da etkileyen metabolik etkileri ile ilişkilendirilmiştir. Öte yandan, mevcut sonuçlar, tip 2 diyabetik deneklerde TNF- α 'nın baskılanmasının metabolik iyileşmelere neden olmak için yeterli olmadığını, yine de dislipidemi ve insülin direnci gibi yaygın metabolik bozukluklar için sitokin olasılığını ortaya koymaktadır (Moller 2000). Tümör nekroz faktörü a (TNF α)-G308A polimorfizminin tip 2 diyabetin yanı sıra kardiyovasküler bozukluğa neden olma işlevini detaylandırmak için bir araştırma yapılmıştır. Çalışma için seçilen denek sayısı 85 yaş ve üzeri yaklaşık 650 kişinin bildirilen polimorfizmin kardiyovasküler bozukluk ve tip 2 diyabet ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Çalışmalar, -G308A TNF promotör polimorfizminin yaşlılık diyabeti insidansı ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (P=0.006). A-alel için homozigotlar arasında diyabet riski için gözlemlenen sonuçlar, G-alelinden farklıdır. A-alel'in G-alel'den 4,6 kat (%95 CI, 1,6-13,3) yüksek olmasının muhtemel olduğu sonucuna ulaşılmış, ayrıca 10 yıllık büyük bir araştırmayla promotör polimorfizminin kanser, bulaşıcı hastalıklar ve kardiyovasküler bozukluklar dahil olmak üzere ölüm oranlarının tüm nedenlerden sorumlu olmadığı bulunmuştur. Ek olarak, TNF α ve TNFc mikro uydu genotipleri gözlemlenmiş, ancak morbidite veya mortalite ile birleştirilmemiştir. -G308A polimorfizminin, kardiyovasküler mortalite hariç, diyabet tehdidi ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır (Schwab *et al*. 2003)

2.8.4 TNF-Reseptörleri

Hücre dışı sTNF- α ve mTNF- α 'nın moleküler etkileri, TNFR1 ve TNFR2 (Aggarwal 1991) gibi bu reseptörlerin herhangi birine bağlanarak meydana gelmiştir. İki farklı TNFR elementi, moleküler kütle, glikozilasyon, proteolitik parmak izleri, ligand bağlama özelliği veya immün reaktivite temelinde farklılık gösterir. TNFRa'nın moleküler kütlesi 75 kD'dir, TNFRB'nin ise 55 kD'si vardır. İki farklı reseptörün varlığını doğrulayan yarı yeniden yapılandırılmış TNFR fragmanları için kullanılan monoklonal antikorlar, özellikle ya TNFRa ya da TNFRB ile reaksiyona giren iki antikor sınıfı tanımlanmıştır. Birkaç hücre tipinde, reseptörler, her hücre için 100-1000 molekülden başlayarak nispeten farklı bir miktarda ifade edilirler (Rothe *et al.* 1992). Farklı hücre tiplerinde, endotel hücreleri ve lökositler gibi reseptörler ifade edilmiştir, TNFR1 daha sık ifade edilirken, TNFR2 ise baskın olarak ifade edilmiştir. Bu iki TNFR'nin farklı biyolojik etkileri araştırılmıştır. TNF- α 'nın proinflamatuar etkilerinin esas olarak TNFR1 nedeniyle arttığı görülmektedir.

Tek transmembran glikoproteinler, hücre dışı bölgelerde %28 benzerlik ile hem TNFR1 hem de TNFR2'de ortaya çıkmıştır. Bu alanlardan, dört sistein açısından zengin olan (CRD'ler) en yaygın olanıdır ve tümü bir ön-ligand bağlama düzeneği alanından (PLAD) reseptörün trimerizasyonuna katkıda bulunan üç sistein-sistein disülfür bağından oluşur. TNFR1'in karboksil ucu, bazı adaptör faktörlerle etkileşerek reseptörlerdeki varyasyon nedeniyle hücre içi ölüm alanına (DD) sahiptir, bu da iltihaplanma veya apoptoza neden olur. Her iki sinyal yolu için TRADD'nin TNFR1'e değiştirilmesi gereklidir. Daha sonra, ya içselleştirmeyi takiben (kompleks II) ya da hücre yüzeyinde (kompleks I) iki kompleksten biri üretilir. TNFassociated faktör 2 (TRAF2) ve reseptör etkileşimli protein (RIP) gerektiren I kompleksinin oluşumu, pro-inmatuvar faktörlerin gen ekspresyonunu provoke eden kinaz yollarıyla sonuçlanır. Öte yandan, ilk kompleksin düzgün çalışamaması, Kompleks II'nin oluşumunda apoptoza yol açar. Kompleks II'nin içinde, pro-kaspaz-8 ve FADD'nin alımı, reseptördeki proteoliz ve içselleştirme nedeniyle ölüme neden olan sinyal kompleksini sentezlemek için meydana gelir.



Şekil 2.4 TNFRI ve TNFRII Yoluyla Sinyal Verme (Aggarwal 1991).

TNFR1 aktivasyonu, TNFR2'ye kıyasla büyük oranda bir potansiyelle NF-kB ekspresyonunu uyarır. Ligandın her iki reseptöre bağlanmasını içeren Scatchard analizi, TNFR1'in TNF- α 'ya daha fazla yakınlık gösterdiğini bildirmiştir. Bu nedenle, proinamatory sinyalleme yollarındaki geliştirme için TNFR1 çok önemlidir (Turner *et al.* 2014).

2.9 Monosit Kemoatraktan Protein-1 (MCP-1)

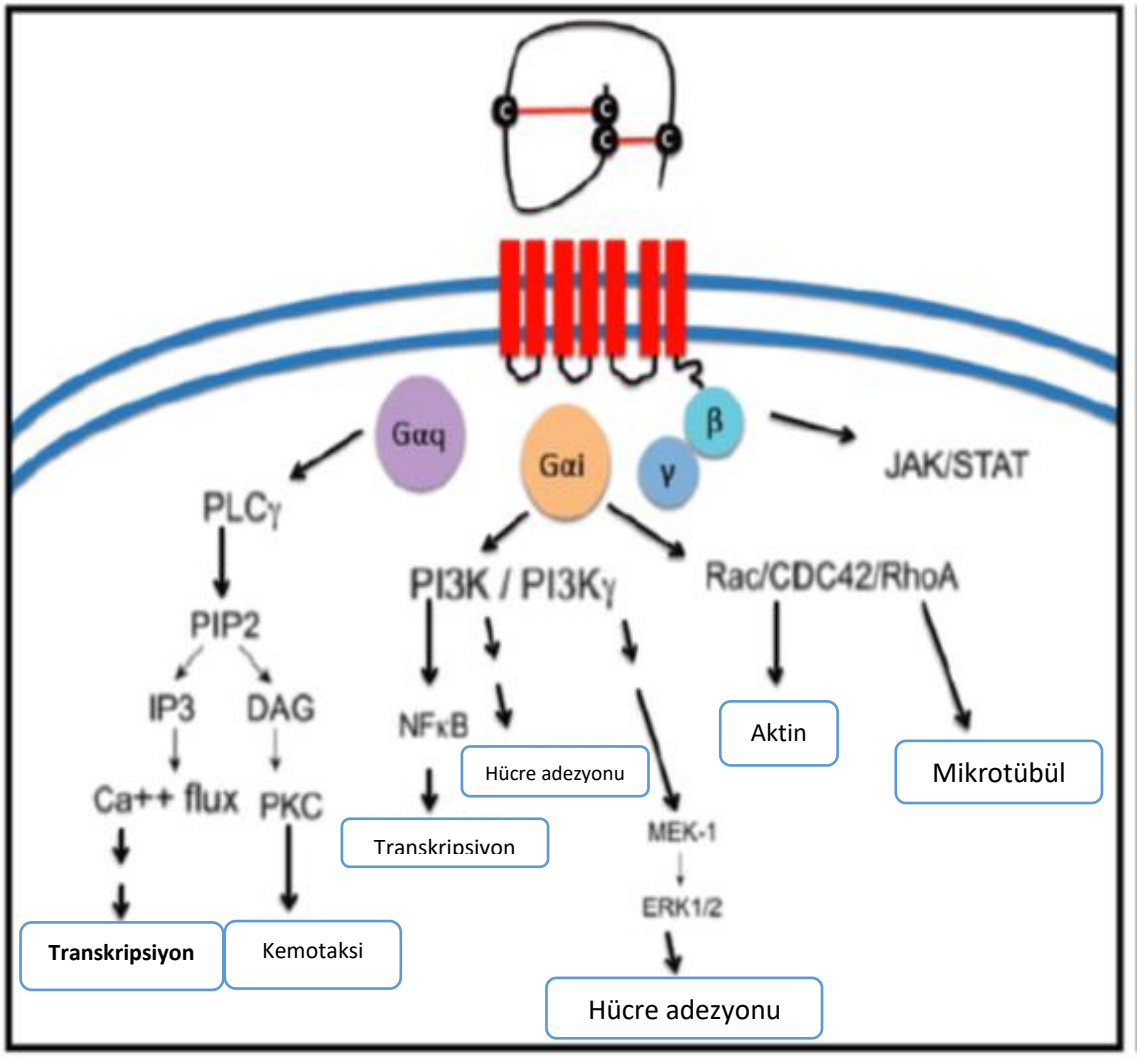
Monosit kemoatraktan Protein-1 (MCP-1), bir insan miyelomonositik hücre hattından şartlandırılmış ortam kullanılarak ilk olarak 1989 yılında Matsushima tarafından (Matsushima ve diğerleri, 1989) bir kemoatraktan sitokin olarak tanımlanmıştır. MCP-1'in DNA klonlaması ve dizilimi aynı yıl tamamlanmıştır (Matsushima *et al.* 1989), Monosit kemoatraktan protein-1 (MCP1) monositleri/makrofajları inflamasyon bölgelerine çeken bir kemokindir (Matrat *et al.* 2011). MCP-1, tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) gibi çeşitli proinflamatuar uyaranlara yanıt olarak mesanjiyal, podosit ve monosit hücreleri tarafından üretilir. Bu inflamatuar hücreler ve maddeler daha sonra

doku hasarına aracılık eder ve böbrek fonksiyon bozukluğuna neden olur. Ayrıca, MCP-1 bağlanmasının, böbrek hücre fonksiyonunun önemli bir koruyucusu olan nefrin seviyelerini azalttığı gösterilmiştir (Tarabra *et al.* 2009) oysa MCP-1'e karşı antagonistler, murin modellerinde böbrek hastalığının ilerlemesini önler (Marks *et al.* 2008).

2.9.1 MCP-1/CCR2 sinyalizasyonu

MCP-1 gibi kemokinler, etkilerini yedi transmembran G proteini kenetli reseptöre (GPCR'ler) bağlanarak gösterrler (Şekil 2.5). GPCR'nin N ucu hücre dışı olarak bulunur ve bu uç ligand etkileşiminin yeridir. Hücre içi C terminali, trimerik bir G proteininin alfa alt birimi ile etkileşime girer (Terashima *et al.* 2005). G proteini alt birimleri daha sonra ayrışır ve alfa alt birimi, fosfolipaz C (PLC) gibi aşağı akış efektörleri aktive etmekte serbesttir. PLC, inositol trifosfat (IP3) ve diasil-gliserol (DAG) oluşumunu katalize eder. IP3 daha sonra, DAG protein kinaz C'yi (PKC) aktive ederken hücre içi kalsiyumu sitozole salmak için kanallar açabilir. PKC ayrıca hücresel kalsiyum depolarını harekete geçirir. İntrasitosolik kalsiyumdaki artış, kemokin sinyallemesinin nihai işlevi, yani hücre mobilitesi için önemlidir. Hücrenin kemotaktant gradyanı boyunca hareket etmesi için, aktin hücre iskeletinin polimerizasyonuna ve kalsiyum/kalmodulin etkileşimlerine bağlı bir süreç olan hücre iskeleti çerçevesini hareket ettirmesi gerekir (Paul 2008).

GPCR aracılığıyla sinyal verme, hareketlilikle ilgili olmayan başka işlevlere sahip olabilir (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 Bir kemokin reseptörüne bağlanan bir CC kemokinin genel şeması. Kemokin reseptörleri, transmembran G proteinine bağlı reseptörlerdir ancak aynı zamanda JAK/STAT sinyal yollarına da bağlıdırlar. Kemokin bağlanması, diğer işlevler arasında hücresel hareketlilik ve transkripsiyonel aktivite ile sonuçlanan çoklu aşağı akış sinyalleme kaskadlarının aktivasyonuna yol açabilir (Tao *et al.* 2020).

Örneğin, PKC hem polarizasyon hem de yapışmada önemli roller oynar ve ayrıca MyD88 fonksiyonunu alveolar epitel hücrelerine seçici olarak geri yükledikten sonra yeniden oluşturulan transkripsiyon faktörü NF-κB aracılı sinyallemenin aktivasyonunda görev alır. G proteinleri ayrıca bir dizi transkripsiyon faktörünü (CREB ve c-jun) aktive

eden MAP kinazlarını (p38 ve ERK) de aktive edebilir. Ek olarak, kemokin reseptörleri doğrudan JAK proteinlerini toplayabilir, böylece JAK-STAT yolunun aktivasyonuna ve ardından proinflamatuar sitokinlerin transkripsiyonunu yukarı regüle etmek için STAT dimerizasyonuna ve çekirdeğe translokasyon izni verir. Bu paradigma, MCP-1.21 JAK-STAT ve GPCR yolları ile kültürlendiğinde JAK2, STAT3 ve STAT5'in tirozin fosforilasyonunu gösteren murin makrofajları için doğru olduğu kanıtlamaktadır, çünkü bazı modellerde JAK'ın farmakolojik inhibisyonu veya mutasyonu hem JAK -STAT hem de GPCR sinyalleşme basamaklarında kusurlara neden olmuştur (Soriano *et al.* 2003).

Kemokin ligandı/reseptör etkileşiminin karışıklığı ve çeşitli hücre içi kaskadların indüklenmesi, kemokin sinyalleşmesine yüksek düzeyde bir plastisite ve karmaşıklık getirir; bu, CCR2'nin iki izoforma (CCR2a, CCR2b) sahip olduğu ve ayrıca heterodimerler oluşturabileceği bulgusu ile daha da güçlendirilmiştir (Sanders *et al.*, 2000). İzoform mRNA ekspresyonunu değerlendiren erken deneyler ve daha sonra izoforma özgü antikorlar kullanılarak yapılan çalışmalar, CCR2b'nin eksprese edilen baskın form olduğunu desteklemektedir (Tanaka 2002). CCR2b/CCR5 heterodimer oluşumunun, bu bireysel reseptörler için ana ligandların, sırasıyla MCP-1 ve RANTES (normal T hücresi ekspresyonu ve salgılanması sıralanması aktivasyonu üzerine düzenlenir) ile birlikte uyarılmış makrofajlarda da meydana geldiği bulunmuştur ve bu durum, kemotaksiden ziyade lökosit yapışmasının tercihli indüksiyonunu işaret eder (Mellado *et al.* 2001).

2.9.2 MCP-1 polimorfizmi

Son zamanlarda, MCP-1 geninin distal düzenleyici bölgesinde, transkripsiyon başlangıç bölgesine göre -2518 konumundaki bir polimorfizm (yayınlanmış dizi Gen Bankası erişim numarası D26087'ye göre) tanımlanmıştır (Rovin, Lu and Saxena 1999). Bu polimorfizmin fonksiyonel önemi, periferik kan mononükleer hücrelerinin veya aktive hepatik stellat hücrelerin/miyofibroblastların sitokin kaynaklı MCP-1 ekspresyonunu analiz eden birkaç in vitro (cam tüpte) çalışma ile gösterilmiştir (Mühlbauer *et al.* 2003). -2518'de G-aleli taşıyan bireylerden alınan hücreler, A/A homozigot deneklerden

alınan hücrelerden daha fazla MCP-1 göstermiştir. Ayrıca, bu yüksek MCP-1 üreten genotiplerin prevalansının bronşiyal astımın varlığı ve ciddiyeti (Szalai *et al.* 2001), erken böbrek nakli yetmezliği riski (Krüger *et al.* 2002), Crohn hastalığının başlangıcı ve hastalık davranışı (Herfarth *et al.* 2003), kutanöz vaskülit sıklığı (Aguilar *et al.* 2001) ve kronik hepatit Cinfection hastalarında fibrozis ilerlemesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mühlbauer *et al.* 2003). Ayrıca, şiddetli koroner arter hastalığı için agenetik risk faktörü olduğu öne sürülmüştür (Szalai *et al.* 2001). Son zamanlarda, kanıtlar, MCP-1 proteininin serum seviyelerinin ve biyolojik aktivitesinin, MCP-1 gen promotörünün (rs1024611) 2518 pozisyonunda meydana gelen tek bir nükleotid polimorfizmi tarafından düzenlenebileceğini göstermiştir.

Bu polimorfizm, MCP-1 geninin transkripsiyonel aktivitesini etkiler. MCP-1 -2518 A/G polimorfizminin G/G ve A/G genotipini taşıyan bireylerin lökositleri, A/A genotipi taşıyan bireylere göre inflamatuar bir uyaranla indüklendikten sonra önemli ölçüde daha yüksek MCP-1 seviyeleri üretir (Rovin, Lu and Saxena 1999). MCP-1 böbrek dokularında görünebilir ve çeşitli böbrek hastalıkları olan hastaların idrarında saptanabilir (Kim and Tam 2011). Glomerüler hastalıkta MCP-1 ekspresyonunu saptamanın bir yöntemi, glomerülopatili hastalarda yüksek olan idrardaki MCP-1 düzeylerini ölçmektir (Tesch *et al.* 1999). MCP-1'in seçici hedeflemesi, bir dizi böbrek hastalığının baskılanmasında etkili bir tedavi olabilir.

2.9.3 MCP-1 Gen Polimorfizmleri ve Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropatinin patogenezi, hücre dışı matrisin birikmesi, glomerüler bazal membran kalınlaşması ve glomerülosklerozile nitelenir (Cooper 1998). 2000 yılında, Wada (Wada *et al.* 2000) ve Banba (Banba *et al.* 2000), diyabetik nefropatili hastalarda sağlıklı kontrollere kıyasla idrar MCP-1 düzeylerinin önemli ölçüde yükseldiğini bulmuşlardır. Ayrıca, idrar MCP-1 seviyeleri, böbrek biyopsi dokusundaki interstisyel makrofajların ve MCP-1 pozitif hücrelerin sayısı, tübülointerstisyel lezyonların ciddiyet derecesi (Wada *et al.* 2000) ve ayrıca albüminürinin kapsamı ile pozitif korelasyon göstermiştir (Banba *et al.* 2000). Bu nedenle MCP-1'in diyabetik nefropati dahil olmak

üzere inflamatuar böbrek hastalıklarında anahtar rolü olduğu ve buna potansiyel olarak makrofajların aracılık ettiği düşünülmektedir.

