T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA PARAOXONASE 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oğuzhan KENGER

DANIŞMAN
Doç. Dr. Feridun AKKAFA

ŞANLIURFA
2021

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA PARAOXONASE 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Oğuzhan KENGER

DANIŞMAN
Doç. Dr. Feridun AKKAFA

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAP) tarafından 19251 proje numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA
2021

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince ve tez çalışma dönemimde engin bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç. Dr. Feridun AKKAFA' ya, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Fuat DİLMEÇ hocama ve Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Halit AKBAŞ hocama teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasına ait kan örneklerinin toplanmasında ve klinik kısımdaki katkı ve desteklerinden dolayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı hocalarımızdan Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali EREN'e, Endokrinoloji asistanlarına ve diğer personellerine teşekkür ediyorum.

Kan örneklerinin tamamlanana kadar saklanması, korunması konusunda katkılarından dolayı Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı hocalarına ve personellerine teşekkür ediyorum.

Çalışma sonuçlarının istatistiksel analizinde destek veren Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalından, Sayın Doç. Dr. Hakim Çelik'e teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamda desteğini esirgemeyen Harran Üniversitesi Sağlık Hizmetleri M.Y.O hocalarından Sayın Öğr. Gör. Dr. Ebru Temiz'e teşekkür ediyorum.

Hayatımın her alanında ve akademik eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini üzerimden hiç çekmeyen, sürekli motivasyon ve azim kaynağım olan, bu hayattaki en büyük şansım çok değerli aileme sonsuz teşekkürler.

Oğuzhan KENGER

Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **IV**
TABLOLAR DİZİNİ ..... **V**
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ ..... **VI**
ÖZET ..... **VII**
ABSTRACT ..... **IX**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Diabetes Mellitus **4**
2.1.1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri **5**
2.1.2. Diabetes Mellitus Etiyolojik Sınıflandırması **7**
2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus **9**
2.2.1 Tip 2 Diabetes Mellitus Patofizyolojisi **9**
2.2.2. İnsülin Sekresyonu ve Glikozun İnsülin Sekresyonundaki Rolü **11**
2.2.3. İnsülin Sinyal Yolakları ve Hedef Doku İşlevleri **16**
2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Oluşumunda Rol Oynayan Faktörler **19**
2.3.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Gelişiminde Çevresel Faktörler **19**
2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus Gelişiminde Genetik Faktörler **21**
2.3.2.1. Monogenik Kökene Dayanan Diabetes Mellitus **21**
2.3.2.2. Poligenik Kökene Dayanan Diabetes Mellitus **22**
2.4. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları **28**
2.4.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'da Akut Komplikasyonlar **28**
2.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus'da Kronik Komplikasyonlar **30**
2.4.2.1. Mikrovasküler Komplikasyonlar **30**
2.4.2.2. Makrovasküler Komplikasyonlar **30**
2.5. Diyabetik Nefropati **31**
2.5.1. Diyabetik Nefropati Patogenezi **32**
2.5.2. Diyabetik Nefropati Evreleri **35**
2.5.3. Mikroalbüminüri **35**
2.6. Paraoxonase (PON) Gen Ailesi **37**

2.6.1. Paraoxonase-1 (PON1) Geni **38**
2.6.2. PON1 Yapısı Ve Özellikleri **39**
2.6.3. PON1 Ve HDL İlişkisi **41**
3. GEREÇ VE YÖNTEM **43**
3.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri **43**
3.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri **43**
3.3.Kan Alımı **43**
3.4.1. Kullanılan Tamponlar ve Hazırlanışı **44**
3.4.2. Araç ve Gereçler **45**
3.5. DNA İzolasyonu **45**
3.6. PON1 Polimorfizmlerinin Pcr-Rflp Yöntemiyle Saptanması **46**
3.6.1. PCR İşlemi (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) **46**
3.6.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi **48**
3.7. Değerlendirme **49**
3.8.1. İstatistiksel Analiz **50**
4. BULGULAR **51**
4.1. Çalışmaya Katılan Bireylerin Demografik ve Biyokimyasal Parametrelerinin Dağılımı **51**
4.2. Çalışma Grupları Arasında Genotip ve Allel Dağılımlarının Karşılaştırması **52**
4.3. Çalışma Grubu Bireylerinin Demografik ve Biyokimyasal Verilerinin Yabanil Tip ile Homozigot Mutant Genotipler Arası Karşılaştırılması **55**
5. TARTIŞMA **59**
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER **65**
7. KAYNAKLAR **66**
8. EKLER **79**

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi 10
Şekil 2.2. Proinsülin Yapısı (56'dan değiştirilerek alınmıştır) 12
Şekil 2.3. Pankreas β Hücrelerinde İnsülin Biyosentezindeki Temel Adımlar (57'den değiştirilerek alınmıştır) 13
Şekil 2.4. İnsülin Molekülünün Yapısı ve Disülfid Bağları (58'den değiştirilerek alınmıştır) 13
Şekil 2.5. GLUT2 Aracılı İnsülin Sekresyonu (63) 16
Şekil 2.6. İnsülin-İnsülin Reseptörü Pleiotropik Etkileri 16
Şekil 2.7. İnsülin Reseptör (IR) Yapısı (69'dan değiştirilerek alınmıştır) 17
Şekil 2.8. İnsülin Sinyal Yolakları (70'den değiştirilerek alınmıştır) 18
Şekil 2.9. İnsülin Sinyal İletiminde PI3 Kinaz ve MAPK Yolakları (76) 19
Şekil 2.10. Tip 2 Diabetes Mellitus, İnsülin ve Adipositokin Sinyal Yolakları ile İlişkili Diferansiyel miRNA'lar ve bunların T2DM Hedef Genlerinin Etkileşim Ağları 27
Şekil 2.11. Diyabet Komplikasyonları Şeması 29
Şekil 2.12. Zaman İçerisinde Diyabetik Nefropati Seyri (102) 31
Şekil 2.13. Diyabetik Nefropati Patogenezinin Şematik Gösterimi 34
Şekil 2.14. GFR Hesaplama Formülleri (116) 37
Şekil 2.15. Kromozom 7q21.1-21.3 Paraksonaz Gen Ailesi (119) 38
Şekil 2.16. Kromozom 7 üzerinde PON1 (122) 39
Şekil 2.17. Paraksonazın Yapısı (127) 40
Şekil 2.18. PON1 Konformasyonel Yapısı, Heliks Yapı ve Ca^{+} Bağı 41
Şekil 2.19. PON1-HDL Bağlanması (133) 42
Şekil 3.1. PON1 geninin Q192RF5 ve Q192RR5 primerleri ile 60 ºC'de PCR'da çoğaltılmasıyla elde edilen 99 baz çiftlik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü 47
Şekil 3.2. PON1 geninin L55M-F5 ve L55M-R5 primerleri ile 55 ºC'de PCR'da çoğaltılmasıyla elde edilen 170 baz çiftlik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü 47
Şekil 3.3. PON1 Geni rs854560 L55M (172T>A) Noktasının Hin1II Restriksiyon Profili 48
Şekil 3.4. PON1 Geni Q192R (rs662 584A>G) Noktasının BspPI Restriksiyon Profili 49

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Diabetes Melitus Tanı Kriterleri 6
Tablo 2.2. Diabetes Mellitus Sınıflandırılması 7
Tablo 2.3. Diğer Spesifik Diyabet Türleri 8
Tablo 2.4. İnsülin Sekresyonunu Stimüle Eden ve İnhibe Eden Faktörler 14
Tablo 2.5. Bazı Transmembran Proteinleri ve Görevleri 15
Tablo 2.6. MODY Alt Tipleri: Gen Mutasyonları, Patofizyoloji ve Klinik Özellikleri 22
Tablo 2.7. Tip 2 Diabetes Mellitus İlişkili Genler ve Biyolojik Fonksiyonları 24
Tablo 2.8. Tip 2 Diabetes Mellitus ve Kardiyovasküler Hastalıkta Ortak Genler (90) 25
Tablo 2.9. Diyabetik Nefropatiyle İlişkili Bazı Genler (91) 26
Tablo 2.10. İdrarla Albümin Atılımı Tanımları 36
Tablo 2.11. HbA1C Düzeylerinin Mikroalbüminüriden Proteinüriye İlerleme Hızına Etkisi 37
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri (135, 136) 46
Tablo 3.2. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Enzimler ve Kesim Bölgeleri (137,138) 49
Tablo 4.1. Çalışma Grupları için Demografik Parametrelerin Dağılımı 51
Tablo 4.2. Çalışma Grupları için Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı 52
Tablo 4.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Hasta Grubu ve Kontrol Grubu arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel Dağılımları 53
Tablo 4.4. Diyabetik Nefropati Hasta Grubu ve Kontrol Grubu arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel Dağılımları 54
Tablo 4.5. Tip 2 DM ve DN Hasta Grubu Arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel dağılımları 55
Tablo 4.6. Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösterenler Bireyler Arasında Demografik Parametrelerin Karşılaştırılması 56
Tablo 4.7. Q192R Polimorfizmi için Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösteren Bireyler Arasında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması 57
Tablo 4.8. L55M Polimorfizmi için Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösteren Bireyler Arasında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması 58

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

AKŞ: Açlık Kan Şekeri

APG: Açlık Plazma Glikozu

BGT: Bozulmuş Glikoz Toleransı

DM: Diabetes Mellitıs

DN: Diyabetik Nefropati

GDM: Gestasyonel Diabetes Mellitus

GER: Granüllü Endoplazmik Retikulum

GFR: Glomerular Filtration Rate

GLUT: Glucose Transporter

GWA: Genome-Wide Association Studies

HbA1c: Glikolize Hemoglobin

HDL: High Density Lypoprotein

IDF: International Diabetes Federation

IR: Insulin Receptor

IRS: Insulin Receptor Substrate

IU: International Unite

LDL: Low Density Lypoprotein

MODY: Maturity-Onset Diabetes of Young

NDGG: National Diabetes Data Group

NIDDM: Non İnsülin Dependent Diabetes

OGTT: Oral Glikoz Tolerans Testi

PON1: Paraoksonaz 1

SDBY: Son Dönem Böbrek Yetmezliği

Tip 2 DM: Tip 2 Diabetes Mellitus

TÜRDEP-I: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması 1

TÜRDEP-II: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması 2

WHO: World Health Organization

ÖZET

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA PARAOXONASE 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Oğuzhan KENGER

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Amaç: Bu çalışmada, Diyabetik nefropatili hastalarda PON1 geni kodlanan bölge Q192R (584A/G; rs662) ve L55M (172 T/A; rs854560) polimorfizmlerinin sıklığı tespit edilerek, Tip 2 Diabetes Mellitus ve Diyabetik Nefropatili hastaların sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılıp, allel ve genotip frekanslarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmanın yürütülmesi için; Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı polikliniklerine başvuran, ADA (American Diabetes Association) kriterlerine göre Tip 2 Diabetes Mellitus tanısı alan 100 hasta ve benzer yaş grubunda bulunan 50 sağlıklı birey kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi. Tip 2 Diabetes Mellitus hastalarının rutin tetkik sonuçları değerlendirilerek mikroalbüminüri ve makroalbüminürisi olan 50 bireyle Diyabetik Nefropati hasta grubu oluşturuldu. Çalışma grubundaki bireylerden EDTA'lı tüplere alınan kan örneklerinden PureLink Genomic DNA izolasyon kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Bireylerin PON1 genine ait Q192R (584A/G; rs662) ve L55M (172T/A; rs854560) polimorfizmleri, bu bölgelere spesifik seçilen forward-reverse primer çifti aracılığıyla PCR ile çoğaltıldı. PCR ürünleri, restriksiyon enzimleri BspPI (AlwI) ve Hin1II (NlaIII) kullanılarak kesildi. Ürünler sırasıyla %4 ve %2 agaroz jel üzerinde yürütüldü ve UV görüntüleme aracılığıyla fotoğraflandı. Sonuçlar değerlendirilerek polimorfizm genotiplemesi yapıldı.

Bulgular: PON1 geni Q192R (584A/G; rs662) polimorfizminde genotip dağılımına bakıldığında, sağlıklı kontrol grubu (n=50) bireylerinde homozigot QQ genotipi 31 bireyde (%62), heterezigot QR genotipi 15 bireyde (%30) ve homozigot RR genotipi 4 bireyde (%8) görülmüştür. Tip 2 Diabetes Mellitus grubu (n=50) bireylerinde homozigot QQ genotipi 29 bireyde (%58), heterezigot QR genotipi 16 bireyde (%32) ve homozigot RR genotipi 5 bireyde (%10) görüldü. Diyabetik Nefropati grubu bireylerinde (n=50) homozigot QQ genotipi 26 bireyde (%52), heterizot QR genotipi 21 bireyde (%42) ve homozigot RR genotipi 3 bireyde (%6) görüldü. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalar sonucunda genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark ifade etmediği

görüldü (p>0.05). PON1 geni L55M (172T/A; rs854560) polimorfizminde genotip dağılımı incelendiğinde sağlıklı kontrol grubu (n=50) bireylerinde homozigot LL genotipi 21 bireyde (%42), heterezigot LM genotipi 21 bireyde (%42) ve homozigot MM genotipi 8 bireyde (%16) görüldü. Tip 2 Diabetes Mellitus grubu (n=50) bireylerinde homozigot LL genotipi 24 bireyde (%48), heterezigot LM genotipi 16 bireyde (%32) ve homozigot MM genotipi 10 bireyde (%20) görüldü. Diyabetik Nefropati grubu bireylerinde (n=50) homozigot LL genotipi 34 bireyde (%68), heterizot LM genotipi 13 bireyde (%26) ve homozigot MM genotipi 3 bireyde (%6) görüldü. Gruplar arası yapılan karşılaştırmalar sonucunda genotip dağılımlarının istatistiksel olarak anlamlı bir fark ifade etmediği görüldü (p>0.05).

Sonuç: Yapılan araştırma sonucunda PON1 geni Q192R (584A/G; rs662) ve L55M (172T/A; rs854560) polimorfizmlerinin, Tip 2 Diabetes Mellitus hastalarında Diyabetik Nefropati'ye yakalanma riski ile ilişkili olmadığı gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: PON1, Tip 2 Diabetes Mellitus, Diyabetik Nefropati, Polimorfizm

ABSTRACT

INVESTIGATION OF PARAOXONASE 1 GENE POLYMORPHYSM IN PATIENTS WITH DIABETIC NEPHROPATHY

Oğuzhan KENGER
Medical Biology Department, Master Thesis

Objective: In this study, It was aimed to determine the frequency of PON1 gene encoded region Q192R (584A/G; rs662) and L55M (172T/A; rs854560) polymorphisms in patients with diabetic nephropathy, comparing the results of patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Diabetic Nephropathy with the control group, and to determine allele and genotype frequencies.

Method: In order to carry out this study; 100 patients who applied to the outpatient clinics of Harran University Faculty of Medicine, Department of Endocrinology and were diagnosed with Type-2 Diabetes Mellitus according to ADA (American Diabetes Association) criteria, and 50 healthy individuals in similar age group were included in the study as a control group. A Diabetic Nephropathy patient group was formed with 50 individuals with microalbuminuria and macroalbuminuria by evaluating the routine examination results of Type-2 Diabetes Mellitus patients. DNA isolation was performed from blood samples (with EDTA) taken from individuals in the study group by using PureLink Genomic DNA isolation kit. The individuals' PON1 gene Q192R (584A/G; rs662) and L55M (172T/A; rs854560) polymorphisms were amplified with PCR via the selected forward-reverse primer pair specific to these regions. PCR products were digested by using the restriction enzymes BspPI (AlwI) and Hin1II (NlaIII). Products were run on 4% and 2% agarose gel respectively and photographed via UV imaging. Polymorphism genotyping was performed by evaluating the results.

Results: When the genotype distribution of the PON1 gene Q192R (584A/G; rs662) polymorphism was analyzed, in the healthy control group (n=50), homozygous QQ genotype in 31 individuals (62%), heterozygous QR genotype in 15 individuals (30%), and homozygous RR genotype was observed in 4 individuals (8%). In the Type-2 Diabetes Mellitus group (n=50), homozygous QQ genotype in 29 individuals (58%),

heterozygous QR genotype in 16 individuals (32%), and homozygous RR genotype was observed in 5 individuals (10%). In the Diabetic Nephropathy group (n=50), homozygous QQ genotype in 26 individuals (52%), heterozygous QR genotype in 21 individuals (42%), and homozygous RR genotype was observed in 3 individuals (6%). As a result of the comparisons between the groups, it was seen that the genotype distributions did not show a statistically significant difference ($p > 0.05$). When the genotype distribution of the PON1 gene L55M (172T/A; rs854560) polymorphism was examined, in healthy control group (n=50) individuals, homozygous LL genotype in 21 individuals (42%), heterozygous LM genotype in 21 individuals (42%), and homozygous MM genotype was observed in 8 individuals (16%). In Type 2 Diabetes Mellitus group (n=50), homozygous LL genotype in 24 individuals (48%), heterozygous LM genotype in 16 individuals (32%), and homozygous MM genotype was observed in 10 individuals (20%). In the Diabetic Nephropathy group (n=50), homozygous LL genotype in 34 individuals (68%), heterozygous LM genotype in 13 individuals (26%), and homozygous MM genotype was observed in 3 individuals (6%). As a result of the comparisons between the groups, it was seen that the genotype distributions did not show a statistically significant difference ($p > 0.05$).

Conclusion: As a result of the research, it was observed that the PON1 gene Q192R (584A/G; rs662) and L55M (172T/A; rs854560) polymorphisms are not associated with the risk of developing Diabetic Nephropathy in Type-2 Diabetes Mellitus patients.

Keywords: PON1, Type-2 Diabetes Mellitus, Diabetic Nephropathy, Polymorp

1. GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), genel olarak insülin hormonu eksikliği veya bu hormonun dokuda oluşturduğu etkilerin azalması, bu etkinin yetersiz kalması sebepleriyle bir canlının temel besin monomerlerinden gerekli miktarda yararlanamadığı, sürekli tıbbi yardım gerektiren kronik metabolizma hastalıklarından biridir (1-6). Metabolik hastalıklar sıralamasında tüm dünyada en üst sırada bulunan bu hastalığın birkaç farklı tipi bulunmaktadır. Diyabet, insanlarda genel olarak Tip 1, Tip 2 ve Gestasyonel diyabet olarak üç ana gruba ayrılır (7).

Tip 1 diyabette, pankreasın insülin üretimi görevini yerine getirememesinden dolayı dışarıdan insülin takviyesi gerektirir. Genellikle çocuklarda ve gençlerde görüldüğü için çocukluk çağı diyabeti adı da verilir (8). Tip 2 diyabetin temelinde ise hem periferal dokulardaki insülin salınımındaki azalma hem de insülin salınımındaki bozukluk yatmaktadır. Genelde 30'lu yaşlardan sonra görülür. Son yıllarda yaşam şekli ve günlük aktivitenin kısıtlanması gibi değişiklikler, obezite sıklığını arttırmıştır. Obezite ise hem çocuklarda hem de gençlerde Tip 2 diyabet sıklığını arttırmaktadır (9). Gestasyonel diyabet, literatürde genellikle yaşam boyu ilk defa hamilelik sürecinde fark edilen veya bu süreçte başlayan glikoz intoleransı olarak tanımlanır. Hamilelik boyunca kan glikoz seviyesinin yüksekliği ile kendini gösterir. Gestasyonel diyabet başlangıcı hamilelik döneminin değişik süreçlerinde meydana gelebilirken, sıklıkla hamileliğin 6. ayından itibaren ortaya çıkmakta ve doğumla birlikte ortadan kalkmaktadır (10,11).

DM'nin sebep olabileceği sorunlar mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak iki ana grupta toplanır. Mikrovasküler olanlar; diyabete bağlı retinopati, diyabetik nefropati ve nöropati olmak üzere üç grupta incelenir. Makrovasküler komplikasyonlara bakıldığında ise koroner kalp hastalıkları, periferik damar hastalığı ve serebrovasküler hastalıklar olduğu görülmektedir (12).

Diyabetik Nefropati (DN); diyaliz tedavisi görmeye başlayan hasta olgularında kronik böbrek yetmezliğine yol açan en önemli etkenlerdendir. Tip 1 ve Tip 2 diyabetle bağlantılı olarak en fazla görülen mikrovasküler komplikasyon olan DN, hastalık oluşumu ve ölüm oranlarının önde gelen sebeplerinden biridir. DN; başka bir böbrek hastalığı olmadan, diyabet hastalığı olan bireyde devamlı olarak idrar albumin çubuğunun pozitif olması ya da bir gün içerisinde normal miktardan daha fazla (>300 mg) albüminin vücuttan atılması veya proteinüri >0,5g/24 saat olarak tanımlanır. DN; diyabet

bulgularında geç rastlanan bir durum gibi görünmesiyle birlikte DN'den önce fizyolojik, patolojik ve klinik belirtliler meydana gelir. Bu belirtiler, araştırmacıları DN'yi kademe kademe incelemeye itmiştir. DN, birçok hastanın son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) ile yüz yüze kalmasından ötürü oldukça kayda değer bir sağlık problemidir. ABD'de meydana gelen SDBY'nin %40'ının sebebi DN'dir (12,13,14).

Paraoksonaz (PON1) karaciğerde sentezlenip seruma salgılanan, toksik metabolitlerden paraoksonun hidrolizinden sorumlu, yüksek yoğunluktaki lipoproteine (HDL) bağlı bir esterazdır. Aynı zamanda LDL'yi lipit peroksitlerinin oksidatif hasarından koruyan antioksidan ve antiinfilamatuar bir enzimdir. Kalsiyum (Ca) bağımlı olup antiaterojenik ve antioksidan özelliği olan bir enzim olması nedeniyle kardiyovasküler hastalıklar, diyabet, sepsis, Alzheimer ve Parkinson gibi pek çok hastalığın gelişmesine karşı koruyucu rol oynayabileceği düşünülmektedir. PON1, LDL bağımlı lipit oksidasyon ürünlerinde miktar artışı ve dolayısıyla birikimine aracı olur. Kolesterol taşınmasında rol oynayarak periferik dokular üzerinde kolesterol birikimine engel olur. (15,16,17).

PON1'deki enzimatik aktivite bireysel farklılıklar göstermektedir. Genetik modifikasyonun yanı sıra tütün ve alkol kullanımı, beslenme gibi çevresel etkilerin de bu farklılıkta etkin olabileceği gözlenmiştir. Buna ek olarak yaş artışına bağlı olarak PON1 enzimatik aktivitesinde azalış tespit edilmiştir. Aktivite azalma sebebi olarak ise yaş artışıyla birlikte HDL'nin oksidasyon yatkınlığının artması düşünülmektedir. PON1 aktivitesinde gerçekleşen değişimlerden, proteini eksprese eden gen lokusundaki polimorfizmler sorumlu tutulmaktadır. PON1 geni kodlanan bölgede lokalize iki aminoasitteki değişmeler serum PON1 aktivitesini doğrudan etkilemektedir. Bu değişiklikler 55. kodonda Leu → Met, 192. Kodonda ise Gln → Arg değişimi olarak kaydedilmiştir. (18,19,20).

Bu çalışmada; DN hastalarında PON1 geni kodlanan bölge Q192R (584A/G; rs662) ve L55M (172T/A; rs854560) polimorfizmlerinin sıklığı tespit edildi, Tip 2 DM ve DN hastalarının sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırılıp, allel ve genotip frekansları belirlendi.

Ayrıca plazma lipoprotein profilleri ile genetik ilişkileri belirlenerek, diğer laboratuvar sonuçları ve klinik bilgileri ile karşılaştırılıp, hastalıkla ilişkilerinin olup

olmadığı araştırıldı. Diyabetik Nefropatili hastalarda bu gen polimorfizmlerinin, Türk toplumunda risk unsuru ya da koruyucu olup olmayacağının belirlenmesi önemlidir. Elde edilen verilerin ileriki çalışmalarda mevcut bilgilere ilave veriler olması bakımından bu çalışmanın yapılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür. Ayrıca kişiye spesifik tedavi yaklaşımlarına yönelik yapılan çalışmalarda polimorfizm çalışmalarının bilinen önemi göz önüne alınarak elde edilecek sonuçların bu alan dizinine önemli katkılar sağlayacağı da düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

Diabetes Mellitus; insülinin genom kaynaklı eksikliği veya fonksiyonel bozukluğu ile karakterize olan, organizmanın karbohidrat, yağ, protein gibi biyomolekül metabolizmasında harabiyete sebebiyet veren bir hastalıktır (21,22,23). DM; hiperglisemi, mikrovasküler ve makrovasküler birçok komplikasyonu beraberinde getiren, dünyada morbidite ve mortalite oranının oldukça yüksek seyrettiği kronik hastalıklar grubunun önemli bir üyesidir (24,25).

Diyabetle birlikte hiperglisemi, vücutta seyretme süresine bağlı olarak genellikle kardiyovasküler sistemde, böbreklerde ve gözde çeşitli komplikasyonlara ve fonksiyon aksaklıklarına sebebiyet verir (7,26,).

DM'nin kronik mikrovasküler komplikasyonlarından biri olan Nefropati, Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY) gelişiminin en önemli etkenidir. DM'nin Tip 2 türü daha yaygın bir şekilde görüldüğünden, DN vakalarının çoğu Tip 2 diyabet ile ilişkilidir. Dünyada genellikle Tip 2 Diyabet ile daha sık seyreden DN; Tip 2 diyabetin morbidite ve mortalitesinde büyül rol üstlenmektedir. DN, normalde kanda olması gereken proteinin idrarla atılma oranının fazla olduğunu gösteren proteinüri ile kendini gösterir. DN sürecinde rutin seyreden proteinüri ve kanda üre-kreatin yüksekliği, mikroalbüminüriyi beraberinde getirmektedir (27,28.29)

2.1. Diabetes Mellitus

DM, pankreasta üretilen insülin hormonunun eksikliği, yetersizliği veya insülin reseptörlerinin gösterdiği direnç nedeniyle kandaki glikozun hücrelere taşınamadığı için kanda birikmesiyle oluşan bir hastalıktır. Hastalık oluşum sebebi tam anlamıyla aydınlatılamasa da otoimmünite, genetik ve çevresel etkiler, viral enfeksiyonlar gibi çeşitli faktörler sonucu geliştiği düşünülmektedir (30).

DM ve beraberinde yol açtığı komplikasyonlar, küresel düzeyde sağlığı tehdit eden hastalık unsurlarının en önemli kollarından bir tanesidir. Dünya genelinde yaşlı nüfus sayısının artışı, sağlıksız beslenme, ölüm yaşının artışı, kentleşme ve ekonomik gelişmeler DM hasta sayısındaki artışı oldukça hızlandırmıştır (31).

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF); 2015 yılı verilerine göre tüm dünya baz alındığında her 11 yetişkinden birinin DM hastası olduğunu tahmin etmektedir. Bu veriler 20-79 yaş sınırlaması çerçevesinde 415 milyon yetişkin bireyin DM hastası olarak

nitelendirildiğini göstermektedir. 2015 yılından sonra geçen kısa süreçte, DM prevelansı için 2019 yılı göstergeleri 463 milyon hasta sayısı ile tüm yetişkinlerin %9,3'üne tekabül etmektedir. Buna ek olarak 20 yaş altı 1,1 milyon çocuk ve ergen ise Tip 1 Diyabet ile hayatını devam ettirmektedir (32,33). Ülkemiz adına en son 2010 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ile birlikte Sağlık Bakanlığı'nın iş birliği çerçervesinde yürütülen TÜRDEP-II prevelans çalışması, Ocak-Haziran 2010 tarihleri arasında 15 ilde 20 yaş ve üzeri 26.499 kişiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma sonuçları, 1997-1998 yıllarında gerçekleştirilen TÜRDEP-I çalışmasıyla karşılaştırıldığında, geçen 12 yıl içerisinde ülkemizdeki diyabet görülme sıklığında %90 oranında bir artış gerçekleştiği saptanmıştır (34).

DM, ilerleyerek seyreden kronik bir hastalık olduğundan tedavisi ömür boyu sürmektedir. Bu yüzden DM tanısının kesinliği oldukça önemlidir. Genel olarak ağız kuruluğu, polifaji veya iştahsızlık, poliüri, noktüri, zayıflama, görmede bulanıklık, ayak uyuşması ve yanma hissi, idrar yolu enfeksiyonlarına ek olarak mantar enfeksiyonları ve kaşıntı, ciltte kuruluk ve yorgunluk gibi belirtiler göstermektedir. DM teşhisi uzun süredir Açlık plazma glikozu (APG) ve 75 g Oral Glikoz Tolerans Testi (OGTT) aracılığıyla konulmaktaydı. Yakın geçmişte ortalama 3 aylık açlık kan şekeri (AKŞ) değerini ifade eden ve kronik hiperglisemi belirteci olan HbA1c de kullanılmaya başlandı (35,36).