MCP-1 gen polimorfizmlerinin böbrek hastalığının ilerlemesi üzerindeki etkisini inceleyen çalışmalar, gen ekspresyonunu düzenlediğine inanılan MCP-1'in distal düzenleyici bölgesindeki -2518 A/G tek nükleotid polimorfizmine (SNP) odaklanmıştır. Spesifik bir alel varlığının interlökin-1β ile uyarılan periferik kan mononükleer hücreleri tarafından daha fazla MCP-1 üretimi ile ilişkili olduğu gösterildiğinde, bu SNP başlangıçta potansiyel olarak önemli olarak tanımlanmıştır (Rovin, 1999). Daha sonraki klinik çalışmalar, Asyalı ve Meksikalı bireylerde Kafkasyalılara kıyasla daha yüksek oranda ifade edilen G alelinin (Rovin, 1999), lupus nefriti ve IgA nefropatisi ile ilgili bazı çalışmalarda böbrek hasarına karşı azaltılmış bir duyarlılıkla ilişkili olduğunu göstermiştir (Mori *et al.* 2005).

MCP-1 A(-2518) alelinin varlığı ayrıca diyabet ve diyabetik nefropati gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Tip 1 diyabetli beyaz ırktan hastalarda normal kontrollere göre A alleli ve A/A genotipinin sıklığının anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmektedir (Yang *et al.* 2004). Benzer şekilde, büyük bir Kafkasyalı kohortunda, G aleli daha düşük tip 2 diyabet insidansı ile ilişkilidir ve azalmış plazma MCP-1 seviyeleri ile ilişkilidir (Simeoni *et al.* 2004). Buna karşılık, Koreli hastalarda yapılan bir çalışma, sağlıklı kontrollere kıyasla tip 2 diyabetli hastalarda MCP-1 genindeki -2518 A/G'nin genel dağılımında anlamlı bir farklılık göstermemiştir (Moon *et al.* 2007). Bununla birlikte, bu çalışma, A aleli ile diyabetik böbrek yetmezliği arasında önemli bir ilişki olduğunu göstermiştir, bu da bazı popülasyonlarda A alelinin diyabetin kendisinden ziyade diyabetik nefropatinin gelişimi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1 MATERYAL

3.1.1 Aletler ve Ekipmanlar:

Bu çalışmada kullanılan araç ve gereçler (Çizelge 3.1)'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Aletler ve Ekipmanlar

NO	Aletler ve Ekipmanlar	Menşe	Firma
1	Kamera	Japonya	Canon
2	Santrifüj	Japonya	Kokusan
3	Derin dondurucu -80C°	Almanya	Jermaks
4	Tek kullanımlık şırınga 5 ml	Çin	Sterile EO.
5	Tek kullanımlık uçlar	Almanya	Netheler-Hinz
6	Distile su cihazi	Almanya	GFL
7	EDTA tüpü	Ürdün	AFCO
8	Elektroforez	ABD	Biometra
9	ELISA Okuyucu ve Yıkayıcı	ABD	BioTek
10	Eppendorf Tüpleri 5.0 mL	Tayvan	Geneaid
11	Eppendorf Mini spin santrifüj	Almanya	Hamburg
12	Jel Tüpü	Ürdün	AFCO
13	İnkübatör	Almanya	Memmert
14	Mikropipetler 5-50, 0,5-10, 100-1000µl	Fransa	Gillson Instruments
15	Nano drop	ABD	Biometra
16	Sysmex XT-2000i otomatik analiz cihazı	ABD	Sysmex
17	Termocycler PCR	ABD	Labnet
18	UV–transillüminatör	Italya	Optima
19	Vorteks	ABD	IKA
20	Su banyosu	Almanya	Memmert

3.1.2 Ticari kitler

Bu çalışmada kullanılan ticari kitler Çizelge (3-2)'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2 Ticari kitler

No.	Kit	Firma	Ülke
1	**Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti**	**Geneaid**	**ABD**
	Toplama tüpü 2ml		
	Elüsyon buffer		
	GB buffer		
	GT buffer		
	GD kolonu		
	W1 buffer		
	Yıkama bufferı		
	Proteinaz K 10mg/ml		
2	**AccuPower™ PCR PreMix**	**Bioneer**	**Kore**
	dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
	KCl		
	Yükleme boyası		
	$MgCl_2$		
	Tris.HCl pH 9.0		
	Taq DNA polimeraz		
3	TNF- α Kiti	**Peprotech**	**Birleşik Krallık**
4	Restriksiyon Enzimi	**Biolab**	**Kanada**

Çizelge 3.3 Bileşenleri ile birlikte TNF- α ELISA kitleri

No	Öğeler	Özellikler
1	Biyotinlenmiş Saptama Ab Seyreltici	1 şişe 10 mL
2	Konsantre Biyotinlenmiş Tespit Ab	1 şişe 120µL
3	Konsantre HRP Konjugatı	1 şişe 120µL
4	Konsantre Yıkama Bufferı (25×)	1 şişe 30mL
5	HRP Konjugat Seyreltici	1 şişe 10mL
6	Mikro ELISA Plakası	8 çukurcuk × 12 şerit
7	Plaka Mühürleyici	5 adet
8	Referans Standart	1 şişe
9	Referans Standardı ve Örnek Seyreltici	1 şişe 20mL
10	Durdurucu Çözelti	1 şişe 10mL
11	Substrat Ayıracı	1 şişe 10mL

3.1.3 İşaretleyici ve primerler

Çizelgeler (3.4) Mevcut çalışmada kullanılan DNA şaretleyici ve primerleri göstermektedir.

Çizelge 3.4 İşaretleyici ve primerler

No.	**İşaretleyici**	Üretici firma	Menşe
1	50 bp DNA ladder	Intronbiotechnology	Kore
2	100 bp DNA ladder	Intronbiotechnology	Kore
3	Primerler	Bioneer	Kore

3.1.3.1 Primerler

TNF-α geni (TNF-α -308 G/A (rs1800629)) ve MCP-1 (-2518G/A) gen polimorfizm primerleri, (Wilson *et al.*, 1992; Simeoni *et al.*, 2004) tarafından tasarlandı. Bu primerler, (GIBCO BRL Grand Island, NY, USA-Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada)) aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir:

Çizelge 3.5 Dizileri ve amplikon boyutları ile Multiplex PCR primerleri

Primer	**Sıra**		**Amplikon**	
TNF-α -308 G/A	F	5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'	107bp	(Wilson *et al*.,1992)
	R	5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3'		
MCP-1 (-2518G/A)	F	50-CCGAGATGTTCCCAGCACAG-30	930bp	(Simeoni *et al*.,2004)
	R	50-CTGCTTTGCTTGTGCCTCTT-3		

3.1.4 Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge (3.6)'de belirtilmiştir..

Çizelge 3.6 Kimyasal maddeler

No.	**Kimyasal**	**Firma and Menşei**
1	Saf etanol	Scharlau (İspanya)
2	Agaroz	BioBasic (Kanada)
3	Etidyum Bromür	
4	Nükleaz icermeyen su	Bioneer (Kore)
5	Ladder 50bp	
6	TBE bufferı 10X	BioBasic (Kanada)

3.1.4.1 Restriksiyon enzimi

RFLP-PCR testinde kullanılan restriksiyon enzimleri firmaları ve menşe ülkeleri ile Çizelge (3.7)'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.7 Restriksiyon enzimi

Restriksiyon enzimi	SNP	Firma/Ülke
PvuII	**MCP-1 (2518G\A G/A**	**GIBCO BRL Grand Island, NY, ABD.** **Qiagen, Mississauga, Ontario, Kanada .**
NcoI	**TNF-α 308 G/A G/A**	

3.2 Yöntemler

3.2.1 Numunelerin toplanması

Hasta ve sağlıklı kontrol grubu Kerbala'da bulunan AL-Hussein Medical City Hastanesi'den (Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bölümü) seçildi. Tip 2 diyabet teşhisi, Amerikan Diyabet Derneği kriterlerine göre konuldu.

Diyabetik nefropati (mikroalbüminüri), radyoimmunoassay (RIA) ile ölçülen albümin ekskresyon hızı (AER), 3 aylık bir süre boyunca 24 saatlik üç idrar toplamanın en az ikisinde 30-300 mg/24-saat olduğunda teşhis edildi. Çalışmanın başlangıcında nefropatisi olan 40 diyabetik hasta ve nefropatisi olmayan 40 diyabetik hasta çalışmaya alındı ancak bu hastalardan nefropatisi olan 5 hasta ve nefropatisi olmayan 5 hasta farklı nedenlerle (kişisel nedenler, nefropatiye yol açan ilaç kullanım öyküsü, böbrek taşı, amiloidoz gibi nedenler) çalışma dışı bırakıldı. Çalışma grubunda nefropatisi olan veya olmayan ARB veya ACE tedavisi alan hasta dahil edilmedi. Bu çalışmanın denekleri 100 diyabetik hasta (35 nefropatili (DN) tip 2 diyabetli ve nefropatisi olmayan tip 2 diyabetli 35 hasta) ve 30 tane kontrol grubunu oluşturan sağlıklı kişiden oluşturuldu. Kontrol grubunu oluşturanlar 75 gr oral glukoz testi (0. ve 2. saat) uygulanan ve normal bulunan kişilerdi. Tüm katılımcılar bilgilendirildi ve onayları alındı. Her hastanın ayrıntılı tıbbi öyküsü alındı. Fenotipik özellikler belirlendi, yaş, cinsiyet, tansiyon kaydedildi.

3.2.2 Kan Örnekleri

Kubital fossa venden alınan kanın aspirasyon alanı %70 alkol ile sterilize edildikten sonra her hasta ve kontrol grubundan kan örneği (5ml) alındı. Toplanan numune hemen aşağıdaki şekilde 2 tüpe aktarıldı:

A. TNF-α geni (TNF-α -308 G/A (rs1800629)) ve MCP-1 (-2518G/) tespiti amacıyla WBC konsantrasyonu ve PCR tekniği için kullanılan 5 ml tüpte (EDTA tüpü) iki mililitre (2 ml) kan A gen polimorfizmi kullanıldı.
B. Düz tüpe (serum tüpü) üç mililitre (3 ml) kan aktarıldı, daha sonra kan örnekleri (RCF) kan serumu elde etmek için 1850 x g'de 5 dakika santrifüj edildi. Ardından kan TNF- α sitokin ve biyokimyasal belirteçlerin taranması için -80 ^{o}C'de donduruldu.

3.2.3 ELISA yöntemi

3.2.3.1 TNF- α Testi

3.2.3.1.1Test prensibi

Bu ELISA kiti Sandwich-ELISA yöntemiyle kullanılmaktadır. Bu kitte sağlanan mikro ELISA plakası, ilk adım olarak İnsan TNF- α 'ya özgü antikorlarla kaplanmalıdır. Uygun mikro ELISA plaka kuyularına eklenen standartlar veya numuneler, antikorlara bağlanacaktır. İnsan TNF- α ve Avidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatına özgü saptama antikorları daha sonra her mikro plaka kuyusuna art arda eklenebilir. İnkübasyondan sonra serbest bileşenler yıkanarak uzaklaştırılır. Her bir kuyucuğa substrat solüsyonu eklendiğinde, yalnızca İnsan TNF- α, tespit antikoru ve Avidin-HRP kompleksi içeren kuyucuklar mavi renkte görünecektir. Sülfürik asit solüsyonu eklendiğinde enzim-substrat reaksiyonu sona erer ve sarı renk görünür. Optik yoğunluk (OD), 450 nm dalga boyunda spektrofotometri ile ölçülebilir. OD değeri, İnsan TNF- α konsantrasyonu ile orantılıdır. Numunelerin OD'sini standart eğri ile karşılaştırarak numunelerdeki İnsan TNF- α konsantrasyonu hesaplanabilir.

3.2.3.1.2 ELISA Tekniği için Maddelerin ve Çözümlerin Hazırlanması:-

1. Antikor yakalama: Bir hacim (11 µg) Keçi anti-insan TNF- α + (0,5 mg) D-mannitol. Flakon santrifüjlendi ve (110 µL) steril su içinde 100mg/ml konsantrasyonda yeniden oluşturuldu.

2. Tespit antikoru: Bir Hacim (11 µg) Biyotilasyonlu Keçi anti-insan TNF- α + (0,5 mg D-manitol. Flakon santrifüjlendi ve 100 mg/ml konsantrasyonda (110 µL) steril su içinde yeniden oluşturuldu.

3. İnsan TNF- α standardı: Bir hacim(1µg) rekombinant insan TNF- α +(2.2 mg) BSA+ (11 mg) D-mannitol. Şişe santrifüjlendi ve 1µg/ml konsantrasyonda (1 ml) steril su içinde yeniden oluşturuldu.

4. Avidin-HRP konjugatı: Hacimli (18 mi) şişe ikiye (9 mi) sıvılaştırıldı ve -20°C'de dondurularak saklandı.

5. Fosfat tamponlu tuzlu su: (10xPBS), steril su içinde (1x PBS)'ye seyreltildi.

6. Yıkama Tamponu: Tween-20 (% 0.05) PBS içinde seyreltildi.

7. Blok bufferı: PBS'de 1% BSA

8. Seyreltici: Tween-20 (% 0.05), BSA (% 0.1) PBS içinde seyreltildi.

9. Plat hazırlığı: Yakalanan Ab, (0.50 ug/ml) konsantrasyona kadar PBS ile seyreltildi ve plakadaki her bir kuyuya (100uL) ilave edildi. Plat kapatıldı ve gece boyunca inkübe edildi. Sıvıyı uzaklaştırmak için kuyucuklar aspire edildi ve plaka (300 µL) yıkama tamponu kullanılarak 4 kez yıkandı. Son işlemden sonra plak ters çevrilerek kalan tampon uzaklaştırıldı ve kağıt havlu üzerine alındı. Her kuyucuğa blok tampon (300 µL) eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi ve plat 4 kez aspire edildi.

3.2.3.1.3 Tahlil prosedürü

1. Her kuyucuğa 100µL standart veya numune hacmi eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

2. Plak mikroplaka yıkayıcı ile aspire edildi ve dilendirildi, Detection Ab (100µ) eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübe edildi.

3. Aspire edildi ve mikroplaka yıkayıcı kullanarak 4 kez yıkandı.

4. Bir hacim 100µL HRP Konjugat eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.

5. Aspire edildi ve mikroplaka yıkayıcı kullanarak 4 kez yıkandı.

6. Substrat Reaktifi (100µL) eklendi ve oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi.

7. Durdurma Solüsyonu (50µL) eklendi ve ardından 405 nm'de okundu.

8. Sonuçlar hesaplandı.

3.3 Biyokimyasal testler

Toplam kolesterol, trigliserit, serum kreatinin ve üre seviyeleri, otomatik Olympus AU2700 Analizörü ile ölçüldü. HbA1c (%) ve mikroalbüminüre seviyeleri otomatik Kimya Analizörü ile ölçüldü.

3.4 Hematolojik çalışma

Hastaların ve kontrol bireylerinin tüm EDTA ile antikoagülanlı kan örnekleri için otomatik kan hücresi sayacı (Sysmex XT-200i) kullanılarak toplam beyaz kan hücresi sayımı (WBC) mutlak ve manuel olarak yapıldı.

3.5 Moleküler Yöntemler

3.5.1 Genomik DNA ekstraksiyonu

Kan örneklerinden genomik DNA, Accupower®Genomic DNA ekstraksiyon kiti (Tam Kan) Geneaid USA kullanılarak ekstrakte edildi ve şirket talimatlarına göre aşağıdaki adımlar izlenerek yapıldı:

1. 200 µl tam kan steril 1.5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve ardından 20 µl proteinaz K eklenip vorteksle karıştırıldı, ardından tüm tüpler 60 °C'de 5 dakika inkübe edildi.

2. Daha sonra her bir tüpe 200µl GSB tamponu eklenerek maksimum lizis verimi elde etmek için vorteks ile karıştırıldı ve ardından tüm tüpler 60^{o}C'de 5 dakika inkübe edildi.

3. Karışıma 200 µl mutlak etanol ilave edildi ve 10 saniye vorteksle karıştırıldı Ardından damlaların kapağın altına yapışmasını sağlamak için hafifçe aşağı doğru döndürüldü. Lizat, 2 ml'lik bir toplama tüpüne takılan GD Binding filtre kolonuna dikkatlice aktarıldı ve ardından tüpler kapatıldıktan sonra 13170 x g'de 1 dakika santrifüjlendi.

4. Lizat atıldı ve ardından her GD kolonuna 400 µl yıkama tamponu 1 (W1) eklendi ve 13170 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.

5. Yıkama tamponu 1 atıldı, GD kolonu 2 ml toplama tüpüne aktarıldı ve ardından her bir GD kolonuna 600µl Yıkama tamponu 2 (W2) eklendi ve 13170 x g'de 30 saniye santrifüjlendi.

6. Yıkama tamponu 2 atıldı, GD 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve daha sonra tüpler bir kez daha 13170 x g'de 3 dakika süreyle santrifüj edilerek etanol tamamen uzaklaştırıldı.

7. Bundan sonra, genomik DNA içeren GD kolonu steril 1.5ml mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve ardından 100µl önceden ısıtılmış Elüsyon tamponu eklendi ve tampon tamamen bağlama kolonu tüpüne emilene kadar tüpleri 3 dakika oda sıcaklığında bırakıldı.

8. Son olarak, tüm tüpler DNA'yı ayrıştırmak için 13170 x g'de 30 saniye santrifüjlendi ve -20°C'lik dondurucuda saklandı.

3.5.2 Genomik DNA Profilleme

Kan örneklerinden ekstrakte edilen genomik DNA, aşağıdaki adımlarla (260 /280 nm) absorbansı okuyarak DNA'nın saflığını kontrol eden ve ölçen Nanodrop spektrofotometre (THERMO. ABD) kullanılarak kontrol edildi:

1. Nanodrop yazılımı açıldıktan sonra uygun uygulama (Nükleik asit, DNA) seçildi.
2. Optik yüz silinerek temizlendi. Ardından, alt ölçüm kaidelerinin yüzeyine 2µl serbest nükleaz suyu dikkatlice pipetlendi.
3. Örnekleme kolu indirildi ve Nanodrop'u başlatmak için Tamam'a tıklandı, ardından kaideler temizlendi ve ölçüme 1 µl DNA eklendi, 260/280 nm'de 1.8 ile 2.1 arasında DNA verimi saf olarak kabul edildi.

3.5.3 RFLP-PCR Tekniği

Hastalarda ve sağlıklı kontrol kan örneklerinde TNF-α geni (TNF-α 308 G/A (rs1800629)) ve MCP-1 (-2518G/A) gen polimorfizminin tespiti için RFLP-PCR tekniği uygulandı. Bu yöntem(Wilson *et al.*, 1992; Simeoni *et al.*, 2004) aşağıdaki adımlara göre gerçekleştirildi:

3.5.3.1 PCR ana karışım hazırlığı

PCR ana karışımı (AccuPower PCR PreMix Kit) kullanılarak hazırlandı ve bu ana karışım, aşağıdaki Çizelge 3.8'de şirket talimatlarına göre yapıldı.

Çizelge 3.8 PCR karışımı

Karışım çözeltisi	**Miktar**	**Konsantrasyon**
Hedef DNA	5µL	20 ng/µL
Nükleaz içermeyen su	40µL	-
İlerler primer	2.5µL of each primer	10pm/ µl
Ters primer	2.5µL of each primer	10pm/ µl
Ana karışım	PreMix	1X
Toplam miktar	50µL	-

Daha sonra, yukarıdaki çizelgede daha önce bahsedilen PCR ana karışım bileşenleri, PCR reaksiyonu için gerekli olan (Taq DNA polimeraz, dNTP'ler, Tris-HCl pH: 9.0, KCl, MgCl2, stabilizatör ve yükleme boyası vb.) diğer tüm bileşenleri içeren standart AccuPower PCR PreMix Kitine yerleştirildi. Ardından tüm PCR tüpleri 600 x g'de 3 dakika Exispin vorteks santrifüjüne aktarıldı. Daha sonra PCR Thermocycler'a (Mygene. Korea) yerleştirildi.

2.5.3.2 PCR Programı

Çizelge (3.9) ve (3.10)'de listelenmiştir.

Çizelge 3.9 TNF-α -308 G/A'nın amplifikasyon koşullar

Adımlar	Derece	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94 °C	2 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	30 sn	35 döngü
Bağlanma	60°C	30 sn	
Uzama	72 °C	45 sn	
Son uzama	72 °C	5 dk	1 döngü
Bekleme	4 °C	ilelebet	__

Çizelge 3.10 MCP-1 (-2518G/A) geninin amplifikasyon koşulları

Adımlar	Derece	Zaman	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94 °C	5 dk	1 döngü
Denatürasyon	94 °C	1 dk	35 döngü
Bağlanma	55°C	1 dk	
Uzama	72 °C	1.5 dk	
Son uzama	72 °C	10 dk	1 döngü
Bekleme	4 °C	İlelebet	__

3.5.3.3 PCR ürün analizi

PCR ürünleri, aşağıdaki adımları izleyerek agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi:

1-%1 Agaroz jel 1X TBE kullanılarak ve 100 °C'de su banyosunda 15 dakika eritilerek hazırlandı, ardından 50 °C'de soğumaya bırakıldı.

2- Daha sonra agaroz jel solüsyonuna 3µL etidyum bromür boyası eklendi.

3-Tarak uygun pozisyonda sabitlendikten sonra tepsiye agaroz jel solüsyonu döküldü, oda sıcaklığında 15 dakika katılaşmaya bırakıldı, ardından tarak tepsiden yavaşça çıkarıldı. Her tarak kuyucuğuna 10 µl PCR ürünü ve Birinci kuyucuğa 10µl (100bp DNA ladder) ilave edildi.

4- Jel tepsisi elektroforez haznesine sabitlendi ve 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Daha sonra 100 volt ve 80 AM'de 1 saat elektrik akımı uygulandı.

5- PCR ürünleri UV transillüminatör kullanılarak görselleştirildi, dijital kamera kullanılarak fotoğraflandı (Sambrook and Russell, 2001).

3.5.3.4 RFLP-PCR karışımı hazırlama

RFLP-PCR karışımı, NcoI ve PvulII kullanılarak hazırlandı. TNF- α geni sırasıyla (TNF-α -308 G/A (rs1800629)) ve MCP-1 (-2518G/A) gen polimorfizmi için restriksiyon enzimidir. Bu reaksiyon karışımı, şirket talimatlarına göre aşağıdaki çizelgede bağımsız olarak yapılmıştır:

Çizelge 3.11 TNF-α -308 G/A ve MCP-1 -2518G/A genotipi için karışım

Karışım çözeltisi	**Miktar**
PCR ürünü	10µL
Restriksiyon enzim tamponu 10X	2µL
Restriksiyon enzimi (10 unit)	1µL
Nükleaz içermeyen su	7µL
Toplam Miktar	20µL

Bundan sonra, bu ana karışım 600 x g'de 2 dakika boyunca Exispin vorteks santrifüjüne yerleştirildi, ardından gece boyunca 37°C'de inkübasyona aktarıldı. Daha sonra REFLP-PCR ürünü agaroz jel elektroforezi (%2.5) ile analiz edildi ve ürün analizi aşağıdaki gibi yapıldı:

Çizelge 3.12 Restriksiyon enzimleri ve DNA Fragmanları boyutu

Restriksiyon enzimleri	**Gen**	**Genotip**	**Fragment boyutu**
PvuII.	**MCP-1 (-2518G/A)**	GG	708- ve 222-bp
		GA	930-708- ve 222-bp
		AA	930 bp
NcoI	TNF-α gene (TNF-α -308 G/A (rs1800629)	GG	87 ve 20 bp
		GA	107, 87 ve 20 bp
		AA	107 bp

3.6 İstatistik analizi

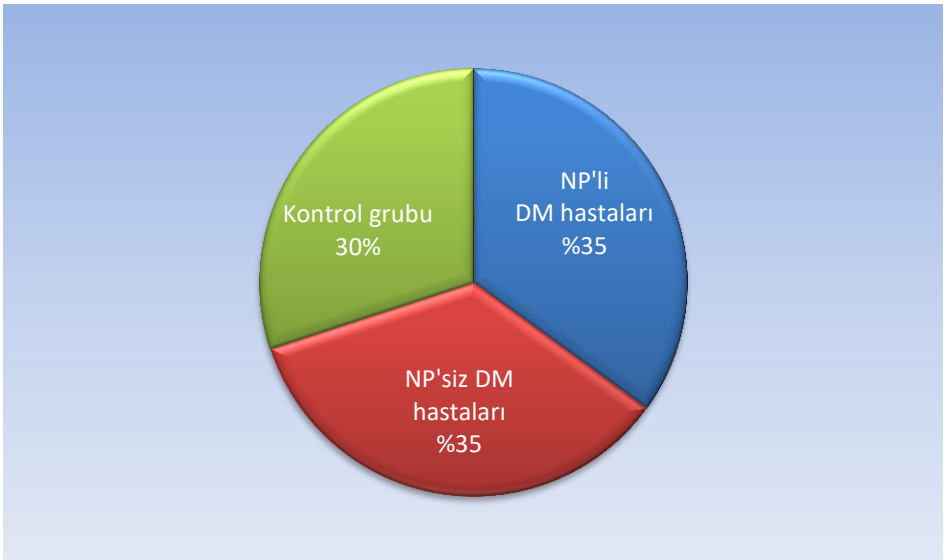
Veriler bilgisayarlı bir veritabanı yapısına çevrildi. İstatistiksel analiz, SSPS versiyon 23 kullanılarak bilgisayar destekli yapıldı.

Veriler ortalama ±, standart hata (SE) olarak verildi. Ek olarak, önemli farklılıkları bulmak için ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $P \leq 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Örneklerin dağılımı

Bu çalışmada diyabetik hasta sayısı 70'tir (35 nefropatili ve 35'i nefropatisiz ve 30 kişi kontrol grubu olarak).



Şekil 4.1 hasta ve kontrol grubu dağılımı.

4.2 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunun klinik ve biyokimyasal bulguları.

Çizelge (4.1)'de DM nefropatili olguların, nefropatisiz DM'nin ve sağlıklı kontrollerin yaşları ortalamaları sırasıyla 52.24, 55.12 ve 54.74 yıl ile ciddi bir fark göstermezken bu kişilerde diyabet süresinin ortalaması DM nefropatili olgularda 9,21 ve DM nefropatisiz olgularda 8,98 yıl ile anlamlı farklılık gösterdi. Nefropatili, nefropatisiz ve sağlıklı DM'nin kan basıncının sistolik ve diyastolik kan basıncı istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi. Ayrıca (Postprandial plazma glukozu, HbA1c, Total kolesterol, Trigliserid, HDL-kolesterol, LDL-kolesterol, Serum kreatinin, Serum üre, Mikroalbüminüri) içeren tüm biyokimyasal testlerin ortalama seviyeleri hasta grupları ve sağlıklı olgular arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdi.

Çizelge 4.1 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunun klinik ve metabolik özellikleri

	DM Nefropatili Oranı ± SD	DM (Nefropatisiz) Oranı ± SD	Kontrol grubu (N=30)Oranı± SD	P-Değeri
Yaş (yıl)	52.24±10.45	55.12±9.65	54.74±8.93	>0.0.5
Diyabet süresi (yıl)	9.21±8.54	8.98±6.23	0	<0.05
Sistolik BP (mmHg)	131.56±13.01	129.78±14.8	105.04±9.21	<0.05
Diastolic BP (mmHg)	81.34±9.11	80.63±21	69.61±4.02	<0.05
Açlık plazma glukozu (mg/dl)	126.12±22.98	118.91±31.02	81.47±12.83	<0.05
Tokluk plazma glukozu (mg/dl)	179.54±21.93	175.98±30.45	120.83±5.93	<0.05
HbA1c (%)	7.3±1.8	7.02±2.01	4.9±0.31	<0.05
Toplam kolesterol (mg/dl)	211.08±25.98	210.97±25.87	160.32±0.92	<0.05
Trigliserit (mg/dl)	182.11±19.04	177.98±22.94	122.61±90.82	<0.05
HDL-kolesterol (mg/dl)	41.62±11.28	42.69±11.09	57.92±11.41	<0.05
LDL-kolesterol (mg/dl)	145.92±30.81	141.62±23.55	101.83±20.8	<0.05
Serum kreatinin (mg/dl)	1.33±0.71	0.89±0.12	0.5±0.2	<0.05
Serum üre (mg/dl)	48.09±25.84	44.87±5.92	22.81±5.91	<0.05
Mikroalbüminüri (mg/day)	210.28±25.76	200.63±5.88	11.04±2.81	<0.05

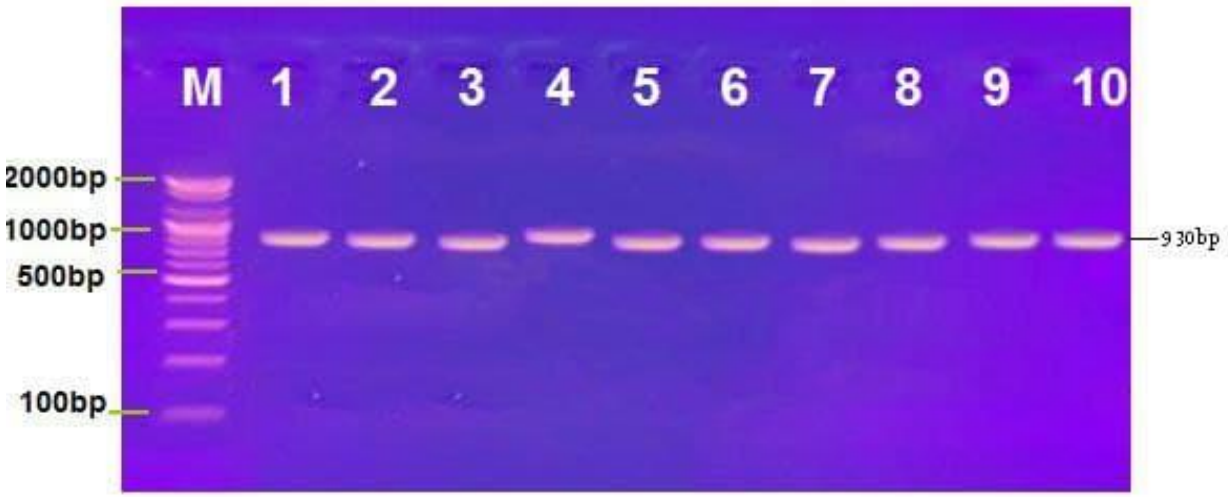
P<0,05 ise, ki-kare testinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

N = Kişi Sayısı

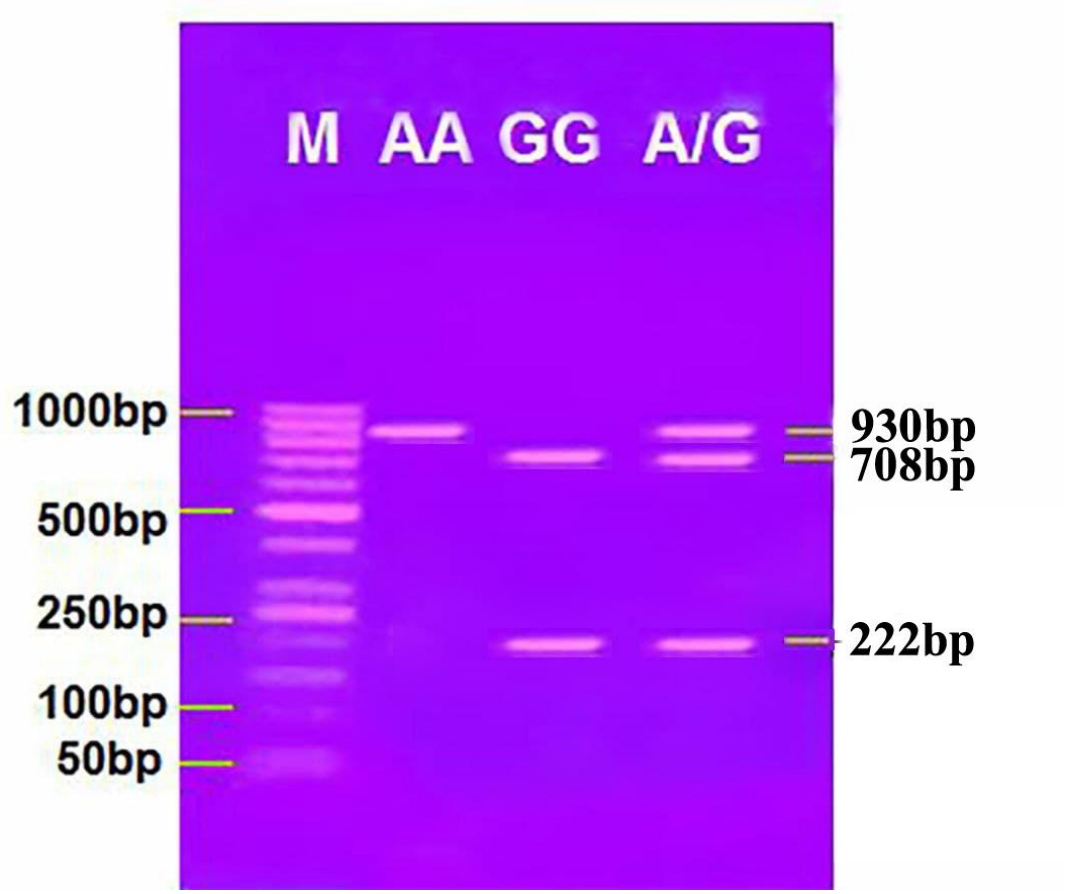
4.3 Genetik çalışma:

4.3.1 MCP-1 2518GA

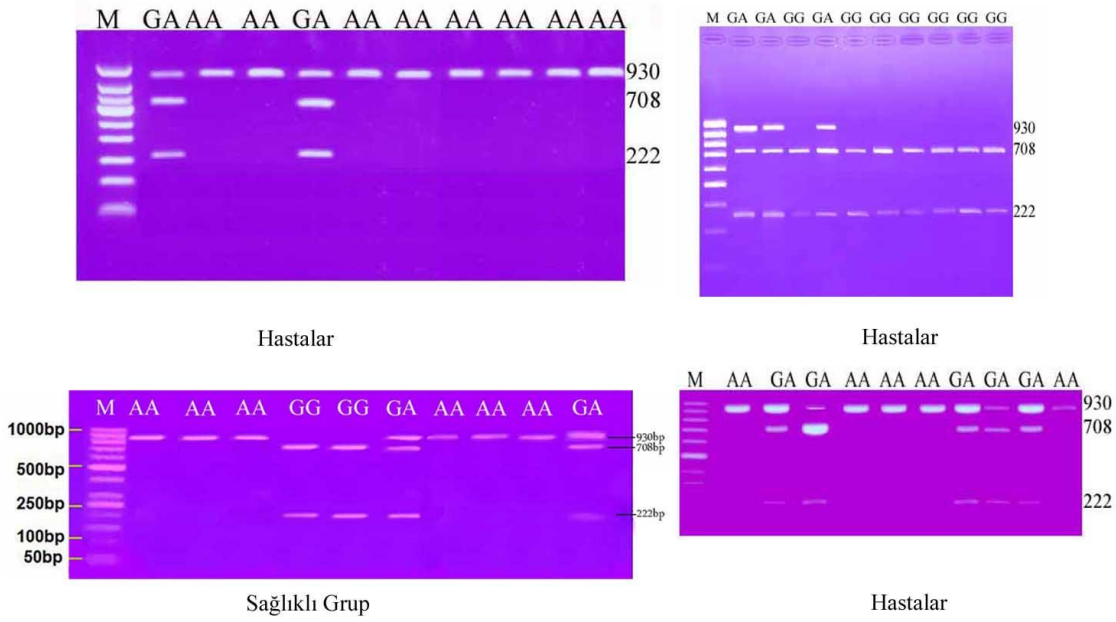
Çalışma gruplarında DNA, (DNA ekstraksiyon kiti) kullanılarak ekstrakte edildi. Sonuçların tespiti, %1 agaroz jel üzerinde elektroforez ile yapıldı ve DNA'nın kompakt bantlar olarak göründüğü U.V ışığına maruz bırakıldı şekil (4.2)



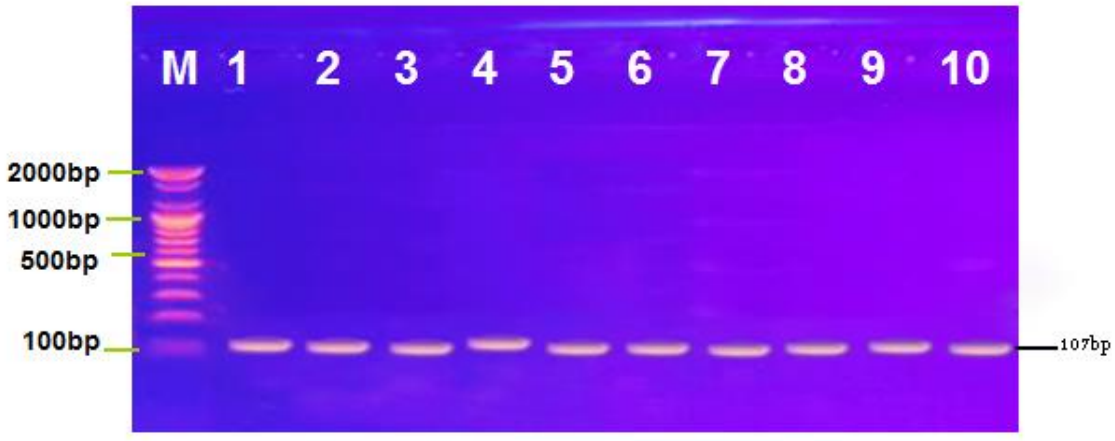
Şekil 4.2 MCP-1 2518GA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Kan hasta numuneleri (şerit 1-5) ve sağlıklı kontrol numuneleri (şerit 5-10)'te gösterilmiştir. Burada M: işaretleyici (2000-100bp), şerit (1-10) 930 bp PCR ürün boyutunda pozitif gen amplifikasyonu (100-2000) göstermektedir.