2.1.1. Diabetes Mellitus Tanı Kriterleri

Amerikan Diyabet Birliği'nin yönergelerine göre diyabet tanısı açlık kan şekerinin venöz kan plazmasında yapılan ölçümlerde minimum iki defa 126 mg/dl ve üzeri olarak ölçülmesiyle konmaktadır. Buna ek olarak gün içerisinde açlık durumu aranmaksızın random saatlerde alınan venöz kan plazmada yapılan ölçümlerde kan glikozu için 200 mg/dl ve üstü sonuç alınması, bunun yanında kilo kayıpları, poliüri gibi tanımlanmış diyabet semptomlarının varlığı tanı konulması için gerek ve yeterli sebeptir (37,38).

Diyabet açısından risk grubunda görülen bireylerde yine venöz kan plazmasından ölçülen AKŞ değerinin ADA'nın 1997 verilerine göre 110 mg/dl, WHO verilerine göre 140 mg/dl altında seyreden bireylerde düzenli aralıklar gözetilerek OGTT tekrarlı şekilde yapılarak diyabet aranmalı veya Bozulmuş Glikoz Toleransı (BGT) aranmalıdır (37).

Bu süreçte okunan AKŞ değerleri tanı için tek başına yeterli oluyorsa OGTT ihtiyacı doğmaz. Ancak hasta genel olarak semptom göstermiyorsa ama okunan değerler glisemi tanısına işaret ediyorsa OGTT ihtiyacı doğar ve tanıda önemli bir rol oynar. Diyabet türleri içerisinde Tip 1'in tanısı için OGTT başvurusuna gerek yoktur (37).

DM tanısı için Tablo 2.1.'de gösterimi yapılan değerler kullanılmaktadır (34). Buna ek olarak Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen ve National Diabetes Data Group (NDDG)'a göre geçerli sayılan tanı kriterleri de mevcuttur.

Tablo 2.1. Diabetes Melitus Tanı Kriterleri (34)

APG (Açlık Plazma Glikozu)	≥126 mg/dl
Rastgele ölçülen Plazma Glikozu + DM belirtileri	≥200 mg/dl
OGTT (Oral Glikoz Tolerans Testi)	≥200 mg/dl
HbA1c	≥ %6,5

- APG ölçümünde venöz plazmada glikoz oksidaz tekniği kullanılmalıdır.
- APG için min. 8 saat açlık istenmelidir.
- Rastgele ölçüm, günün istenilen zaman diliminde gıda alımına bağlı olmadan ölçülebilir.
- OGTT oral yolla 75 g glikoz takviyesi ile yapılmalıdır.
- Testlerin birbirine üstünlüğü söz konusu değildir.

WHO'ya göre venöz veya kapiller kandan glikoz ölçümlerinde AKŞ; 140 mg/dl ve üstü veya glikoz yüklemesinden 2 saat sonraki ölçümlerde venöz kan ölçümünün 200 mg/dl ve üstü, kapiller kan ölçümünün de 220 mg/dl üstü değerleri göstermesi gerekmektedir. BGT tanısı için AKŞ 100 mg/dl'den büyük, 140 mg/dl'den küçük olmalı veya glikoz yüklemesinden 2 saat sonraki ölçümlerde venöz kanda 140-199 mg/dl arası değerler gözlenmeli, kapiller kanda ise 160-219 mg/dl arası değerlerin gözlenmesi gerekmektedir.

2.1.2. Diabetes Mellitus Etiyolojik Sınıflandırması

Türkiye Diyabet Vakfı'nın 2019 yılında güncellediği verilere göre DM genel olarak 4 ana sınıfta toplanmıştır. Bu sınıflandırma ana diyabet formları olan Tip 1 DM, Tip 2 DM ve Gestasyonel DM ile birlikte Sekonder DM formları olan diğer spesifik grubu kapsamaktadır (36).

Tablo 2.2. Diabetes Mellitus Sınıflandırılması **(36)**

1. Tip 1 DM **Genellikle pankreas ß-hücre yıkımına bağlı mutlak insülin eksikliği**	a) İmmün sistem aracılı: Tip1 vakaların %95'i. %90 pankreatik Otoantikor (+) b) İdiyopatik: Tip1 vakaların %5'i. Otoantikor (-)
2. Tip 2 DM **Genellikle insülin direnci ve dolayısıyla insülin salınım bozukluğu**	İnsülin direnci, insülin yetmezliği, İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin salınım defekti,
3. Gestasyonel DM **İlk olarak hamilelikte ortaya çıkan ve çoğunlukla hamilelik sonlanmasıyla düzelen DM tipi**	Hamilelik esnasında ortaya çıkan karbonhidrat intoleransı
4.Diğer Spesifik Diyabet Türleri	a. Beta Hücre Fonksiyonunun Genetik Defektleri b. İnsülin Etkisinde Genetik Defektler c. Ekzokrin Pankreas Hastalıkları d. Endokrinopatiler e. İlaç ve Kimyasal Maddelerle Oluşan f. Enfeksiyonlar g. İmmün İlişkili Diyabetin Sık Olmayan Formları h. Diyabetle Birlikte Görülebilen Diğer Genetik Sendromlar

Tablo 2.3. Diğer Spesifik Diyabet Türleri **(36)**

Beta Hücre Fonksiyonunun Genetik Defektleri	-MODY'ler (Görülme sıklığına göre sıralama) HNF-1a (MODY 3) Glukokinaz enzim eksikliği (MODY 2) HNF-4a (MODY 1) IPF-1 (MODY 4) HNF-1b (MODY 5) NeuroD1 (MODY 6) -Mitokondrial DNA -Diğerleri
İnsülin Etkisinde Genetik Defektler	Tip A insülin direnci, Leprechaunism, Rabson-Mendenhall Sendromu, Lipoatrofik diyabet ve diğerleri
Ekzokrin Pankreas Hastalıkları	Pankreatit, Travma/pankreotektomi, Neoplazi, Kistik fibrozis, Hemokromatozis, Fibrokalkülöz pankreatopati ve diğerleri
Endokrinopatiler	Akromegali, Cushing Sendromu, Glukagonoma, Feokromasitoma, Hipertiroidi, Somatostatinoma, Aldosteronoma ve diğerleri
İlaç ve Kimyasal Maddelerle Oluşan Diyabet	Vakor, Pentamidin, Nikotinik asit, Glukokortikoidler, Tiroid hormonları, Diazoksid, b-adrenerjik agonistler, Tiazid diüretikler, Antipsikotik ilaçlar, Dilantin, Statinler, d-interferon ve diğerleri
İnfeksiyonlar	Konjenital kızamıkçık, Sitomegalovirus, Koksaki B Kabakulak Adenovirüsler ve diğerleri
İmmün İlişkili Diyabetin Sık Olmayan Formları	"Stiff-man" Sendromu, Antiinsülin reseptör antikoru ve diğerleri
Diyabetle Beraber Görülebilen Diğer Genetik Sendromlar	Down Sendromu, Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu, Wolfram Sendromu, Friedreich Ataksisi, Myotonik Distrofi Huntington Koresi ve diğerleri

2.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Tip 2 DM, insülin bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) türü olarak bilinen, asıl nedeni zamanla gelişen insülin direnci olan, buna ek olarak ß hücrelerindeki fonksiyonel bozukluklar ve hepatik glikoz sentez miktarındaki artışların da hastalık gelişiminde önemli rol oynadığı multifaktöriyel metabolik bir hastalıktır. Bu hastalıkta Tip 1 DM'nin aksine insülin sekresyonu ve üretimi mevcuttur (40,41).

Sebep olduğu akut ve/veya kronik komplikasyonlar ve dünya genelindeki insidansı göz önüne alındığında Tip 2 DM, morbidite ve mortalite nedenleri arasında oldukça önemli bir role sahiptir. Yayılımına bakıldığında Tip 2 DM, genel olarak orta yaş kesimi ve yaşlı kesimde daha sık görülen, genetik faktörler ve çevresel etmenlerin de hastalık gelişiminde etkili olduğu bir hastalık türüdür. Buna ek olarak, son zamanlarda hastalık gelişiminin adolesan ve genç nüfusta da oldukça arttığı bildirilmiştir. Tip 2 DM, bütün diyabetik olguların yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Hastalık yaş olarak erken dönemlerde başlamasına rağmen, klinik yönden semptomsuz dönemler halinde ilerler. İlk şikâyet bulguları ortalama 45 yaşlarında meydana gelir ve ilk tanı meydana gelen bu kronik şikayetler eşliğinde konmaktadır (42,43,44).

Obezite, yaşanılan coğrafya, ırksal köken, fiziksel aktiflik gibi etmenler hastalık oluşumunu etkileyerek bölgesel hastalık insidansındaki farklılıklara da yol açmaktadır. Örneğin Çin genelinde %2, Güney Pasifik üzerinde Nauru Adası civarında %40 prevelansa sahip olan Tip 2 DM, ABD'nin Arizona eyaletinde yaşayan Pima yerlilerinde %50 prevalansa sahiptir (45).

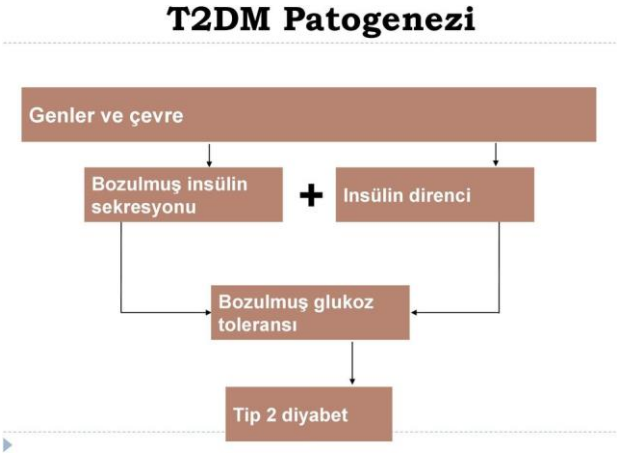
2.2.1 Tip 2 Diabetes Mellitus Patofizyolojisi

Tip 2 DM'nin patogenezi, karaciğer dokusunda ve kas dokularında meydana gelen insülin direnci, pankreatik insülin ekspresyonunun ve sekresyonunun zaman içinde giderek azalması sebepleriyle açıklanmaktadır. Buna ek olarak hepatik glikozun üretiminin artması da bu metabolik bozukluğa yol açan sebepler arasında gösterilmektedir ancak bu artışın metabolik bozukluk üzerinde primer bir etkisi olduğu yönündeki bulgular oldukça azdır. Vücutta glikoz homeostazı, insülin sekresyonu ve duyarlılığının sürekliliği ile mümkündür. Vücut dokularının ortamda insülin varken glikoz alabilme kabiliyeti (insülin hassasiyeti), hücrelerin ortamda insülin yokken glikozu metabolize edebilme

kabiliyetleri (glikoz hassasiyeti) ve pankreas ß hücrelerinin kandaki glikoz oranına göre insülin sekresyonu yaparak kan şekeri seviyesini düzenleyebilme yeteneği glikoz homeostazının sürekliliğini sağlamaktadır. Bu denge sağlıklı glikoz metabolizmasının sorunsuz işlemesine ve korunmasına olanak sağlar (46,47).

Sağlıklı bir metabolizmada, glikoz ihtiyacı yoksa insülin hormonu karaciğer üzerinde glikojenin glikoza dönüşümünü ve yeniden glikoz üretimi süreçlerini inhibisyona uğratır ve hepatik glikoz üretiminde baskılama görevi görür. Aynı zamanda ortam glikoz miktarına göre, glikozun periferik dokulara taşınmasına aracılık ederek glikojen depolanması veya ATP üretimi için oksidasyona uğramasını sağlamaktadır. Tip 2 DM'ye yol açan insülin direnci sonrasında, bu işlevlerin hepsi progresif olarak bozulur ve sonuç olarak hepatik glikozun üretimindeki baskılama azalır, üretimde artış meydana gelir. Yağ ve kas dokuları gibi periferik dokularda da insülin destekli glikoz kullanımı veya depolanma miktarı azalır (40,48).

Bu sonuçlar dolayısıyla vücut, hiperglisemi engelleme reaksiyonu olarak ß hücreleri aracılığıyla sürekli artan düzeyde insülin sekresyonu yaparak kandaki glikoz miktarını kompanse etmeye çalışır. Zamanla glisemi normal düzeye düşürülür ancak bu süreçte sağlıklı metabolizmaya kıyasla salgılanan insülin miktarı ortalamanın 2 katına kadar çıkabilmektedir. Böylece bireydeki açlık glisemisi normal düzeyden 140 mg/dL düzeylerine ulaştığında, salgılanan insülin düzeyi sağlıklı bireylere göre ortalama 2 kata kadar artmaktadır. Başlangıç döneminde ß hücreleri oldukça sağlıklı olsalar da çeşitli sebepler ve sürekli insülin ekspresyonu zamanla ß hücrelerinde fonksiyon kaybına sebebiyet vermektedir. Dolayısıyla total insülin sekresyonu giderek azalarak diyabet hastalığı kendini göstermektedir (40,48).



Şekil 2.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Patogenezi (49)

Tip 2 DM vakalarında, bireyin periferal dokularında insülin duyarlılığı azalmış ve insüline karşı direnç kazanılmıştır. Buna ek olarak bu vakalarda, langerhans adacıklarındaki ß hücreleri tarafından, kazanılan direnci aşabilecek insülin sekresyonu gerçekleşememektedir (46). Gelişen direncin sebebi olarak genetik fonksiyonel bozukluklar ve çevresel etkiler ileri sürülmüştür. Çevresel etkilerin başında obezite ve hareket eksikliği gelmektedir. Buna ek olarak, hastalık gelişimi ile alakalı ilerleyen yaş, soyağacında diyabet öyküleri, tütün kullanımı, genetik yatkınlık, pankreatik hastalıklar, hamilelik sırasında geçirilmiş gestasyonel diyabet (GDM), yaşanılan coğrafya ve ırk farklılıkları gibi birçok klinik risk içeren etmen bulunmaktadır. Tip 2 DM başlangıç yaşı olarak 40'lı yaşlar öne çıksa da son dönemlerde genç kesimde de hastalık seyri giderek artmaktadır (50,51).

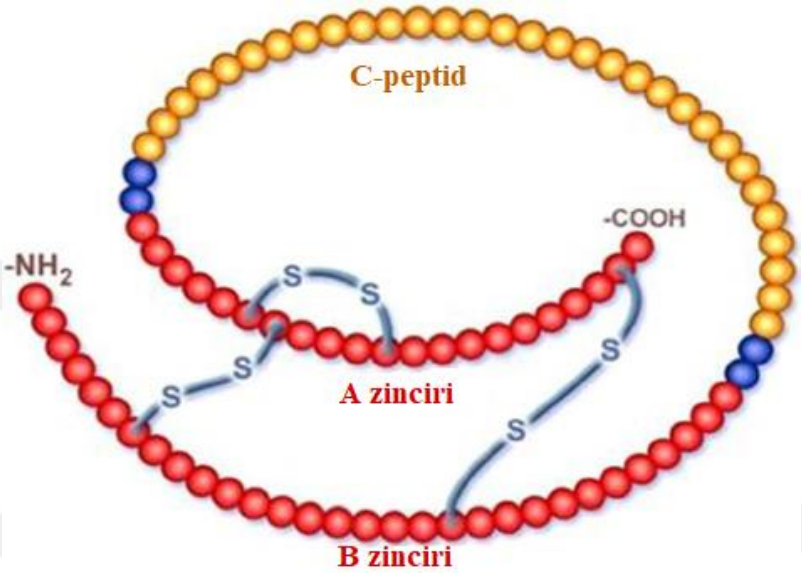
DM patogenezi belli süreçlerden oluşmaktadır. Preklinik evre olarak adlandırılan dönemde, kan glikozu düzeyi açlık ve tokluk durumunda normal düzeydedir ancak bu durumu sağlayan ß hücrelerinin aşırı fazla insülin sekresyonu yapması ve kan glikoz düzeyini normal aralıkta tutabilmek için total insülin üretiminin sağlıklı bireye göre neredeyse 2 kat artmasıdır. Zamanla ß hücrelerinin bu kadar fazla çalışması, hücresel yorgunluğa ve insülin sekresyonunda azalmaya sebebiyet verir.

Bu dönemde açlık glisemisi stabil düzeyde olduğu halde tokluk glisemisi yükselir. Bu durum glikoz intolerans evresi olarak adlandırılmaktadır. Bu dönemleri takiben insülin direnci progresif olarak artar. Bu durum karaciğer kaynaklı glikoz üretimi artışını da beraberinde getirir. Böylece zamanla açlık hiperglisemisi meydana gelir. Bu dönemde henüz açlık glisemisi 140 mg/dL altında seyreder ve bu aralık klinik diyabetin erken dönemi olarak adlandırılmaktadır. Hiperglisemi bu değeri aştığında, insülin direnci giderek artar ve aynı zamanda insülin salgısı da giderek azalır (52,53).

2.2.2. İnsülin Sekresyonu ve Glikozun İnsülin Sekresyonundaki Rolü

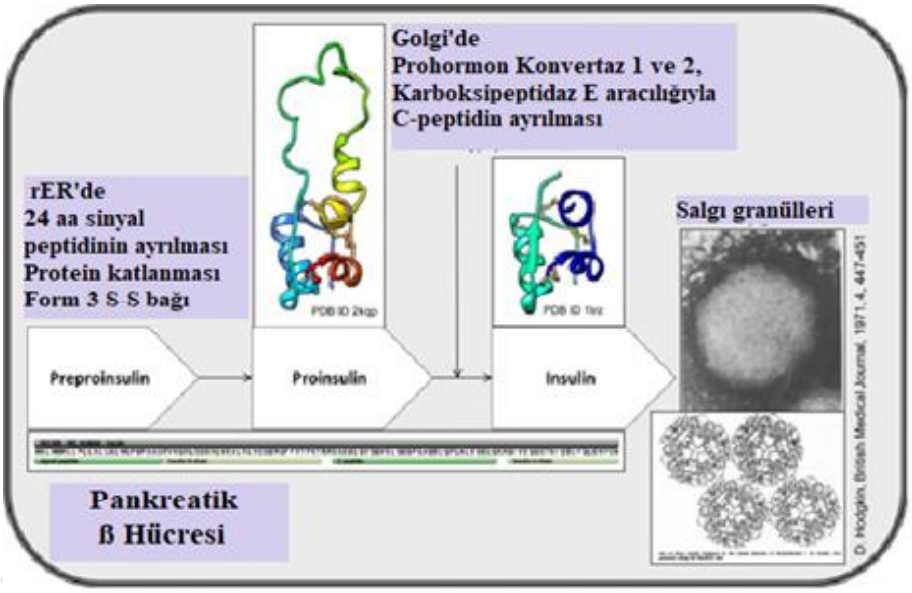
İnsülin, pankreasın hücresel boyutta yaklaşık %1'lik kısmını oluşturan ß hücreleri tarafından langerhans adacıklarında eksprese edilen bir hormondur. 51 aminoasit rezidüsünden meydana gelen insülin polipeptidi, A zinciri (21 aminoasitlik) ve B zinciri (30 aminoasitlik) olmak üzere ikili kovalent disülfit bağlarına sahiptir (54,55).

İnsülin ekspresyonu hücre çekirdeğinde mRNA sentezinden sonra aşamalı bir şekilde gerçekleşir. Sentezlenen mRNA sitoplazmada Granüllü Endoplazmik Retikulum (GER) aracılığıyla başlayan translasyonda önce preproinsülin sentezlenir. Bu aşamadan sonra sisternalarda preproinsülinden sinyal peptit çıkarılmasıyla pro-insülin üretimi gerçekleşir. Pro-insülin, yapı olarak B zincirinin N-terminal bölgesinden ve A zincirinin C- terminal bölgesinden C peptide bağlı bir şekildedir (54,55).

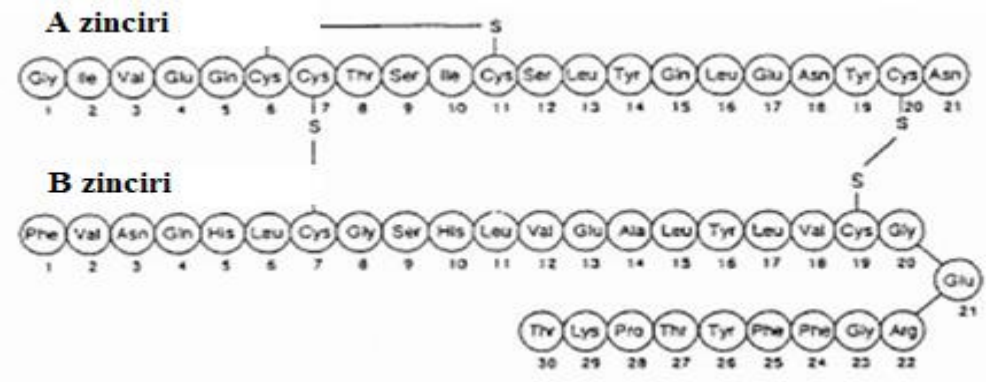


Şekil 2.2. Proinsülin Yapısı (56'dan değiştirilerek alınmıştır)

GER'den ayrılan pro-insülin, golgi üzerinde karboksipeptidaz gibi preteazlar ve pro-hormone converter gibi enzimler aracılığıyla C-peptid zincirinden kurtulur ve insüline dönüşür (54,55).



Şekil 2.3. Pankreas β Hücrelerinde İnsülin Biyosentezindeki Temel Adımlar (57'den değiştirilerek alınmıştır)



Şekil 2.4. İnsülin Molekülünün Yapısı ve Disülfid Bağları (58'den değiştirilerek alınmıştır)

İnsülin sekresyonu yapılırken C-Peptit sekresyonu da gerçekleşir. Üretilen pro-insülinin bir kısmı insüline dönüşmeden dolaşıma verilir, bu miktar dolaşımda bulunan immün reaktif miktarının ortalama %20'sine tekabül etmektedir. Dolaşımdaki pro-insülinin biyolojik aktifliği ve etkinliği insülinin %10'una karşılık gelmektedir (54,55). Sağlıklı erişkin bireylerde ß hücreleri tarafından 24 saatte ortalama 40-50 IU pulsatil bir şekilde insülin salgılanır. Bu miktarın yarısı bazalde (açlık durumunda, ekzojen stimülasyon olmadan) salgılanırken, yarısı sindirime yanıt şeklindedir. Sağlıklı erişkin bireylerde açlık durumunda bazal insülin düzeyi ortalama 10 IU şeklinde seyreder.

Yemek sonrası sindirim başladığında 10 dakika içerisinde insülin sekresyonu giderek artar. En konsantre insülin miktarı 30-45 dk arasında gözlemlenmektedir. Bu süre sonrasında beslenme sonrası kan glikozu hızlı şekilde düşürülerek 90-120 dk gibi bir süreçte bazal düzey miktarı yakalanır (59).

Stimüle edilmiş insülin sekresyonu, bir ekzojen stimüle edici faktöre verilen hücresel yanıt olarak başlatılır. İn-vivo şartlarda bu durum ß hücrelerinin yemek sonrası artan kan glikozuna yanıtı olarak açıklanır. 80-100 mg/dL miktarını aşan açlık kan glikozu, insülin sekresyonunu uyarmaya başlar. Her ne kadar c-AMP, lösin, mannoz gibi saptanmış insülin stimülatörleri varsa da en güçlü insülin stimülesi glikoz tarafından sağlanmaktadır (59).

Tablo 2.4. İnsülin Sekresyonunu Stimüle Eden ve İnhibe Eden Faktörler (60)

STİMÜLATÖRLER	İNHİBİTÖRLER
Kan glikozunun artması	**Kan glikozunun düşmesi**
Amino asitler (arginin, lösin gibi) Serbest yağ asitleri ß-keto asitler	
c-AMP ß2-adrenerjik stimülasyon Glukagon Teofilin	Somatostatin Leptin
Parasempatik stimülasyon Asetilkolin (M4 reseptörleri)	Sempatik stimülasyon α2-adrenerjik stimülasyon Galanin
İntestinal hormonlar (gastrin, sekretin, CCK, GIP, GLP-1**)**	
Sülfonilüre grubu oral antidiyabetik ilaçlar	Diazoxide, Thiazid diüretikleri, Fenitoin, Alloksan, Mikrotübül inhibitörleri

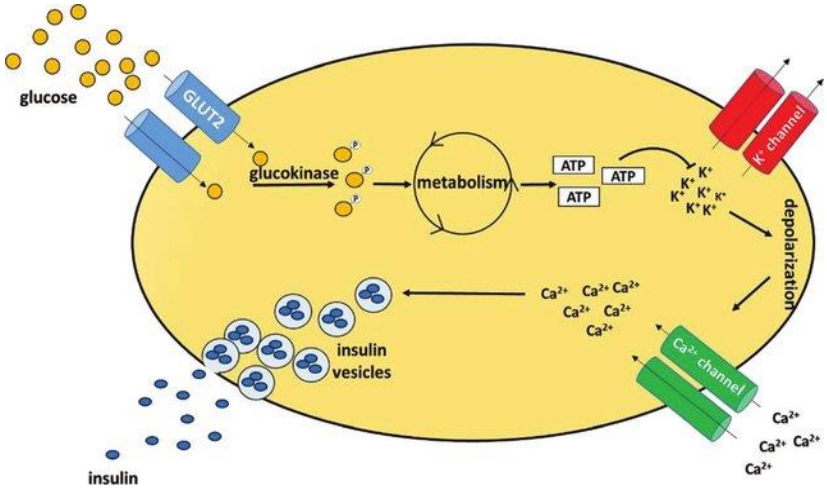
Glikoz, insülinin üretiminde ve sekresyonunda en aktif ve önemli görevi üstlenir. Molekül olarak hidrofilik yapıda olan ve polar özellik gösteren glikoz, büyük boyutlu bir

molekül olması dolayısıyla membran difüzyonu için bazı taşıyıcı transmembran proteinlerine gereksinim duyar. Glikoz taşıyıcıları veya GLUT kısaltmasıyla bilinen bazı transmembran proteinleri, Na^+ ve ATP bağımlı olmayıp glikozun hücre içerisine alınmasına aracılık ederler. Özellikle karaciğer, pankreas ve ince bağırsak bölgelerinde bulunan GLUT2 insülin sekresyonunda etkilidir (61,62).

Tablo 2.5. Bazı Transmembran Proteinleri ve Görevleri (62)

PROTEİN ADI	LOKALİZE DOKU	GÖREV
GLUT-1	Eritrosit, Böbrekler, Beyin	Hücre içine glikoz alımı
GLUT-2	Karaciğer, Pankreas, Bağırsak Hücreleri	Hızlı glikoz alımı, salınım kapasiteleri ve düşük afinite
GLUT-3	Böbrekler, Beyin	Hücre içine glikoz alımı İnsülin-stimüle edilmiş glikoz alımı
GLUT-4	Kalp, iskelet kası, yağ doku	
GLUT5	İnce bağırsak	Fruktoz ve glikoz emilimi

Sindirim süreci sonrası yükselen kan glikozu seviyesi pankreas langerhans adacıklarındaki ß hücreleri tarafından algılanır. Kandaki fazla glikoz, hücre membranları üzerindeki GLUT-2 transmembran proteinleri ile sitoplazma içerisine alınır. Başlayan glikoliz süreci ile glikoz pirüvata kadar yıkılır. Yıkım sonucu elde edilen ATP enerjisi ile ATP-linked K (ATP bağımlı potasyum) kanalları kapanarak ekstraselüler ortama potasyum çıkışı durdurulur. Potasyum kanallarının kapanmasıyla depolarize olan hücrede Ca (kalsiyum) kanalları açılır, böylece hücre içine alınan kalsiyumla sitoplazma kalsiyum miktarı artar. Kalsiyum, insülin barındıran veziküler membrana bağlanan bir haberci protein olarak görev yapar ve ekzositoz aracılı insülin sekresyonunu başlatır (61,62).