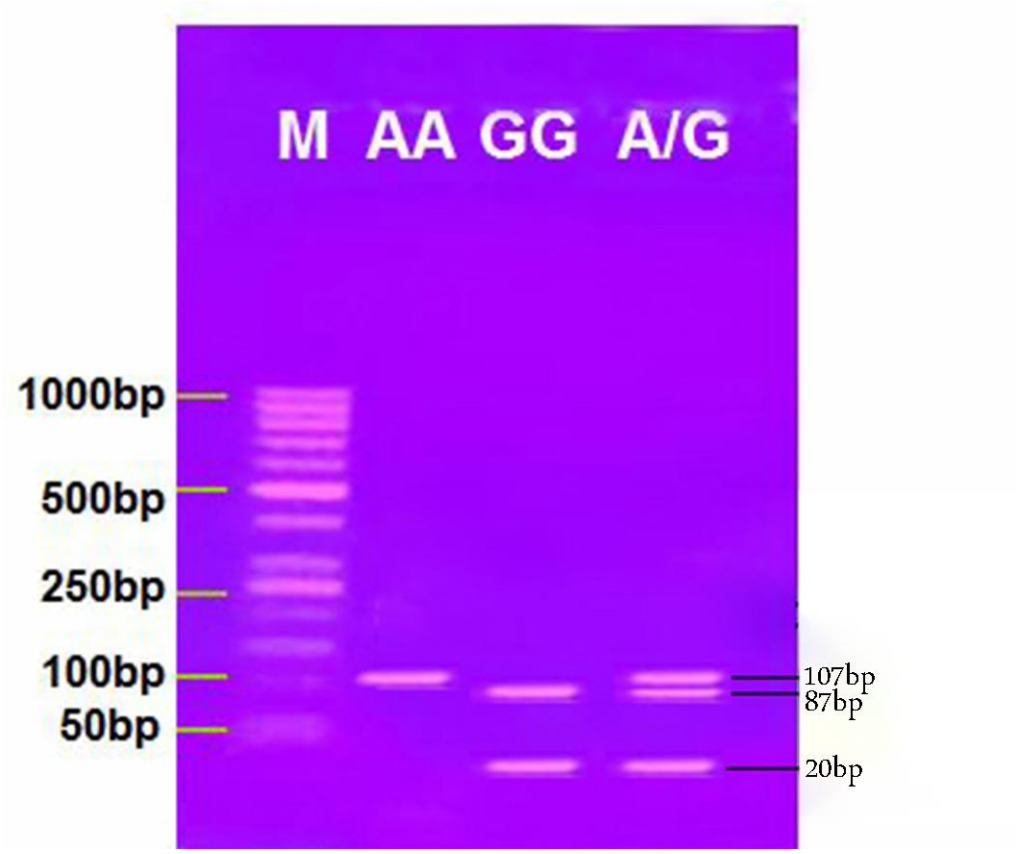
Şekil 4.3 PvuII kullanılarak MCP-1 2518GA'nın RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Restriksiyon enzimi. Burada M: işaretleyici (50-1000 bp), şerit (AG) heterozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 930- 708- ve 222-bp bantlarına sindirilen ürün, şerit (GG) homozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 708- ve 222-bp bantları ve 930 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü.



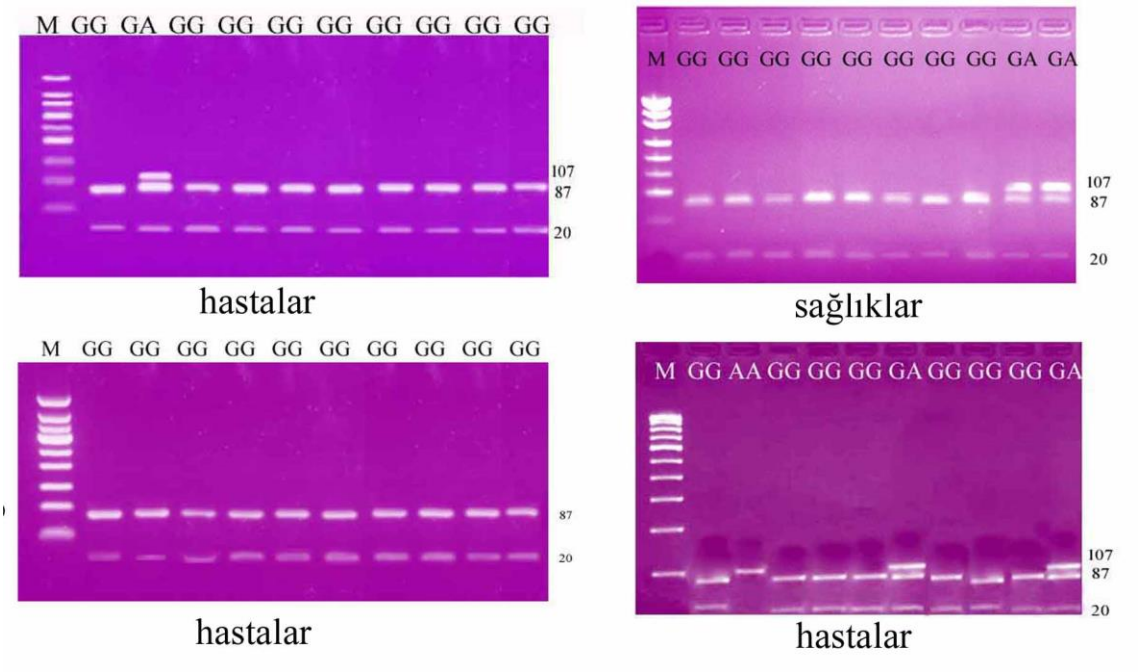
Şekil 4.4 sağlıklı gruplar ve hastalar için PvuII kullanılarak MCP-1 2518GA'nın RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Restriksiyon enzimi. Burada M: işaretleyici (50-1000 bp), şerit (AG) heterozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 930-708- ve 222-bp bantlarına sindirilen ürün, şerit (GG) homozigotu, Restriksiyon enzimi tarafından 708- ve 222-bp bantları ve 930 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü.



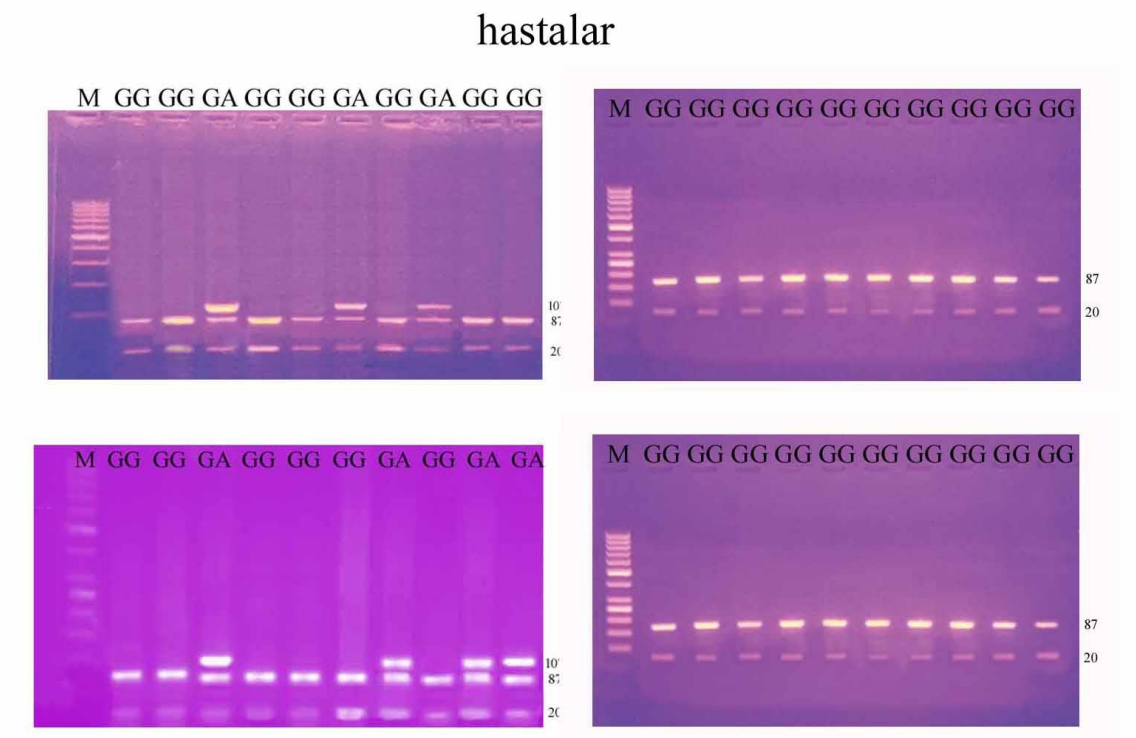
Şekil 4.5 Bazı kan hasta örnekleri (şerit 1-5)'da ve sağlıklı kontrol örnekleri (şerit 6 - 10)'da gösterilmiştir. Burada M**:** işaretleyici (2000-100bp), şerit (1-10) 107bp PCR ürün boyutunda (100-2000) pozitif gen amplifikasyonu.



Şekil 4.6 NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır.



Şekil 4.7 sağlıklı gruplar ve hastalar için NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır.



Şekil 4.8 hastalar için NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak TNF-α geninin (TNF-α -308 G/A (rs1800629) RFLP-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. Burada M: marker (50-1000bp), 107 bp bantlarında restriksiyon enzimi tarafından kesilmeyen şerit (AA) homozigot ürünü, şerit (G/G) homozigotu, restriksiyon enzimi tarafından 87 ve 20 bp bantlarına sindirilen ürün ve şerit (A/G) heterozigotu, ürünü restriksiyon enzimi 107, 87 ve 20 bp bantlarına ayırır

4.3.1.1 DM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde MCP-1 2518G/A Genotip ve Alel Dağılımları.

MCP-1 2518G/A genotipinin sonuçları, hastalar için iki grup (AA homozigot , GA heterozigot) ve sağlıklı vakalar için üç grup (AA homozigot , GA heterozigot ve GG mutant homozigot) gösterdi. 70 hastadan 42(%60)'sinde genetik polimorfizm vardı. AA, GA ve GG genotipleri için sırasıyla 42 (60%), 28 (%40) ve 0 (%0) idi. 30 sağlıklı kontrol grubunun AA, GA ve GG genotipleri sırasıyla 14 (%46,6), 12 (%40) ve 4 (%13,3) oranlarında idi.

Hastalarda alel sıklığı sonucu -2518*G ve -2518*A alelleri sırasıyla 28 (%20) ve 112 (%80) idi. MCP-1 2518G/A genotipine göre −2518*G ve −2518*A alel sıklığı sağlıklı kontrollerde sırasıyla 20 (%33,3) ve 40 (%66,6) olarak bulunurken, P değeri <0,05 ile

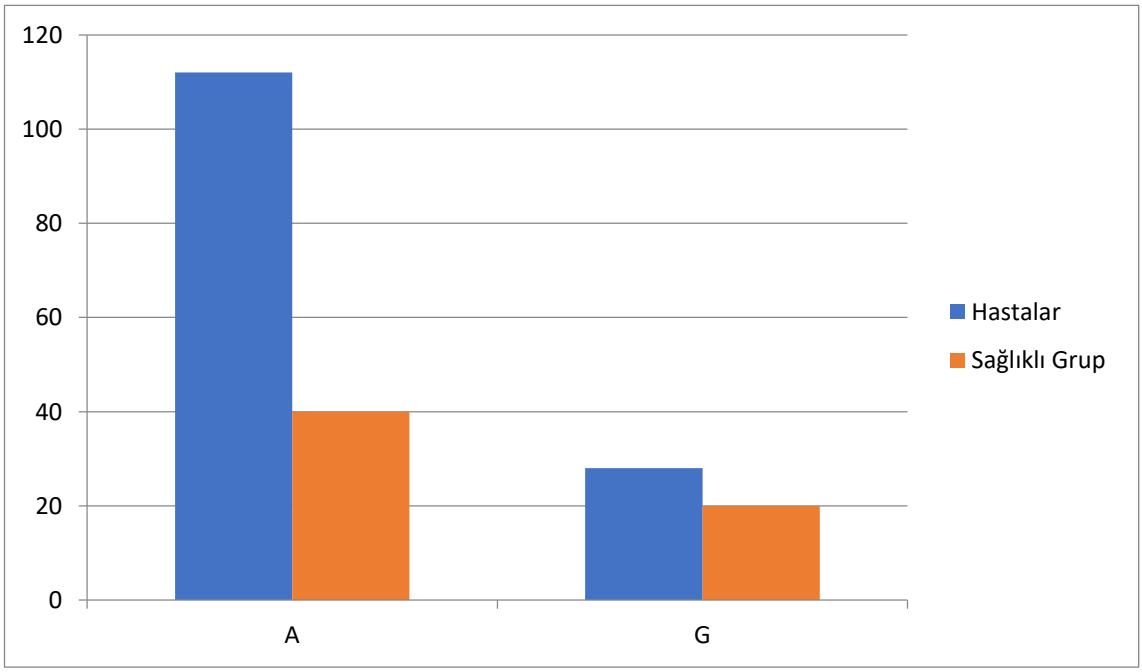
vaka ve kontroller arasındaki sıklıklara bakıldığında, çalışmamızdaki hastaların anlamlı derecede daha düşük homozigot genotip GG frekansı gösterdiği kaydedildi. Öte yandan sırasıyla AA ve AG genotiplerinin frekansları istatistiksel olarak farklı değildi. Ayrıca alel, hasta ve kontrol gruplarında G aleli ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi.

Çizelge 4.2 Diyabetik hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda monosit Kemoatraktan protein 1 (MCP-1) 2518G/A gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

MCP-1 geni	Hastalar (N=70)	Sağlıklı Grup (N=30)	P.Değeri
Genotipler			
AA	42 (60%)	14(46.6%)	P>0.05
GA	28(40%)	12(40%)	P>0.05
GG	0 (0%)	4(13.3%)*	P<0.05
Aleller			
A	112(80%)	40(66.6%)	P>0.05
G	28(20%)	20(33.3%)	P>0.05

*=P<0.05

N=başarıyla genotiplenen Hastalar.



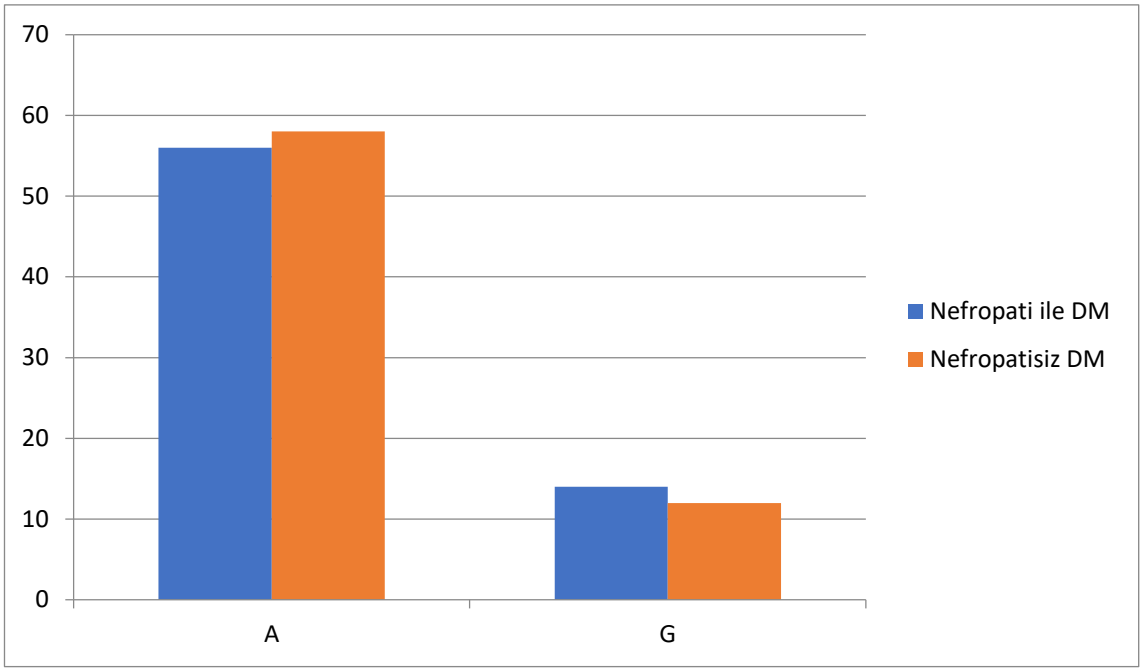
Şekil 4.6 Diyabetik hastalar ve sağlıklı kontrol grubunda monosit Kemoatraktan protein-1 (MCP-1) 2518G/A gen polimorfizminin alel frekansları

4.3.1.2 MCP-1 2518G/A Nefropatili ve Nefropatisiz DM Hastalarında Genotip ve Alel Dağılımları.

Şekil (4)'ün sonuçları hasta gruplarında (nefropatili DM ve nefropatisiz DM) MCP-1 2518G/A Genotipinin polimorfizmini içeriyordu. Kaydedilen AA genotiplerinin sıklığı diyabetik nefropati hasta grubunda yüksek oranda (%60) temsil edildi ve GA genotiplerinde daha az sıklık (%40) gösterdi. GG için ise hiç örnek bulunamadı. Ancak bu sonuçları kontrol gruplarıyla karşılaştırdığımızda, AA için (%65.7) ve GA için (%34.8) genotiplerin olduğunu, GG genotiplerinin de kontrol gruplarında az sıklıkta da olsa var olduğu sonucuna ulaşıldı. DM nefropati hastalarında −2518*G ve −2518*A alellerinin alel sıklığı sırasıyla 14 (%20) ve 56 (%80) iken nefropatisi olmayan hastalarda -2518*G ve -2518*A alel sıklığı sırasıyla 12 (%17.2) ve 58 (%82.8) olarak bulundu.

Çizelge 4.3 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

MCP-1 Geni	Nefropati ile DM N=35	Nefropatisiz DM N=35	P.Değeri
Genotip			
AA	21(60%)	23(65.7%)	
GA	14(40%)	12(34.8%)	
Aleller			P>0.05
A	56 (80%)	58(82.8%)	
G	14(20%)	12(17.2%)	



Şekil 4.7 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin alel frekansları

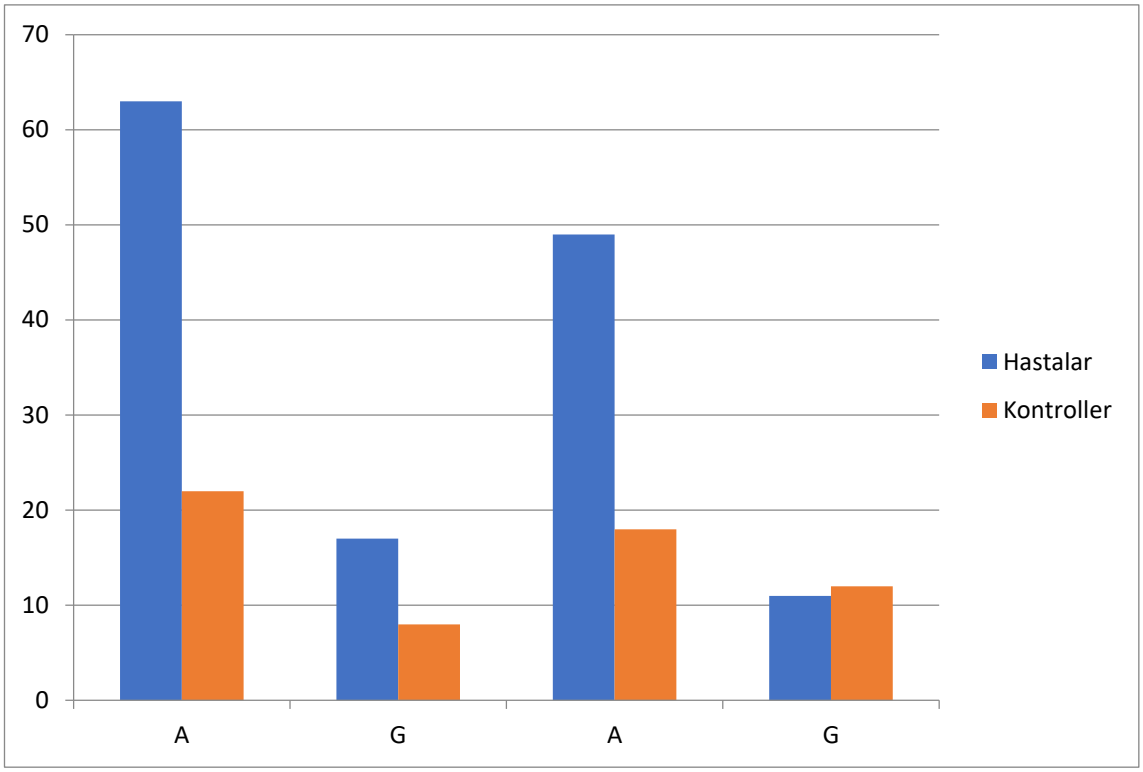
4.3.1.3 MCP-1 Geninin Genotip ve Alel Frekanslarının Hasta Olgu ve Sağlıklı Gruplarda Cinsiyete Göre Dağılımı.

Çizelgede, MCP-1 Geni için genotip ve alel sıklığına bağlı olarak, cinsiyete göre, sonuçlar bu çalışmaların iki grubu arasında hem kadınlarda hem de erkeklerde genotip ve alel sıklığı açısından istatistiksel olarak farklılık olduğunu göstermektedir. Ancak A aleli hasta grubunda (erkekler için %78.75 ve kadınlar için %81.7) daha sık kaydedilirken kontrol grubunda farklılık gösterdi (erkekler için %73.3 ve kadınlar için %60).

Çizelge 4.4 Hasta ve kontrol grubunda MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin cinsiyete göre genotip ve alel frekansları

	Hastalar (n=40)		**Kontroller (n=15)**	
MCP-1 Geni Erkek Genotipi	**No**	**%**	**No**	**%**
AA	**23**	**57.5**	**8**	**53.3**
AG	**17**	**42.5**	**6**	**40**
GG	**0**	**0**	**1**	**6.7**
Alel				
A	**63**	**78.75**	**22**	**73.3**
G	**17**	**21.25**	**8**	**26.7**
x^2x^2**=9.03**				
P< 0.05 [HS]				

	Hastalar (n=30)		**Kontroller (n=15)**	
MCP-1 Geni Kadın Genotip	**No**	**%**	**No**	**%**
AA	**19**	**63.3**	**6**	**40**
AG	**11**	**36.7**	**6**	**40**
GG	**0**	**0**	**3**	**20**
Alel				
A	**49**	**81.7**	**18**	**60**
G	**11**	**18.3**	**12**	**40**
x^2x^2**=9.11**				
P< 0.05 [HS]				



Şekil 4.8 Hasta ve kontrol grubunda MCP-1 (2518A/G) gen polimorfizminin cinsiyete göre alel frekansları

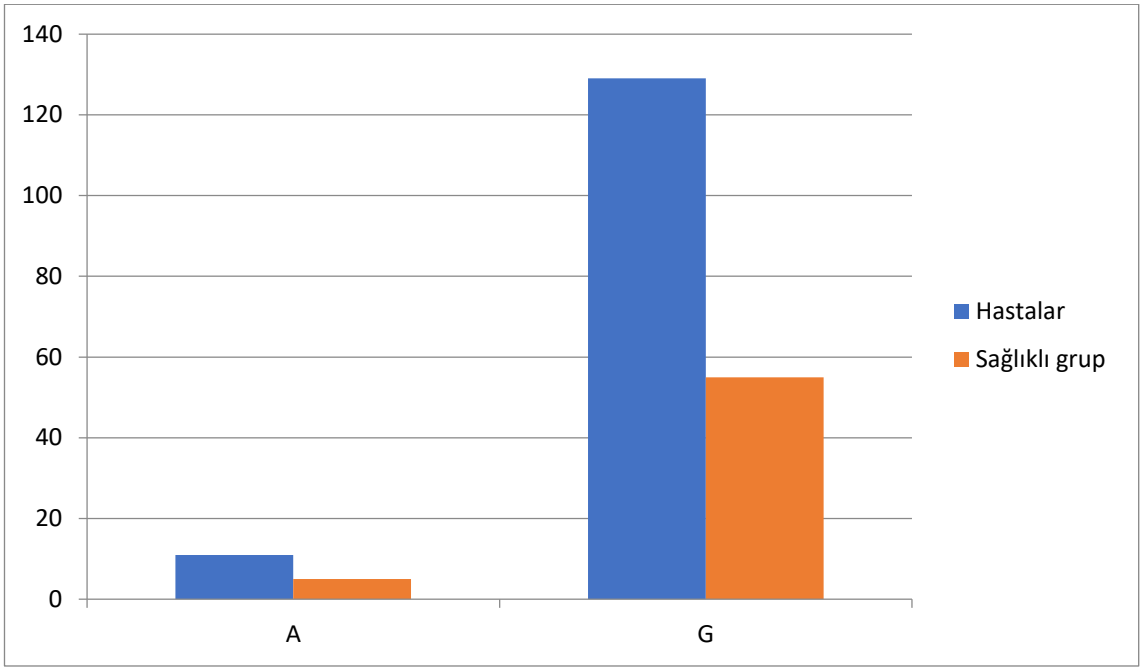
4.3.2 TNF-α −308 (G/A) Genotipi

4.3.2.1 TNF-α −308 (G/A) DM Hastaları ve Sağlıklı Kontrollerde Genotip ve Alel Dağılımları.

Çizelge (4.5)'in sonuçları, hasta ve kontrol gruplarında TNF-α −308 (G/A) polimorfizmi içermiştir. Bu sonuçlara baktığımızda, GG genotiplerinin frekansı yüksek oranda (%85.7) bulunduğunu, GA (%12.8) ve AA genotiplerinin (%1.5) ise daha az sıklıkta bulunduğunu belirledik. Kontrol gruplarında GG genotiplerinin (%83.38) yüksek oranda mevcut olduğunu, GA genotiplerinin ise yüzde (%16.6) ve AA genotiplerinin (%3.3) yüzdesiyle sık olmadığını gördük.

Çizelge 4.5 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunda TNF-α-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

TNF- α -308	Hastalar (N=70)	Sağlıklı grup (N=30)	P.Değeri
Genotipler			
AA	1 (1.5%)	1(3.3%)	0.02
GA	9(12.8%)	5(16.6)*	0.04
GG	60 (85.7%)	24(83.38%)	0.42
Aleller			
A	11(7.9%)	5(8.3%)	1.0
G	129(92.1%)	55(91.7%)*	0.04



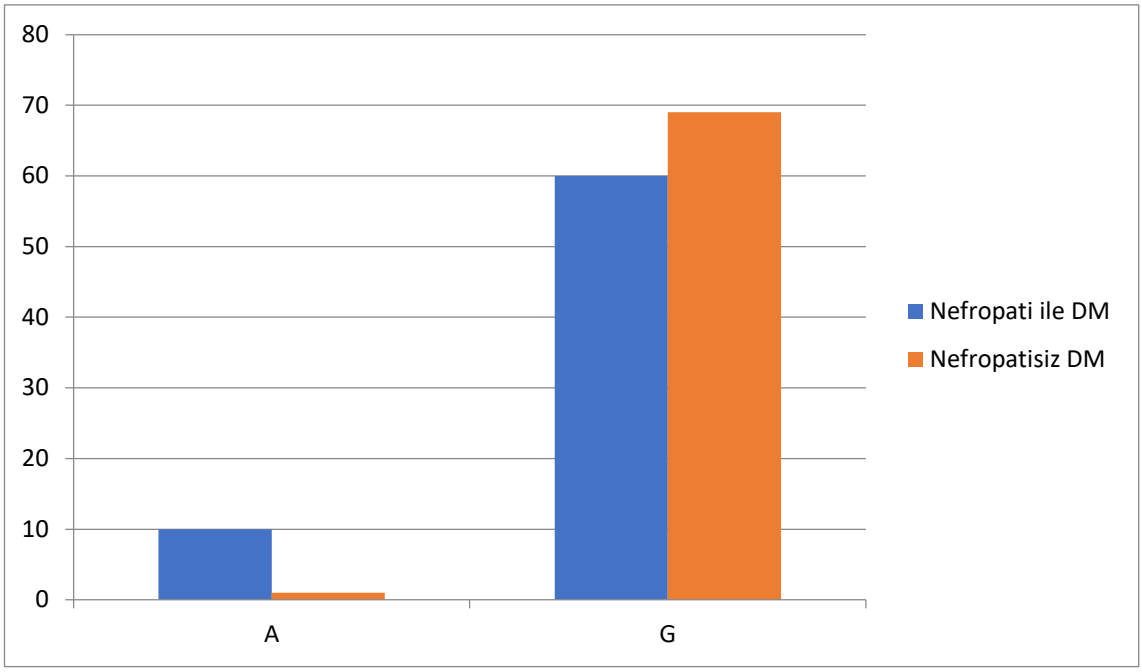
Şekil 4.9 Diyabetik hasta ve sağlıklı kontrol grubunda TNF- α -308 gen polimorfizminin alel frekansları

4.3.2.2 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF- α -308 gen polimorfizminin genotip ve alel dağılımı.

TNF- α -308 gen polimorfizminin her ikisinde de SNP'lerin bulunması nefropati riskini arttırabilir. Bu çalışmada nefropati gelişiminde önemli olan gendeki farklı polimorfizmler, TNF- α -308 geninde yer almaktadır. Polimorfizmler için alelik ve genomik kombinasyonların etkilerinin analizi, tanımlanan polimorfizmlerin çoğunun çok işlevli hastalıklar üzerinde etkisi olduğunu öne sürse de, genetikteki polimorfizm kombinasyonlarının bireysel varyantlardan daha yüksek fonksiyonel etkilere sahip olduğu söylenebilir. Nefropati gelişimine duyarlılığın homozigot olarak AA mutantı sadece nefropatili hasta grubunda kaydedildiğinden ve nefropatisi olmayan hastalarda kaydedilmediğinden AA genotipi ve A alelinin nefropati gelişimini artırabileceği düşünülebilir.

Çizelge 4.6 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

TNF- gen-308 Gen	Nefropati ile DM N=35	Nefropatisiz DM N=35	P.Değeri
Genotip			
AA	**1(2.9%)**	**0(0%)**	
GA	**8(22.8%)**	**1(2.9%)**	
GG	**26(74.3%)**	**34(97.1%)**	
Aleller			**P<0.05**
A	**10 (14.3%)**	**1(1.5%)**	
G	**60(85.7%)**	**69(98.5%)**	



Şekil 4.10 Nefropatili ve Nefropatisiz DM'de TNF-gen-308 gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

4.3.2.3 TNF-α gen polimorfizmlerine göre hasta ve Kontrol grubunda TNF-α serum düzeyleri.

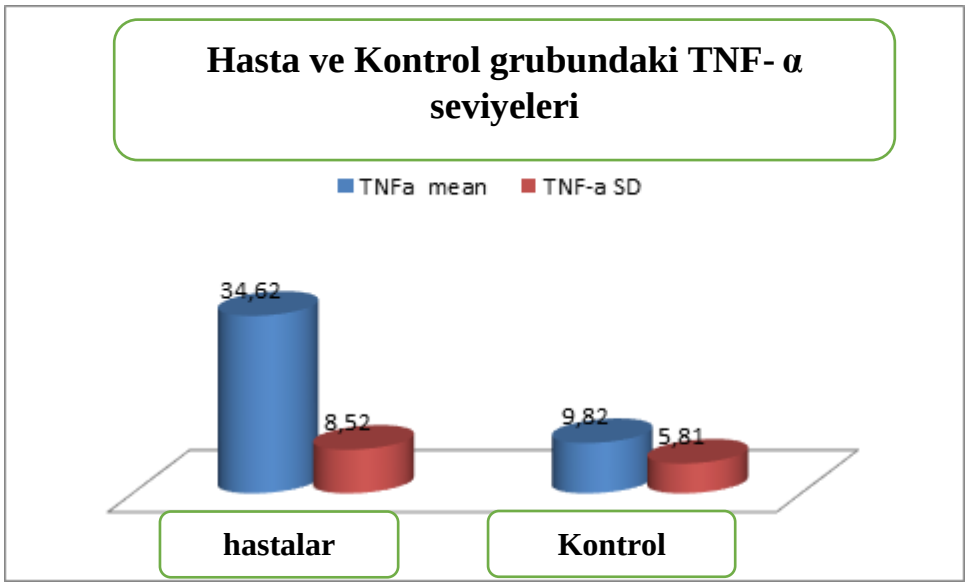
Esas olarak monositler ve makrofajlar tarafından üretilen TNF-α, DN sürecinde hayati bir işlev görür. Ayrıca insülin direnci ve insülin sekresyonu üzerinde de etkileri olmuştur. Ek olarak, TNF-α, doğrudan böbrek hasarına yol açabilecek epitelyal, mezanjiyal ve glomerüler hücreler için sitotoksik olmuştur. Ayrıca TNF-α'nın glomerüler ve tubulointerstisyel hasarda yer alan inflamatuar süreçlere aracılık etmede kritik bir rolü olduğu belirtilmiştir. TNF-α genindeki SNP'ler, TNF-α üretiminin düzenlenmesi açısından doğrudan fonksiyonel öneme sahiptir. Özellikle, transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı DNA motifleri ile ilgili olan TNF- α geninin düzenleyici bölgelerindeki bu polimorfik bölgeler özellikle araştırılmalıdır.

Sonuçlar, homozigot AA genotipinin DN hastaları arasında yüksek serum TNF-α seviyesine sahip olduğunu ortaya koydu. AG ve GG grupları arasındaki fark ortalama TNF- α değerleri için anlamlı bir farklılık göstermezken, TNF-α'nın homozigot AA genotipinin, birkaç inflamatuar hastalıkta hayati bir belirteç olduğu belgelenmiştir. Hücrelerin yüksek TNF-α üreticisi olması ve hastalığa yatkınlık TNF-α ekspresyonunda bir artışa neden olabilir. Bu artan seviye, hem TNF- α hem de reseptörlerinin eksprese edildiği ve komşu hücreler tarafından IL-8, akut faz proteinleri, kemokin ve büyüme faktörleri gibi diğer sitokinlerin üretimini uyaran inflamasyon gibi uyarıcı faktörlerin tepkisinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca, TNF- α'nın, azalmış glomerüler filtrasyon hızı

ve glomerüler kan akışı ve glomerüler filtrasyon bariyerinin bozulması dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla DN gelişimine sebebiyet verdiği rapor edilmiştir. Diyabetik nefropati gelişimi için önemli bir risk ile birlikte artan TNF-α üretimi, oksidatif stresi uyarabilir ve glomerüler hücreler üzerinde doğrudan sitotoksik ve apoptotik etkiye sahip olabilir. Bu da, DN'nin öngörülmesine ve erken teşhisine yardımcı olabilir.

Çizelge 4.7 TNF- α gen polimorfizmlerine göre hasta ve Kontrol grubunda gözlenen çözünür TNF-α serum seviyeleri(ng/dl)

	Hasta Grubu	Kontrol Grubu	P. değeri
AA	37.78±7.83	9.81±5.72	0.01
AG	30.45±3.83	11.73±6.91	0.031
GG	32.64±5.81	10.92±6.21	0.028
P. değeri	0.502	0.741	



Şekil 4.4 Hasta ve kontrol grubundaki TNF- α seviyeleri.

4.3.2.4 Hasta ve kontrol grubunda TNF- α -308 Gen polimorfizminin genotip ve alel frekanslarının cinsiyete göre dağılımı.

Çizelge (4.8)'nin sonuçlarında, cinsiyete göre TNF- α -308 Geni için genotip ve alel sıklığı kaydedilmiştir. Sonuçlar, bu çalışmanın iki grubu arasında hem kadınlarda hem de erkeklerde genotip ve alel sıklığında istatistiksel farklılık olduğunu göstermektedir. GG genotipi kontrol grubunda daha sık kaydedilmiştir (erkeklerde %93.4 ve kadınlarda %90), hasta grubunda farklılık göstermektedir (erkekler için %90 ve kadınlar için %95) ve AA Alel sadece hasta grubunda ve sadece erkeklerde kaydedilmiştir bu durum erkek grubunda hastalık gelişme riskinin artmasıyla ilişkili olabilir.