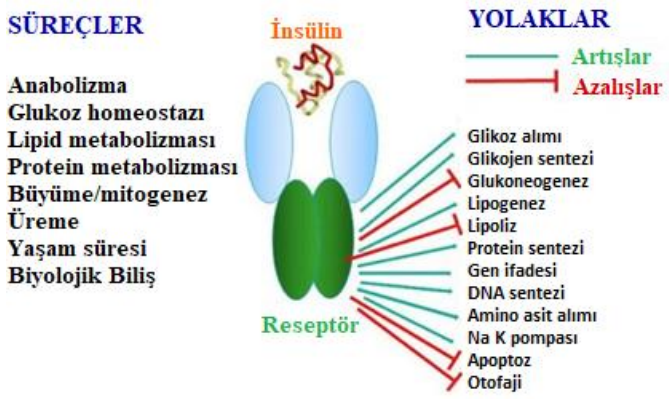


Şekil 2.5. GLUT2 Aracılı İnsülin Sekresyonu (63)

2.2.3. İnsülin Sinyal Yolakları ve Hedef Doku İşlevleri

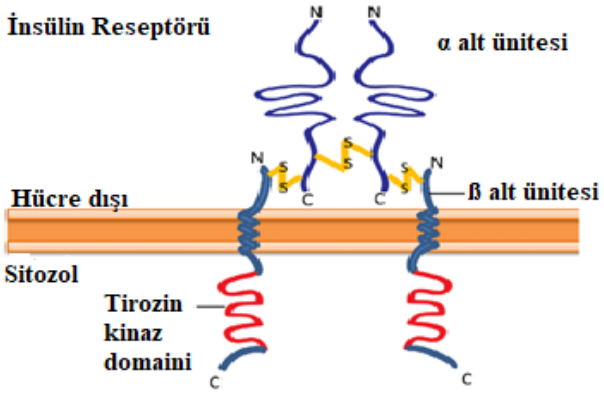
İnsülin, kandaki glikoz miktarının stabil düzeyde tutulmasının yanı sıra interselüler ve intraselüler madde transportu, hücre büyümesi ve diferansiyasyonu, stimülatör veya inhibitör proteinlerin uyarılması gibi farklı işlevlerde aktif rol alır.

İnsülin özellikle kas doku, yağ doku ve karaciğer dokusunda aktif rol oynamaktadır. İnsülinin bu dokulardaki rolü hücre içine glikoz transportudur. Çizgili kaslarda ve miyokard üzerinde protein sentezi ve glikojen sentezi gibi metabolik olayları aktive ederken, aynı zamanda karaciğer dokusunda glikojenoliz ve glukojenezi baskılar (64,65).



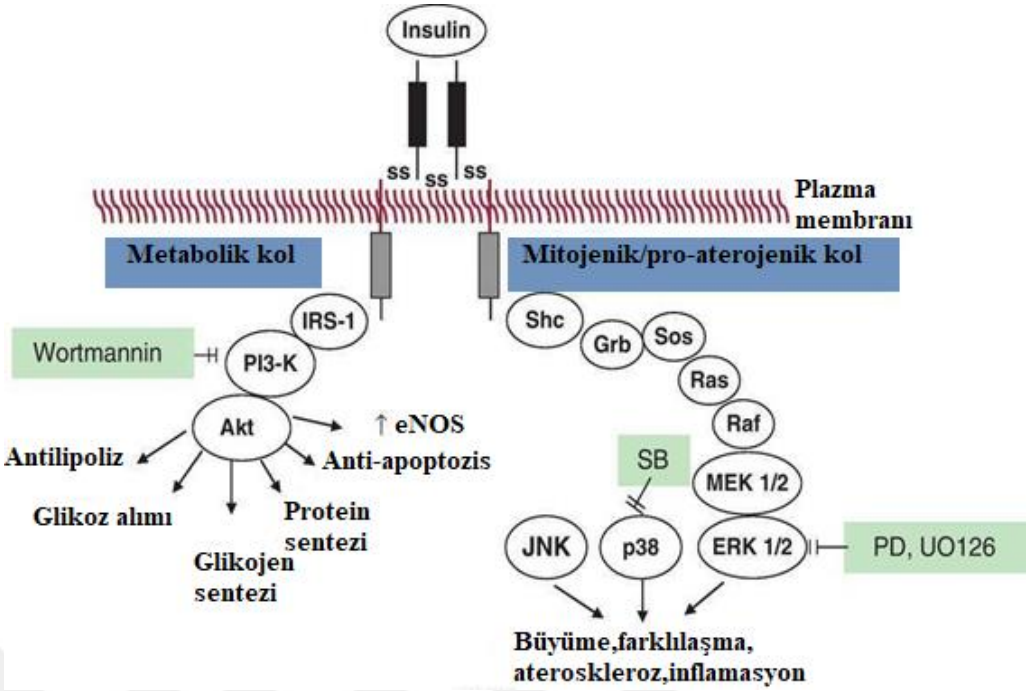
Şekil 2.6. İnsülin-İnsülin Reseptörü Pleiotropik Etkileri (66'dan değiştirilerek alınmıştır)

Pankreatik ß hücreleri tarafından sekrete edilen insülin, hücre sitoplazmasına girebilmek için İnsülin Reseptörü (IR)'ne ihtiyaç duyar. IR, enzim kenetli reseptör ailesinin bir üyesidir. 2 α ve 2 β subunite sahip olan glikoprotein bir yapı olan IR, ekstraselüler alanda bulunan α ünitesinde insülin bağlanma bölgesini barındırır. İntraselüler kısımda enzim aktivitesi bulunan IR, tirozin kinaz aktivitesi göstermektedir (64,67,68).



Şekil 2.7. İnsülin Reseptör (IR) Yapısı (69'dan değiştirilerek alınmıştır)

IR yapısında, reseptör ve enzim aynı proteindir. Heterotetramerik yapısı aracılığıyla ekstraselüler alanda reseptör görevini üstlenmektedir. Aynı zamanda intraselüler alanda tirozin kinaz aktivitesiyle efektör olarak birincil haberciler ve sekonder habercilere sinyal iletimini sağlar. IR'nin ligandı olan insülinin reseptöre bağlanması, reseptörün 3 boyutlu yapısının değişmesine ve bir dimerleşmeye sebebiyet verir. Böylece reseptörün sitoplazma kısmına bakan ucundaki enzimatik bölge aktivasyona uğrar. Aktif hale gelen reseptör hem transotofosforilasyonla kendini fosforile eder hem de sitoplazmadaki efektör ve ikincil haberci proteinlerini fosforilleyerek sinyal iletimini sağlar ve sinyal amplifikasyonunu başlatır (64,67,68).



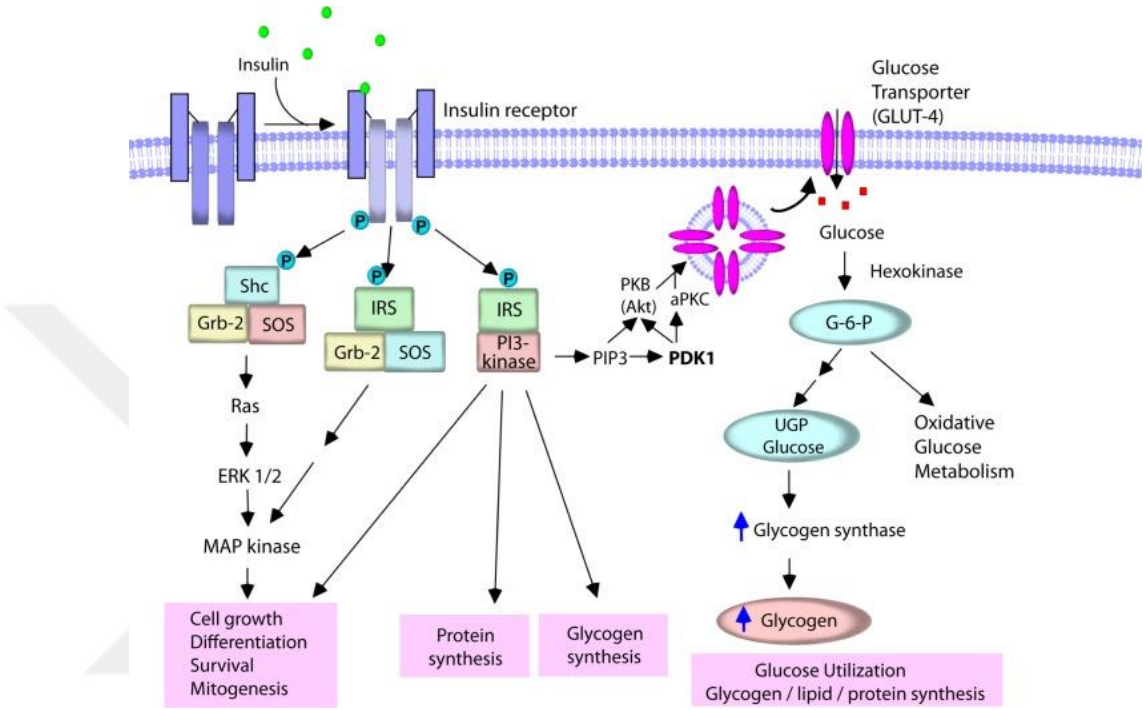
Şekil 2.8. İnsülin Sinyal Yolakları (70'den değiştirilerek alınmıştır)

İnsülin reseptörlerinin ß subunitinde gerçekleşen tirozin kinaz aktivasyonu, hücre içinde efektör görev gören insülin reseptörünün substrat proteinlerini (IRS-1,2,3,4) tirozin rezidülerinden fosforiller ve bu IR aktivasyonunun ilk etkisi olarak görülür. IRS'lerin fosforillenmesi hücre içinde sinyal aktarımını başlatır ve gerekli insülin etkisini sağlayabilecek çeşitli sinyal yolaklarının aktifleşmesine olanak sağlar.

Bu sinyal yolakları Fosfoinositid-3 Kinaz (PI3 Kinaz) ve Mitogen-activated protein kinase (MAPK) aracılı sinyal yolağı olmak üze iki ana gruptur. PI3 Kinaz yolağı, glikoz transportu, glikojen ve protein sentezi, lipoliz inhibisyonu, apoptoz inhibisyonu ve nitrik oksit miktarını arttırarak anti-inflamatuar etki gibi metabolik etkileri tetikler. MAPK sinyal yolağı ise hücre büyümesi, farklılaşması, ateroskleroz ve inflamasyon gibi mitojenik etkileri tetikler.

PI3 kinaz yolağının aktivasyonu, glikoz transportu yolağından sorumlu IRS-1 ve IRS-2 proteinleri tarafından gerçekleştirilir. Bu aktivasyon, PDK1 aktivasyonunu takiben GLUT-4 transport proteininin hücre membranına hareketini sağlar ve böylece hücre içine kandaki fazla glikozun alınmasına aracılık eder. MAPK sinyal yolağının aktivasyonu ise Grb2/sos aktivasyonu ile Ras-Raf-MEK-ERK sinyal kaskadının sonucu gerçekleşmektedir. Bu sinyal yolağında etkili olan molekül insülin benzeri büyüme

faktörü (IGF) proteinleridir. IGF, insülinle aynı sinyal yolaklarını aktive edebilen ve biyolojik açıdan aynı yanıtların oluşmasına aracılık eden bir polipeptid hormon molekülüdür (71-75).



Şekil 2.9. İnsülin Sinyal İletiminde PI3 Kinaz ve MAPK Yolakları (76)

2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Oluşumunda Rol Oynayan Faktörler

Malecki ve Klupa, 2005'de yaptıkları bir çalışmada Tip 2 DM'nin klinik tablosunun oluşumunda çevre ve genetik faktörlerin bir arada rol aldığını bildirmişlerdir. Genel olarak genetik faktörlerin çevresel faktörlerden daha etkin ve önemli olduğunu belirterek, bu genetik faktörleri monogenik ve poligenik faktörler olarak iki ana grupta toplamışlardır (77).

2.3.1. Tip 2 Diabetes Mellitus Gelişiminde Çevresel Faktörler

Tip 2 DM gelişiminde özellikle yaşlanma, vücut kitle indeksinin aşırı artışıyla gelişen obezite, coğrafi yaşam konumu, ırk farklılıkları, cinsiyet, fiziksel aktivite yetersizliği gibi birçok faktör rol oynamaktadır (45).

Hastalık yaşlanmaya bağlı olarak ciddi bir artışla seyretmektedir. 12 yıl boyunca takip edilen 65 yaşın üzerindeki 4000'den fazla Tip 2 DM hastasıyla yapılan çalışmada, 50'li yaşlarındayken vücut yağ oranı yüksek olan kişilerin, zaman içerisinde diyabet hastası olma olasılığının neredeyse 4 kat daha fazla olduğu raporlanmıştır.

Cinsiyet, Tip 2 DM üzerinde önemli rolü olan faktörlerden bir tanesidir. İskandinav ülkeleri hariç dünya genelinde kadınlarda Tip 2 DM prevelansı daha yüksektir. İskandinav ülkerinde erkekler daha fazla bu hastalığa yakalanmaktadır.

Irk farklılıkları, Tip 2 DM riskini etkileyen faktörlerden biridir. İspanyol kökenli bireyler, Amerika yerlileri, Asyalılar ve bunlara ek olarak siyahi bireylerde Tip 2 DM riski beyaz bireylere oranla daha fazladır.

Vücut yağ oranı ve obezite Tip 2 diyabet üzerindeki en ciddi risktir. Hastalığa sahip bireylerin %80'i obez veya obez adayıdır. Hastalık açısından vücuttaki yağların karın bölgesinde toplanması, uyluk çevresinde toplanmasından daha risklidir. Ancak son zamanlardaki araştırmalar, bel çevresinin diyabet hastalığı yönünden kilo fazlalığına göre daha önemli olduğunu göstermektedir.

Fiziksel aktivitenin önemi BGT hastalarında Tip 2 DM'ye yakalanma riskini azalttığını gösteren çalışmalarla kanıtlanmıştır. Hareketsiz ve aktivitesiz bir yaşam Tip 2 DM riskini oldukça arttırmaktadır.

Diyet ve sağlıklı beslenme, Tip 2 DM açısından oldukça önemlidir. Genellikle yağlı besinleri tercih edenlerde Tip 2 DM riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Cinsiyete bağlı hormonlar, Tip 2 DM gelişiminde özellikle kadınlarda globülin düzeylerinin azalması gibi durumlar hastalık riskini arttırmaktadır. Polikistik over sendrom tanısı olan kadınlarda kilo vermede zorluk, insülin direncindeki artış, buna bağlı yüksek insülin sekresyonu gibi sebepler de yine Tip 2 DM açısından büyük risk teşkil etmektedir.

Alkol ürünleri ve tütün ürünleri kullanımı da Tip 2 DM açısından risk teşkil etmektedir. Tütün ürünleri kullananların hastalığa yakalanma riski ortalama 2 kat artmakta ve hastalıktan sonraki komplikasyonlar daha ciddi olabilmektedir. Alkol tüketimi ise karaciğerde alkolün metabolize edilmesi sırasında glikoz sentezi engellendiği için glikojen depolarının fazla kullanımına sebebiyet vererek hipoglisemiyi tetikler (37,78).

2.3.2. Tip 2 Diabetes Mellitus Gelişiminde Genetik Faktörler

Tip 2 DM, çevresel ve genetik etkilere bağlı multifaktöriyel bir hastalıktır. Tip 2 DM prevelansında ırksal farklılığa göre hastalık görülmesi ve Pima halkındaki %50 hastalık prevelansı yalnızca çevre etkileriyle açıklanamayacak düzeydedir. Aile öyküsünde diyabetli birey bulunması, yapılan ikiz çalışmaları gibi durumlarda Tip 2 DM riskinin artması genetik faktörlerin yansıması olarak kendini göstermektedir. Yine diyabetli bireylerin kardeşlerinde hastalık riski yüksekliği, genel popülasyon riskine oranla 4 kat yüksektir. Buna ek olarak diyabetik bireylerin birincil akrabalarında diğer yakınlarına göre insülin duyarlılığında azalma görüldüğü ve ilerleyen yaşlarda diyabet olgularının daha sık görüldüğü raporlanmıştır. Tek yumurta ikizlerinde kardeşlerin aynı oranda hastalık durumu yaklaşık olarak %55 civarlarında iken, çift yumurta ikizlerinde bu oranın %15 civarlarında olması genetik faktörlerin etkisini göz önüne koymaktadır.

Tip 2 DM, multifaktöriyel heterojeniteye bağlı bir hastalık olduğu için, hastalıkla ilişkili genomik zeminde de bir heterojenite olduğu düşünülerek araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalar sonucu, Tip 2 DM'ye sebebiyet veren tek bir genin olmadığı tespit edilmiştir. Yalnızca gençlerde görülen erişkin benzeri diyabet türünün (MODY türlerinin) monogenik özellikler gösterdiği saptanmıştır. Bunun üzerine Tip 2 DM genetiği iki başlık altında toplanmıştır (45,81).

2.3.2.1. Monogenik Kökene Dayanan Diabetes Mellitus

Tip 2 DM, genelde monogenik ve poligenik olgular şeklinde iki ana grupta incelenmektedir. Monogenik olgular, tek bir gene bağlı mutasyonlar ve polimorfik yapılar sonucu hastalık oluşumuna yol açarlar. Bu olgularda genellikle spesifik klinik belirtiler ve fenotip yansımaları mevcuttur. Tip 2 DM gençlerde rastlanan erişkin tip DM (MODY) olguları hariç genelde poligenik seyreden ve bireysel farklılıklar gösteren çeşitli genetik varyasyonlar sonucu meydana gelmektedir. MODY olguları bütün olguların ortalama %5-10 kadarını kapsamaktadır. MODY, metabolik sendrom, mitokondriyal DM ve neonatal DM olguları, monogenik kaynaklı DM çeşitleridir (77,79).

MODY olgularının bu kadar net aydınlatılabilmesinin temelinde çok jenerasyona sahip aile bireyleriyle yapılan çalışmalar yatmaktadır. Erken yaş tanısı mümkün olduğu için monogenik olgular oldukça net tanımlanabilmiş ve genotipe bağlı fenotip özellikleri ortaya çıkarılabilmiştir. Genotip/fenotip durumu neredeyse 1 olan bu monogenik

olgularda, insülin sekresyonunda azımsanamayacak derecede şiddetli bozukluklar veya insülin hassasiyetinde fazla miktarda azalma görülmektedir (81,82).

Tablo 2.6. MODY Alt Tipleri: Gen Mutasyonları, Patofizyoloji ve Klinik Özellikleri (80)

MODY	GEN	PATOFİZYOLOJİ	KLİNİK ÖZELLİKLER
1	HNF4A	Transkripsiyon faktörü; azalmış insülin sekresyonu	Nadir (%5); yenidoğan hiperinsülinemi, düşük trigliserid, mikrovasküler komplikasyonlara eğilim, sülfonilürelere duyarlılık
2	GCK	Fosforilasyon defektinden dolayı azalan glikoz duyarlılığı; glikojen depo azlığı	Yaygın (%30-50) artmış açlık glikozu, OGTT'de artmış glikoz olasılığı <55 mg/dL; genellikle ilaç gerektirmeyen hafif diyabet
3	HNF1A	Transkripsiyon faktörü; azalmış insülin sekresyonu, progresif ß-hücre hasarı	Yaygın (%30-50), yüksek penetrans; glikozüri, mikrovasküler komplikasyonlar, sunfonilüreye duyarlılık
4	POX1/IPF	Bozulmuş pankreas gelişimi, homozigotik pankreas agenezisi gelişimi	Nadir (%1), tanı anındaki ortalama yaş 35, oral anti-diyabet tedavisi gerektirir (ve insülin)
5	HNF1B	Transkripsiyon faktörü; azalmış insülin sekresyonu	Nadir (%5), diyabetle birlikte ekstra pankreatik bulgular (böbrek kistleri veya displazi, kadınlarda genital anormallikler, erkeklerde azospermi), değişken fenotip; insülin tedavisi gerektirir
6	NEUROD1	ß-hücre fonksiyonlarının anormal gelişimi	Çok seyrek (<%1) erişkin başlangıçlı diyabet
7	KLF11	Tümör baskılayıcı gen; ß hücrelerinin glikoz duyarlılığında azalma	Çok seyrek (<%1), tip 2 diyabete benzeyen fenotip
8	CEL	Azalmış endokrin ve ekzokrin pankreas fonksiyonları	Çok seyrek (<%1), tipik otozomal dominant diyabet
9	PAX4	Apoptozu ve ß hücre poliferasyonunu etkileyen transkripsiyon faktörü	Çok seyrek (<%1), olası ketoasidoz
10	INS	İnsülin geninin heterozigot mutasyonu	Çok seyrek (<%1), 20 yaşından önce başlayan diyabet; sülfonilüre veya insülin tedavisi genellikle gereklidir
11	BLK	İnsülin salınımını etkileyen heterozigot mutasyon	Çok seyrek (<%1), daha yüksek vücut kitle indeksleri ile artan etki
12	ABCC8	ATP'ye duyarlı potasyum kanalları disfonksiyonu	Çok seyrek (<%1), çok seyrek klinik fenotip HNF1A / 4A-MODY'e benzerdir
13	KCNJ11	ATP'ye duyarlı potasyum kanalları disfonksiyonu	Çok seyrek (<%1), klinik fenotip heterojendir

2.3.2.2. Poligenik Kökene Dayanan Diabetes Mellitus

Tip 2 DM'de poligenik olgular multifaktöriyeldir. Birden fazla gen yapısının çevresel şartlarla birlikte etkin olması sonucu meydana gelmektedir. Bu genetik çeşitlilik, heterojen hastalık olgusuna sebep olduğu için, bireylerde Tip 2 DM görülme yaşının,

hastalığın progresif tavrının ve bilinen tedavilerden alınan yanıtın çok farklı seyretmesine sebep olmaktadır. Tip 2 DM ile ilişkili genlerin tespiti için tüm genom analizleri, linkage analiz yöntemleri gibi teknikler araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Poligenik kökene dayanan Diabetes Mellitus'un genetik zemininin aydınlatılmasında 2007'de yürütülen ilk genomik çapta ilişkilendirme (GWA) çalışmasında oldukça önemli sonuçlar raporlanmış ve bu çalışma Tip 2 DM genetiği hakkında başlatılan çalışmalar için zincirin ilk halkasını oluşturmaktadır. Bu çalışma sonucu son zamanlarda, Tip 2 DM gelişmesi ile önemli düzeyde ilişkili olduğu saptanan genler arasında PPARG, TCF7L2, FTO, KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A, MCR4, HHEX, IGF2BP2 ve SLC30A8 bulunduğu bildirilmiştir (83-86).

Bu genler arasından KCNJ11, ATP bağımlı K (potasyum) kanalı Kir6.2 adacığını kodlar, TCF7L2 ise proglukagon geninin ekspresyonunda görevlidir. Böylece glukagon benzeri peptit-1 sentezinin regülasyonunda görev alır. HHEX, CDKN2A, SLC30A8, CDKAL1, KCNQ ve IGF2BP2 gibi genlerdeki varyasyonların insülin sekresyonu, ß hücrelerinin fonksiyonel regülasyonu ve insülin direncinde rol aldığı raporlanmıştır. Ayrıca PPARG genindeki varyasyonların insülin salınımında rol oynadığı, CAPN10 genindeki varyasyonların glikoz taşınım yolağında görev aldığı, MCR4 ve FTO gen mutasyonlarının da obezite ile ilişkileri raporlanmıştır (83-86).

Poligenik Tip 2 DM ile ilişkili bilinen aday genler, 2008'de yapılan üç ayrı GWA çalışmalarında daha da genişletilmiştir. Çalışmalar sonucunda JAFZ1, TSPAN8-LGR5, THADA, NOTCH2, ADAMTS9, CDC123-CAM-KID genlerinin Tip 2 DM ile ilişkisi raporlanmıştır. Sonrasında 2009 yılında yaklaşık 40 bin kişinin dahil olduğu 10 ayrı genomik çapta ilişkilendirme çalışması daha yapılmıştır. Buna ek olarak 2010'da 21 GWA çalışmasının sonuçları meta analiz yöntemiyle değerlendirilmiştir. Çalışmalar devam ettikçe yeni ilişkili genler literatüre eklenmiştir. 2015 itibariyle Avrupa ve Asya popülasyonlarında toplam 70 lokus Tip 2 DM ile ilişkili bulunmuştur. Bu lokuslardaki genlerin fizyolojik etkileri göz önüne alındığında genellikle ß hücrelerinin fonksiyonelliği, insülin ekspresyonu ve sekresyonu ile alakalı olduğu raporlanmıştır. Bu lokusların az bir kısmının ise insülin hormonunun aktivite düzenlemesiyle ilgili görev aldığı kaydedilmiştir (88-89).

Freeman ve Cox, 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada Tip 2 DM ile ilişkili genleri biyolojik fonksiyonlarına göre sınıflandırarak raporlamışlardır. Bu genlerin dolaylı

yoldan veya doğrudan diyabet gelişimine katkı sunduğunu ortaya koyarak Tip 2 DM'nin genetik temel ağına önemli katkıda bulunmuşlardır. Tablo 2.7.' de bu çalışmada raporlanan genler verilmiştir.

Tablo 2.7. Tip 2 Diabetes Mellitus İlişkili Genler ve Biyolojik Fonksiyonları **(87)**

BİYOLOJİK FONKSİYONLAR	T2DM İLİŞKİLİ GENLER
İnsülin Aktivitesi (Farklı Dokularda)	ENPP1, INSR, IRS1, IRS2, RBP4, PIK3R1, PPP1R3A, FOXO1, FOXA2
Karaciğer Fonksiyonu	FABP2 , GYS1 , GCGR , IGF1 (ve diğer dokular)
Adiposit Fonksiyonu	PPARγ , ADIPOQ , ADRß3 , RBP4
Enerji Homeostazisi	PGC1 , SIRT1
ß hücre disfonksiyonu	Endotelyal NOS3, TCFL72, Kir6x & ABCC8 (hipotalamus)
Diğer dokularla bağlantılı genler	CAPN10, HNF4α, TCF1 (HNF1α), ABCC8, (SUR1), KCNJ11 (Kir6.2), SLC2A2 (GLUT2), UCP2, FOXO1, IAPP, INS, NNT, GCK, SIRT1, ARNT

Bunlara ek olarak yapılan GWA çalışmalarında rapor edilen genler, diyabet komplikasyonlarının hızlandırdığı kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilendirilmiştir. Tip 2 DM ve kardiyovasküler hastalıkların patogenezinde insülin direnci, inflamasyon, oksidatif stres, dislipidemi, obezite, yüksek kan basıncı gibi ortak bulgular ve semptomlara sahip olması ortak aday genlerle alakalı bu çalışmanın başlatılmasında kilit rol oynamıştır. Tip 2 DM ve kardiyovasküler hastalıkta genetik temelin ortaklığını gösteren sonuçlar ve ortak genler raporlanmıştır (90).

Yapılan diğer çalışmalarda, özellikle oksidatif stres diyabette aterojenez gelişiminde en önemli etken olduğu için redoks dengesiyle ilişkili genler incelenmiştir. Süperoksit dismutaz geninin Ala16Val (rs4880) polimorfizmi en çok rastlanan gen varyasyonudur. Diyabetli kadınlarda kardiyovasküler hastalığa yakalanma riskinin daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Buna ek olarak Adinopektin geninin 276 G/T tek nokta mutasyonu, Tip 2 DM'li hastalarda koroner arter hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, ADIPOR1 geninin rs266729 promotör varyantı da yine oksidatif stresle birlikte kardiyovasküler hastalık riskiyle ilişkilendirilmiştir. (90).