Çizelge 4.8 Cinsiyete göre hasta ve kontrol grubunda TNF- α -308 Gen polimorfizminin genotip ve alel frekansları

	Hastalar (n=30)		**Kontroller (n=15)**	
TNF- gen-308 Geni **Kadın**	**No**	**%**	**No**	**%**
Genotip	**Hastalar (n=40)**		**Kontroller (n=15)**	
AA	**0**	**0**	**1**	**6.6**
TNF- gen-308 Geni **Erkek**	**No**	**%**	**No**	**%**
Genotip				
AA	**1**	**2.5**	**0**	**0**
AG	**6**	**15**	**2**	**13.3**
GG	**33**	**82.5**	**13**	**86.7**
Alel				
x^2x^2 **=9.23**				
A	8	10	2	6.6
G	72	90	28	93.4
x^2x^2 **=9.13**				
P< 0.05 [HS]				

5. Tartışma

Diyabetik nefropati, özellikle tip 2 diyabet bağlamında, diyabetik popülasyonda morbidite ve mortalitenin ana nedeni olan böbrek yetmezliğinin başlıca nedeni haline gelmiştir. Metabolik ve hemodinamik değişikliklerin bir sonucu olarak böbrek hasarının klasik görünümü önemli ölçüde dönüştürülmüştür. Mevcut kanıtlar, doğuştan gelen bağışıklığın aktivasyonunun ve ardından düşük dereceli bir kronik inflamatuar reaksiyonun gelişiminin, diyabetik nefropatinin patogenezinde ve ilerlemesinde önemli bir fenomen olduğunu göstermektedir (Navarro-González *et al.,* 2009). Bu bağlamda, inflamatuar sitokinler, başlıca, kan hücreleri (esas olarak monositler ve makrofajlar) tarafından ve ayrıca çeşitli intrinsik böbrek hücreleri (endotelyal, mezangial, dendritik ve tübüler) tarafından ifade edilen, sentezlenen ve salınan bir sitokin olan TNF-α dahil olmak üzere önemli bir role sahiptir. Epitel hücreleri (Schulz *et al.,* 2004; Navarro-González *et al.,* 2009) ve iki sitokinin, MCP-1 (2518A/G) ve -308 G/A konumlarındaki TNF-α geni SNP'lerinin, transkripsiyon başlangıç bölgesine göre gen ekspresyonunu çeşitli bulaşıcı ve otoimmün hastalıklarla etkilediği gösterilmiştir (Rice *et al.,* 2002) ve bu hastalıklarla bağlantılıdır (Simeoni *et al.,* 2004). Bu nedenle, bu çalışmada, Irak popülasyonunda KBH hastalarında -308 G/A konumlarındaki - MCP-1 (2518A/G) ve TNF-α geni SNP'lerinin sTNF-α seviyeleri ile ilişkisi analiz edilmiştir.

Kötü glisemik kontrol, hipertansiyon ve diyabetin süresi, DN gelişimi için risk faktörleridir. DN'nin patogenezinde genetik yatkınlık önemli bir rol oynamaktadır (Banba *et al.,* 2000). Diyabette glomerüler makrofaj birikimi, DN'nin patogenezinde monosit toplama mekanizmalarını içerir (Kato *et al.,* 1999). Kemokinler, çeşitli böbrek hastalığı modellerinde akut inflamatuar yanıtta önemli bir rol oynar (Rice *et al.,* 2002). Büyük bir Kafkasyalı kohortunda, MCP-1 G-2518 gen varyantı, plazma MCP-1 seviyeleri, insülin direnci ve tip 2 diyabet prevalansı ile önemli ölçüde ve negatif olarak ilişkilidir (Simeoni *et al.,* 2004). Zietz ve arkadaşları Kafkasyalı tip 2 diyabetli 534 hastada, monositlerin ve aktive lenfositlerin başlıca kemoatraktan olan kemokin MCP-1 geninin serum seviyeleri ve -2518 AG promotör polimorfizmi ile metabolik parametreler, ayrıca insülin, leptin ve sitokinler tümör nekroz faktörü ve alfa (TNF-alfa) ile interlökin-6 (IL-6) arasındaki ilişkiyi araştırdı. Bu çalışmada tip 2 diyabetli

hastalarda literatürle karşılaştırıldığında MCP-1 düzeyleri önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Buna karşılık, genotip frekansları diyabetik olmayan hastalardakine benzerdi ve MCP-1 seviyeleri ile ilişkili değildi (Zietz *et al.,* 2005). Mori ve arkadaşları, MCP-1 geninin transkripsiyonunu düzenleyen A-2518G pozisyonunda IgAN ve MCP-1 gen polimorfizminin ilerlemesi arasındaki ilişkiyi netleştirmek için böbrek biyopsisine dayalı olarak IgA nefropatisi (IgAN) teşhisi konan 277 Japon hastayı araştırdı. MCP-1 2518'deki AA genotipi, IgA nefropatisi olan Japon hastalarda böbrek hastalığının ilerlemesi için bağımsız bir risk faktörüydü ve böbrek sağkalımı ile yakından ilişkiliydi (Mori *et al.,* 2005). Tucci ve arkadaşları, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve lupus nefritinde (LN) fonksiyonel bir MCP-1 polimorfizminin rolünü inceledi. Bu sonuçlar, bir A/G veya G/G genotipinin SLE gelişimine yatkınlık oluşturabileceğini ve ayrıca bu genotiplere sahip SLE hastalarının LN geliştirme riskinin daha yüksek olabileceğini gösterdi (Tucci *et al.,* 2004). Bu çalışmada MCP-1 -2518 A - G promotör polimorfizmlerinin genotipik ve alelik frekansları arasındaki ilişkiyi ve bunların Irak popülasyonunda DN geliştirme riski ile ilişkisini değerlendirme amaçlandı. Bazı araştırmacılar G'de -2518 daha fazla MCP-1 üretimi olduğunu ve böbrek nakli yapılan hastalarda böbrek allogreft yetmezliği için bir risk faktörü olduğunu bildirmiştir (Krüger *et al.,* 2002) Ancak bizim çalışmamızda, MCP-1 GG genotipinin polimorfizmlerinin ($P<0.05$) frekansları, diyabetik hastalarda anlamlı olarak daha düşük olarak ortaya çıktı. Kore'de yapılan bir çalışmada, DM'li Koreli hastalarda progresif böbrek yetmezliği ile A alel taşıyıcılığı arasında anlamlı bir ilişki tanımlanmıştır (Moon *et al.,* 2007). Çalışmamızda MCP-1 -2518 A - G nefropatisi olan ve olmayan diyabetik hastalar arasında genotip ve alel frekansları farklı değildi ($P>0.05$). Bu çalışma Irak popülasyonunda MCP-1 -2518 A - G gen polimorfizminin nefropati gelişme riski ile ilişkili olmadığını gösteren ilk çalışmadır. Sonuç olarak, çalışmamız MCP-1 -2518 A - G gen polimorfizminin DN duyarlılığını belirlemede belirli bir rolü olmayabileceğini düşündürmektedir. Bu farklılığın nefropatinin derecesindeki veya diyabetin süresindeki farklılığa bağlı olabileceğini düşünüyoruz. Sınırlı sayıda hasta çalışmamızın olumsuz sonuçlarına katkıda bulunmasına ragmen, bu çalışmada Iraklı DM'li hastalarda GG genotipinin kontrol deneklerinden istatistiksel olarak önemli derecede düşük olduğunu bulduk.

TNF-α -308 G/A geni SNP'leri ile NP arasında bir ilişki bulamadık. Ancak bildiğimiz kadarıyla bu, TNF-α -308 G/A SNP ile NP arasındaki ilişkiyi araştıran ilk çalışmadır. Öte yandan, sonuçların aksine, TNF-α -308 G/A SNP daha önce kuzey Hindistan (Chow *et al.*, 2007) ve Çin popülasyonlarında (Wang *et al.*, 2005) KBH için güçlü bir predispozan risk faktörü olarak ilişkilendirilmişti. Bununla birlikte, Asya Hintlilerinde SNP'nin önceki bir raporuna gore (Prasad *et al.*, 2007), sonuçlarımız çalışma gruplarımızda gözlemlenen polimorfik A/A genotipinin çok düşük sıklığı ile de açıklanabilir. Benzer şekilde, SNP'lerin herhangi bir haplotip kombinasyonu ile NP arasında bir ilişki gözlemlemedik, bu da TNF-α -308 G/A geni SNP'lerinin NP'ye duyarlılık üzerinde önemli bir etkiye sahip olma olasılığının düşük olduğunu düşündürüyor, ancak içinde yer alan diğer varyantların katkısı olsa da. NP'ye duyarlılıkta TNF-α geninin promotör bölgesi göz ardı edilemez.

sTNF-α seviyeleri ile ilgili olarak, NP hastaları CS'ye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek sTNF-α seviyeleri gösterdiğinden, yüksek sTNF-α seviyeleri ile NP arasında bir ilişki bulduk. Bu, İspanyol ve Çin popülasyonlarında kronik düşük dereceli inflamasyonu olan KBH hastalarında da yüksek sTNF-α seviyeleri bulan Navarro-González, Fernández-Real ve arkadaşları ve Shen ve arkadaşları tarafından gözlemlenenlerle tutarlıdır (Fernández-Real *et al.*, 2012). sTNF-α seviyeleri ile ilgili olarak, NP hastaları CS'ye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek sTNF-α seviyeleri gösterdiğinden, yüksek sTNF-α seviyeleri ile NP arasında bir ilişki bulduk. Bu, İspanyol ve Çin popülasyonlarında kronik düşük dereceli inflamasyonu olan KBH hastalarında da yüksek sTNF-α seviyeleri bulan Navarro-González, Fernández-Real ve Shen tarafından gözlemlenenlerle tutarlıdır (Fernández-Real *et al.*, 2012).

Öte yandan sTNF-α düzeyleri ile kreatinin, üre ve fosfor düzeyleri arasında ve monosit sayısı ile pozitif, GFR ile negatif korelasyon gözlemledik. Hemodinamik değişikliklerin ve endotel geçirgenliğinin değişmesinin GFR'yi azalttığı, bunun sonucunda kreatinin, üre ve albümin gibi metabolik atık ürünlerin birikmesine yol açtığı bildirilmiştir. Ek olarak, TNF-α reseptörlerinin (sTNFR'ler) çözünebilir fraksiyonunun dolaşımdaki konsantrasyonlarından çıkarılan TNF-α sisteminin aktivasyonu, tip 2 diyabette potansiyel olarak idrar albümin, kreatinin oranı ve GFR üzerinde bağımsız etkiler

gösterebilir (Fernández-Real *et al.*, 2012). sTNF- α seviyeleri ile amino asit katabolizmasının birincil nitrojenli son ürünü olan ve nitrojenli atıkların atılması için gerekli olan üre arasındaki ilişkiye ilişkin olarak, idrarı güçlü bir şekilde konsantre etme yeteneği de dahil olmak üzere, yeterli renal tübüler fonksiyon için kolaylaştırılmış üre taşınmasına izin veren beş üre taşıyıcısının eklenmesinin böbreğin yüksek polar moleküllü üreye geçirgenliğini büyük ölçüde arttığı bilinmektedir (Schmidt, Höcherl and Bucher, 2007). Bu bağlamda daha önce yapılan bir çalışmada, 1 mg/kg dozunda TNF-α'nın bolus infüzyonunun fraksiyonel üre atılımını, iç medulla üre konsantrasyonunu ve ozmolalitesini, tübüler üre geri emilimini ve idrar üresini azaltırken plazma ozmolalitesini ve üreyi arttırdığı tespit edilmiştir. Bu tür bulgular, üre taşıyıcılarının azalmasından kaynaklanmaktadır (Ramseyer and Garvin, 2013). Bu nedenle, hastalarımızda gözlemlenen artmış sTNF-α düzeylerinin, üre taşıyıcılarının ekspresyonundaki azalma ile ilişkili olabileceğini ve üre birikimini destekleyebileceğini varsaydık. Ancak, bu spekülasyon gelecekteki çalışmalarda daha fazla araştırma gerektirecektir.

Ayrıca, sTNF-α seviyeleri ile artan fosfor seviyeleri arasındaki korelasyon, TNF-α'nın daha önce vasküler kalsifikasyonun kritik bir aracısı olduğu bildirildiğinden ve bu da KBH hastalarında ortak bir özellik olduğu için açıklanabilir. Bununla birlikte, KBH'deki vasküler kalsifikasyonun moleküler patogenezinin altında yatan mekanizmalar son derece karmaşıktır ve çeşitli inflamatuar faktörlerin, lipidlerin, minerallerin ve oksidatif stresin bağlantısından etkilenir (Masuda *et al.*, 2013). Ayrıca, TNF-α 'nın NP'ye bağlı vasküler kalsifikasyonu desteklediği moleküler mekanizma belirsizliğini korumaktadır (Masuda *et al.*, 2013). NP'ye bağlı vasküler kalsifikasyonun düzenlenmesinde TNF-α sinyali ile endoplazmik retikulum stres sinyal yollarından biri (PERK-eIF2a-ATF4-CHOP ekseni) arasında önemli bir bağlantı buldu. PERK-eIF2a-ATF4-CHOP sinyal yolunun TNF-α 'nın neden olduğu vasküler kalsifikasyonu arttırdığı mekanizma belirsizliğini koruyor. Ancak bu muhtemelen artan fosfat alımı ile ilgilidir (Masuda *et al.*, 2013). Ayrıca, elde ettikleri sonuçlar, majör tip III sodyum bağımlı fosfat taşıyıcısı olan Pit-1'in vasküler kalsifikasyonda çok önemli bir düzenleyici olduğunu, çünkü Pit-1'in PERK-eIF2a-ATF4-CHOP sinyal yolunun ana hedefi olduğunu göstermektedir.

Ayrıca CHOP'un (C/EBP homolog protein) Pit-1 ekspresyonunu artırarak fosfat alımını önemli ölçüde arttırdığını gözlemlediler (Masuda *et al.*, 2013).

Öte yandan, inflamasyona ek olarak, KBH'nin ileri evrelerinde, fosforu elimine etmek için toplam böbrek kapasitesi, serum fosfor konsantrasyonları artmaya başlayacak şekilde yeterince azalır, artan kalsiyum ve kalsiyum-fosfat ürünü, bu hastalarda vasküler kalsifikasyon gelişimine bağlanmıştır (Ossareh, 2011). Bununla birlikte, sTNF-α seviyeleri ile artan fosfor seviyeleri arasındaki ilişki, gelecekteki çalışmalarda daha fazla araştırma gerektirecektir.

sTNF-α seviyeleri ile yüksek monosit sayısı arasındaki korelasyona ilişkin olarak, monositlerin TNF-α'nın çok önemli sekretörleri olduğu bilinmektedir (Schulz *et al.*, 2004), sırayla vasküler endotelyumdaki adezyon molekülü ekspresyonu yoluyla lökosit göçünü indükler, lokal inflamasyon bölgelerinde monositlerin ve makrofajların aktivasyonunu ve farklılaşmasını destekler (Makhatadze, 1998).

Son olarak, AG çalışma grubunda sTNF-α seviyeleri ile TNF-α -308 G/A geni SNP'leri arasında bir ilişki gözlemledik. Bu, sağlıklı deneklerde TNF-α seviyesi ekspresyonu ile SNP'ler arasında bir ilişki olmadığını da gösteren Mekinian ile uyumlu değildir(Mekinian *et al.*, 2011). Bu nedenle, sonuçlarımız KBH hastalarında TNF-α geni SNP'lerinin sTNF-α seviyeleri ile fonksiyonel bir ilişkisi olduğunu düşündürebilir. Bununla birlikte, dolaşımdaki TNF-α seviyeleri aynı zamanda transkripsiyonel seviye, mRNA stabilitesinin transkripsiyon sonrası kontrolü ve yarı ömür, çözünür forma bağlı reseptörün translasyon sonrası bölünmesi ve metabolik reseptörlerinin ekspresyonunu içeren parametreler tarafından düzenleme dahil olmak üzere farklı aşamalarda değiştirdiğinden, bu büyük ölçüde spekülatiftir (Schulz *et al.*, 2004). Ayrıca, TNF-α geninin promotör bölgesinde yer alan diğer varyantların sTNF-α ekspresyonuna katkısını göz ardı edemeyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmalar doğrultusunda, MCP-1 2518 G/A gen polimorfizminin A/A genotipi taşıyan bireylere oranla %60 yüksek olduğu tespit edilirken G/G genotipinde herhangi bir fark tespit edilmemiştir. Buna bağlı olarak A-aleli ile kontrol grubunu karşılaştırdığımızda hastalarda önemli ölçüde farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. Aynı şekilde MCP-1 2518G/A gen polimorfizmine sahip genotip gruplarında nefropatili ve nefropatisiz hastalar arasında önemli bir fark bulunmazken cinsiyet gruplarında yapılan incelemelerde dikkate değer farklılıklar tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak TNF-α-308 Gen Polimorfizmi, sağlıklı grupla karşılaştırıldığında hastalarda A/A, A/G genotipi ve G-alelinde istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunurken cinsiyet gruplarında farklılık bulunmamıştır.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, nefropati ile mücadele stratejilerinin planlanmasında MCP-1 2518G/A ve TNF-α-308 Gen Polimorfizmlerinin göz önünde bulundurulması, Diyabetik nefropatinin patofizyolojisi üzerinde bunlara benzer veya diğer gen polimorfizmlerin saptanması ve etkilerinin incelenmesi ve MCP-1 2518G/A ve TNF-α-308 Genindeki genetik polimorfizmlerin spesifik reseptör antagonisti ile birlikte nefropati şiddetini azaltmadaki rolü nün araştırılması önerilmektedir.

7. Kaynaklar

Aggarwal, B. B. 1991 ‘Structure of tumor necrosis factor and its receptor’, *Biotherapy*. Springer, 3(2), pp. 113–120.

Aggarwal, B. B. 2003 ‘Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword’, *Nature reviews immunology*. Nature Publishing Group, 3(9), pp. 745–756.

Aguilar, F. *et al.* 2001 ‘MCP-1 promoter polymorphism in Spanish patients with systemic lupus erythematosus’, *Tissue Antigens*. Wiley Online Library, 58(5), pp. 335–338.

Akobeng, A. K. and Zachos, M. 2003 ‘Tumor necrosis factor-alpha antibody for induction of remission in Crohn’s disease’, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, (4).

Alberti, K. G. M. M. and Zimmet, P. Z. 1998 ‘Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Provisional report of a WHO consultation’, *Diabetic medicine*. Wiley Online Library, 15(7), pp. 539–553.

Alicic, R. Z., Johnson, E. J. and Tuttle, K. R. 2018 ‘SGLT2 inhibition for the prevention and treatment of diabetic kidney disease: a review’, *American Journal of Kidney Diseases*. Elsevier, 72(2), pp. 267–277.

Alicic, R. Z., Rooney, M. T. and Tuttle, K. R. 2017 ‘Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities’, *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 12(12), pp. 2032–2045.

Andersen, A. R. *et al.* 1983 ‘Diabetic nephropathy in type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study’, *Diabetologia*. Springer, 25(6), pp. 496–501.

Anderson, J. W., Kendall, C. W. C. and Jenkins, D. J. A. 2003 ‘Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies’, *Journal of the American college of nutrition*. Taylor & Francis, 22(5), pp. 331–339.

Anil Kumar, P. *et al.* 2014 ‘Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus’, *Frontiers in endocrinology*. Frontiers, 5, p. 151.

Anık, A. *et al.* 2015 ‘Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update’,

Journal of pediatric endocrinology and metabolism. De Gruyter, 28(3–4), pp. 251–263.

Asghar, T. *et al.* 2004 'The tumor necrosis factor-α promoter− 1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population', *Human Reproduction*. Oxford University Press, 19(11), pp. 2509–2514.

Ashcroft, F. M. and Rorsman, P. 2012 'Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years', *Cell*. Elsevier, 148(6), pp. 1160–1171.