Tablo 2.8. Tip 2 Diabetes Mellitus ve Kardiyovasküler Hastalıkta Ortak Genler (90)

GEN	BAĞIL PROTEİN İŞLEVİ	GENETİK VARYANTLARIN ROLÜ
Adinopektin	Anti inflamatuar ve antiaterojenik etkilere sahip adipokin	↑ Risk
ADIPOR1	Adiponektin reseptörü. Yağ asitleri ve glikoz metabolizması	↑ Risk
ApoE	Lipoprotein taşınımı	↑ Risk
CDKN2A/2B	Sikline bağımlı kinaz inhibitörü. Hücre döngüsünün düzenlenmesi	↑ Risk
CELSR2-PSRC1-SORT1	CELSR2, temas aracılı iletişime dahil olan katerin üst ailesinin bir üyesidir. PRSC1 (prolin ve serin açısından zengin sarmal 1), mitozda önemli bir rol oynar. SORT1 (sortilin 1), farklı proteinlerin hücre yüzeyine veya hücre altı kompartmanlarına trafiğinde rol oynar.	↓ Risk
GLUL	Amonyak ve glutamat detoksifikasyonu, asit-baz homeostazı, hücre sinyali ve hücre proliferasyonunda rol oynayan enzim	↑ Risk
HMGA1	Hücre büyümesinde, farklılaşmasında ve glikoz metabolizmasında rolü olan mimari transkripsiyon faktörü	↑ Risk
HNF1A	Hepatik nükleer faktör 1A, gelişim ve metabolik homeostazda rol oynar.	↑ Risk
HP	Hemoglobin bağlanma kapasitesi. Anjiyogenez ve kolesterol kristalizasyonu teşvik edici aktivitede yer alır.	↑ Risk
PARAOXONASE	Lipid oksidasyonuna karşı koruyan enzim.	↑ Risk
PCSK9	Plazma kolesterol metabolizmasında rol oynar.	↓ Risk
PHACTR1	PHACTR1 aktine bağlanır ve aktin hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde rol oynar.	↑ Risk
SOD2	Toksik süperoksiti hidrojen peroksit ve iki atomlu oksijene dönüştürür.	↑ Risk
TCF7L2	Wnt sinyal yolağının bir ünitesi	↑ Risk

Diyabete bağlı olarak gelişen nefropati, diyabetik bireyleri etkileyen ikincil önemli komplikasyonlardan biridir. Yapılan araştırmalarda DN ile ilişkili gen varyantları araştırılmıştır.

Bu araştırmalar sonucu, interlökin ailesinden IL-6 promotör bölgesinde 634 C/G polimorfizmi, TNF -a- 308 G/A polimorfizmi, COL4A1 genindeki iki SNP (rs614282 ve rs679062), Laminin ailesinden LAMA4 geninin rs3734287 varyantı ve LAMC1 geninin rs20557 varyantı DN ile ilişkilendirilmiştir.

Bunlara ek olarak Anjiyotensin1-dönüştürücü enziminde D allelinin DN'ye yatkınlıkta rol oynadığı, AT2R 1332 G:A polimorfizmi, NOS3 G894T missens mutasyonu, NOS3 promoter (rs2070744) içerisinde T786C tek nükleotid polimorfizmi, Katalaz geninin rs560807 varyantı ve SOD2 geninde V16A, rs4880 valin-alanin polimorfizmi DN ile ilişkili bulunmuştur.

Adinopektin rs182052 minör allel A, APOE geninin E2 ve E4 varyantları, Aldoz Redüktaz AC dinükleotid polimorfizmi, GLUT1 (XbaI -intron 2 ve HaeIII SNPs-ekson 2) polimorfizmleri DN ile ilişkili bulunmuştur (91).

Tablo 2.9. Diyabetik Nefropatiyle İlişkili Bazı Genler (91)

GEN KATEGORİSİ	GEN VARYANTI SEMBOLÜ	LOKASYON	FENOTİP
Büyüme Faktörleri	IGF-1	12q23.2	Tip 1 DN
	IGFBP-1	7p14	Tip 2 DN
	TGF ß R2	3p24.1	Tip 1 DN
	TGF ß R3	1p22.1	Tip 1 DN
Matris	TIMP3	22q12.3	Tip 1 DN
Metaloproteinazlar ve	MMP9	20q13.12	Tip 1 DN
Dipeptidazlar	CNDP1	18q22.3	Tip 2 DN
Transkripsiyon	HNF1B1/TCF2	17q12	Tip 1 DN
Faktörleri	NRPI	10p11.12	Tip 1 DN
	PRKCBI	16p12.1	Tip 1 DN
	USFI	1q23.3	Tip 1 DN
Diğer Genler	ELMO1	7p14	Tip 2 DN
	p22phox	16q24.3	Tip 1 DN
	GPXI	3p21.3	Tip 1 DN
	BCL2	18q21.33	Tip 1 DN
	AQPI	7p14.3	Tip 1 DN

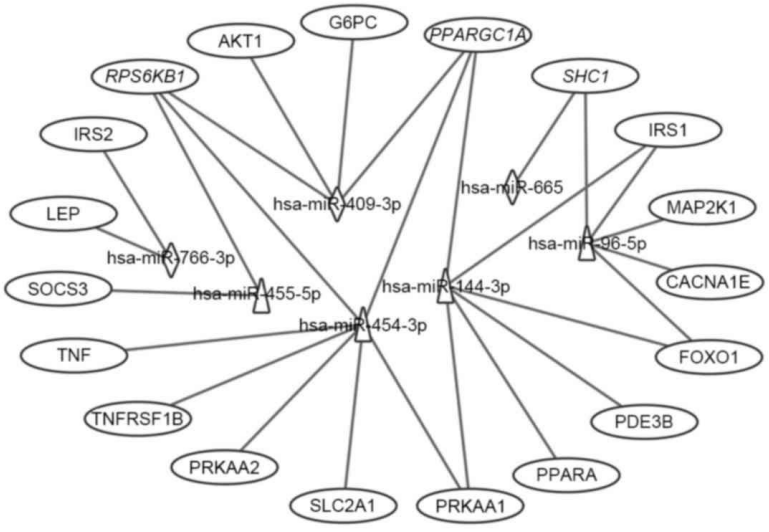
Bu genetik faktörlere ek olarak, mRNA'ların regülasyonunda görevli mikro RNA (miRNA) türlerinin de diyabet gelişiminde etkin rol oynadıkları kaydedilmiştir. miRNA'lar çok çeşitli hastalıkların patogenezinde ve biyolojik işlevlerde oldukça önemli roller üstlenmektedir. mRNA yıkımı, tranlasyonun inhibe edilmesi gibi biyolojik

süreçlerin işleyişinde rol alan miRNA'lar gen ekspresyonu ve regülasyonunda oldukça etkili roller üstlenmektedir (92).

miRNA'lar; hücresel diferansiyasyon, hücre sağ kalımı, çoğalma ve sinyal iletimi gibi organizmanın önemli biyolojik fonksiyonlarında dolaylı olarak etki ederek mRNA düzenlenmesi aracılığıyla işlev görürler. Genom üzerinde RNA dizinlerinin intron ve ekzonlarında yer alabilen miRNA'lar patolojik şartlarda ilgili genlerin sentezini düzenlerler (92).

Yapılan çalışmalarda Tip 2 DM olgularında, kanda glikoz miktarının artmasıyla ilişkili miR-26a-5p, -320a, -26b-5p, -192-5p, 29b-3p, -130b-3p, 29c-3p, -125b-1-3p, -221-3p, -140-5p olmak üzere on tane miRNA tanımlanmıştır. Bunun yanında arterlerde miR221 ve miR222 ekspresyon seviyelerinin Tip 2 DM hastalarında yükseldiği saptanmıştır. Bu belirteçlere ek olarak, Tip 2 DM hastalarında miR-9, miR-124a, miR-30d, miR146a, miR34a, miR375, miR-29a ekspresyon seviyeleri, glikoz toleransı normal düzeyde olan birey genotipleriyle karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları, sağlıklı birey genotiplerine göre Tip 2 DM'li bireylerde bu miRNA'ların ekspresyon seviyelerinin oldukça yüksek olduğunu ortaya çıkarmıştır (93).

Tip 2 DM teşhisi açısından önem arz eden miRNA'lardan, miR320a, miR-222, miR142-3p, miR375 ve miR-27a ekspresyonlarının arttığı, miR-20b, miR-652, miR-17, miR-197 ekspresyonlarının azaldığı kaydedilmiştir (93).



Şekil 2.10. Tip 2 Diabetes Mellitus, İnsülin ve Adipositokin Sinyal Yolakları ile İlişkili Diferansiyel miRNA'lar ve bunların T2DM Hedef Genlerinin Etkileşim Ağları

Üçgenler, yukarı regüle edilmiş miRNA'ları; elmaslar aşağı regüle edilmiş miRNA'ları ve ovaller Tip2 DM için hedef genleri temsil etmektedir. İtalik yazıyla belirtilen genler (RPS6KB1, PPARGC1A ve SHC1), aşağı regüle ve yukarı regüle miRNA'lar tarafından hedeflenen genleri gösterir. ACNA1E, kalsiyum voltaj kapılı kanal alt birimi a1E; TNFRSF1B, tümör nekroz faktörü a reseptör süper ailesi, üye 1B; IRS, insülin reseptörü substratı; SOCS3, sitokin sinyallemesinin 3 baskılayıcısı; PPARGC1A, peroksizom proliferatör ile aktifleştirilen reseptör p, koaktivatör 1α; PPARA, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör a; PRKAA1,protein kinaz, AMP ile aktive olan, a1; AKT1, mürin timoma viral onkogenin homoloğu 1; SLC2A1, çözünen taşıyıcı aile 2, üye 1; G6PC, glikoz-6-fosfataz, katalitik alt birim; LEP, leptin; SHC1, Src homoloji 2 alanı içeren, dönüştüren protein 1; MAP2K1, mitojenle aktifleştirilen protein kinaz kinaz 1; RPS6KB1, ribozomal protein S6 kinaz, 70 kDa, polipeptit 1; PDE3B. fosfodiesteraz 3B; FOXO1'de Foxhead box O1 genini temsil etmektedir (94).

2.4. Tip 2 Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabetle ilişkili yapılmış klinik çalışma sonuçlarından elde edilen veriler, yüksek miktardaki glikoz düzeyinin diyabete bağlı gelişen komplikasyonların temelinde yatan en önemli etken olduğunu ortaya koymuştur. Diyabet dolayısıyla gelişen hiperglisemi, metabolik mekanizmalarda düzensizliklere yol açarak kompleks ve multifaktöriyel etkileşimler sonucu diyabet komplikasyonlarına sebep olmaktadır. Diyabete bağlı olarak artan oksidatif stres, endotel fonksiyonunda düzensizlik ve hasara yol açarak özellikle vasküler sistemle ilişkili komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Diyabet hastalığı süresince seyreden hiperglisemi kaynaklı meydana gelen akut ve kronik (mikrovasküler, makrovasküler) komplikasyonlar diyabet hastalarında mortalitenin yükselmesinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır (95).

2.4.1. Tip 2 Diabetes Mellitus'da Akut Komplikasyonlar

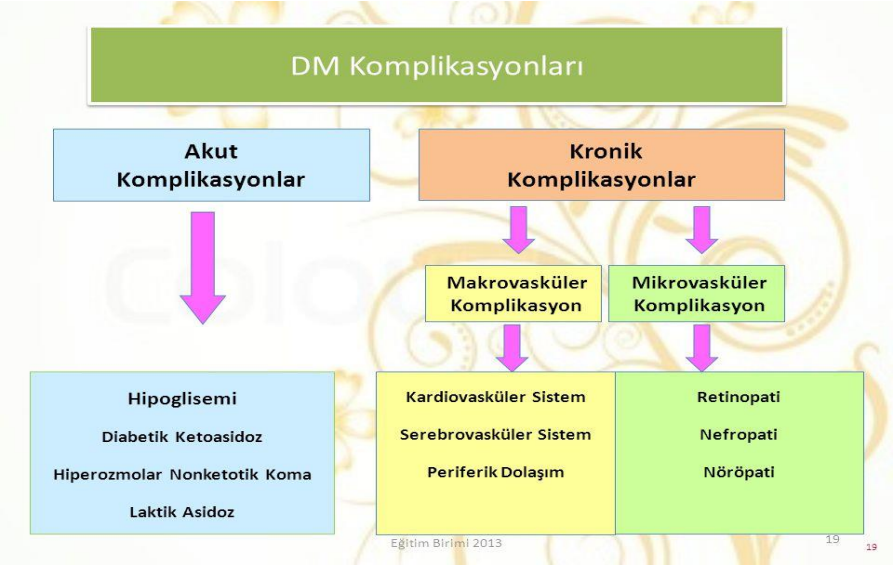
Hipoglisemi: Yetersiz beslenme, aşırı egzersiz veya fazla insülin miktarına bağlı olarak kan şekerinin fazla miktarda (45 mg/dL altına) düşmesidir. Meyve suyu, bir miktar toz şeker veya kesme şeker kullanımıyla düzelebilen akut komplikasyonlardan bir tanesidir. Aynı zamanda Whipple Triadı olarak bilinir.

Ketoasidaz: Diyabetik Ketoasidaz (DKA); Ortamda insülin eksikliği veya yetersizliği olmadığı durumda kandaki karbonhidratların hücrelerde kullanılamaması, bununla birlikte karbonhidrat açısından yetersiz beslenme sebepleriyle meydana gelmektedir. Vücut, gereken enerjiyi yağ metabolizmasını kullanarak elde etmeye çalışır, bu durum da asetoasetik asit-aseton gibi ketonların üretimini arttırmaya başlar. Kan glikoz miktarı ve keton miktarı arttığı için müdahale edilmediği takdirde ölümle sonuçlanabilir. Tip 1'de daha sık görülür.

Laktik Asidoz: Daha çok Tip 2 Diyabetli kişileri etkileyen bu komplikasyon, vücutta biriken laktik asit sonucu meydana gelir.

Hiperosmolar Osmotik Hiperglisemi: Bu komplikasyonun sorumlusu glukagon hormonudur. Kanı sindirim sistemine taşıyan damarlardaki glukagon/insülin hormonları oranının yükselmesi, karaciğerdeki glikozun yeniden yapımını ve glikojeninyıkımını arttırarak hiperglisemi meydana getirir. Bu olgularda ketoasidaz yoktur. Böbreklerin çok fazla idrar oluşturmasıyla hızlı sodyum-potasyum kaybı yaşanır. Gelişen bu komplikasyonun kardiyak aritmisine ve ölüme yol açabileceği bildirilmiştir.

Fungal ve Bakteri Kaynaklı Enfeksiyonlar: Diyabet hastalığı olan bireylerde sık sık mantarlara ve bakterilere bağlı olarak cilt enfeksiyonları veya tırnak enfeksiyonlarına daha fazla yatkınlık mevcuttur (95,96).



Şekil 2.11. Diyabet Komplikasyonları Şeması

2.4.2. Tip 2 Diabetes Mellitus'da Kronik Komplikasyonlar

Diyabetik hastaların dokularında ve organlarında meydana gelen biyokimyasal değişiklikler morfolojik sorunları ve fonksiyonel değişiklikler kronik komplikasyonları açıklamaya yardımcı olur. Kronik komplikasyonlar, mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar olarak gruplandırılmaktadır.

2.4.2.1. Mikrovasküler Komplikasyonlar

Diyabete bağlı gelişen mikrovasküler komplikasyonlar 3 gruba ayrılmıştır (97,99,100).

Diyabetik Nefropati: Genelde glomerüllere giden kılcal damarlardaki hasar dolayısıyla böbrek fonksiyonlarının progressif bir şekilde bozulması nefropatiye yol açar. Tip 2 DM'li hastalarda %5-10 oranında SDBY seyretmektedir. Mikroalbüminüri (idrar mikroalbümin/kreatin 30 nefropatinin erken belirtecidir ve başlangıç olarak kabul edilmektedir.

Diyabetik Retinopati: Kronik seyreden hiperglisemi sebebiyle gelişir. Hipertansiyon gibi parametrelerin de retinopati oluşumunda etkisi olduğu için multifaktöriyel bir komplikasyondur. Retinada bulunan kılcal damarların kanda sürekli yüksek seyreden glikoz düzeyine bağlı olarak fonksiyonel bozukluklar yaşanır. 20 yıldan uzun süredir diyabetli bireylerde retinopati %60 prevelansa sahiptir.

Nöropati: Diyabetik bireylerin hemen hemen yarısında etkili olan bir komplikasyondur. Ayak ve bacaklarda duyu kaybı, diyabetik ayak veya bacak yarasına sebebiyet vererek ampütasyon mecburiyeti doğurabilmektedir. İktidarsızlık etmenlerinden biri olarak tanımlanır.

2.4.2.2. Makrovasküler Komplikasyonlar

Diyabete bağlı makrovasküler komplikasyonlar 3 grupta toplanmıştır (98,99,100).

Koronar arter hastalığı (Ateroskleroz): Genellikle arterlerin iç tabakasında kolesterol, yağ ve inflamatuar atıkların birikmesiyle plak oluşumu gelişir. Plaklar damar lümenlerinin daralmasına ve damarların sertleşmesine yol açar. Obezite, sigara ateroskleroz açısından riski arttırmaktadır.

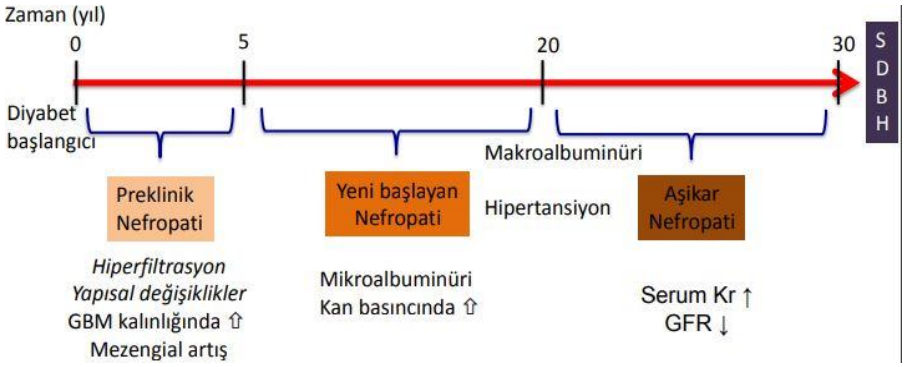
Periferik Arter Hastalığı: Ateroskleroz kaynaklı kollara, iç organlara ve alt ekstremitelere kan akışını sağlayan damarlarda tıkanma nedeniyle meydana gelmektedir.

Serebrovasküler Hastalık: Beyni besleyen damarlarda tıkanma ile meydana gelir. Oksijen ve besinden mahrum kalan beyin bölgesi ile alakalı belirtiler gösterir.

2.5. Diyabetik Nefropati

Diyabet komplikasyonları arasında en yaygın prevelansa sahip mikrovasküler bir komplikasyon olan DN, dünya genelinde böbrek yetmezliği hastalığının veya replasman tedavisi gerektiren böbrek hastalıklarının zeminini oluşturan en önemli fonksiyonel bozukluklardan biridir. Vücuttaki sıvı homeostazı ve kan akış düzensizlikleri, inflamatuar ve metabolik fonksiyonlardaki defektler DN gelişiminin temelinde yatan unsurlardır. Hiperglisemi olgularında sitokin, büyüme faktörleri ve kemokinlerin ekspresyonundaki artış diyabette mikrovasküler seviyede komplikasyonların baş göstermesine sebep olmaktadır. Diyabetli bireylerde 3-6 aylık sürede yapılan üç idrar tetkikinin en az ikisinde hastanın albüminüri değerleri mg/24 saat bazında >300 veya µg/dk bazında >200 çıkması DN tanısının konulmasını sağlamaktadır (101).

Diyabete bağlı böbrek hastalıklarının karakterizasyonu, idrar ile albümin atılımının artışı, glomerüler filtrasyon hızının (GFR) 90-120 aralığının altına düşmesi, kan basıncının artması ve kardiyovasküler hastalık riskinde artışla seyretmektedir. DN, Tip 1 DM'li bireylerin %20-30'unda 15 yıl içinde mikroalbüminiri gelişmektedir. Mikroalbüminüri gelişen hastaların ortalama %50'si aşikar nefropatiye yakalanmakta, aşikar nefropati gelişen hastaların ortalama %10'unda son dönem böbrek yetmezliği meydana gelmektedir. Tip 2 DM'li bireylerde DN görülme prevelansı daha yüksektir. Tip 2 DM'li hastaların %10-20'sinde aşikar nefropati gelişirken, 20 yıl içerisinde bu hastaların %20'sinde son dönem böbrek yetmezliği meydana gelmektedir (102).



Şekil 2.12. Zaman İçerisinde Diyabetik Nefropati Seyri (102)

DN için risk faktörleri hipergliseminin süre ve derecesi, dislipidemi, sigara, obezite, hipertansiyon, etnik köken ve genetik yatkınlık olarak sıralanabilir. Genetik yatkınlıkta önemli kısımlar aile bireylerinde DN öyküsünün bulunması, RAS gen polimorfizmleri ve insülin direnci gibi faktörlerdir (102). DN teşhisi için gerekli tarama Tip 1 DM'li bireylerde diyabet tanısından 5 yıl sonra her yıl bir tetkik yapılmalı, Tip 2 DM'li bireylerde hastalık tanısı konulduktan sonra tanıdan itibaren yılda bir tetkik yapılarak DN aranmalıdır. DN teşhisinden sonraki tedavi ve seyri yavaşlatma prensipleri HbA1C düzeyinin 7g/dL'nin altında tutulması, tansiyonun 130/80 mmHG altında kontrollü seyri, hiperlipidemi temelli tedavi, sigara bıraktırma gibi risk faktörlerini içermektedir. Mikroalbüminürisi olan hastalarda hipertansiyon görülmese bile anjiyotensin reseptör blokeri (ARB) veya anjiyotensin converter enzim inhibitör (ACEI) verilmesi önerilmektedir (103).

2.5.1. Diyabetik Nefropati Patogenezi

DN patogenezinde glikotoksisiteye ve anormal lipid profillerine bağlı metabolik yolak ve kardiyovasküler sistemde oluşan kan basıncının gücü, şiddeti ve zamanlamasının sağlıklı dolaşımdakine kıyasla bozulan hemodinamik yolak olmak üzere iki ana mekanizma rol oynar. Bu iki yolak aracılığıyla nefropati gelişmesinde başrolü hiperglisemi oynamaktadır.

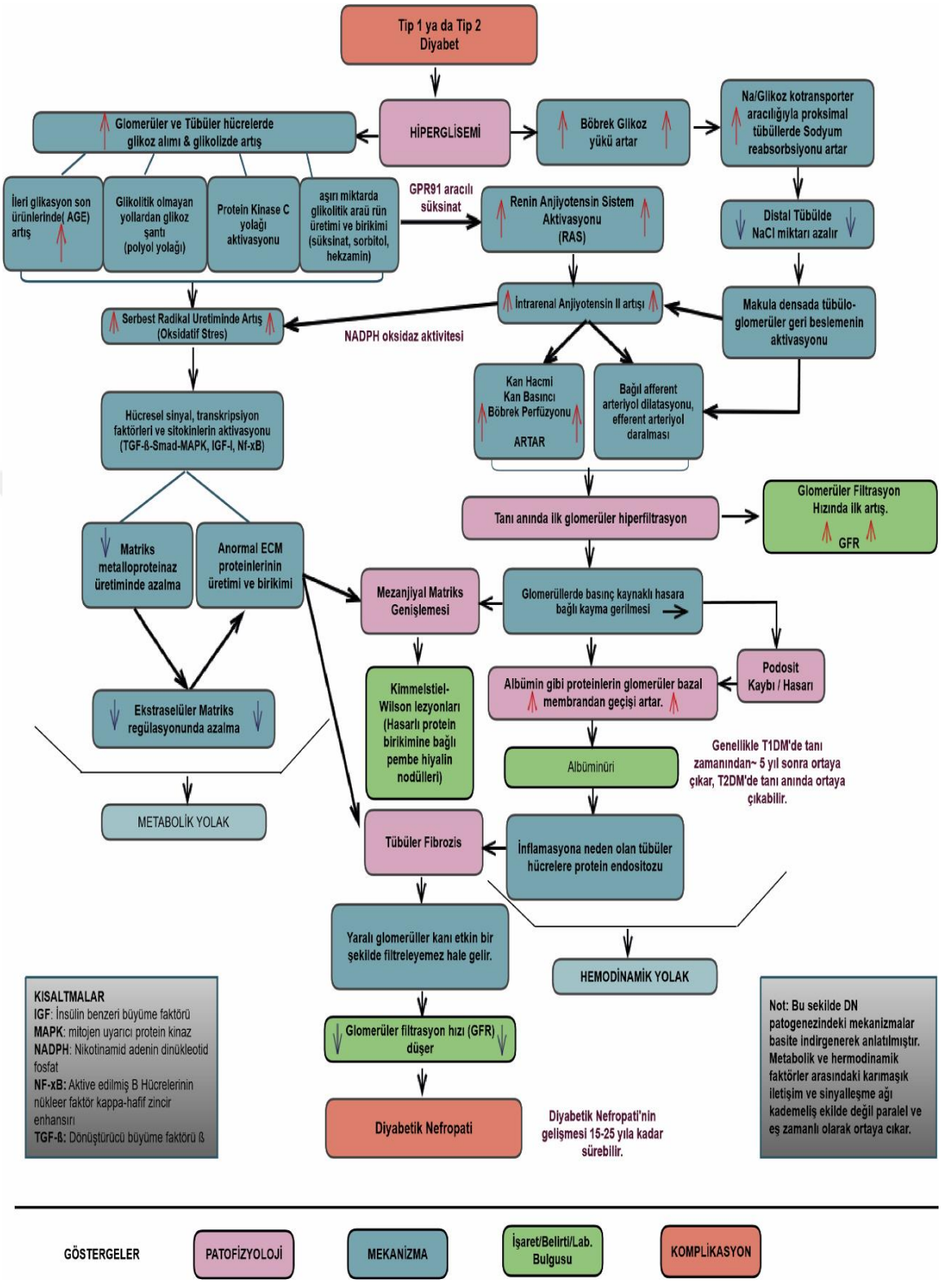
Metabolik yolak aracılı nefropati gelişiminde; Tip 1 veya Tip 2 DM'ye bağlı hiperglisemi glomerüler ve tübüler hücrelerde glikoz alımını ve glikolizizi arttırır. Bu durum hücrede ileri glikasyon son ürünleri seviyesini arttırır, glikozun glikolitik olmayan bir yolağa yönlendirilmesi (polyol), Protein Kinase C yolağının aktivasyonu, aşırı miktarda glikolitik ara ürün üretimi (süksinat, hekzamin) ve birikmesi gibi durumlara yol açar. Bu sonuçların etkisi ve GPR91 aracılı süksinat yoluyla RAS (Renin-anjiyotensin) sisteminin aktivasyonu sonucu intrarenal anjiyotensin II miktarının artması NADPH oksidaz aktivasyonu aracılığıyla serbest radikal üretimini arttırarak vücutta oksidatif stresi arttırır.

Artan oksidatif stres hücresel düzeyde transkripsiyon faktörleri ve sitokinlerin (TGF-ß-Smad-MAPK, IGF-1, NF-xB) hücresel sinyalleşmesini başlatarak ekspresyon başlangıcına aracı olur. Bu doğrultuda artan ekspresyon düzeyleri, matris metalo-proteinazların üretimini azaltır ve Ekstra Sellüler Matriks (ECM) regülasyonunda azalmaya sebep olur. Böylece anormal seviyede ECM proteinlerinin üretimi ve giderek

birikimi gerçekleşir. Bu durum mesangial matrix genişlemesine sebep olur. Hasarlı proteinlerin birikmesine bağlı pembe hiyalin nodülleri boy gösterir ve tübüler fibrozis oluşur. Defektli glomerüller kanı düzgün filtre edemez, böylece GFR düşer ve bireyde DN gelişir.

Hemodinamik bozukluk aracılı nefropati gelişiminde, Tip 1 veya Tip 2 DM'ye bağlı hiperglisemi böbrekte glikoz yükünün artmasına sebebiyet verir. Böbrekte artan glikoz yükü, Sodyum/glikoz co-transporter proteinler aracılığıyla proksimal tübülde sodyum geri emilimi artar, böylece distal tübülde NaCl miktarı azalır. Bu durum makula densada tübülo-glomerüler geribildirimin aktivasyonuna yol açar. Bu aktivasyon doğrudan bağıl afferent arteriyol dilatasyonu veya efferent arteriyol daralması gibi sonuçlara yol açar. Ayrıca bu aktivasyon intrarenal anjiyotensin II miktarının artmasına da sebep olur. Artan intrarenal anjiyotensin II miktarı kan basıncında, tansiyonda ve böbrek perfüzyonunda artışa ve yine bağıl afferent arteriyol dilatasyonu veya efferent arteriyol daralmasına sebep olur.

Bu sonuçlar tanı sırasında ilk glomerüler hiperfiltrasyon görülmesine yol açar. Bu durum GFR artışının başlangıcı olarak nitelendirilir. GFR artışı, glomerül basıncının neden olduğu hasara karşı aşırı strese yol açar. Aşırı stres, mesangial matriks genişlemesine sebebiyet vererek pembe hiyalin nodüllerinin oluşmasıyla tübüler fibrozise yol açar. Tübüler fibrozis sonrası defektli glomerüller kanı düzgün filtre edemediği için GFR düşmeye başlar ve bireyde diyabetik nefropati gelişir. Glomerül basıncının neden olduğu hasara karşı aşırı stres bowman kapsülü epitel dokusunda podosit hücre kaybı veya defektine sebep olur. Bu defekt glomerüler membranda albümin gibi proteinlerin geçirgenliğini arttırarak albüminüriye sebep olur. Albüminüri, inflamasyona sebep olan tübüler hücrelere protein endositozuna sebep olarak tübüler fibrozise zemin hazırlar. GFR düşük seyreder ve bireyde DN gelişir (104,105,106).



Şekil 2.13. Diyabetik Nefropati Patogenezinin Şematik Gösterimi

(105'den değiştirilerek alınmıştır)

2.5.2. Diyabetik Nefropati Evreleri

DN süreci toplam beş ana evre altında incelenmiştir (101,104,107,108).

a. Hiperfiltrasyon Evresi: GFR artışının izlendiği evre olarak bilinir. Tanı anında GFR dakikada 150ml'den büyükse nefropati riski vardır. Ayrıca idrarla birlikte albümin atılımı düzeyinde artış gözlenebilir. Beslenmede protein alımında kısıtlama, ACE inhibisyonu gibi tedaviler gerektirmektedir.

b. Sessiz Evre: GFR yüksekliğinin devam ettiği bu evrede idrarla atılan albümin seviyesi normaldir. 5-15 yıl sürebilen bu evre, hiperfiltrasyon evresiyle hemen hemen aynı tedavileri gerektirir ve hipertansiyon kontrolü şarttır.

c. Mikroalbüminüri (Nefropati başlangıcı) Evresi: Diyabet tanısı alan hastaların ortalama %40'ında mikroalbüminüri görülür. Mikroalbüminüri olgularının %80'i sonunda nefropatiye dönüşür. İdrarla birlikte atılan albümin 30-300 mg/24 saat veya 20-200 µg/dk olarak seyreder. GFR 1.1 ml/dk/yıl azalmayla seyreder. Tip 2 DM'li hastalar nefropati tanısı aldığında genelde mikroalbüminüri evresindedirler. Tip 2 DM'li olgularda ACE inhibitörleri kullanımı gereklidir. Bu inhibitörler renin anjiyotensin blokeri olarak görev aldığı için böbrek MCP-1 seviyesini baskılayarak doku iyileşmesinde rol oynarlar.

d. Makroalbüminüri (Klinik Nefropati) Evresi: Gelişim süreci ortalama 20 yıldır. İdrarla albümin atılımı günde 300 mg veya dakikada 200 µg üzerinde seyreder. Albümin atılımı her geçen yıl katlanarak artar. GFR değerleri düşük seyreder ve bireysel farklılık göstererek yılda 2-20 ml/dk oranında azalmayla karakterizedir.

e. Son Dönem Böbrek Yetmezliği (SDBY) Evresi: Gelişim süreci ortalama 25 yıldır. GFR oldukça düşük seyrederken (<15 ml/dk), böbreğin çalışma kapasitesi %5-%10 aralığındadır. Artık diyaliz veya böbrek nakli dışında tedavi imkanı artık bulunmamaktadır.

2.5.3. Mikroalbüminüri

Mikroalbüminüri, idrarla birlikte atılan albümin miktarının 30-300 mg/24 saat veya 20-200 µg/dk olarak seyretmesi olarak tanımlanır. Mikroalbüminüri tanısından sonraki 10 yıllık süreçte 10 hastadan 8'inde klinik nefropati seyrettiği belirlenmiştir. Diyabete bağlı olarak mikroalbüminüri seyrindeki nefropatiye yönelik progresif sürecin

ilerlemesi Tip 1 olgularında % 4/yıl iken Tip 2 olgularında % 4,7/yıl olarak saptanmıştır (109,110).

Hiperfiltrasyon evresinin tanısıyla GFR artışını takiben sessiz evreyle devam eden nefropati gelişimi, ilk 5 yıldan sonra GFR düşüşünün başlaması ve idrar albümin seviyesinin 30 mg/24saat ve 300 mg/24saat arasında seyretmesiyle mikroalbüminüri evresine geçiş yapar. Tip 2 DM olgularında diyabet başlangıcı tanıdan önceki yıllara dayandığı için, Tip 2 DM tanısıyla birlikte direkt mirkoalbüminüri tanısı da mümkün olabilmektedir (111,113).

Tablo 2.10. İdrarla Albümin Atılımı Tanımları (112)

KATEGORİ	Nokta idrar (mg/mmol)	24 Saatlik idrar (mg/gün)	Belirli saatlerde (µg/dk)
Sağlıklı			
Erkek	<2,5	<30	<20
Kadın	<3,5	<30	<20
Mikroalbüminüri			
Erkek	2,5-30	30-300	20–200
Kadın	3, -30	30-300	20–200
Makroalbüminüri			
Erkek	≥30	≥300	≥200
Kadın	≥30	≥300	≥200

(*mg/mmol cinsinden idrarda mikroalbümin/kreatin oranı x 100)

Hastada mikroalbüminüri gelişmesi, nefropati gelişiminde diğer bireylere göre %42 daha fazla risk doğurmaktadır. İdrarla albümin atılımı ayakta durmaya bağlı olarak, diyetle protein tüketimine bağlı olarak, egzersiz sonrasında ve diürez artışına bağlı olarak özellikle gündüz saatlerinde artış göstermektedir. Bireyin vücut kitle endeksi, yaşı ve cinsiyeti gibi özellikleri kesin olmamakla birlikte albümin atılımını arttırabilmektedir. Bunlara ek olarak idrar yolu enfeksiyonları, ateş, kalp yetmezliği gibi ek hastalıklar albümin atılım miktarının artmasına sebep olmaktadır (113).

Tip 1 ve Tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yapılan çalışma sonuçları, glisemi kontrolünün mikroalbüminüri gelişimini önleme veya geciktirme açısından oldukça önemli olduğunu vurgulamıştır. Bu çalışma sonucunda, 8.0'ın altında tutulan HbA1C

değerlerine sahip hastaların diğer hastalara göre daha yavaş nefropati ilerleme hızına sahip oldukları saptanmıştır (114).

Tablo 2.11. HbA1C Düzeylerinin Mikroalbüminüriden Proteinüriye İlerleme Hızına Etkisi (113)

HbA1c(%)	n	Proteinüreiye ilerleme hızı (…/100 insan yılı)	Mikroalbüminüriden proteinüriye ilerleme üzerine HbA1c'nin etkisi (CI%95)
<8.0	85	1,3	1,0
8,0-8,9	57	5,1	4,2(1,2-14,4)
9,0-9,9	64	4,2	3,2(0,9-11,2)
≥10	68	6,7	5,5(1,6-18,7)

Tip 2 DM olgularında diyabet tanısından itibaren mikroalbüminüri aranmaya başlanmalıdır. Tip 2 DM hastaları diyabet tanısını aldıklarında zaten diyabet öyküleri uzun yıllara dayandığı için, bu olguların yaklaşık %7'sinde DM tanısı anında mikroalbüminüri seyri mevcuttur. Mikroalbüminüri tanısı için hastanın 3-6 aylık periyot aralığında yapılan 3 idrar tetkikinin en az 2 tanesinde idrar albümin/kreatin oranının Tablo 2.8.'de verilen mikroalbüminüri değer aralıklarında olması gerekmektedir (115).

Buna ek olarak GFR düzeyleri de tanıda önemlidir. Genç bireylerde GFR düzeyleri 80–130mL/dk/1,73m^2 aralığındadır ancak yaş artışına bağlı olarak 50 yaş ve üzeri bireylerde her on yılda bir bu değer ortalama 10mL/dk azalmayla seyredebilmektedir. GFR hesabı iki farklı formülle yapılabilir, kadınlar için yapılan hesaplamada çıkan sonuç 0,85 ile çarpılmalıdır (115,116).

$$\text{Kreatinin klirensi(mL/dk)} = \frac{[140\text{-yaş(yıl)}]\text{x Beden ağırlığı(kg)}}{72\text{x serum kreatinin (mg/dL)}}$$

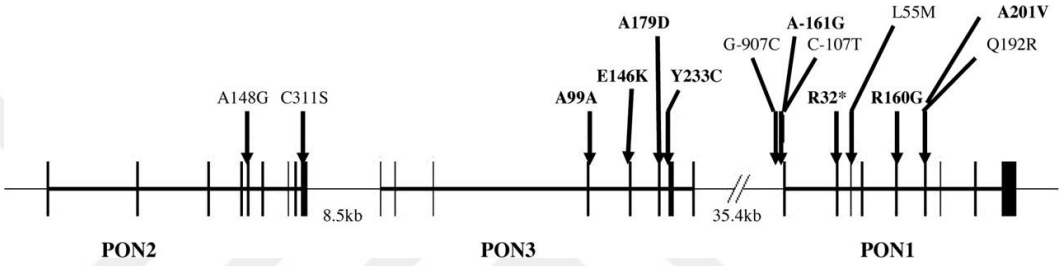
$$\text{Kreatinin klirensi(mL/dk)} = \frac{\text{İdrar kreatinin(mg/dL) x Günlük idrar hacmi(mL)}}{\text{Serum kreatinin(mg/dL) x 1440}}$$

Şekil 2.14. GFR Hesaplama Formülleri (116)

2.6. Paraoxonase (PON) Gen Ailesi

Paraoxonase gen ailesi, insan genomunda submetasentrik C grubu kromozomlardan biri olan 7. kromozomun q kolu üzerinde 2. bölgede 1. bandın 1 ve 3 alt bantları arasında lokalizedir. PON gen ailesi PON1, PON2, PON3 olmak üzere toplam üç

genden oluşmakta ve bu genler arası benzerlik aminoasit rezidü sıralanması bakımından %60, nükleotid seviyesi bakımından %70 oranlarında seyretmektedir. PON gen ekspresyonları her dokuda farklı düzeylerde gerçekleşmektedir. Bununla birlikte PON1 ve PON3 özellikle karaciğer dokusu ve plazmada daha fazla eksprese olurken PON2 özellikle böbrek, testisler, düz kas hücrelerinde ve karaciğerde daha fazla eksprese edilmektedir. Hemen hemen her dokuda eksprese olan PON2, HDL ile ilişkili bulunamamıştır. Geçmişten bu yana yapılan çalışmalar, PON1 gen ifadesinin ürünü olan paraksonaz enziminin HDL'nin yapısına katılmasının saptanmasıyla PON1 üzerindeki çalışmaların yoğunlaşmasına sebebiyet vermiştir. Dolayısıyla PON1 literatürü daha geniş kapsamlı hale gelmiştir (117,118,119).

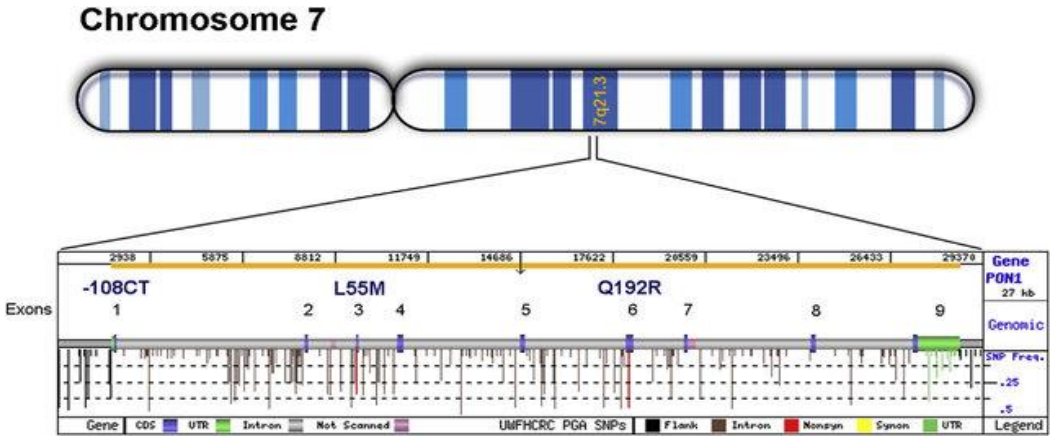


Şekil 2.15. Kromozom 7q21.1-21.3 Paraksonaz Gen Ailesi (119)

3'-5' düzlemine dik olarak inen çizgiler ekzon gösterimi, 3'-5' düzlemine paralel olan kalın yatay çizgiler gen sınırlarını temsil etmektedir.

2.6.1. Paraoxonase-1 (PON1) Geni

7q21.3'de lokalize olan ve özellikle karaciğer dokusunda eksprese edilen PON1, HDL ilişkili Ca^{+2} bağımlı A-esteraz enzim grubunun önemli bir üyesidir. Kimyasal özelliklerine bakıldığında PON1, 43 kDa ağırlığa sahip 354 aminoasit rezidüsünden meydana gelen glikoprotein yapılı bir biyomoleküldür. Aminoasit bakımından fazla sayıda lösin içeren PON1, izoelektrik nokta 5.1 pH'a sahiptir (120,121).

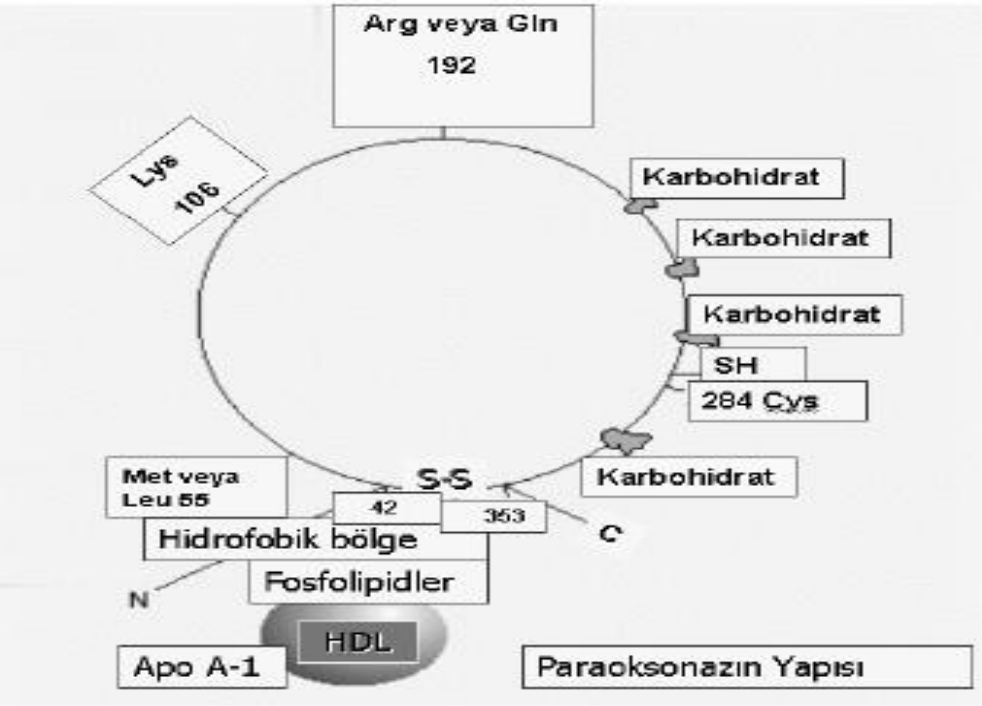


Şekil 2.16. Kromozom 7 üzerinde PON1 (122)

2.6.2. PON1 Yapısı ve Özellikleri

PON1, hidrolaz aktivitesi gösteren ve antioksidan etkileriyle bilinen glikoprotein yapılı bir enzimdir. Karaciğerde üretilerek kana salınan PON1, arilesteraz, paraksonaz ve laktonaz aktivitelerine sahiptir ve organofosfat yapılı bileşiklerin (paraokson gibi) detoksifiye edilmesi ve lipit peroksit hidrolizini sağlayarak LDL oksidasyonunu engellemek gibi önemli roller üstlenmektedir. Peroksidaz türevi aktivasyona sahiptir ve lipopolisakkaritlerin inaktivasyonlarını sağlayarak mikrobiyal endotoksisiteye yönelik korumada yardımcı olmaktadır (123,124).

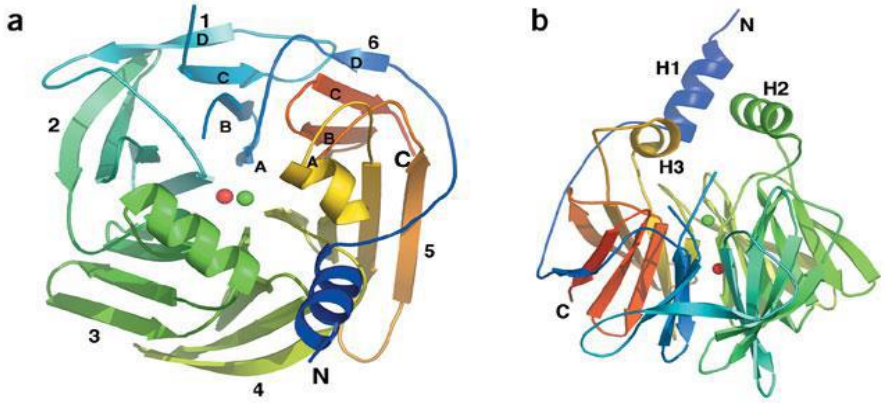
43 kDa ağırlığındaki PON1 proteinin yaklaşık 7 kDa'sı PON1 yapısında proteine dört ayrı noktadan bağlı bulunan karbonhidrat ünitelerine aittir. Protein yapısında 3 farklı noktada sistein rezidüsü bulunmaktadır. Bu sistein rezidülerinden 42-353 aminoasit pozisyonlarındaki sisteinlerin kendi arasında kurduğu disülfid bağı, PON1 yapısının halkasal bir yapı almasına sebebiyet vermektedir. Disülfid bağ yapısında görevi bulunmayan 284 pozisyonundaki diğer sistein rezidüsü serbest durumdadır ve PON1 aktivitesinde substrat tanıma ve bağlanma işlevlerinde görevlidir (125,126).



Şekil 2.17. Paraksonazın Yapısı (127)

PON1 protein yapısında, yapının stabilitesi ve aktivite devamlılığı için 7.4 A° arayla iki tane kalsiyum molekülü bulunmaktadır. Bu Ca^+ molekülleri merkeze yakın ve uzak olmak üzere iki farklı görevde rol alırlar. Üst kısımda bulunan 1 numaralı Ca^+ molekülü katalitik aktivasyonda görevli olup, merkezde bulunan 2 numaralı Ca^+ molekülü protein konformasyonu stabilitesinde görevlidir ve yapıda bulunmaması veya uzaklaşması direkt denatürasyon sebebidir (128).

Buna ek olarak üç farklı hidrofobik karakterli heliks yapı (H1,H2,H3) bulunmaktadır. Bu hidrofobik yapılar enzimin aktif bölgesinin yapısal olarak konformasyonunun belirlenmesi, HDL'ye bağlanmada aracılık etme gibi önemli görevlere sahiplerdir (128). PON1, Hidrofobik yapıdaki N-terminal bölge aracılığıyla ApoAI ve ApoJ gibi HDL alt birimleriyle ilişkili olarak HDL'ye kolaylıkla bağlanabilmektedir (128).



Şekil 2.18. PON1 Konformasyonel Yapısı, Heliks Yapı ve Ca^{+} Bağı (129)

a) 6 ß- kırmal yapının üstten görünümünü, N- ve C- terminal bölge uçlarını, kırmızı ve yeşil küçük daireler Ca^{+2} iyonlarını temsil edecek şekilde gösterilmektedir. b) 6 ß- kırmal yapının yan bakış görünümünü, H1, H2, H3 hidrofobik uçları, kırmızı ve yeşil küçük daireler Ca^{+2} iyonlarını göstermektedir.

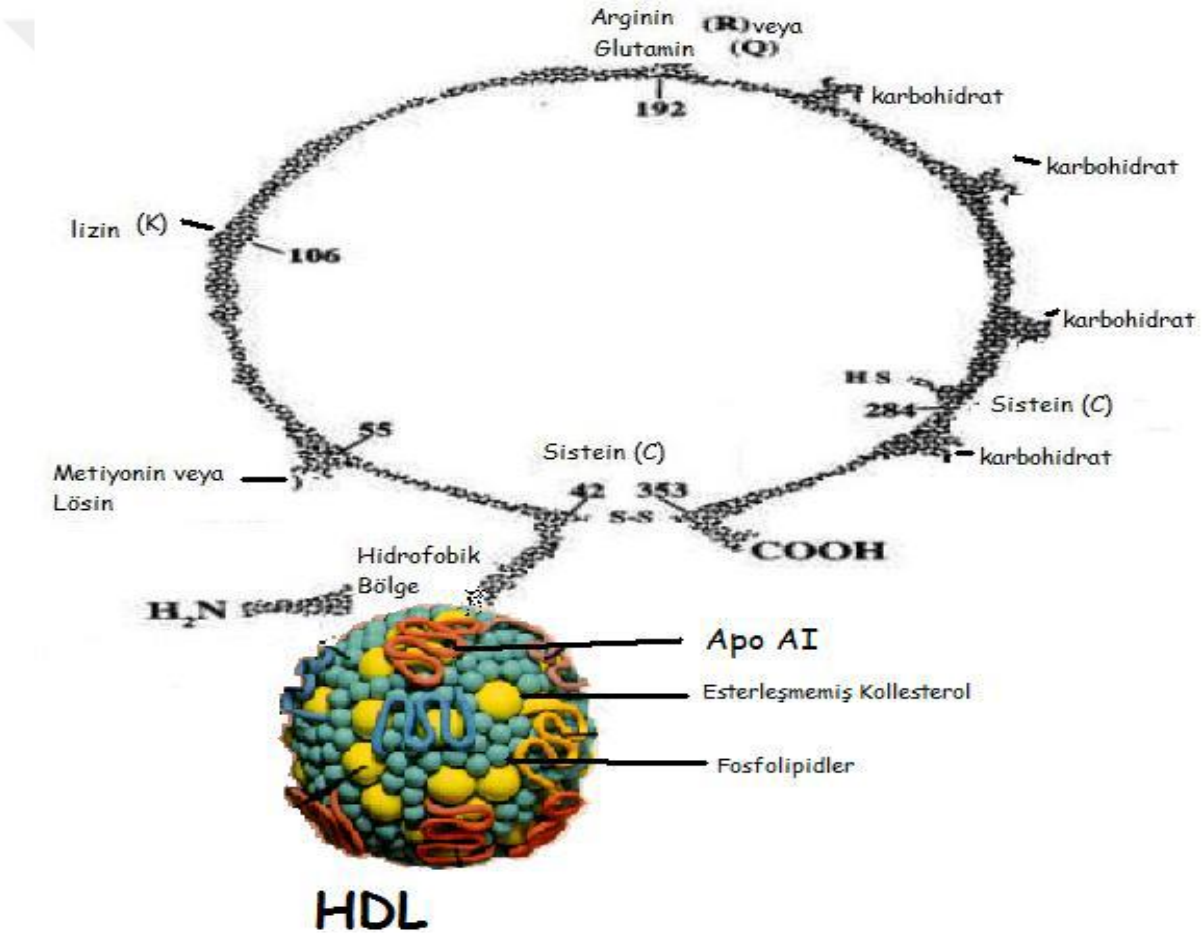
2.6.3. PON1 ve HDL ilişkisi

Karaciğer üzerinde üretilen PON1, HDL'ye bağlı bir şekilde dolaşımda bulunmaktadır. Serumdaki PON1 miktarının artması veya azalması HDL ile yakından ilişkili olup, lipoproteinlerin ortamda olmamasıyla PON1 aktivitesinin çok aşırı düştüğü ve neredeyse aktivasyonunu kaybettiği belirtilmiştir (129).

Dokularda eksprese edilen PON1 proteinin sekresyonu için HDL gibi bir taşıyıcıya ihtiyacı vardır. HDL, yapısındaki ApoAI ve ApoJ proteinleri aracılığıyla PON1'in N- terminal ucuyla bağlanma gerçekleştirmektedir. Bu bağlanma sonrası kan dolaşımına salınan HDL üzerindeki PON1 molekülü, dolaşım lipoproteinleri ve endotel fosfolipidlerinin oksidatif stresten korunması için antioksidan bir protein olarak çalışır, LDL'yi lipit peroksitlerinden dolayısıyla da oksidasyon tehlikesinden korumaktadır (129,130,131). Bu durum Şekil 2.19. da gösterilmiştir (133).

PON1, organofosfat türevi gazları hidrolize ederek zararsız hale getirmektedir. Organofosfat grubu biyomoleküller, hem A-esteraz hem de nöromuskuler sistemdeki B-esterazlar grubundaki enzimlerin de substratıdır. B-esteraz enzimleri, organofosfatlar tarafından geri dönüşümü mümkün olmayacak şekilde inhibisyona uğratıldıkları için, PON1 organofostat hidrolizi ile aynı zamanda nörolojik sistem açısından da koruyucu ve önemli bir enzimdir (132).

Buna ek olarak PON1-HDL kompleksi kolesterolü periferal hücrelerden taşımaya aracılık ederek PAF gibi diğer proteinlerin de yardımıyla LDL oksidasyonunu önlemeye katkı sağlamaktadır. PON1 peroksidaz aktivitesi, HDL yapısındaki linoleat hidroperoksit seviyelerinde düşüşe ve HDL üzerinde ortadan kaldırılmaya aracılık etmektedir. LDL'nin bakır gibi iyonların okside etkisinden ve serbest radikal kaynaklı oksidatif stres etkilerinden korunmasında PON1'in fosfolipid ve peroksit hidroliz işlevi oldukça önemlidir. Bakteriyel kaynaklı toksik etkilere karşı HDL molekülünün TNF-α ve bazı interlökinlerin ekspresyon ve sekresyonunu inhibe edici etkisinde PON1 merkezli bir işlevsellik bulunmaktadır (132).



Şekil 2.19. PON1-HDL Bağlanması (133)

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada Helsinki Deklarasyonu'na bağlı kalınmıştır. Çalışma protokolleri ve yöntemleri Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmanın başında bütün katılımcılardan onay alınmıştır. Çalışmaya toplam 150 birey dahil edilmiştir. Tip 2 DM Grubu, DN Grubu ve Kontrol Grubu olmak üzere 50'şer kişilik üç grup oluşturulmuştur. Çalışma grupları, Şanlıurfa Harran Üniversitesi Hastanesi Endokrinoloji Poliklinikleri'ne başvuran, benzer yaş aralığında, farklı cinsiyetlerde ve 18 yaş üzeri bireylerden oluşmaktadır.

3.1. Çalışmaya dahil edilme kriterleri

Tip 2 DM hasta grubu: Endokrinoloji polikliniğinde Tip 2 DM tanısı konmuş ve tedavisi devam eden çalışmaya onay vermiş 18 yaş üstü 50 hastadan oluşmuştur.

DN hasta grubu: Daha önce Endokrinoloji polikliniğinde Tip 2 DM tanısı konmuş, idrar mikroalbümin/kreatin oranı ≥30 mg/gün üzeri olan çalışmaya onay vermiş 18 yaş üstü 50 hastadan oluşmuştur.

Kontrol Grubu: Tip 2 DM tanısı ve Nefropati tanısı konmamış, 18 yaşından büyük çalışmaya onay vermiş 50 hastadan oluşmuştur.

3.2. Çalışmaya Dahil Edilmeme Kriterleri

Bilinen malignitesi olanlar, DN dışında nefropatisi olanlar, gebeliği olanlar, aşikar kardiyovasküler hastalığı, nörodejeneratif hastalığı olanlar ve diyabetik ayak yarası olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

3.3.Kan alımı

Hastalardan antekübital venöz EDTA'lı (mor başlıklı) hemogram tüpüne 4 cc ve düz biyokimya tüpüne 4 cc olmak üzere toplam 8 cc kan alındı, EDTA'lı tüpteki kanlar, hasta alımı tamamlanıncaya kadar -20 derecede saklandı.