Association, A. D. 2015 '2. Classification and diagnosis of diabetes', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 38(Supplement 1), pp. S8–S16.

Banba, N. *et al.* 2000 'Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy', *Kidney international*. Elsevier, 58(2), pp. 684–690.

Baptiste-Roberts, K. *et al.* 2007 'Family history of diabetes, awareness of risk factors, and health behaviors among African Americans', *American Journal of Public Health*. American Public Health Association, 97(5), pp. 907–912.

Barrett, J. C. *et al.* 2009 'Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 41(6), p. 703.

Bayley, J. P., Ottenhoff, T. H. M. and Verweij, C. L. 2004 'Is there a future for TNF promoter polymorphisms?', *Genes & Immunity*. Nature Publishing Group, 5(5), pp. 315–329.

Bene, J., Hadzsiev, K. and Melegh, B. 2018 'Role of carnitine and its derivatives in the development and management of type 2 diabetes', *Nutrition & diabetes*. Nature Publishing Group, 8(1), pp. 1–10.

Berkow, R. L. *et al.* 1987 'Enhancement of neutrophil superoxide production by preincubation with recombinant human tumor necrosis factor.', *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immnol, 139(11), pp. 3783–3791.

Black, R. A. *et al.* 1997 'A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-α from cells', *Nature*. Nature Publishing Group, 385(6618), pp. 729–733.

Bloomgarden, Z. T. 2004 'Type 2 diabetes in the young: the evolving epidemic', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 27(4), pp. 998–1010.

Blüml, S. *et al.* 2012 'Targeting TNF receptors in rheumatoid arthritis', *International immunology*. Oxford University Press, 24(5), pp. 275–281.

Boden, G. 1996 ‘Fatty acids and insulin resistance’, *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 19(4), pp. 394–395.

Bojestig, M. *et al.* 1994 ‘Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus’, *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 330(1), pp. 15–18.

Bolodeoku, J. and Donaldson, D. 1996 ‘Urinalysis in clinical diagnosis.’, *Journal of clinical pathology*. BMJ Publishing Group, 49(8), p. 623.

Boney, C. M. *et al.* 2005 ‘Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus’, *Pediatrics*. Am Acad Pediatrics, 115(3), pp. e290–e296.

Borch-Johnsen, K., Andersen, P. K. and Deckert, T. 1985 ‘The effect of proteinuria on relative mortality in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus’, *Diabetologia*. Springer, 28(8), pp. 590–596.

Brownlee, M. 2001 ‘Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications’, *Nature*. Nature Publishing Group, 414(6865), pp. 813–820.

Buffington, C. K., Givens, J. R. and Kitabchi, A. E. 1990 ‘Sensitivity of pyruvate dehydrogenase to insulin in activated T lymphocytes: lack of responsiveness to insulin in patients with polycystic ovarian disease and diabetes’, *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 39(3), pp. 361–368.

Carswell, E. A. *et al.* 1975 ‘An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 72(9), pp. 3666–3670.

Chehade, J. M., Gladysz, M. and Mooradian, A. D. 2013 ‘Dyslipidemia in type 2 diabetes: prevalence, pathophysiology, and management’, *Drugs*. Springer, 73(4), pp. 327–339.

Chow, F. Y. *et al.* 2007 ‘Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice’, *Diabetologia*. Springer, 50(2), pp. 471–480.

Cooper, M. E. 1998 ‘Pathogenesis, prevention, and treatment of diabetic nephropathy.’, *Lancet (London, England)*. England, 352(9123), pp. 213–219. doi: 10.1016/S0140-6736(98)01346-4.

Cottam, D. R. *et al.* 2002 ‘The effect of obesity on neutrophil Fc receptors and adhesion

molecules (CD16, CD11b, CD62L)', *Obesity surgery*. Springer, 12(2), pp. 230–235.

Cowie, C. C. *et al.* 1989 'Disparities in incidence of diabetic end-stage renal disease according to race and type of diabetes', *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 321(16), pp. 1074–1079.

Van Deutekom, A. W., Heine, R. J. and Simsek, S. 2008 'The islet autoantibody titres: their clinical relevance in latent autoimmune diabetes in adults (LADA) and the classification of diabetes mellitus', *Diabetic medicine*. Wiley Online Library, 25(2), pp. 117–125.

Eckel, R. H. *et al.* 2011 'Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized?', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 96(6), pp. 1654–1663.

Fernández-Real, J. M. *et al.* 2012 'Structural damage in diabetic nephropathy is associated with TNF-α system activity', *Acta diabetologica*. Springer, 49(4), pp. 301–305.

Flynn, J. L. *et al.* 1995 'Tumor necrosis factor-α is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice', *Immunity*. Elsevier, 2(6), pp. 561–572.

Foundation, N. K. 2012 'KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD: 2012 update', *American Journal of Kidney Diseases*. Elsevier, 60(5), pp. 850–886.

Fourlanos, S. *et al.* 2005 'Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) should be less latent', *Diabetologia*. Springer, 48(11), pp. 2206–2212.

Gane, J. and Stockley, R. 2012 'Mechanisms of neutrophil transmigration across the vascular endothelium in COPD', *Thorax*. BMJ Publishing Group Ltd, 67(6), pp. 553–561.

González, E. L. M. *et al.* 2009 'Trends in the prevalence and incidence of diabetes in the UK: 1996–2005', *Journal of Epidemiology & Community Health*. BMJ Publishing Group Ltd, 63(4), pp. 332–336.

Group, D. S. 2003 'Age-and sex-specific prevalences of diabetes and impaired glucose regulation in 13 European cohorts1', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 26(1), pp. 61–69.

Group, L. M. S. S. G. and T. U. of B. C. M. A. 1999 'TNF neutralization in MS: results

of a randomized, placebo-controlled multicenter study', *Neurology*. AAN Enterprises, 53(3), p. 457.

Guariguata, L., Nolan, T. and Beagley, J. 2014 'International diabetes federation', *IDF Diabetes Atlas. Brussels: International Diabetes Federation*.

Haffner, S. M. *et al.* 1999 'Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study.', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 22(4), pp. 562–568.

Hajeer, A. H. and Hutchinson, I. V 2000 'TNF-α gene polymorphism: Clinical and biological implications', *Microscopy research and technique*. Wiley Online Library, 50(3), pp. 216–228.

Harper, N. *et al.* 2003 'Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis', *Journal of Biological Chemistry*. Elsevier, 278(28), pp. 25534–25541.

Van Hauwermeiren, F., Vandenbroucke, R. E. and Libert, C. 2011 'Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1', *Cytokine & growth factor reviews*. Elsevier, 22(5–6), pp. 311–319.

Hectors, T. L. M. *et al.* 2011 'Environmental pollutants and type 2 diabetes: a review of mechanisms that can disrupt beta cell function', *Diabetologia*. Springer, 54(6), pp. 1273–1290.

Van Heel, D. A. *et al.* 2002 'Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism that affects an interaction between the OCT1 and NF-κB transcription factors', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 11(11), pp. 1281–1289.

Hehlgans, T. and Pfeffer, K. 2005 'The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games', *Immunology*. Wiley Online Library, 115(1), pp. 1–20.

Herfarth, H. *et al.* 2003 'Polymorphism of monocyte chemoattractant protein 1 in Crohn's disease', *International journal of colorectal disease*. Springer, 18(5), pp. 401–405.

Hochegger, K. *et al.* 2007 'Role of α/β and γ/δ T cells in renal ischemia-reperfusion injury', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. American

Physiological Society, 293(3), pp. F741–F747.

Hoffmann, E. *et al.* 2002 ‘Multiple control of interleukin-8 gene expression’, *Journal of leukocyte biology*. Wiley Online Library, 72(5), pp. 847–855.

Horiuchi, T. *et al.* 2010 ‘Transmembrane TNF-α: structure, function and interaction with anti-TNF agents’, *Rheumatology*. Oxford University Press, 49(7), pp. 1215–1228.

Hu, F. B. *et al.* 2001 ‘Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women’, *New England journal of medicine*. Mass Medical Soc, 345(11), pp. 790–797.

Hull, R. L. *et al.* 2004 ‘Islet amyloid: a critical entity in the pathogenesis of type 2 diabetes’, *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*. Oxford University Press, 89(8), pp. 3629–3643.

Ikezumi, Y., Atkins, R. C. and Nikolic-Paterson, D. J. 2003 ‘Interferon-γ augments acute macrophage-mediated renal injury via a glucocorticoid-sensitive mechanism’, *Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 14(4), pp. 888–898.

Janeway, C. A. 2001 ‘How the immune system works to protect the host from infection: a personal view’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences, 98(13), pp. 7461–7468.

Jones, R. H. *et al.* 1979 ‘Progression of diabetic nephropathy’, *The Lancet*. Elsevier, 313(8126), pp. 1105–1106.

Karamanou, M. *et al.* 2016 ‘Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors’, *World journal of diabetes*. Baishideng Publishing Group Inc, 7(1), p. 1.

Kato, S. *et al.* 1999 ‘Renin-angiotensin blockade lowers MCP-1 expression in diabetic rats’, *Kidney international*. Elsevier, 56(3), pp. 1037–1048.

Kim, C., Newton, K. M. and Knopp, R. H. 2002 ‘Gestational diabetes and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review’, *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 25(10), pp. 1862–1868.

Kim, J., Wei, Y. and Sowers, J. R. 2008 ‘Role of mitochondrial dysfunction in insulin resistance’, *Circulation research*. Am Heart Assoc, 102(4), pp. 401–414.

Kim, M. J. and Tam, F. W. K. 2011 ‘Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease’, *Clinica chimica acta*. Elsevier, 412(23–24), pp. 2022–2030.

Kintscher, U. *et al.* 2008 ‘T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance’, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. Am Heart Assoc, 28(7), pp. 1304–1310.

Kitching, A. R., Holdsworth, S. R. and Tipping, P. G. 1999 ‘IFN-γ mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis’, *Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 10(4), pp. 752–759.

Koch, M. *et al.* 2000 ‘The tumour necrosis factor alpha–238 G→ A and–308 G→ A promoter polymorphisms are not associated with insulin sensitivity and insulin secretion in young healthy relatives of Type II Diabetic patients’, *Diabetologia*. Springer, 43(2), pp. 181–184.

Krolewski, A. S. *et al.* 1985 ‘The changing natural history of nephropathy in type I diabetes’, *The American journal of medicine*. Elsevier, 78(5), pp. 785–794.

Krüger, B. *et al.* 2002 ‘A monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) polymorphism and outcome after renal transplantation’, *Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 13(10), pp. 2585–2589.

Lara-Castro, C. and Garvey, W. T. 2008 ‘Intracellular lipid accumulation in liver and muscle and the insulin resistance syndrome’, *Endocrinology and metabolism clinics of North America*. Elsevier, 37(4), pp. 841–856.

Legro, R. S. 2006 ‘Type 2 diabetes and polycystic ovary syndrome’, *Fertility and sterility*. Elsevier, 86, pp. S16–S17.

Lepore, M. *et al.* 2014 ‘Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCRβ repertoire’, *Nature communications*. Nature Publishing Group, 5(1), pp. 1–15.

Lim, A. K. H. and Tesch, G. H. 2012 ‘Inflammation in diabetic nephropathy.’, *Mediators of inflammation*, 2012, p. 146154. doi: 10.1155/2012/146154.

Lizakowski, S., Tylicki, L. and Rutkowski, B. 2013 ‘Direct renin inhibition–a promising strategy for renal protection?’, *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research*. International Scientific Information, Inc., 19, p. 451.

Löbner, K. *et al.* 2006 ‘Predictors of postpartum diabetes in women with gestational

diabetes mellitus', *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 55(3), pp. 792–797.

Lumeng, C. N., Bodzin, J. L. and Saltiel, A. R. 2007 'Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization', *The Journal of clinical investigation*. Am Soc Clin Investig, 117(1), pp. 175–184.

Makhatadze, N. J. 1998 'Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications', *Human immunology*. Elsevier, 59(9), pp. 571–579.

Marhoffer, W. *et al.* 1992 'Impairment of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 15(2), pp. 256–260.

Marks, S. D. *et al.* 2008 'Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 is predictive of poor renal prognosis in paediatric lupus nephritis', *Nephrology Dialysis Transplantation*. Oxford University Press, 23(11), pp. 3521–3526.

Martínez-Castelao, A., De Alvaro, F. and Górriz, J. 2005 'Epidemiology of diabetic nephropathy in Spain', *Kidney International*. Elsevier, 68, pp. S20–S24.

Masuda, M. *et al.* 2013 'PERK-eIF2α-ATF 4-CHOP signaling Contributes to TNF α-Induced vascular Calcification', *Journal of the American Heart Association*. Am Heart Assoc, 2(5), p. e000238.

Matrat, A. *et al.* 2011 'Simultaneous detection of anti-C1q and anti-double stranded DNA autoantibodies in lupus nephritis: predictive value for renal flares', *Lupus*. SAGE Publications Sage UK: London, England, 20(1), pp. 28–34.

Matsushima, K. *et al.* 1989 'Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line.', *The Journal of experimental medicine*, 169(4), pp. 1485–1490.

McCarthy, M. I. 2010 'Genomics, type 2 diabetes, and obesity', *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 363(24), pp. 2339–2350.

Mekinian, A. *et al.* 2011 'Functional study of TNF-α promoter polymorphisms: literature review and meta-analysis', *European cytokine network*, 22(2), pp. 88–102.

Mellado, M. *et al.* 2001 'Chemokine receptor homo-or heterodimerization activates distinct signaling pathways', *The EMBO journal*. John Wiley & Sons, Ltd, 20(10), pp. 2497–2507.

El Mesallamy, H. O. *et al.* 2012 'Clinical significance of inflammatory and fibrogenic

cytokines in diabetic nephropathy.', *Clinical biochemistry*. United States, 45(9), pp. 646–650. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2012.02.021.

Micheau, O. and Tschopp, J. 2003 'Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes', *Cell*. Elsevier, 114(2), pp. 181–190.

Milicevic, Z. *et al.* 2008 'Natural history of cardiovascular disease in patients with diabetes: role of hyperglycemia', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 31(Supplement 2), pp. S155–S160.

Mizuki, N. *et al.* 1995 'Microsatellite polymorphism between the tumor necrosis factor and HLA-B genes in Behcet's disease', *Human immunology*. Elsevier, 43(2), pp. 129–135.

Mogensen, C. E. 1996 'Diabetic complications and early treatment using ACE inhibitors: Concluding remarks', *Journal of Diabetes and its Complications*. Elsevier, 10(3), pp. 151–153.

Mohamed-Ali, V. *et al.* 1997 'Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-α, in vivo', *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*. Oxford University Press, 82(12), pp. 4196–4200.

Molitch, M. E. *et al.* 2015 'Diabetic kidney disease: a clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes', *Kidney international*. Elsevier, 87(1), pp. 20–30.

Moller, D. E. 2000 'Potential role of TNF-α in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier, 11(6), pp. 212–217.

Molnár, M., Wittmann, I. and Nagy, J. 2000 'Prevalence, course and risk factors of diabetic nephropathy in type-2 diabetes mellitus', *Med Sci Monit*, 6(5), pp. 929–936.

Monti, M. C. *et al.* 2007 'Familial risk factors for microvascular complications and differential male-female risk in a large cohort of American families with type 1 diabetes', *The Journal of clinical endocrinology & metabolism*. Oxford University Press, 92(12), pp. 4650–4655.

Moon, J. *et al.* 2007 'Association of polymorphisms in monocyte chemoattractant protein-1 promoter with diabetic kidney failure in Korean patients with type 2 diabetes mellitus', *Journal of Korean medical science*. The Korean Academy of

Medical Sciences, 22(5), pp. 810–814.

Mori, H. *et al.* 2005 'Monocyte chemoattractant protein-1 A-2518G gene polymorphism and renal survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy', *Clinical and experimental nephrology*. Springer, 9(4), pp. 297–303.

Mühlbauer, M. *et al.* 2003 'A novel MCP-1 gene polymorphism is associated with hepatic MCP-1 expression and severity of HCV-related liver disease', *Gastroenterology*. Elsevier, 125(4), pp. 1085–1093.

Nankervis, A. *et al.* 2010 'ADIPS consensus guidelines for the testing and diagnosis of gestational diabetes mellitus in Australia', *Modified June*.

Nathan, D. M. *et al.* 2009 'Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes', *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 32(1), pp. 193–203.

Navarro-González, J. F. *et al.* 2009 'Tumor necrosis factor-alpha as a therapeutic target for diabetic nephropathy.', *Cytokine & growth factor reviews*. England, 20(2), pp. 165–173. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.02.005.

Navarro-González, J. F. *et al.* 2011 'Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy.', *Nature reviews. Nephrology*. England, 7(6), pp. 327–340. doi: 10.1038/nrneph.2011.51.

Navarro-Gonzalez, J. F. and Mora-Fernandez, C. 2008 'The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy', *Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 19(3), pp. 433–442.

Navarro-González, J. F. and Mora-Fernández, C. 2008 'The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy.', *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. United States, 19(3), pp. 433–442. doi: 10.1681/ASN.2007091048.

Nedwin, G. E. *et al.* 1985 'Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization', *Nucleic acids research*. Oxford University Press, 13(17), pp. 6361–6373.

Negoro, K. *et al.* 1999 'Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene', *Gastroenterology*. Elsevier, 117(5), pp. 1062–1068.

Nelson, R. G. *et al.* 1996 ‘Development and progression of renal disease in Pima Indians with non-insulin-dependent diabetes mellitus’, *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 335(22), pp. 1636–1642.

Nichols, G. A., Hillier, T. A. and Brown, J. B. 2007 ‘Progression from newly acquired impaired fasting glusose to type 2 diabetes’, *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 30(2), pp. 228–233.

Odegaard, J. I. *et al.* 2007 ‘Macrophage-specific PPARγ controls alternative activation and improves insulin resistance’, *Nature*. Nature Publishing Group, 447(7148), pp. 1116–1120.

Orchard, T. R. *et al.* 2002 ‘Uveitis and erythema nodosum in inflammatory bowel disease: clinical features and the role of HLA genes’, *Gastroenterology*. Elsevier, 123(3), pp. 714–718.

Ossareh, S. 2011 ‘Vascular Calcıfıcatıon In Chronıc Kıdney Dısease Mechanısms And Clınıcal Implıcatıon’. Iranıan Journal Of Kıdney Dıseases (Ijkd).

Parameswaran, N. and Patial, S. 2010 ‘Tumor necrosis factor-α signaling in macrophages’, *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression*. Begel House Inc., 20(2).

Paul WE: Fundamental immunology (ed 6th). Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott pp. 817-818.

Persson, F. and Rossing, P. 2018 ‘Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective’, *Kidney International Supplements*. Elsevier, 8(1), pp. 2–7.

Peterfalvi, A. *et al.* 2008 ‘Invariant Vα7. 2-Jα33 TCR is expressed in human kidney and brain tumors indicating infiltration by mucosal-associated invariant T (MAIT) cells’, *International immunology*. Oxford University Press, 20(12), pp. 1517–1525.