3.4. Kullanılan Kimyasallar ve Malzemeler

Etanol (Riedel-de Haen 32221)

Double distile su

PCR Master Mix 2x (Thermoscientific, K0171)

DNA izolasyon kiti (Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Mini Kit K1820-02)

Hin1II restriksiyon endonükleaz (Thermoscientific, ER1831)

BspPI restriksiyon endonükleaz (Thermoscientific, ER1321)

FastRuler Low Range DNA Ladder (Thermoscientific, SM1103)

Agaroz A (Bio Basic Inc., Kanada)

Lityum hidroksit monohidrat (Sigma-Aldrich, Almanya)

Borik Asit (Merck, Almanya)

Gliserol (Merck, Almanya)

Bromo fenol blue (Merck, Almanya)

Primerler (4 adet) (Metabion, Almanya)

Lityum borat elektroforez tamponu (pH 8.5)

6X Loading Dye

3.4.1. Kullanılan Tamponlar ve Hazırlanışı

Lityum Borat (20X), pH 8.5➔ 8,392 gt Lityum hidroksit monohidrat, 30 gram Borik asit tartıldı. 1 L saf suda çözüldü.

6x Loading Dye ➔ 10Mm Tris-HCl (pH 7.6), %60 gliserol, %0.03 bromofenol blue, 60 mM EDTA

Elektroforez Tamponu ➔ 50ml 20x Lityum Borat 950 ml distile su ile 1x'e seyreltilerek kullanılır.

Elektroforez Jeli pH 8.5 ➔ 79.8 ml distile su, 4.2 ml 20x Lityum Borat, 4.2 µl 10mg/ml Etidyum bromür, %4'lük jel için 3,4 gram Agaroz, %1,5'luk jel için 1,275 gram agaroz.

3.4.2. Araç ve Gereçler

1. Buzdolabı (Bosch, Türkiye)
2. Derin Dondurucu (Sanyo, Japonya)
3. Hassas terazi (Vibra, İngiltere)
4. pH Metre (Consort, Belçika)
5. Soğutmalı Santrifuj (Hettich, Almanya)
6. Vortex (Labnet, Amerika)
7. PCR makinesi (Sensoquest Labcycler, Almanya)
8. Etüv (Nüve EN 500, Türkiye)
9. Elektroforez güç kaynağı (Consort, Belçika)
10. Elektroforez tankı (CLP, Amerika)
11. Jel Analiz ve Dökümentasyon Sistemi (Gen-Box CFx, Türkiye)
12. Buharlı Otoklav (Hirayama, Japonya)
13. Mikrodalga Fırın (Vestel, Türkiye)
14. Laminar flow (Heraus, Almanya)
14. Deiyonize su cihazı (SG, Almanya)
15. 1,5 ml'lik kapaklı ependorf tüp (Isolab, Almanya)
16. 0,2 ml'lik PCR tüpleri
17. PCR pipet uçları
18. Otomatik ayarlanabilir pipet seti (Eppendorf, Almanya)

3.5. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, EDTA'lı tam kan örneklerinden K1820-02 katalog numaralı PureLink™ Genomic DNA Mini Kit kullanılarak yapıldı (134).

1) 200 µL tam kana 20 µL Proteniaz K Solüsyonu ve 20 µL RNase A Solüsyonu eklenip vortekslendi, karışım oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
2) Karışıma 200 µL Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
3) Karışım 55 °C'de 10dk inkübe edildi.
4) Karışıma 200 µL 96-100% Etanol eklendi.
5) Karışım spin kolona aktarıldı ve 10000 x g hızda 1 dakika oda sıcaklığında santrifüjlendi.
6) Çökeltiyi barındıran tüp atıldı ve kolon temiz bir tüpe aktarıldı.
7) Kolona 500 µL Wash Buffer 1 eklendi ve 10000 x g hızda 1 dk santifüjlendi.

8) Çökeltiyi barındıran tüp atıldı ve kolon tekrar temiz bir tüpe aktarıldı.

9) Kolona 500 µL Wash Buffer 1 eklendi ve maximum g hızda 3dk santirüjlendi.

10) Kolon temiz bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, kolona 40 µL Elution Buffer eklendi ve maximum g hızda 1dk santrifüjlenerek DNA elde edildi.

3.6. PON1 Polimorfizmlerinin PCR-RFLP Yöntemiyle Saptanması

PON1 geni L55M ve Q192R polimorfik bölgeleri üzerinde seçilen dört (4) adet primer (forward ve reverse), sekans dizilerine göre sentez ettirilerek, PCR'da genomik DNA'nın çoğaltılmasında kullanıldı.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri (135, 136)

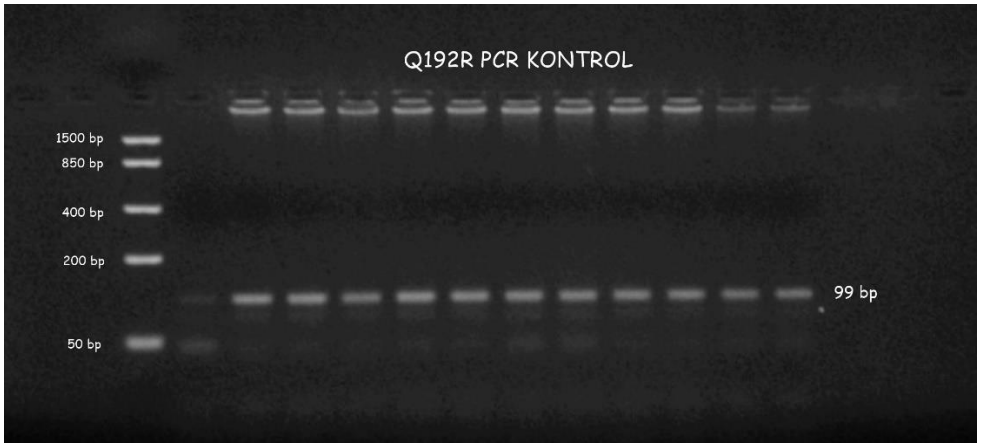
SNP	Primer Dizisi	Amplifikasyon ürünü
192 Q/R	5'–TATTGTTGCTGTGGGACCTGAG–3' (Q192RF5), 5'-CACGCTAAACCCAAATACATCTC-3' (Q192RR5)	99bp
55 L/M	5'-GAAGAGTGATGTATAGCCCCAG-3' (L55MF5), 5'-TTTAATCCAGAGCTAATGAAAGCC-3'(L55MR5)	170bp

3.6.1. PCR İşlemi (Polimeraz zincir reaksiyonu)

Q192R polimorfik noktasının çoğaltılması amacıyla; Reaksiyon için 15 µl PCR mix hazırlandı. PCR mix için, 7,5 µl PCR Master Mix(K0171), 0,3 µl forward primer, 0,3 µl reverse primer, 4,9 ddH_2O ve 20-100 ng/µl kadar DNA'dan 2 µl kullanıldı. PCR reaksiyonu; 95°C'de 5 dakika, 95°C'de 30 saniye, 60 °C'de 30 saniye, 72 °C'de 45 saniye (40 siklus) ve 72°C'de 5 dakika olacak şekilde gerçekleştirildi.

PON1 geni 6. ekzon üzerinde bulunan rs662 A>G polimorfik alanını içeren 99 baz çiftlik amplifikasyon ürünü;

TATTGTTGCTGTGGGACCTGAGCACTTTTATGGCACAAATGATCACTATTTT
CTTGACCCCTACTT**A**CAATCCTGGGAGATGTATTTGGGTTTAGCGTG

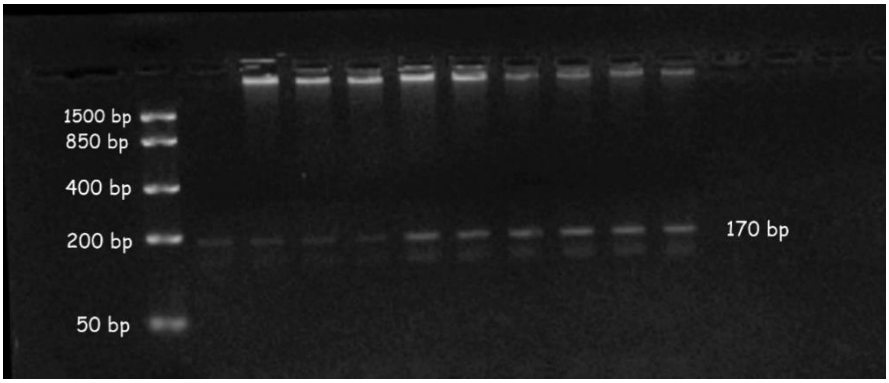


Şekil 3.1. PON1 geninin Q192RF5 ve Q192RR5 primerleri ile 60 ºC'de PCR'da çoğaltılmasıyla elde edilen 99 baz çiftlik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü

PON1 geni kodlanan bölge; L55M polimorfizmi için 15 µl PCR mix hazırlandı. PCR mix için, 7,5 µl PCR Master Mix(K0171), 0,3 µl forward primer, 0,3 µl reverse primer, 4,9 ddH_2O ve 20-100 ng/µl kadar DNA'dan 2 µl kullanıldı. PCR reaksiyonu 95°C sıcaklıkta 5 dakika, 95°C sıcaklıkta 30 saniye, 55°C sıcaklıkta 30 saniye, 72°C sıcaklıkta 45 saniye (40 cycle), 72 °C sıcaklıkta 5 dakika seyredecek şekilde gerçekleştirildi.

PON1 geni 3. ekzon üzerinde bulunan rs854560 172 T>A polimorfizmini içeren 170 baz çiftlik amplifikasyon ürünü;

GAAGAGTGATGTATAGCCCCAGTTTCAAGTGAGGTGTGATAAAGAAATGGA
TCCACATCCTGCAATAATATGAAACAACCTGTACTTTCTGTTCTCTTTTCTGG
CAGAAACTGGCTCTGAAGACTTGGAGATACTGCCTAATGGACTGGCTTTCA
TTAGCTCTGGATTAA



Şekil 3.2. PON1 geninin L55M-F5 ve L55M-R5 primerleri ile 55 ºC'de PCR'da çoğaltılmasıyla elde edilen 170 baz çiftlik PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntüsü

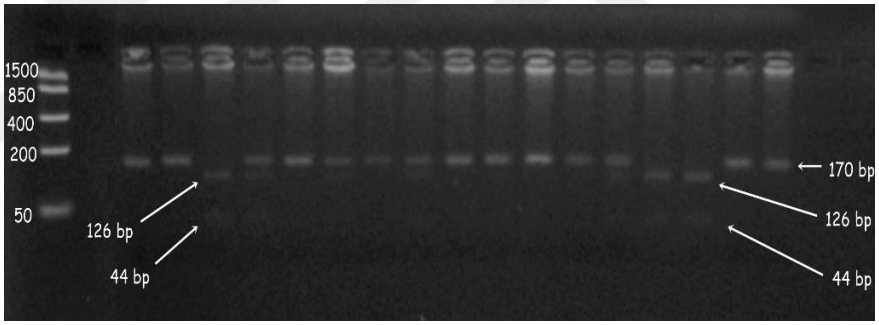
3.6.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) Analizi

Yürütülen PCR işlemi sonucu çoğaltılan PON1 geni kodlanan bölge; 170 bp uzunluğunda olan 10 µl L55M DNA'sına; 20 µl restriksiyon enzim karışımı eklenerek (2 µl restriksiyon tamponu (10x Buffer G), 0,4 µl (2U) Hin1II restriksiyon endonükleaz) 5 saat boyunca 37°C'de kesim işlemi yapıldıktan sonra 65°C'de 20 dakika inkübe edilerek reaksiyon bitirildi.

L55M PCR-RFLP ürünlerini yürütebilmek için %2 agaroz jel hazırlandı.

Elektroforez'de kullanılacak agaroz jelin hazırlanışı (pH 8.5)		
LB buffer	1x	85 ml
EtBr(10mg/ml)	0.5 5µg/ml	4.2 µg/ml
Agaroz	% 2	1,7 gr

PCR-RFLP ürünleri jele yüklenerek 200V'da 25 dakika yürütüldü.



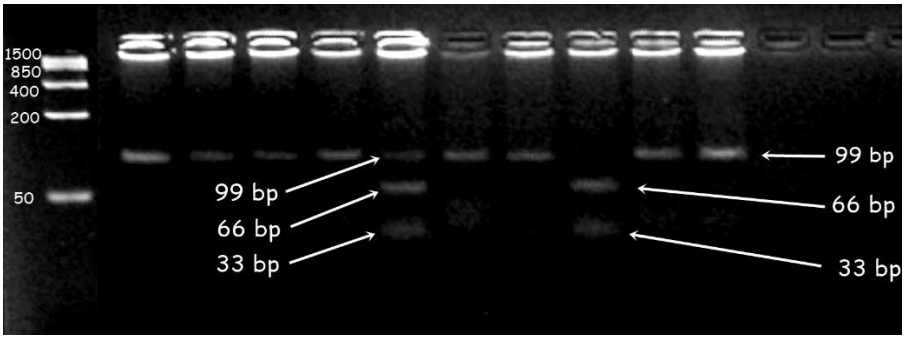
Şekil 3.3. PON1 Geni rs854560 L55M (172T>A) Noktasının Hin1II Restriksiyon Profili

99 bp uzunluğunda olan 10 µl Q192R DNA'sına, 20 µl restriksiyon enzim karışımı eklenerek (2 µl restriksiyon tamponu (10x Buffer Tango), 0,5 µl (1U) BspPI restriksiyon endonükleaz) endonükleaz enzimi ile 6 saat boyunca 55°C'de kesim işlemi yapıldıktan sonra 80°C'de 20 dakika inkübe edilerek reaksiyon bitirildi.

Q192R PCR-RFLP ürünlerini yürütebilmek için %4'lük agaroz jel hazırlandı.

Elektroforez'de kullanılacak agaroz jelin hazırlanışı (pH 8.5)		
LB buffer	1x	85 ml
EtBr(10mg/ml)	0.5 5µg/ml	4.2 µg/ml
Agaroz	%4	3,4 gr

PCR-RFLP ürünleri jele yüklenerek 95V'da 1 saat yürütüldü.



Şekil 3.4. PON1 Geni Q192R (rs662 584A>G) Noktasının BspPI Restriksiyon Profili

RFLP analizinde kullanılan enzimler ve kesim bögleleri tablo 3.2. de verilmiştir.

Tablo 3.2. Polimorfizmlerin Belirlenmesinde Kullanılan Enzimler ve Kesim Bölgeleri (137,138)

Polimorfizm	**Restriksiyon Enzimi**	**Kesim Bölgesi**
L55M	Hin1II (NlaIII)	5'… $CATG_{\downarrow}$ …3'
		3' …$_{\uparrow}$GTAC …5'
Q192R	BspPI (AlwI)	5'…GGATC (N) $_{4}\downarrow$…3'
		3'…CCTAG (N) $_{5}\uparrow$…3'

3.7. DEĞERLENDİRME

Elektroforez sonrası amplifikasyon ve kesim ürünlerini içeren jel, Jel dökümantasyon ve analiz sistemi kullanılarak değerlendirildi. FastRuler LowRange DNA Ladder marker olarak kullanıldı. PCR-RFLP ürünlerinin, allel seviyesinde homozigot ve heterozigot durumlarına göre marker bantlarıyla karşılaştırma yapılarak değerlendirildi.

L55M gen polimorfizmi için; 170 baz çifti (bç) uzunluğunda amplifikasyon ürünü Hin1II ile kesildikten sonra, jelde sadece 170 bç belirten bandın olması polimorfizmin olmadığını (Wild-tip, L/L), 126 ve 44 bç belirten iki DNA bandının olması homozigot polimorfizmi (M/M), 170, 126 ve 44 bç uzunluğunda üç DNA bandı olması heterozigotik polimorfizm (L/M) olarak değerlendirildi.

Q192R gen polimorfizmi için; 99 bç'lik PCR ürünü PCR-RFLP ile analiz edildiğinde: jelde 99 bç uzunluğunda tek DNA bandının görülmesi polimorfizmin olmadığını (Wild-tip, Q/Q); 66 ve 33 bç uzunluğunda iki DNA bandının görülmesi homozigot (R/R); 99, 66, 33 bç uzunluğunda üç DNA bandının görülmesi heterozigot (Q/R) polimorfizm olarak değerlendirildi.

3.8.1. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri için SPSS V25.0 programı kullanıldı. Biyokimyasal veriler ve demografik veriler Anova testi kullanılarak karşılaştırıldı. Biyokimyasal ve demografik verilerin yabanil tip ve mutant allel arasında karşılaştırılması için T testi uygulandı. Allel frekansları ve genotip dağılımları Hardy-Weinberg dengesine uyumluluk için Chi-square testi ile analiz edildi. Allel dağılım ve sıklığının gruplar arası farklılıkları da Fisher's exact testi ile değerlendirildi. $P < 0.05$ değerleri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya katılan bireylerin demografik ve biyokimyasal parametrelerinin dağılımı

Çalışma gruplarına ait demografik ve biyokimyasal parametreler **Tablo 4.1.** ve **Tablo 4.2.**'de verilmiştir.

Çalışmaya Tip 2 DM tanısı olan 50 hasta (yaş ortalaması 52.06±8.43, VKİ ortalaması 30.97±4.56), daha önceden tip 2 diyabet tanısı olan DN'li 50 hasta (yaş ortalaması 50.94±10.75, VKİ ortalaması 29.88±3.75) ve 50 sağlıklı birey (yaş ortalaması 50.42±11.064, VKİ ortalaması 25.21±1.11) dahil edildi.

Tip 2 DM, DN ve kontrol grubu arasında cinsiyet, yaş ve VKİ değerleri anova testi ile tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda bireylerin VKİ değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Çalışma Grupları için Demografik Parametrelerin Dağılımı

Değişkenler	T2DM Hastaları	T2DM Nefropati Hastaları	Sağlıklı Kontrol Grubu	p değeri
Örnek Sayısı(n)	50	50	50	
Cinsiyet(E/K)	25/25	24/26	12/38	
Yaş (yıl)	52.06±8.43	50.94±10.75	50.42±11.062	0.712*
VKİ(kg/m^2)	30.97±4.56	29.88±3.75	25.21±1.11	<0.01*

Tip 2 DM, DN ve kontrol grubu arasında biyokimyasal veriler anova testi ile tek yönlü varyans analizine tabi tutuldu (**Tablo 4.2.**) Kreatin ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) değerleri istatistiksel olarak anlamlı değilken, Açlık kan şekeri(AKŞ), Trigliserit, Total Kolesterol, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL), tahmini glomerüler filtrasyon hızı (eGFR), idrar mikroalbümin ve idrar kreatin değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek görüldüğü ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Tablo 4.2. Çalışma Grupları için Biyokimyasal Parametrelerin Dağılımı

Değişkenler	T2DM Hastaları	T2DM Nefropati Hastaları	Sağlıklı Kontrol Grubu	p değeri
Örnek Sayısı(n)	50	50	50	
AKŞ (mg/dl)	167.24±60.11	192.92±90.31	89.84±10.41	<0.01*
HbA1c (%)	9.76±9.51	8.96±2.49	5.14±0.34	<0.01*
Üre (mg/dl)	32.23±15.65	36.52±23.09	27.15±8.57	0.023*
Kreatin (mg/dl)	1.078±1.59	0.993±0.52	0.72±0.196	0.163
Trigliserit (mg/dl)	239.24±235.7	213.36±132.94	146.4±76.87	0.015*
Total Kol. (mg/dl)	192.9±51.48	173.12±44.17	161.14±54.96	0.013*
LDL (mg/dl)	137.53±24.15	86.73±37.20	70.21±29.44	0.051
HDL (mg/dl)	52.66±63.61	40.72±9.91	68.84±44.16	0.009*
eGFR ml/dk	91.22±19.33	84.46±24.73	104.88±20.81	<0.01*
İdrar mikroalbümin (mg/gr)	10.97±14.83	154.76±240.21	-	<0.01*
İdrar Kreatinin (ml/dk)	142.48±95.11	97.78±69.08	-	0.008*

4.2. Çalışma grupları arasında genotip ve allel dağılımlarının karşılaştırması

Bu çalışmada Tip 2 DM, diyabetik nefropati ve kontrol grubunda PON1 geni **Q192R** ve **L55M** polimorfik alanların (sırasıyla X^2:0,715 ve 0.049) genotip oranlarının Hardy-Weinberg dengesiyle uyumlu olduğu belirlendi (p>0.05). Bunun yanı sıra hasta grupları ve kontrol grubu arasında genotip ve allel frekanslarının dağılımı incelendi.

Kontrol grubu ile Tip 2 DM hasta grubunda **Q192R** polimorfik bölge için QQ ve QR genotipleri karşılaştırıldığında (X^2:0,091) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi (p>0.05). QQ ve RR genotipleri karşılaştırıldığında (X^2:0.500) RR genotipi DM grubunda kontrol grubuna göre daha fazla görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü. R(mutant) alleline Tip 2 DM hasta grubunda kontrol grubuna göre daha çok rastlansa da yapılan gruplar arası karşılaştırmada sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0.05); **L55M** polimorfik bölge için LL ve LM genotipleri karşılaştırıldığında (X^2:0.139) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. LL ve MM genotipleri karşılaştırıldığında (X^2:0.201) MM genotipi Tip 2 diyabetli

bireylerde daha fazla görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. Tip 2 DM hasta grubunda M alleli sıklığı kontrol grubuna göre daha fazlaydı ve yapılan karşılaştırma sonucunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.3.)

Tablo 4.3. Tip 2 Diabetes Mellitus Hasta Grubu ve Kontrol Grubu arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel Dağılımları

SNP Genotip/Allel	Tip2 DM (n=50)	Kontrol (n=50)	X^2	OR (%95 CI)	p değeri
		Q192R			
Genotip					
QQ	31 (%62,0)	26 (%52,0)	Referans	Referans	Referans
QR	15 (%30,0)	21 (%42,0)	0.091	1.680 (0.973-2.900)	0.069
RR	4 (%8,0)	3 (%6,0)	1.000	0.894 (0.183-4.364)	0.500
Allel					
Q	77 (%77,0)	73 (%73,0)	Referans	Referans	Referans
R	23 (%23,0)	27 (%27,0)	0.427	0.750 (0.177-3.180)	0.624
		L55M			
Genotip					
LL	21 (%42,0)	34 (%68,0)	Referans	Referans	Referans
LM	21 (%42,0)	13 (%26,0)	0.139	0.619 (0.350-1.095)	0.139
MM	8 (%16,0)	3 (%6,0)	0.201	0.375 (0.106-1.332)	0.200
Allel					
L	63 (%63,0)	81 (%81,0)	Referans	Referans	Referans
M	37 (%37,0)	19 (%19,0)	0.005*	0.514 (0.318-0.829)	0.007*

X^2: Ki-Kare, OR: Odds Ratio, CI: Confidence interval

Kontrol grubu ile DN hasta grubunda **Q192R** polimorfik bölgesi için QQ-QR ve QQ-RR genotipleri karşılaştırıldığında (sırasıyla X^2:0,407-0,543) RR genotipi DN hasta grubunda daha fazla görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi. R alleli sayısı DN ve kontrol grubu arasında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Tablo 4.4.).

Kontrol Grubu ile DN hasta grubunda **L55M** polimorfik bölgesi için LL-LM ve LL-MM genotipleri karşılaştırıldığında (sırasıyla X^2:0.068,0.074) LL ve MM genotiplerinin DN hasta grubunda daha fazla görülmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). M alleli sayısının DN hasta grubunda kontrol grubuna göre daha fazla olduğu ve istatistiksel olarak da anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Diyabetik Nefropati Hasta Grubu ve Kontrol Grubu arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel Dağılımları

SNP Genotip/Allel	DN (n=50)	Kontrol (n=50)	X^2	OR (%95 CI)	p değeri
		Q912R			
Genotip					
QQ	29 (%58,0)	26 (%52,0)	Referans	Referans	Referans
QR	16 (%32,0)	21 (%42,0)	0.407	0.762 (0.453-1.280)	0.408
RR	5 (%10,0)	3 (%6,0)	0.543	1.667 (0.421-6.603)	0.715
Allel					
Q	74 (%74,0)	73 (%73,0)	Referans	Referans	Referans
R	26 (%26,0)	27 (%27,0)	0.026*	0.963 (0.607-1.528)	0.500
		L55M			
Genotip					
LL	24 (%48,0)	34 (%68,0)	Referans	Referans	Referans
LM	16 (%32,0)	13 (%26,0)	0.068	1.231 (0.663-2.283)	0.068
MM	10 (%20,0)	3 (%6,0)	0.074	3.333 (0.975-11.395)	0.071
Allel					
L	64 (%63,0)	81 (%81,0)	Referans	Referans	Referans
M	36 (%27,0)	19 (%19,0)	0.007*	1.895 (1.170-3.067)	0.011*

X^2: Ki-Kare, OR: Odds Ratio, CI: Confidence interval

Tip 2 DM hasta grubu ile DN hasta grubu arasında **Q192R** polimorfik bölgesi için QQ-QR ve QQ-RR genotipleri karşılaştırıldığında (sırasıyla X^2:0,549-0,748) QQ (yabanil tip) ile QR (heterezigot mutant) ve RR (homozigot mutant tip) genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. DM hasta grubu ile DN hasta grubu arasında alleller karşılaştırıldığında; R(mutant) allelinin Tip 2 DM grubu ve DN grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

DM hasta grubu ile DN hasta grubu arasında **L55M** polimorfik bölgesi için LL-LM ve LL-MM genotipleri karşılaştırıldığında (sırasıyla X^2:0,407-0.795) sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. DM hasta grubu ile DN hasta grubu arasında L ve M allelleri karşılaştırıldığında M allelinin Tip 2 DM grubu ve DN grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. Tip 2 DM ve DN Hasta Grubu Arasında PON1 Geni Q192R ve L55M Genotip/Allel dağılımları

SNP Genotip/Allel	Tip2 DM (n=50)	DN (n=50)	X^2	OR (%95 CI)	p değeri
		Q192R			
Genotip					
QQ	31 (%62,0)	29 (%58,0)	Referans	Referans	Referans
QR	15 (%30,0)	16 (%32,0)	0.549	1.280(0.705-2.323)	0.524
RR	4 (%8,0)	5 (%10,0)	0.748	1.250(0.356-4.385)	1.000
Allel					
Q	77 (%77,0)	74 (%74,0)	Referans	Referans	Referans
R	23 (%23,0)	26 (%26,0)	0.742	1.130(0.694-1.841)	0.743
		L55M			
Genotip					
LL	21 (%42,0)	24 (%48,0)	Referans	Referans	Referans
LM	21 (%42,0)	16 (%32,0)	0.407	0.762(0.453-1.280)	0.408
MM	8 (%16,0)	10 (%20,0)	0.795	1.250(0.538-2.904)	0.795
Allel					
L	63 (%63,0)	64 (%63,0)	Referans	Referans	Referans
M	37 (%37,0)	36 (%27,0)	0.883	0.973(0.675-1.402)	1.000

X^2: Ki-Kare, OR: Odds Ratio, CI: Confidence interval

4.3. Çalışma Grubu Bireylerinin Demografik ve Biyokimyasal Verilerinin Yabanil Tip İle Homozigot Mutant Genotipler Arası Karşılaştırılması

Çalışmaya dahil edilen bireylerin demografik verileri, polimorfizm içermeyen sağlıklı genotip ile homozigot mutant polimorfizmli genotip arasında karşılaştırıldı. DN grubunda SBP (mmHg) değerlerinin homozigot polimorfik genotipte, polimorfizm içermeyen sağlıklı genotipe göre daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi. Diğer parametreler arasında yapılan karşılaştırmalarda elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösteren Bireyler Arasında Demografik Parametrelerin Karşılaştırılması

rs662 (Q192R)									
	Tip 2 DM			**DN**			**Kontrol**		
Genotip	**QQ**	**RR**	**p**	**QQ**	**RR**	**p**	**QQ**	**RR**	**p**
(n)	31	4		29	5		26	3	
Yaş (yıl)	50.97± 8.32	57± 13,03	0,323	51.17± 10.78	49.80± 5.26	0,343	49.77± 9.76	55± 15.62	0.227
VKI (kg/m²)	31.48± 4.92	32,55± 4,91	0,560	29.62± 3.21	32.12± 3.81	0,079	25.24± 1.12	25.50± 1.08	0,802
SBP (mmHg)	123.55 ±16.24	112,5± 9,57	0,180	124.48 ±12.70	142± 20.49	0,043 *	112.30±9 .08	116.66 ±5.77	0.313
DBP (mmHg)	77.42± 7.73	72.5± 9.57	0,512	78.28± 6.58	88± 8.36	0,524	75±7.07	80±0.7	0.239
rs854560 (L55M)									
	Tip 2 DM			**DN**			**Kontrol**		
Genotip	**LL**	**MM**	**p**	**LL**	**MM**	**p**	**LL**	**MM**	**p**
N	21	8		24	10		34	3	
Yaş (yıl)	52.05± 6.64	52.50± 6.57	0.640	49.50± 11.01	54.80± 10.71	0.663	51.74± 11.63	43± 3.46	0.209
VKİ (kg/m²)	30.28± 4.35	32.94± 3.88	0.771	28.82± 2.97	31.20± 4.98	0.132	25.27± 1.03	25.23± 1.07	0.996
SBP (mmHg)	121.90 ±17.21	128.75 ±14.6	0.964	127.91 ±16.41	120± 14.9	0.316	115.88±7 .83	113.33 ±11.55	0.351
DBP (mmHg)	76.66± 7.96	80±9.2 5	0.671	79.58± 6.9	75.72± 9.71	0.278	76.17± 6.52	76.66± 5.57	0.580

Çalışmaya dahil edilen bireylerin biyokimyasal verileri, QQ ve RR genotipleri arasında karşılaştırıldı. Tip 2 DM hastalarında Q192R polimorfizmi için QQ ve RR genotipleri arasında AKŞ, eGFR ve idrar kreatin değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). HbA1c, üre, kreatin, trigliserit, total kolesterol, LDL, HDL ve idrar mikroalbümin değerleri istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$).

DN hastalarında biyokimyasal veriler için QQ ve RR genotipleri arasında yapılan karşılaştırmada sonuçların anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Kontrol grubunda biyokimyasal parametreler QQ ve RR genotipleri arasında karşılaştırıldığında, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. ($p>0.05$) (Tablo 4.7.)

Tablo 4.7. Q192R Polimorfizmi için Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösteren Bireyler Arasında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması

	rs662 (Q192R)								
Çalışma Grubu	**Tip2 DM**			**DN**			**Kontrol**		
Genotip	**QQ**	**RR**	**p**	**QQ**	**RR**	**p**	**QQ**	**RR**	**p**
Genotip Sayısı(n)	31	4		29	5		26	3	
AKŞ (mg/dl)	167.45± 63.76	178.25± 14.56	0.022*	202.72± 91.42	217.4± 134.34	0.09	89.42± 10.58	97.66± 13.05	0.694
HbA1c (%)	7.68±2.71	7.93±2.45	0.478	9.44± 2.78	8.47± 1.79	0.156	5.15± 0.36	5.02± 0.16	0.164
Üre (mg/dl)	32.02± 18.48	42.07± 25.2	0.219	39.14± 28.14	35.95± 10.41	0.376	25.68± 8.05	31.38± 10.11	0.625
Kreatin (mg/dl)	0.85±0.38	0.983±0.37	0.593	1.004± 0.55	1.04± 0.35	0.720	0.72± 0.19	0.70± 0.26	0.418
Trigliserit (mg/dl)	249.32± 284.44	238.25± 80.44	0.432	214.86± 151.09	192.4± 80.08	0.355	149.65± 81.9	105.66± 23.45	0.277
Total Kolesterol	192.7± 55.11	204± 28.57	0.389	178.75± 48.16	155.4± 45.91	0.875	178.03± 74.57	128.66± 51.86	0.685
LDL (mg/dl)	91.75± 39.75	84.27± 31.26	0.319	91.49± 43.65	71.52± 37.65	0.590	75.50± 34.50	73.4± 1.21	0.100
HDL (mg/dl)	53.33± 35.01	43.08± 10.55	0.129	40.88± 11.28	39.8± 12.63	0.797	78.51± 53.50	42± 5.29	0.141
eGFR (ml/dk)	94.14± 17.27	71± 28.67	0.048*	83.13± 24.01	77.6± 17.75	0.471	104.69± 21.36	101.33± 24.41	0.778
İdrar (mg/gr) mikroalbümin	10.91± 14.33	3.37± 1.42	0.067	146.47± 211.2	186.8± 223.74	0.680	-	-	-
İdrar Kreatin (ml/dk)	141.28± 67.89	198.38± 256.83	<0.01*	108.45± 79.18	83.04± 50.62	0.501	-	-	-

Tip 2 DM grubunda L55M polimorfizmi için LL ve MM genotipleri arasında biyokimyasal parametreler karşılaştırıldığında HDL, eGFR ve idrar kreatin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu; AKŞ, HbA1c, üre, trigliserit, total kolesterol, LDL, HDL ve idrar mikroalbümin değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

DN grubunda LL ve MM genotipleri arasında biyokimyasal parametreler karşılaştırıldığında eGFR değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu; AKŞ, HbA1c, üre, kreatin, trigliserit, total kolesterol, LDL, HDL, idrar mikroalbümin ve idrar kreatinin değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$).

Kontrol grubunda LL ve MM genotipleri arasında biyokimyasal veriler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. L55M Polimorfizmi için Çalışma Gruplarında Polimorfizm Göstermeyen ve Homozigot Polimorfizm Gösteren Bireyler Arasında Biyokimyasal Parametrelerin Karşılaştırılması

	Rs854560 (L55M)								
Çalışma Grubu	**Tip2 DM**			**DN**			**Kontrol**		
Genotip	**LL**	**MM**	**p**	**LL**	**MM**	**p**	**LL**	**MM**	**p**
Genotip Sayısı(n)	21	8		29	5		26	3	
AKŞ (mg/dL)	161.47± 62.69	158.37± 44.34	0.092	221.95± 94.64	179.5± 87.47	0.715	88.44± 10.61	87.33± 4.51	0.075
HbA1c (%)	7.49± 2.68	7.95±2.77	0.216	9.71± 2.09	8.46± 3.14	0.979	5.12± 0.3	5.18± 0.27	0.587
Üre (mg/dL)	30.99± 14.80	31.30± 9.31	0.486	38.58± 22.04	33.67± 9.36	0.149	26.96± 8.85	28.53± 12.35	0.412
Kreatin (mg/dL)	0.85± 0.42	0.79±0.17	0.073	1.04± 0.64	0.88± 0.19	0.129	0.73± 0.21	0.63± 0.12	0.357
Trigliserit (mg/dL)	183.24± 127.94	168.25± 80.65	0.561	215± 101.67	207.3± 126.57	0.958	145.7± 75.89	113.33± 22.74	0.212
Total Koles. (mg/dL)	177.23± 45.87	210.37± 68.06	0.300	171.36± 41.59	173.1± 46.11	0.502	166.58± 71.86	142.66± 41.68	0.390
LDL (mg/dL)	81.81± 35.4	100.46± 46.68	0.182	85.94± 36.21	82.22± 40.45	0.539	67.47± 26.31	76.13± 2.01	0.087
HDL (mg/dL)	57.45± 37.26	42.63± 10.76	0.022*	40.18± 9.93	41.5± 11.01	0,583	76.75± 49.28	41.8± 5.07	0.119
eGFR (ml/dk)	91.85± 19.44	102± 6.14	0.003*	87.54± 30.32	78.9± 13.27	0.039*	102.85± 21.65	121.33± 16.5	0.387
İdrar (mg/gr) mikroalbümin	8.59± 9.29	7.12± 6.29	0.106	144.83± 233.11	235.5± 366.44	0.213	-	-	-
İdrar Kreatin(ml/dk)	121.45± 78.39	130.98± 25.19	0.013*	86.97± 76.47	102.75± 47.47	0.320	-	-	-

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin Tip 2 diyabetli hastalarda diyabetik nefropati gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca demografik ve biyokimyasal parametreler ile polimorfizmler arasındaki ilişki de incelenmiştir.

Diabetes Mellitus (DM); birden fazla komplikasyon ile endike olup dünyada en sık rastlanan kronik metabolik bir hastalıktır. DM gelişiminin; çevresel, fiziksel ve genetik faktörlere bağlı olduğu bilinmektedir (139). Metabolik hastalıklar sıralamasında tüm dünyada en üst sırada bulunan bu hastalık genel olarak Tip 1, Tip 2 ve Gestasyonel diyabet olarak üç ana gruba ayrılır (7).

Tip 2 DM, insüline bağımlı olmayan diyabet türü olarak tanımlanır ve asıl nedeni zamanla gelişen insülin direncidir. Ayrıca ß hücrelerinde fonksiyon bozuklukları, hepatik glikoz sentezindeki artışlar da hastalık gelişiminde rol oynamaktadır. Tip 2 DM'nin sebep olduğu akut veya kronik komplikasyonlar dünya genelinde yüksek insidansa sahip olduğu için morbidite ve mortalite nedenleri arasında oldukça önemli bir role sahiptir (41-43). DN, diyabet komplikasyonları içerisinde en yaygın prevelansa sahiptir. Vücuttaki sıvı homeostazı ve kan akışında meydana gelen düzensizlikler DN'nin oluşumundaki en önemli kriterlerdir (101). DN'de genetik faktörlerin etkisi geçmiş yıllardan beri araştırılmış ve bugüne kadar Tip 2 diyabete bağlı nefropatide birden fazla genom çapında ilişkilendirme (geome wild -GWS) çalışması yayınlanmıştır. Bu çalışmalar Tip 2 diyabete bağlı nefropati gelişiminde genlerin önemini güçlü bir şekilde ortaya koymaktadır (140-142).

PON1, karaciğerde üretilen ve çeşitli dokularda da eksprese edilen kalsiyum bağımlı bir esterazdır. Genellikle HDL partikülleri ile birleştiği yerde kana salınır ve LDL'yi oksidatif stresten koruma, aterosklerozu önleme gibi vücutta önemli görevleri üstlenmiştir. Bunun yanı sıra organofosfat toksinlerinin hidrolizasyonunda ve detoksifikasyonunda da önemli rol oynadığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (143-146).

PON1 geni anlamlı bölgesinde görülen polimorfizmlerden en sık iki tanesi Q192R ve L55M polimorfizmleridir. Q192R polimorfizminin inme, koroner arter hastalığı, Tip 2 DM ve hiperlipidemi, L55M polimorfizminin ise yine inme ve koroner arter hastalığı gibi hastalıklarla ilişkisi olduğu raporlanmıştır (147,148). Farklı etnik grupları ile yürütülen çalışmalar sonucunda, PON1 geninin 192. pozisyonda R allelinin bulunmasının

ateroskleroz gelişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (149,150). Liu ve ark. tarafından yürütülen meta-analiz çalışmasında ise PON1 geni ve iskemik inme hastalığı arasındaki ilişki test edilmiş ve Q192R polimorfizminde R alleli ya da RR genotipinin, iskemik inme için risk arttırıcı bir faktör olduğu ileri sürülmüştür (151). PON1 gen polimorfizmi ile diyabet ve nefropati gelişimi arasındaki ilişkiyi ilk inceleyen çalışma 2000 yılında Araki ve ark. tarafından yürütülmüştür. Bu çalışmada Tip 1 diyabetli hastalarda nefropati gelişiminin, PON1 polimorfizmi ile ilişkisinin olmadığını göstermişlerdir (152). Benzer hasta grupları ile 2017 yılında PON1 Q192R ve L55M polimorfizmleri test edilmiş ve Tip 1 diyabetli hastalarda L55M ve Q192R polimorfizmlerinin DN gelişiminde rol oynayan genetik belirteçler olabileceğini ileri sürmüşlerdir (153).

PON1 gen polimorfizminin DN gelişimi üzerine etkilerini inceleyen bir diğer çalışma ise Jun ve ark. tarafından 2013 yılında yapılmıştır. PON1 geni Q192R polimorfizminin DN ile ilişkisini incelemek için ikisi Kafkas popülasyonu ve üçü Asya popülasyonunun dahil edildiği toplam 5 çalışma sonuçlarıyla metaanaliz gerçekleştiren araştırmacılar, Q192R ve L55M polimorfizmi ile DN gelişimi arasında bir ilişkisi olmadığını raporlamışlardır (154). Alicja ve arkadaşları tarafından 2020 yılında yapılan bir çalışmada, L55M gen polimorfizminin, hemodiyaliz hastalarında insüline bağımlı olmayan DM nefropatisiyle ilişkisinin olmadığı bildirilmiştir (155).

Biz bu çalışmada, Tip 2 DM'li hastalarda PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin genotip ve allel oranlarının DN gelişimine etkisini araştırdık. İlk olarak, Tip 2 DM ve kontrol grubu arasında Q192R ve L55M polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansları karşılaştırıldı. Bu karşılaştırmada RR ve MM mutant genotiplerinin, Tip 2 DM grubunda fazla olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Bu bulgulara ek olarak allel frekanslarını kıyasladığımızda, R allelinin varlığının anlamlı olmadığı, M allelinin ise Tip 2 DM'li gruptaki varlığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). DN ve kontrol grubu arasında Q192R ve L55M polimorfizm karşılaştırması sonucunda, RR ve MM mutant genotiplerinin DN grubunda fazla olduğunu tespit ettik. Kontrol grubu ile kıyasladığımızda DN grubunda mutant genotipin varlığının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Allel varlığını test ettiğimiz DN grubunda; R allelinin varlığının anlamlı olmadığı, M allelinin ise DN'li grupta varlığının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$). Tip 2 DM ve DN grupları arasında Q192R ve L55M polimorfizm karşılaştırması sonucunda ise RR ve MM mutant

genotiplerinin DN grubunda daha fazla olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Tip 2 DM grubu ile kıyasladığımızda DN grubunda R ve M allellerinin varlığının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

PON1 gen ifadesinin metabolizma üzerine etkilerinin incelenmesi ile ilgili olarak 1961 yılında Uriel ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada PON1 ile HDL ilişkisinin olduğu gösterilmiştir (156). 1985'de paraoksonazın HDL üzerinde lokalize olduğu, 1988'de ise Apo-A1 bağımlı aktivasyona sahip olduğu bildirilmiştir (157-159). PON1 alloenzimlerinden Q ve R alloenzimlerinde paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi olduğu bildirilmiş, Q alloenziminin R'ye göre LDL'yi oksidasyondan koruma özelliğinin daha yüksek olduğu ileri sürülmüştür (160).

Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, Tip 2 DM tanısı olan hastalarda PON1 aktivitesinin düştüğü raporlanmıştır. Bunun yanında Tip 2 DM hastalarında azalmış PON1 aktivitesinin kardiyovasküler hastalık riskini arttırdığı yönünde güçlü kanıtlar elde edilmiştir (161-163). Rozek ve arkadaşları; diyabetli hastalarda ateroskleroz oluşumunda rol oynayan hücre zarı peroksidasyonuna karşı HDL koruyuculuğunun, azalan PON1 aktivitesiyle azaldığını ileri sürmüşlerdir (151).

PON1 geninden yoksun knock-out fareler ile yürütülen bir çalışmada HDL'nin, arteriyel hücre kültürlerinde LDL oksidasyona karşı koruma sağlayamadığı raporlanmıştır. Başka bir çalışmada normal ekspresyon seviyesinden daha fazla PON1 ekspresyonu gerçekleştirilen transgenik farelerde, HDL'nin normal farelerden elde edilen HDL'ye göre 3 kat fazla PON1 aktivitesi gösterdiği kanıtlanmış, LDL'yi oksidasyondan korumada transgenik farelerdeki HDL'nin daha etkin olduğu bulunmuştur (164-165).

HDL-PON1 ilişkisini aydınlatmayı hedefleyen çalışmalardan biri Li ve ark. tarafından 2008 yılında yürütülmüş ve aşikâr nefropatisi olan ve yeni tanı nefropatisi olan Tip 2 DM'li hastalarda HDL-PON1 aktivitesinin azaldığını rapor edilmiştir (166).
PON1 polimorfizm ve Tip2 DM oluşumunu Qujeq ve arkadaşları 2018 yılında çalışarak, tuzla uyarılan PON1 genotip ve fenotiplerinin Tip 2 DM'de aterojenik indekslerle ilişkisini incelemişlerdir. LL genotipli bireylerle LM+MM genotipli bireyler arasında ve QQ genotipli bireylerle QR+RR genotipli bireyler arasında demografik verileri karşılaştırdıklarında, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir (167). Yine 2019 yılında Ayan ve ark. yürüttükleri bir çalışmada diyabetli ve başlangıç seviyede DN'li hastalarda paraoksonaz, arilesteraz ve homosistein tiyolaktonaz

aktivitelerini incelemişlerdir. Kontrol grubu, Tip 2 DM normoalbüminüri ve Tip 2 DM mikroalbüminürili hasta grupları arasında demografik verileri karşılaştırdıklarında, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (168).

Çalışmamızda kontrol, Tip 2 DM ve DN hasta grubu bireylerinin yaş, cinsiyet, VKİ, AKŞ, HbA1c, Üre, Kreatin, LDL, HDL, Trigliserit, Total kolesterol, eGFR, idrar mikroalbümin ve idrar kreatinin gibi demografik ve biyokimyasal parametrelerinin hastalık oluşumu üzerine etkilerinin varlığını istatistiksel analizlerle test ettik. Bunun yanı sıra her parametreyi, PON1 polimorfizm (yabanil tip (QQ-LL) ve homozigot mutant tip (RR-MM)) genotipleri arasında istatistiksel olarak karşılaştırdık. Ayrıca DN gelişiminde, demografik ve biyokimyasal parametrelerin genotip ve alleller arasındaki farklılıklarını araştırdık.

Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda yaş ortalamalarının birbirine yakın olduğunu ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gözlemledik. Buna ek olarak her çalışma grubunda bireylerin yaş değerleri Q912R ve L55M polimorfik bölgeleri için QQ-RR ve LL-MM arasında istatistiksel olarak karşılaştırdık. Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda bireylerin yaş ortalamalarının dağılımının, QQ-RR ve LL-MM genotipleri arasında anlamlı olmadığını tespit ettik. Tip 2 DM hastalığının fiziksel olarak kendini geç fark ettiren bir hastalık türü olması sebebiyle bireyde şikayetlerin 5-10 yıl içerisinde görülmesi, Tip 2 DM tanısında da gecikmeye yol açmaktadır. Bu yüzden geçen zamanda DN gelişimi söz konusu olabilmekte ve Tip 2 DM tanısı ile aynı anda DN tanısının da mümkün olabileceği bilinmektedir (103).

Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda VKİ değerlerine bakıldığında her iki hasta grubunda VKİ değerlerinin, kontrol grubundaki VKİ değerlerine göre daha yüksek olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$).

Buna ek olarak Tip 2 DM, DN ve kontrol grubu arasında bireylerin VKİ değerleri Q912R ve L55M polimorfik bölgeleri için yabanil tip ve homozigot mutant genotipler (QQ-RR ve LL-MM) arasında istatistiksel olarak karşılaştırdık. RR ve MM genotipine sahip bireylerde VKİ ortalamaları daha yüksek görülse de, sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü.

Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda SBP ve DBP değerlerini Q192R ve L55M polimorfik bölgeleri için ayrı ayrı yabanil tip ve homozigot mutat genotipler arasında karşılaştırdık.

Q192R ve L55M polimorfik bölgesi için Tip 2 DM ve kontrol grubunda SBP değerlerinin dağılımı QQ-RR ve LL-MM genotipleri arasında anlamlı değildi. DN grubunda SBP değerlerinin dağılımının QQ-RR genotipleri arasında anlamlı olmadığı, LL-MM genotipleri arasında anlamlı olduğu görüldü. DBP değerlerinin karşılaştırılması sonucunda; Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda QQ-RR ve LL-MM genotipleri arasında DBP değerlerinin anlamlı olmadığı görüldü.

Qujeq ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, LL ve LL+MM genotiplerine sahip bireyler arasında AKŞ, HbA1c, trigliserit, total kolesterol, HDL, LDL gibi biyokimyasal parametreleri karşılaştırmışlardır. AKŞ, trigliserit, total kolesterol ve LDL değerleri LL+MM genotipine sahip bireylerde daha yüksek görülse de karşılaştırma sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. QQ ve QR+RR genotiplerine sahip bireyler arasında biyokimyasal parametreleri karşılaştırdıklarında AKŞ, HbA1c, trigliserit, total kolesterol ve LDL değerlerinin QQ genotipine sahip bireylerde daha yüksek olduğu görülmüştür. QQ ve QR+RR genotipli bireyler arasında yapılan karşılaştırmada LDL değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu, diğer parametrelerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür (167).

Ayan ve arkadaşlarının diyabetli ve başlangıç seviyede DN'li hastalarda paraoksonaz, arilesteraz ve homosistein tiyolaktonaz aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmada; kontrol grubu, diyabetli normoalbüminüri grubu ve diyabetli mikroalbüminüri grubu bireyleri arasında HbA1c, eGFR, Kreatinin, LDL, HDL, trigliserit, total kolesterol, idrar albümini ve idrar kreatini gibi biyokimyasal parametreler karşılaştırılmıştır. Gruplar arasında HbA1c, HDL, kreatinin, trigliserit ve idrar albümin değerleri karşılaştırıldığında sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğunu ancak eGFR, LDL, total kolesterol ve idrar kreatin değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir (168).

Biz yaptığımız çalışmada, Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda, biyokimyasal parametreleri (AKŞ, HbA1c, Üre, Kreatin, Trigliserit, Total Kolesterol, LDL, HDL, eGFR, idrar mikroalbümin ve idrar kreatin) tek yönlü varyans analizine tabi tuttuk ve anova testi ile karşılaştırdık. Gruplar arasında LDL ve Kreatin değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, AKŞ, HbA1c, Üre, Trigliserit, Total Kolesterol, HDL, eGFR, idrar mikroalbümin ve idrar kreatin değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p<0.05$).

Ayrıca hasta grupları ve kontrol grubundaki bireylerin biyokimyasal parametrelerini PON1 Q912R ve L55M polimorfik bölgeleri için yabanil tip ve homozigot mutant genotipler (QQ-RR ve LL-MM) arasında istatistiksel olarak karşılaştırdık. QQ ve RR genotipleri arasında, AKŞ değerlerinin Tip 2 DM grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu, DN ve kontrol grubunda anlamlı olmadığı görüldü. LL ve MM genotipleri arasında ise AKŞ değerlerinin gruplar arasında anlamlı olmadığı görüldü.

PON1 Q192R polimorfik bölgesi için yapılan istatistiksel karşılaştırmada HbA1c, Üre, Kreatin, Trigliserit, Total Kolesterol, LDL değerleri QQ-RR ve LL-MM genotipleri arasında karşılaştırıldığında Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. HDL değerleri QQ ve RR genotipleri arasında anlamlı olmadığı, LL ve MM genotipleri arasında ise anlamlı olduğu görüldü. eGFR değerleri; Tip 2 DM hasta grubunda QQ ve RR genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olduğu DN ve kontrol grubunda anlamlı olmadığı görüldü. LL ve MM genotipleri arasında, Tip 2 DM ve DN grubunda istatistiksel olarak anlamlı olduğu, kontrol grubunda ise anlamlı olmadığı görüldü. İdrar mikroalbümin değerleri; Tip 2 DM, DN ve kontrol grubunda QQ-RR ve LL-MM genotipleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. İdrar kreatin değerleri; Tip 2 DM grubunda QQ-RR ve LL-MM genotipleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü($p<0.05$). Ancak DN grubunda QQ-RR ve LL-MM genotipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü. Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde, PON1 Q192R ve L55M polimorfizmlerinin, Tip2 DM tanısı olan hastalarda DN gelişimine etkisinin olmadığı görülmüştür.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlara göre, PON1 geni Q192R ve L55M polimorfizmlerinin, Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda Diyabetik Nefropati gelişimine etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmaya katılan kişi sayısının az olması, çalışmanın kısıtlayıcı faktörleri arasında gösterilebilir. Çalışmaya katılan kişi sayısının arttırılması ile daha kesin sonuçların elde edebileceğini düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Telo S. Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. Fırat Tıp Dergisi 2005;10(3):117-122.

2. Parmaksız İ. Diyabet komplikasyonlarında ileri glikasyon son ürünleri. Marmara Med. J 2011;24:141-148.

3. TEMD Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu, 2018;15-33

4. Bennett PH, Knowler WC. Diabetes Mellitus ve Glukoz Hemostazının Tanımı, Teşhisi ve Sınıflandırması. Kahn CR, Weir GC, King GL, et al. Joslin's Diabetes Mellitus. 14. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık Ltd Şti, 2008:331-340.

5. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Am Diabetes care. 2015;27(1):5–10.

6. Türkiye Diyabet Vakfı. Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2019. 9th ed. Balcı MK, editor. Türkiye; 2019.

7. Kahn B B, Type 2 Diabetes: When Insulin Secretion Fails to Compensate for Insulin Resistance, Cell, 92, 593-596, 1998.

8. Aschner, P. Horton, E., Leiter, L. A., Munro, N., & Skyler, J. S. (2010). Practical Steps to Improving The Management Of Type 1 Diabetes: Recommendations From The Global Partnership For Effective Diabetes Management. Int J Clin Pract, 64, 305-315.

9. Al-Qazaz, H. K., Hassali, M. A., Shafie, A. A., Sulaiman, S. A. S., & Sundram, S. (2011). Perception and Knowledge of Patients with Type 2 Diabetes in Malaysia About Their Disease and Medication: A qualitative study. Research in Social and Administrative Pharmacy, 7, 180-191.

10. Wendland EM, Torloni MR, Falavigna M, Trujillo J, Dode MA, Campos MA, et al. Gestational diabetes and pregnancy outcomes-a systematic review of the World Health Organization (WHO) and the International Association of Diabetes in Pregnancy study groups (IADPSG) diagnostic criteria. BMC Pregnancy Childbirth. 2012;12(1):23.

11. Gasim T. Gestational diabetes mellitus: maternal and perinatal outcomes in 220 Saudi women. Oman Med J. 2012;27(2):140.

12. US Renal Data System. USRDS 2000 Annual Report, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Bethesta , MD,2000

13. Geoffrey Boner, Mark E Cooper, editors. Management of Diabetik Nephropathy 2000;P:13

14.Jorge L. Gross, Azevedo MD, et al. Diabetic Nephropathy: Diagnosis, Prevention, And Treatment. Diabetes Care 2005; 28:176–88.

15.Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17:1067-73.

16.Aviram M, Rosenblat M, Bisgaier CL, Newton RS, Primo-Parmo SL, La Du BN. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. J Clin Invest. 1998; 101(8):1581-1590

17.Mackness MI, Durrington PN. HDL, its enzymes and its potential to influence lipid peroxidation. Atherosclerosis. 1995; 115(2): 243-253

18.Costa LG., Vitalone A., Cole TB., Furlong. Modulation of Paraoxonase (PON1) activity Biochem Pharmacol. 2005; 69 : 541-550

19.Deakin SP, James RW. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1 Clinical Science 2004; 107: 435-447

20.Aviram M. Does paraoxonase play a role in susceptibility to cardiovascular disease? Mol Med Today 1999;5:381-6.

21. Kuzuya T, Nakagawa S, Satoh J, Kanazawa Y, Iwamoto Y, Kobayashi M, Nanjo K, Sasaki A, Seino, Y, Ito C, Shima K, Nonaka K, Kadowaki T, Report of the Committee on the Classification and Diagnostic Criteria of Diabetes Mellitus, Diabetes Research and Clinical Practice, 55, 65-85, 2002.

22. Amaral S, Oliveira P J, Ramallo-Santos J, Diabetes and the Impairment of Reproductive Function: Possible Role of Mitochondria and Reactive Oxygen Species, Current Diabetes Reviews, 4, 46-54, 2008.

23. Puavilai G, Chanprasertyotin S, Sriphrapradaeng A, Diagnostic Criteria for Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance: 1997 Criteria by the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (ADA), 1998 WHO Consultation Criteria, and 1985 WHO Criteria, Diabetes Research and Clinical Practice, 44, 21-26, 1999.

24.Heydari I, Radi V, Razmjou S, Amiri A, Chronic Complications of Diabetes Mellitus in Newly Diagnosed Patients, International Journal of Diabetes Mellitus, 2(1), 61-63, 2010.

25.Ryden L, Standhl E, Bartnik M, Berghe GVD, Betteridge J. Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular disease. EurHeart J 2007; 28: 88-136.

26. Nassar P O, Walker C S, Salvador C S, Felipetti F A, Orrico S R P, Nassar C A, Lipid Profile of People with Diabetes Mellitus Type 2 and Periodontal Disease, Diabetes Research and Clinical Practice, 96(1), 35-39, 2012.

27. Cho NH, Kirigia J, Mbanya JC, Ogurstova K, Guariguata L, Rathmann W et al. Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 8th edition, 2017; 14(5):120-40.

28. Said G. Diabetic Neuropathy: An update. J Neurol 1996; 243(6):431-40.

29. Lippert J, Ritz E, Schawarzberg A, Schneider P. The rising tide of end-stage renal failure from diabetic nephropathy type II—an epidemiological analysis. Nephrol Dial Transplant 1995; 10: 462-7.

30. Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, et al. Definition, classification and diagnostics of diabetes mellitus. J Lab Med. 2018;126(7):406–10.

31. Kıbrıs Türk Diyabet Derneği, Kıbrıs Diyabet Çalıştayı 2015. Diyabette Toplumsal Farkındalığın Geliştirilmesi, Sağlık Ekibi, Toplum ve Hastanın Eğitilmesi. 2015 (1), 90.

32. Zimmet P, Williams J, de Courten M. Diagnosis and classification of diabetes mellitus Eds:J.A.M. Wass, S.M. Shalet, E. Gale, S. Amiel. Oxford Textbook of 44 Endocrinology and Diabetes. Oxford, New York, Oxford University Press, 1635-1646

33. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas — 9th Edition. DiabetesAtlas http://www. diabetesatlas.org/ (Erişim Tarihi : 22.09.2020)

34. Türk Diyabet Cemiyeti, Diyabet, Diyabet İstatistikleri, Türdep-2 sonuçlarının özeti. http://www.diabetcemiyeti.org/c/turdep-2-sonuclarinin-ozeti (Y.T.: 05.11.2013) (E.T.:25.09.2020)

35. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2014;37(Supplement1):S81-S90.

36. Türkiye Diyabet Vakfı, (2019). TÜRKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi. Ankara.

37. Altuntaş Y. Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflaması. In: Yenigün M, Altuntaş Y. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı Nobel Tıp Kitabevi İstanbul 2001;51-61.

38. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 27:S5-S10,2004.

39. Kaşkatepe B., Otoimmün Hastalıklar. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri. https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/62732/mod_resource/content/1/13.hafta%20otoimmun%20hastal%C4%B1klar.pdf (E.T.: 26.09.2020)

40. Satman İ. ve TURDEP Çalışma Grubu. (2011)

41. Groop LC, Widen E, Ferrannini E. Insulin resistance and insulin deficiency in pathogenesis of type 2 diabetes. Errors of metabolism or methods. Diabetologia 36: 1326-1331, 1993.

42. Oldroyd J, Banerjee M, Heald A, Cruickshank K. Diabetes and ethnic minorities. Postgrad Med J 2005; 81: 486–490.

43. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001; 414: 782-787.

44. Yenigün M. Her yönüyle Diabetes Mellitus. 2. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2001; 51-61.

45. Buse JB, Polonsky KS, Burant CF. Type 2 diabetes mellitus. Williams Textbook of Endocrinology, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky K, Larsen PR. Elsevier, Philadelphia, 2008;1329-89.

46. Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pahogenesis and therapy. Lancet 2005; 365: 1333-1346.

47. Groop LC, Widen E, Ferrannini E. Insulin resistance and insulin deficiency in pathogenesis of type 2 diabetes. Errors of metabolism or methods. Diabetologia 36: 1326-1331, 1993.

48. De Fronza RA, Ferrainni E, Simonsen DC. Fasting hyperglycemia in NIDDM: Controbutions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. Metabolism 38: 387-395, 1989.

49. Akarsu E, Diabetes Mellitus Patogenezinde Vitamin Eksikliğinin Rolü. Türk Diyabet Cemiyeti, Sağlık Profesyonelleri, 49. Ulusal Diyabet Kongresi, 19.04.2013.

50. Akçay G, Akçay MN, Akarsu E. Endokrin ve Metabolizma Hastalıkları. Erzurum, Aktif Yayıncılık. 2000;191-244.

51. Yenigün M. "Her Yönüyle Diabetes Mellitus", Nobel Tıp Kitabevi, 2. Baskı, İstanbul, 2001.

52. Kefeli A. Tip 2 diabetes mellituslu hastlarda farklı insülin tedavi protokollerinin kilo alımı ile ilişkisi. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim Araştırma Hastanesi Dahiliye Kliniği, İstanbul, 2009.

53. Altuntaş Y. Tip 2 diabetes mellitus'un patogenezi. Her yönüyle diabetes mellitus. (Doç. Dr. Yenigün M, ed). İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 219-223, 2001.

54. Kayaalp SO. İnsülin, oral ve diğer antidiyabetik ilaçlar ve glukagon. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Cilt 2. Ankara 2000, 1252-72.

55. Joshi SR, Parikh RM, Das AK. Insulin--history, biochemistry, physiology and pharmacology. J Assoc Physicians India 2007; 55: 19-25.

56. Akinlade A.T., Ogbera A.O., Fasanmade O.A., Olamoyegun M.A., Serum C-peptide assay of patients with hyperglycemic emergencies at the Lagos State University Teaching Hospital (LASUTH), Ikeja. Int Arch Med. 2014 Nov 28; 7: 50.

57. Protein Data Bank, Molecular explorations through biology and medicine, Diabetes Mellitus, Insulin. DOI: 10.2210/rcsb_pdb/GH/DM/drugs/Insulin/Insulin

58. Perrett M., Maurer T., Insulin Interactions with the Insulin Receptor. http://biology.kenyon.edu/BMB/jsmol2015/TMMPInsulinR/indexMP314.html (E.T.: 01.10.2020)

59. Sucakli MH, Ozkan F, Inci MF, Celik M, Keten HS, Bozoglan O. Effects of smokeless tobacco (Maras powder) use on carotid intima media tickness. Med Sci Monit 2013; 19: 859-64.

60. Final Repolarizasyon Sürecine Katkıda Bulunan K+ Akımları, Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri
https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/143417/mod_resource/content/0/Pankreas%C4%B1n%20endokrin%20fonksiyonlar%C4%B1.pdf (E.T.: 03.10.2020)

61. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Prof. Dr. Hafize Uzun Ders Notları. Membranlarda Moleküllerin Hareketi: Pasif Transport. http://194.27.141.99/dosya_depo/ders_notlari/hafize_uzun/Membranlarda%20molek%FCllerin%20hareketi.ppt (E.T.: 05.10.2020)

62. Altıntaş A., Pankreas, Yapısı-Görevleri ve Pankreas Hastalıkları Fizyopatolojisi. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/1045/mod_resource/content/1/6.%20Pankreas%20fzyp.pdf (E.T. 05.10.2020)

63. Ewa Świderska, Justyna Strycharz, Adam Wróblewski, Janusz Szemraj, Józef Drzewoski and Agnieszka Śliwińska (November 5th 2018). Role of PI3K/AKT Pathway in Insulin-Mediated Glucose Uptake, Blood Glucose Levels, DOI: 10.5772/intechopen.80402.

64. Baumann CA, Saltiel AR (2001). Spatial compartmentalization of signal transduction in insulin action. BioEssays. 2001;23:215-222.

65. Zhang Y, Wat N, Stratton IM, Warren-Perry MG, Orho M, Groop L, Turner RC. UKPDS 19: heterogeneity in NIDDM: separate contributions of IRS-1 and β3-adrenergic-receptor mutations to insulin resistance and obesity respectively with no evidence for glycogen synthase gene mutations, Diabetologia. 1996;39:1505-1511.

66. De Meyts P., The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network, Endotext, 27.04.2016.

67. Akay G.G., Enzim-kenetli ve G-protein-kenetli hücre yüzey reseptörleri ile sinyal iletimi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji AbD. Ankara Üniversitesi Açık Ders Malzemeleri.
https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/143961/mod_resource/content/1/Enzim-kenetli%20ve%20G-proteini-kenetli%20h%C3%BCcre%20y%C3%BCzey%20resept%C3%B6rleri%20ile%20sinyal.pdf (E.T.:06.10.2020)

68. Prof Dr. B. Sönmez UYDEŞ DOĞAN Ders notları, Reseptör Tipleri ve Hücre içi Sinyal İletimi, 11.11.2019.
https://avesis.istanbul.edu.tr/resume/downloadfile/sonmezdo?key=12ca8f3f-c47f-42eb-976d-901f8238d227 (E.T.:06.10.2020)

69. Biomolecules and Therapeutics 25(1):44-56, January 2017. DOI: 10.4062/biomolther.2016.128

70. Caterina D.R., Madonna R., Atherogenesis and Diabetes, Focus on Insulin Resistance and Hyperinsulinemia. Revista Española de Cardiologia. Vol. 65. Núm. 4. páginas 309-313 (Abril 2012. DOI: 10.1016/j.rec.2011.11.009.

71. Yu KT, Czech MP. Tyrosine phosphorylation of the insulin receptor beta subunit activates the receptor-associated tyrosine kinase activity. J Biol Chem, 1984; (259) :5277-5286.

72. Farese RV. Insulin-sensitive phospholipid signaling systems and glucose transport. Update II. Exp Biol Med (Maywood), 2001;(226:283)-295.

73. Avruch J. Insulin signal transduction through protein kinase cascades. Mol Cell Biochem, 1998; (182):31-48

74. Kahn CR. Knockout mice challenge our concepts of glucose homeostasis and the pathogenesis of diabetes. Exp Diabesity Res, 2003;4(3):169-182

75. Czech MP, Corvera S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. J Biol Chem, 1999; (274):1865-1868

76. β-Adrenergic Receptor and Insulin Resistance in the Heart, Biomol Ther (Seoul). 2017 Jan; 25(1): 44–56. DOI: 10.4062/biomolther.2016.128

77. M.T. Malecki / Diabetes Research and Clinical Practice 68S1 (2005) S10–S21

78. Balkan F., Sigara ve Alkol Kullanımının Şeker Hastalığına Etkileri, 21.10.2012 http://www.drendokrin.org/2012/10/sigara-ve-alkol-kullaniminin-seker.html (E.T.:14.10.2020)

79. Tsai FJ, Yang CF, Chen CC, Chuang LM, Lu CH, Chang CT, Wang TY, Chen RH, Shiu CF, Liu YM, Chang CC, Chen P, Chen CH, Fann CS, Chen YT, Wu JY. A genome-wide association study identifies susceptibility variants for type 2 diabetes in Han Chinese. PLoS Genet, 2010; 19;6(2)

80. Anık A., Çatlı G., Abacı E., Böber E., Maturity-onset diabetes of the young (MODY): an update, Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism | Volume 28: Issue 3-4, 10.01.2015.

81. Malecki MT and Klupa T. Type 2 diabetes mellitus: from genes to disease. Pharmacol Rep. 2005;57:20-32.

82. Guja C, Gagniuc P, Ionescu-Tirgovişte. Genetic factors involved in the pathogenesis of type 2 diabetes. Proc Rom Acad Series B 2012; 1: 44-61.

83. Groenewoud MJ, Dekker JM, Fritsche A, Nijpels G, Heine RJ, Maassen JA, Machicao F, Schäfer SA, Häring HU, Hart LM 't, Van Haeften TW. Variants of CDKAL1 and

IGF2BP2 affect firstphase insulin secretion during hyperglycaemic clamps. Diabetologia, 2008; (51):1659–1663

84. Stancáková A, Kuulasmaa T, Paananen J, Jackson AU, Bonnycastle LL, Collins FS, Boehnke M, Kuusisto J, Laakso M. Association of 18 confirmed susceptibility loci for type 2 diabetes with indices of insulin release, proinsulin conversion, and insulin sensitivity in 5,327 nondiabetic Finnish men. Diabetes, 2009; 58(9):2129–2136.

85. Wu Y, Li H, Loos RJ, Yu Z, Ye X, Chen L, Pan A, Hu FB, Lin X. Common variants in cdkal 1, cdkn2a/b, igf2bp2, slc 30a8, and hhex /ide genes are associated with type 2 diabetes and impaired fasting glucose in a chinese han population. Diabetes, 2008(57):2834−2842.

86. Elbein S. Genetics factors contributing to type 2 diabetes across Ethnicities. J Diabetes Sci Technol, 2009;3(4):685-689.

87. Freeman H., Cox R.D., Type-2 diabetes: a cocktail of genetic discovery, Human Molecular Genetics, Volume 15, Issue suppl_2, 15 October 2006, Pages R202–R209,

88. Olokoba A.B., Obateru O.A., Olokoba L.B., Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends, Oman Med J. 2012 Jul; 27(4): 269–273. DOI: 10.5001/omj.2012.68

89. Zeggini E, Scott LJ, Saxena R, Voight BF. Meta-analysis of genome-wide association data and large-scale replication identifies additional susceptibility loci for type 2 diabetes. Nat Genet 2008;40:638 45.

90. De Rosa S., Arcidiacono B., Chiefari E., Brunetti A., Indolfi C., Foti D.P., Type 2 Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease: Genetic and Epigenetic Links. Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Jan 17;9:2. DOI: 10.3389/fendo.2018.00002. eCollection 2018.

91. Rizvi S., Raza S.T., Mahdi F., Association of genetic variants with diabetic nephropathy, World J Diabetes. 2014 Dec 15;5(6):809-16. doi: 10.4239/wjd.v5.i6.809.

92. Çelik D.A., Koşar P.A., Özçelik N., MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi, S.D.Ü. Týp Fak. Derg. 2013:20(3)/121-127.

93. Bolkent S., Tip 1 ve Tip 2 Diyabet ile İlişkili miRNA'lar, Turkiye Klinikleri J Med Sci 2018;38(3):266-74.

94. Yang Z.M, Chen L.H. et al. Serum microRNA profiling and bioinformatics analysis of patients with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. Mol Med Rep. 2017 Apr;15(4):2143-2153. DOI: 10.3892/mmr.2017.6239. Epub 2017 Feb 22.

95. Ovalı S., Tip 2 Diyabette SAFRANAL'ın İnflamasyon Üzerine Etkisi, Afyon Kocatepe Üniversitesi F.B.E. Kimya Anabilim Dalı, Temmuz 2014.

96. Türk Diyabet Vakfı, Diyabet Hakkında Herşey, Komplikasyonlar. https://www.turkdiab.org/diyabet-hakkinda-hersey.asp?lang=TR&id=58 (E.T.:20.10.2020

97. Yenigün M. Diabetik mikroanjiyopati ve diabetik makroanjiyopati. (Yenigün M ed). Her yönüyle diabetes mellitus. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 315-370, 2001.

98. Bayraktar M. Diyabetin Akut komplikasyonları. Endokrinoloji metabolizma ve diabet (Özata M, Yönem A ed). Endokrinoloji metabolizma ve diabet. İstanbul, Medikal Yayıncılık. 342-352, 2006.

99. Bozkurt N ,Yıldız E. Diyet El Kitabı: 7. Baskı; Hatiboğlu Basım Ve Yayımcılık. 2013; 257-297

100. Ulusal Diyabet Konsessus Grubu. Türkiye Diyabet Vakfı Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 5. Baskı Nisan 2015. ISBN 978-975-98038-2-7.

101. Bingöl G., Topbaş E., Diyabetik Nefropati Evreleri ve Evrelere Özgü Hemşirelik Yaklaşımı. Türk Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Hemşireleri Derneği Nefroloji Hemşireliği Dergisi 2018:2 (13)

102. Turgut F., Diyabetik Nefropati: Patogenezde yeni görüşler ve Tedavide yeni hedefler. 31. Ulusal Nefroloji, Hipertansiyon, Diyaliz ve Transplantasyon Kongresi.

103. Yavuzer S., Diyabetik Nefropati. Turkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics. 2015;6(1):33-7

104. Atasoy ve ark., Diyabetik Nefropatiye Genel Bir Bakış, Med Bull Haseki 2015; 53: 16-19

105. Chen S., Gui S. Yu Y., DIABETIC NEPHROPATHY: PATHOGENESIS. https://calgaryguide.ucalgary.ca/diabetic-nephropathy-pathogenesis/ (Y.T.:03.05.2020) , (E.T.:24.10.2020)

106. Kurt M., Atmaca A., Gürlek A., Diyabetik Nefropati, Hacettepe Tıp Dergisi 2004; 35:12-17.

107. Marso SP. Diabetic nephropathy. In: Marso SP (ed). The Handbook of Diabetes Mellitus and Cardiovascular Disease. 1st edition. London: Remedica Group, 2003; 113-27.

108. Sindel Ş (editör). Current Nefroloji ve Hipertansiyon Tanı ve Tedavi. Ankara, Güneş Kitabevi; 2012.

109. Mathiesen ER, Oxenboll B, Johansen K, Svendsen PA, Deckert T. Incipient nephropathy in type1 (insulin-dependent) diabetes. Diabetologia 1984;26:406-410.

110. Elving LD, Bakkeren JA, Jansen MJ, de Kat Angelino CM, de Nobel E, van Munster PJ. Screening for microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: frozen storage of urine samples decreases their albumin content. Clin Chem 1989;35:308-310.

111. Warram JH, Gearin G, Laffel L, Krolewski AS. Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. J Am Soc Nephrol 1996;7:930-937.

112. Mann JF, Gerstein HC, Yi QL, Lonn EM, Hoogwerf BJ, Rashkow A, Yusuf S. Development of renal disease in people at high cardiovascular risk: results of the HOPE randomized study. J Am Soc Nephrol 2003;14:641-647.

113. SANCAKDAR E., Diabetik Nefropatiye Genetik Yatkınlıkta ADDUCİN GLY460TRP, ACE I/D ve AGTM235 Gen Polimorfizmlerinin Rolü, Fırat Üniversitesi Tıbbi Biyokimya AbD., Elazığ, 2010.

114. Warram JH, Scott LJ, Hanna LS, Wantman M, Cohen SE, Laffel LM, et al. Progression of microalbuminuria to proteinuria in type 1 diabetes: nonlinear relationship with hyperglycemia. Diabetes 2000;49:94-100.

115. Gross JL, de Azevedo MJ, Silveiro SP, Canani LH, Caramori ML, Zelmanovitz T. Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment. Diabetes Care 2005;28:164-176.

116. Edelstein CL, Cronin R.E., The Patient With Acute Renal Failure Manuel of Nephrology 1999, 132-154.

117. Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A et al. (2001). Paraoxonase-2 Deficiency Aggravates Atherosclerosis in Mice Despite Lower Apolipoprotein-B-containing Lipoproteins. J Biol Chem 281: 29491-500.

118. Li HL, Liu DP, Liang CC (2003). Paraoxonase gene polymorphisms, oxidative stres and diseases. J Mol Med 81: 766-79.

119. Ranade K., et al. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. 2005 Nov;36(11):2346-50. DOI: 10.1161/01.STR.0000185703.88944.7d. Epub 2005 Oct 20.

120. Gan KN, Smolen A, Eckerson HW, La Du BN. (1991). Purification of human serum paraoxonase/arylesterase. Evidence for one esterase catalyzing both activities. Drug Metab Dispos. 19(1):100-106.

121. Lourdes R, Bharti M, Durington PN, Hernandez A, Mackness MI. Hydrolysis of platelet-activating factor by human serum paraoxonase. Biochem J 2001; 354: 1-7.

122. Başkol G., Köse K., Paraoksonaz: Biyokimyasal Özellikleri, Fonksiyonları ve Klinik Önemi, Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal) 26 (2) 75-80, 2004.

123. Billecke S, Draganov D, Counsell R, Stetson P, Watson C, Hsu C. ve ark. Human serum paraoxonase (PON1) isozymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. Drug Metab. Dispos.2000, 28, 1335–1342.

124. Dragonov DI, La Du BN. Pharmacogenetics of paraoxonases; a brief review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2004; 369(1): 78-88.

125. Sorenson RC, Primo-Parmo SL, Kuo CL, Adkins S, Lockridge O, La Du BN. (1995). Reconsideration of the catalytic center and mechanism of mammalian paraoxonase/arylesterase.Proc Natl Acad Sci U S A. 92(16):7187-7191.

126. Azarsız E, Sözmen EY (2000). Paraoksonaz ve Klinik Önemi. Türk Biyokimya Dergisi 25(3): 109-19.

127. Balcı Ekmekçi Ö, Donma O, Ekmekçi H. (2004). Paraoksonaz. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 35(2):78-82.

128. Sunay S.Z., Paraoksonaz Polimorfizminin ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesinin Pestisitlere Maruz Kalan Bireylerde Araştırılması, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Disiplinlerarası Adli Tıp Anabilim Dalı, Adli Kimya ve Adli Toksikoloji Bölümü, Ankara,2010.

129. Bayrak T, Bayrak A, Demirpençe E, Kılınç K (2005). Yeni bir kardiyovasküler belirteç adayı: paraoksonaz. Hacettepe Tıp Dergisi 36: 147-51.

130. Oda MN, Bielicki JK, Berger T, Forte TM (2001). Cysteine substitutions in apolipoprotein AI primary structure modulate paraoxonase activity. Biochemistry 40: 1710-18.

131. Fatima et al., PON1 concentration and high-density lipoprotein characteristics as cardiovascular biomarkers, Arch Med Sci Atheroscler Dis. 2019; 4: e47–e54.

132. Altınkaynak Y., Postprandial Lipidemide Serum Paraoksonaz 1 (PON1) Aktivitesinin İncelenmesi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Trabzon, 2012.

133. La Du BN, Aviram M, Billecke S, et al. (1999). On the physiological role(s) of the paraoxonases. Chem Biol Interact 119-120: 379-388.

134.(https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf) (E.T.: 16.02.2021)

135. Humbert R, Adler DA, Disteche CM, Hassett C, Omiecinski CJ, Furlong CE. The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. Nat Genet 1993;3:73-6.

136. Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum paraoxonase. Gen Pharmacol 1998;31:329-36.

137.Hin1I Kataloğu, https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1831#/ER1831 (E.T.:22.02.2021)

138.BspPI Kataloğu, https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1321#/ER1321

(E.T.:22.02.2021)

139. Özdemir İ., Hocaoğlu Ç., Tip 2 diabetes mellitus ve yaşam kalitesi: Bir gözden geçirme. Göztepe Tıp Dergisi 24(2):73-78,2009

140. Iyengar SK, Abboud HE, Goddard KA, Saad MF, Adler SG, Arar NH, Bowden DW, Duggirala R, Elston RC, Hanson RL, Ipp E, Kao WH, Kimmel PL, Klag MJ, Knowler WC, Meoni LA, Nelson RG, Nicholas SB, Pahl MV, Parekh RS, Quade SR, Rich SS, Rotter JI, Scavini M, Schelling JR, Sedor JR, Sehgal AR, Shah VO, Smith MW, Taylor KD, Winkler CA, Zager PG,

Freedman BI: Genome-wide scans for diabetic nephropathy and albuminuria in multiethnic populations: The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND). Diabetes 56: 1577–1585, 2007

141. Iyengar SK, Freedman BI, The FIND Consortium: A multiethnic genome-wide linkage study for diabetic nephropathy. The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND) Study [Abstract]. J Am Soc Nephrol 18: 608A, 2007

142. Sedor JR, Nelson RG, The FIND Consortium: A genomewide scan for estimated glomerular filtration rate (eGFR): The Family Investigation of Nephropathy and Diabetes (FIND) Study [Abstract]. J Am Soc Nephrol 18: 14A, 2007

143. Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. Atherosclerosis, 2011;214(1):20-36.

144. Mackness M, Mackness B., Human paraoxonase-1 (PON1): Gene structure and expression, promiscuous activities and multiple physiological roles, Gene, 2015 Aug 1;567(1):12-21.

145. Mahrooz A., Pharmacological Interactions of Paraoxonase 1 (PON1): A HDL-Bound Antiatherogenic Enzyme, Current Clinical Pharmacology, Volume 11 , Issue 4 , 2016.

146. Kim DS, Marsillach J, Furlong CE, Jarvik GP, Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease, Pharmacogenomics. 2013 Sep; 14(12): 1495–1515.

147. Fortunato G, Rubba P, Panico S, Trono D, Tinto N, Mazzaccara C, et al. A paraoxonase gene polymorphism, PON 1 (55), as an independent risk factor for increased carotid intima-media thickness in middle-aged women. Atherosclerosis 2003;167(1):141-8.

148. Voetsch B, Benke KS, Damasceno BP, Siqueira LH, Loscalzo J. Paraoxonase 192 Gln-->Arg polymorphism: an independent risk factor for nonfatal arterial ischemic stroke among young adults. Stroke 2002;33(6):1459- 64.

149. Sanghera DK, Saha N, Aston CE, Kamboh MI. Genetic polymorphism of paraoxonase and the risk of coronary heart disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997;17(6):1067-73

150. Antikainen M, Murtomäki S, Syvänne M, Pahlman R, Tahvanainen E, Jauhiainen M, et al. The Gln-Arg191 polymorphism of the human paraoxonase gene (HUMPONA) is not associated with the risk of coronary artery disease in Finns. J Clin Invest 1996;98(4):883-5.

151. Shunmoogam N., Naidoo P., Chilton R., Paraoxonase (PON)-1: a brief overview on genetics, structure, polymorphisms and clinical relevance, Vasc Health Risk Manag. 2018; 14: 137–143.

152. Araki S., Makita Y., Canani L., Ng D., Warram J.H., Krolewski A.S., Polymorphisms of human paraoxonase 1 gene (PON1) and susceptibility to diabetic nephropathy in Type I diabetes mellitus, Diabetologia volume 43, pages1540–1543 (2000).

153. Ons Fekih et al., Paraoxonase 1 polymorphisms (L55M and Q192R) as a genetic marker of diabetic nephropathy in youth with type 1 diabetes, Endokrynologia Polska 2017;68(1):35-41.

154. Jun Wang et al., Association of paraoxonase gene polymorphisms with diabetic nephropathy and retinopathy, Molecular Medicine Reports, October 2, 2013, 1845-1851.

155. Grzegorzewska E. Et al., Paraoxonase 1 gene polymorphisms concerning non-insulin-dependent diabetes mellitus nephropathy in hemodialysis patients, Journal of Diabetes and its Complications, Volume 34, Issue 11, November 2020, 107687

156. Uriel J., Charactérisation des cholinestérases etd'autres estérases cardoxylique après électrophorèseet immunoélectrophorèse en gelose I. Applications àl'étude des estérases du serum humain normal. Ann.Inst. Pasteur, 101: 104-119, 1961.

157. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolysing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophospates. J Biol Chem 1946; 164:271-89.

158. Aldridge WN. Serum esterases. I. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J 1953;53(1):110-7.

159. Mackness MI, Walker CH. Multiple forms of sheep serum A-esterase activity associated with the high-density lipoprotein. Biochem J 1988;250(2):539-45

160. Başkol G., Köse K., Paraoksonaz: Biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi, Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal) 26 (2) 75-80, 2004.

161. Mackness, B, Mackness, MI, Arrol, S, Turkie, W, Julier, K, Abuashia, B, Miller, JE, Boulton, AJM, Durrington, PN. Serum paraoxonase (PON1) 55 and 192 polymorphism and paraoxonase activity and concentration in non-insulin dependent diabetes mellitus. Atherosclerosis 139 (1998), 341-349

162. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraoxonase preventsaccumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. FEBS Lett 1991;286:152-4.

163. Rozenberg O, Shiner M, Aviram M, Hayek T. Paraoxonase 1 (PON1) attenuates diabetes development in mice through its antioxidative properties. Free Radic Biol Med. 2008 Jun 1;44(11):1951-9

164. Shih DM, Xia YR, Wang XP, Miller E, Castellani LW, Subbanagounder G, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. J Biol Chem 2000;275(23):17527-35

165. Oda MN, Bielicki JK, Ho TT, Berger T, Rubin EM, Forte TM. Paraoxonase 1 overexpression in mice and its effect on high-density lipoproteins. Biochem Biophys Res Commun 2002; 290(3):921-7.

166. Li C., Gu Ç., Protective effect of paraoxonase 1 of high-density lipoprotein in type 2 diabetic patients with nephropathy, Nephrology (Carlton), 2009 Aug;14(5):514-20. doi: 10.1111/j.1440-1797.2008.01035.x. Epub 2008 Feb 3.

167. Qujeq D et al., Genotype and phenotype of salt-stimulated paraoxonase 1 (PON1) is associated with atherogenic indices in type 2 diabetes, J Diabetes Metab Disord. 2018 Jun; 17(1): 1–10.

168. Ayan D. et al., Evaluation of Paraoxonase, Arylesterase, and Homocysteine Thiolactonase Activities in Patients with Diabetes and Incipient Diabetes Nephropathy, J Med Biochem. 2019 Oct; 38(4): 481–488.

DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA PARAOXONASE 1 GEN POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%8	%7	%4	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	www.turkdiab.org İnternet Kaynağı	%1
2	openaccess.hku.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
3	Submitted to Harran Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
4	dergipark.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	www.noroloji.org.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to TechKnowledge Turkey Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.acibadem.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Hacettepe University Öğrenci Ödevi	<%1
9	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1