Pierce, M., Keen, H. and Bradley, C. 1995 ‘Risk of Diabetes in Offspring of Parents with Non-insulin-dependent Diabetes’, *Diabetic medicine*. Wiley Online Library, 12(1), pp. 6–13.

Pociot, F. *et al.* 2010 ‘Genetics of type 1 diabetes: what’s next?’, *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 59(7), pp. 1561–1571.

Polonsky, K. S., Sturis, J. and Bell, G. I. 1996 ‘Non-insulin-dependent diabetes

mellitus—a genetically programmed failure of the beta cell to compensate for insulin resistance', *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 334(12), pp. 777–783.

Posch, P. E. *et al.* 2003 'Novel polymorphisms and the definition of promoter "alleles" of the tumor necrosis factor and lymphotoxin α loci: inclusion in HLA haplotypes', *Genes & Immunity*. Nature Publishing Group, 4(8), pp. 547–558.

Pozzilli, P. and Buzzetti, R. 2007 'A new expression of diabetes: double diabetes', *Trends in Endocrinology & Metabolism*. Elsevier, 18(2), pp. 52–57.

Prasad, P. *et al.* 2007 'Association of TGFβ1, TNFα, CCR2 and CCR5 gene polymorphisms in type-2 diabetes and renal insufficiency among Asian Indians', *BMC medical genetics*. BioMed Central, 8(1), pp. 1–6.

Rabe, K. *et al.* 2008 'Adipokines and insulin resistance', *Molecular medicine*. BioMed Central, 14(11), pp. 741–751.

Rahul, S. G. *et al.* 2022 'Regulation of Blood Glucose Using Auto-Tuned PID Controller in Healthcare Systems', in *Proceedings of International Conference on Computational Intelligence and Computing*. Springer, pp. 263–271.

Ramos-Casals, M. *et al.* 2008 'Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies', *Best practice & research Clinical rheumatology*. Elsevier, 22(5), pp. 847–861.

Ramseyer, V. D. and Garvin, J. L. 2013 'Tumor necrosis factor-α: regulation of renal function and blood pressure', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. American Physiological Society Bethesda, MD, 304(10), pp. F1231–F1242.

Rao, M. *et al.* 2007 'Cytokine gene polymorphism and progression of renal and cardiovascular diseases', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 72(5), pp. 549–556. doi: 10.1038/sj.ki.5002391.

Rasmussen, S. K. *et al.* 2000 'The− 238 and− 308 G→ A polymorphisms of the tumor necrosis factor α gene promotor are not associated with features of the insulin resistance syndrome or altered birth weight in Danish Caucasians', *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. Oxford University Press, 85(4), pp. 1731–1734.

Reantragoon, R. *et al.* 2013 'Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells', *Journal of Experimental*

Medicine. The Rockefeller University Press, 210(11), pp. 2305–2320.

Renal, D. U. S. 2007 'System. USRDS 2007 annual report: atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States. Bethesda: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases.'

Rice, J. C. *et al.* 2002 'Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney', *Renal failure*. Taylor & Francis, 24(6), pp. 703–723.

Ritz, E. and Orth, S. R. 1999 'Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus', *New England Journal of Medicine*. Mass Medical Soc, 341(15), pp. 1127–1133.

Robertson, R. P. *et al.* 2003 'Glucose toxicity in β-cells: type 2 diabetes, good radicals gone bad, and the glutathione connection', *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 52(3), pp. 581–587.

Rosenkranz, A. R. *et al.* 2000 'Regulatory interactions of αβ and γλ T cells in glomerulonephritis', *Kidney international*. Elsevier, 58(3), pp. 1055–1066.

Rothe, J. *et al.* 1992 'Tumor necrosis factor receptors-structure and function', *Immunologic research*. Springer, 11(2), pp. 81–90.

Rovin, B. H., Lu, L. and Saxena, R. 1999 'A novel polymorphism in the MCP-1 gene regulatory region that influences MCP-1 expression', *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier, 259(2), pp. 344–348.

Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001 'Molecular cloning: A laboratory manual. Mol', *Cloning A Lab. Man*.

Sanders, S. K. *et al.* 2000 'Functional differences between monocyte chemotactic protein-1 receptor A and monocyte chemotactic protein-1 receptor B expressed in a Jurkat T cell', *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immnol, 165(9), pp. 4877–4883.

Sapey, E. *et al.* 2010 'Tumor necrosis factor–α rs361525 polymorphism is associated with increased local production and downstream inflammation in chronic obstructive pulmonary disease', *American journal of respiratory and critical care medicine*. American Thoracic Society, 182(2), pp. 192–199.

Savransky, V. *et al.* 2006 'Role of the T-cell receptor in kidney ischemia–reperfusion injury', *Kidney international*. Elsevier, 69(2), pp. 233–238.

Scheele, W. *et al.* 2016 ‘Phosphodiesterase type 5 inhibition reduces albuminuria in subjects with overt diabetic nephropathy’, *Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 27(11), pp. 3459–3468.

Schmidt, C., Höcherl, K. and Bucher, M. 2007 ‘Cytokine-mediated regulation of urea transporters during experimental endotoxemia’, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. American Physiological Society, 292(5), pp. F1479–F1489.

Schulz, S. *et al.* 2004 ‘Relation between the tumor necrosis factor-α (TNF-α) gene and protein expression, and clinical, biochemical, and genetic markers: age, body mass index and uric acid are independent predictors for an elevated TNF-α plasma level in a complex risk model’, *European cytokine network*. Citeseer, 15(2), pp. 105–111.

Schulze, M. B. *et al.* 2006 ‘Comparison of anthropometric characteristics in predicting the incidence of type 2 diabetes in the EPIC-Potsdam study’, *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 29(8), pp. 1921–1923.

Schwab, S. G. *et al.* 2003 ‘Association of tumor necrosis factor alpha gene-G308A polymorphism with schizophrenia’, *Schizophrenia research*. Elsevier, 65(1), pp. 19–25.

Shai, I. *et al.* 2006 ‘Ethnicity, obesity, and risk of type 2 diabetes in women: a 20-year follow-up study’, *Diabetes care*. Am Diabetes Assoc, 29(7), pp. 1585–1590.

Sheehan, K. C. *et al.* 1995 ‘Monoclonal antibodies specific for murine p55 and p75 tumor necrosis factor receptors: identification of a novel in vivo role for p75.’, *The Journal of experimental medicine*, 181(2), pp. 607–617.

Simeoni, E. *et al.* 2004 ‘Association between the A–2518G polymorphism in the monocyte chemoattractant protein-1 gene and insulin resistance and Type 2 diabetes mellitus’, *Diabetologia*. Springer, 47(9), pp. 1574–1580.

Soriano, S. F. *et al.* 2003 ‘Chemokines integrate JAK/STAT and G-protein pathways during chemotaxis and calcium flux responses’, *European journal of immunology*. Wiley Online Library, 33(5), pp. 1328–1333.

Srivastava, S. P. *et al.* 2019 ‘Microrna crosstalk influences epithelial-to-mesenchymal, endothelial-to-mesenchymal, and macrophage-to-mesenchymal transitions in the kidney’, *Frontiers in pharmacology*. Frontiers, 10, p. 904.

Stentz, F. B. and Kitabchi, A. E. 2003 ‘Activated T lymphocytes in type 2 diabetes:

implications from in vitro studies', *Current drug targets*. Bentham Science Publishers, 4(6), pp. 493–503.

Stumvoll, M., Goldstein, B. J. and Van Haeften, T. W. 2005 'Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy', *The Lancet*. Elsevier, 365(9467), pp. 1333–1346.

Susztak, K. *et al.* 2006 'Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy', *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 55(1), pp. 225–233.

Szalai, C. *et al.* 2001 'Polymorphism in the gene regulatory region of MCP-1 is associated with asthma susceptibility and severity', *Journal of allergy and clinical immunology*. Elsevier, 108(3), pp. 375–381.

Takebayashi, K. *et al.* 2006 'Association between circulating monocyte chemoattractant protein-1 and urinary albumin excretion in nonobese Type 2 diabetic patients.', *Journal of diabetes and its complications*. United States, 20(2), pp. 98–104. doi: 10.1016/j.jdiacomp.2005.05.008.

Tanaka, S., Green, S. R. and Quehenberger, O. 2002 'Differential expression of the isoforms for the monocyte chemoattractant protein-1 receptor, CCR2, in monocytes', *Biochemical and biophysical research communications*. Elsevier, 290(1), pp. 73–80.

Tao, J. *et al.* 2020 'JAK-STAT activity in peripheral blood cells and kidney tissue in IgA nephropathy', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. Am Soc Nephrol, 15(7), pp. 973–982.

Tarabra, E. *et al.* 2009 'Effect of the monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine receptor 2 system on nephrin expression in streptozotocin-treated mice and human cultured podocytes', *diabetes*. Am Diabetes Assoc, 58(9), pp. 2109–2118.

Taubes, G. 2008 'Paradoxical effects of tightly controlled blood sugar', *Science*. American Association for the Advancement of Science, 322(5900), pp. 365–367.

Terashima, Y. *et al.* 2005 'Pivotal function for cytoplasmic protein FROUNT in CCR2-mediated monocyte chemotaxis', *Nature immunology*. Nature Publishing Group, 6(8), pp. 827–835.

Tesch, G. H. *et al.* 1999 'Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-

mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis', *The Journal of clinical investigation*. Am Soc Clin Investig, 103(1), pp. 73–80.

Thauland, T. J. *et al.* 2008 'Th1 and Th2 cells form morphologically distinct immunological synapses', *The Journal of Immunology*. Am Assoc Immnol, 181(1), pp. 393–399.

Tieu, J. *et al.* 2014 'Screening and subsequent management for gestational diabetes for improving maternal and infant health', *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd, (2).

Tsai, E. Y. *et al.* 1996 'Tumor necrosis factor alpha gene regulation in activated T cells involves ATF-2/Jun and NFATp.', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 16(2), p. 459.

Tsytsykova, A. V and Goldfeld, A. E. 2002 'Inducer-specific enhanceosome formation controls tumor necrosis factor alpha gene expression in T lymphocytes', *Molecular and cellular biology*. American Society for Microbiology (ASM), 22(8), p. 2620.

Tucci, M. *et al.* 2004 'Strong association of a functional polymorphism in the monocyte chemoattractant protein 1 promoter gene with lupus nephritis', *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*. Wiley Online Library, 50(6), pp. 1842–1849.

Tuomi, T. 2005 'Type 1 and type 2 diabetes: what do they have in common?', *Diabetes*. Am Diabetes Assoc, 54(suppl 2), pp. S40–S45.

Turner, M. D. *et al.* 2014 'Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. Elsevier, 1843(11), pp. 2563–2582.

Ueki, K. *et al.* 2006 'Total insulin and IGF-I resistance in pancreatic β cells causes overt diabetes', *Nature genetics*. Nature Publishing Group, 38(5), pp. 583–588.

Wada, T. *et al.* 2000 'Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy', *Kidney international*. Elsevier, 58(4), pp. 1492–1499.

Wajant, H., Pfizenmaier, K. and Scheurich, P. 2003 'Tumor necrosis factor signaling', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, 10(1), pp. 45–65.

Wang, J. *et al.* 2008 'Dietary energy density predicts the risk of incident type 2 diabetes: the European Prospective Investigation of Cancer (EPIC)-Norfolk Study', *Diabetes Care*. Am Diabetes Assoc, 31(11), pp. 2120–2125.

Wang, Y. *et al.* 2005 'Association between tumour necrosis factor-α G-308A polymorphism and risk of nephropathy in obese Chinese type 2 diabetic patients', *Nephrology Dialysis Transplantation*. Oxford University Press, 20(12), pp. 2733–2738.

Wei, Y. *et al.* 2008 'Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. American Physiological Society, 294(3), pp. R673–R680.

Weisberg, S. P. *et al.* 2003 'Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue', *The Journal of clinical investigation*. Am Soc Clin Investig, 112(12), pp. 1796–1808.

Whincup, P. H. *et al.* 2008 'Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review', *Jama*. American Medical Association, 300(24), pp. 2886–2897.

Wilson, A. G. *et al.* 1992 'Single base polymorphism in the human tumour necrosis factor alpha (TNFα) gene detectable by Ncol restriction of PCR product', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 1(5), p. 353.

Wilson, A. G. *et al.* 1995 'Comparative genetic association of human leukocyte antigen class II and tumor necrosis factor-alpha with dermatitis herpetiformis', *Journal of investigative dermatology*. Elsevier, 104(5), pp. 856–858.

Yang, B. *et al.* 2004 'Polymorphisms of chemokine and chemokine receptor genes in Type 1 diabetes mellitus and its complications', *Cytokine*. Elsevier, 26(3), pp. 114–121.

Yaqoob, M. *et al.* 1994 'Evidence of oxidant injury and tubular damage in early diabetic nephropathy', *QJM: An International Journal of Medicine*. Oxford University Press, 87(10), pp. 601–607.

Yost, J. and Gudjonsson, J. E. 2009 'The role of TNF inhibitors in psoriasis therapy: new implications for associated comorbidities', *F1000 medicine reports*. Faculty of 1000 Ltd, 1.

Zeyda, M. *et al.* 2007 'Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory

phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production', *International journal of obesity*. Nature Publishing Group, 31(9), pp. 1420–1428.

Zhang, H.-G. *et al.* 1998 'Inhibition of tumor necrosis factor α decreases inflammation and prolongs adenovirus gene expression in lung and liver', *Human gene therapy*. Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA, 9(13), pp. 1875–1884.

Zietz, B. *et al.* 2005 'Caucasian patients with type 2 diabetes mellitus have elevated levels of monocyte chemoattractant protein-1 that are not influenced by the–2518 A→ G promoter polymorphism', *Diabetes, Obesity and Metabolism*. Wiley Online Library, 7(5), pp. 570–578.

Ziyadeh, F. N. 1993 'The extracellular matrix in diabetic nephropathy', *American journal of kidney diseases*. Elsevier, 22(5), pp. 736–744.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Surri Faris Subhi Hayyawi

Doğum Yeri: Irak

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Lisans: Babil- Üniversitesi / Biyoloji – 2017

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi, Biyoloji – 2022

Çaliştiği Kurum/Kurumlar ve Yıl: İmam Hüseyin Tıp Hastansi-Kerbala (2012-2019)

بسم الله الرحمن الرحيم

No 07781

جمهورية العراق
محافظة كربلاء المقدسة
دائرة صحة كربلاء المقدسة
مركز التدريب والتنمية البشرية
مكتب المركز
العدد: ٢٨٩
التاريخ: ٤ / ٢ / ٢٠٢١

Holy Karbala governorate
Karbala Health Department
General manager's office
Training and Human Development
Center

دائرة صحة كربلاء المقدسة
قسم التدريب والتنمية البشرية

الى/قسم التخطيط وشعبة الموارد البشرية
الموضوع/ تسهيل مهمة

السلام عليكم ...
كتابكم المرقم ١٠٢٠ في ٢٠٢١/٣/١ والحاقا بكتابنا المرقم ١٥٣٨ في ٢٠٢١/١٢/٧
لامانع لدينا من تسهيل مهمة طالب الماجستير (سري فارس صبحي) لإنجاز بحثه الموسوم :
(دور TNF-a 308/A وMBC1في تطور مرض العجز الكلوي عند مرضى السكر) في مؤسساتنا الصحية /مدينة الامام الحسين(ع)الطبية علما ان المشرف العلمي للبحث (د.محمد صالح مهدي) على ان لاتتحمل دائرتنا اي نفقات مادية
مع الاحترام...

الدكتورة
د/ تقوى خضر عبد الكريم
مدير مركز التدريب والتنمية البشرية
٢٠٢١/٢/ ٤

نسخة منه الى:
مختبر الصحة العامة/للتفضل بالاطلاع مع الاحترام

العنوان/كربلاء المقدسة - حي الحسين(ع) - قرب دائرة كتب العدل - رقم الهاتف / ٠٣٢٣٢٨٠٠٢
البريد الالكتروني / Email / train.centerKH@yahoo.com .

Ali UĞUR
Arapça Yeminli Tercüman
Tel:0505-576 94 19

21 Temmuz 2022

IRAK CUMHURİYETİ
KERBELA VALİLİĞİ
KERBELA SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
EĞİTİM VE İNSAN GELİŞİMİ BÖLÜMÜ
ARAŞTIRMA VE BİLGİ YÖNETİMİ ŞUBESİ
SAYI: 389 TARİH: 02.03.2021

BİSMİLLAHİRRAHMANİRRAHİM

T.C. ÇANKIRI 2. NOTERLİĞİ Cumhuriyet Mah. Belediye Cad. Belediyeoğlu İşhanı No: 33/33 ÇANKIRI TEL: 0378 213 66 84

LOGO

No 077811

MÜHÜR

PLANLAMA VE KAYNAK GELİŞTİRME BİRİMİNE

KONU: GÖREVİ KOLAYLAŞTIRMA

SELAMLAR...

01.03.2021 tarih 1020 sayılı yazınıza ek olarak 07.12.2021 tarih ve 1538 sayılı yazımız .
Yüksek lisans öğrencisi SURRI FARIS SUBHI tarafından verilen dilekçe ve başlangıçtaki rızanıza dayanarak bölümümüzün haftalık oturumunda araştırma kuruluna ilgilinin dilekçesi sunulmuştur.

ARAŞTIRMA KONUSU : (MBC1 TNF-a 308/A'nın Diyabet hastalarındaki böbrek yetmezliği hastalığın gelişmesi) başlıklı araştırmasını kolaylaştırmak sağlık kuruluşlarımızda / İmam Hüseyin (a.s) tıp şehrinde, araştırmanın bilimsel danışman öğretmeni Dr. Muhammed Salih Mehdi rehberliğinde bölümümüze herhangi bir mali külfet yüklememek şartıyla yapılmasına hiçbir itirazımız yoktur.

Saygılarımızla...

İMZA MÜHÜR

DOKTOR TAKVA HIDR ABDÜLKERİM

EĞİTİM VE İNSAN GELİŞİMİ BÖLÜM MÜDÜRÜ

02.03.2021

DAĞITIM:

Halk Sağlığı Laboratuvarına gereğini saygılarımızla...

TERCÜMAN BEYANI:

Tercüme edilmek üzere bana verilen Arapça dilindeki belgeyi Türkçe diline tam ve doğru olarak çevirdiğimi beyan ederim.

Değerli Kağıt Bedeli Nakden Alınmıştır

İmzaya Yetkili Başkatip Şükran DİLBAZ

YEMİNLİ TERCÜMAN:

ALİ UĞUR 25267518792

[Kırkevler Mah. Şehit j. K. Onb. Mustafa Yusuf Sk. No: 1/6 Merkez / ÇANKIRI] [İMZA]

Bu tercümenin yukarıdaki adreste bulunan noterliğimiz yeminli tercümanı ALİ UĞUR tarafından Arapça dilinden Türkçe diline tercüme edildiğini onaylarım.

21 Temmuz 2022