

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**DİYABETİK NEFROPATİLİ HASTALARDA MİR-184, MİR-98,  
MİR-185, MİR-196A-3p VE MİR-203  
EKSPRESYON DÜZEYLERİ VE HASTALIK ŞİDDETİ İLE  
İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. İsmet EROĞLU**

**İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Hakan KORKMAZ**

**ISPARTA-2019**

## TEŞEKKÜR

İlk günden bu yana tez çalışmamın her evresinde büyük bir özveriyle yanımda olan, yol gösteren, ışık tutan, moral ve güven veren tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Hakan KORKMAZ'a,

Dört yıllık zorlu uzmanlık eğitimi sürecimde gece gündüz desteklerini esirgemeyen başta İç Hastalıkları ABD Başkanı Prof. Dr. Muhammed Cem KOÇKAR olmak üzere kıymetli hocalarım Prof. Dr. Mehmet ŞAHİN, Prof. Dr. Altuğ ŞENOL, Prof. Dr. Barış AFŞAR, Prof. Dr. Rengin Elsürer AFŞAR, Doç. Dr. Dilek AYDIN, Doç. Dr. Murat KOÇER, Doç. Dr. Bülent Çetin, Dr. Öğretim Üyesi Emine Güçhan ALANOĞLU, Dr. Öğretim Üyesi Demircan ÖZBALCI, Dr. Öğretim Üyesi Seyfullah KAN'a,

Çalışmamız ile tanışma fırsatı bulduğum güleryüzlerini eksik etmeyen Dr. Öğretim Üyesi Kuyuş Hekimler ÖZTÜRK'e ve Dr. Öğretim Üyesi Fevziye Burcu ŞİRİN'e,

Her zaman yanımda hissettiğim Fatma Gür HATİP, Murat Bircan TUĞLU, Rıza Burak ÖZ, Aslıhan KARADAĞ, Bora TORUS, Samet ALTUNEL ve Sönmez ŞEVİK gibi isimlerin nezdinde çok sevgili onlarca asistan arkadaşlarıma,

İç Hastalıkları ABD hemşireleri, sekreterleri ve çalışanlarına,

Varlıklarıyla huzur bulduğum canım aileme ve herşeyim, eşim Hande Nur EROĞLU'ya çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğünün TTU-2018-6675 nolu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

**Dr. İsmet EROĞLU**

**Isparta/2019**

## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>iii</b>
<b>KISALTMALAR .....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLolar DİZİNİ .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Diyabetes Mellitus .....	3
2.1.1. Tanımı .....	3
2.1.2. Epidemiyoloji.....	3
2.1.3. Sınıflaması .....	4
2.1.3.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus.....	4
2.1.3.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus.....	5
2.1.4. Tip 2 Diyabetes Mellitus.....	6
2.1.4.1. Tanı .....	6
2.1.4.2. Komplikasyonlar .....	6
2.1.4.2.1. Akut Komplikasyonlar .....	6
2.1.4.2.2. Kronik Komplikasyonlar.....	6
2.1.4.2.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar.....	7
2.1.4.2.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar .....	7
2.2. Diyabetik Nefropati.....	8
2.2.1. Epidemiyoloji.....	9
2.2.2. Diyabetik Nefropati Risk Faktörleri .....	9
2.2.2.1. Arteriyel Hipertansiyon.....	9
2.2.2.2. Hiperglisemi .....	10
2.2.2.3. Sigara .....	10
2.2.2.4. Cinsiyet .....	10
2.2.2.5. Dislipidemi.....	10
2.2.2.6. Aşırı Protein Alımı.....	11
2.2.2.7. Hiperürisemi.....	11
2.2.2.8. Yaş .....	11
2.2.2.9. Genetik Yatkınlık .....	11
2.2.3. Diyabetik Nefropati Patolojisi .....	12

2.2.3.1. Diyabetik Nefropati Patolojik Sınıflandırma: .....	12
2.2.3.2. Diyabetik Nefropati Patofizyoloji .....	12
2.2.3.3. VEGF ve TGF $\beta$ .....	12
2.2.3.3. Hemodinamik Değişiklikler .....	14
2.2.3.4 İskemi ve İnflamasyon .....	15
2.2.3.5. RAAS Aktifleşmesi .....	17
2.2.3.6. Podosit Otofaji .....	18
2.2.3.7. Mitokondri Disfonksiyonu .....	18
2.2.3.8. Epigenetik Düzenlemeler .....	19
2.2.4. MikroRNA (miRNA) .....	20
2.2.4.1. MiRNA Sentezi .....	20
2.2.4.2. MiRNA ve Diyabet .....	21
2.2.4.3. MiRNA ve Diyabetik Nefropati .....	23
<b>3. MATERYAL METOD .....</b>	<b>26</b>
3.1. Çalışmaya Alınacak Olguların Seçimi .....	26
3.2. Antropometrik Ölçümler .....	27
3.3. Biyokimyasal Analizler .....	27
3.4. VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi .....	28
3.5. TGF- $\beta$ Düzeylerinin Belirlenmesi .....	28
3.6. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi .....	28
3.6.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler .....	29
3.6.2. Primerler .....	29
3.6.3. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Tayini .....	30
3.6.4. miRNA İzolasyon Protokolü .....	30
3.6.5. cDNA İzolasyon Protokolü .....	31
3.6.6. Real Time PCR Protokolü .....	32
3.7. İstatiksel Analiz .....	33
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>35</b>
4.1. Grupların Hemogram ve ALT Düzeyleri Açısından Değerlendirilmesi .....	36
4.2. Grupların AKŞ, HbA1c ve Diyabet Süreleri Açısından Değerlendirilmesi ...	37
4.3. Grupların Lipid Düzeyleri Açısından Değerlendirilmesi .....	37
4.4. Grupların Böbrek Fonksiyonları Açısından Değerlendirilmesi .....	38
4.5. Grupların VEGF ve TGF $\beta$ Düzeylerinin Değerlendirilmesi .....	38
4.6. Grupların MikroRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi .....	39

4.7. Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar .....	40
4.8. DN Gelişiminde MiRNA'ların Etkisi .....	41
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>45</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>54</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>55</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>56</b>



## KISALTMALAR

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>ACE</b>	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
<b>ADA</b>	: Amerikan Diyabet Cemiyeti
<b>AGE</b>	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
<b>AKŞ</b>	: Açlık Kan Şekeri
<b>ALT</b>	: Alanin Aminotransferaz
<b>Anti GAD</b>	: Glutamik Asit Dekarboksilaza Karşı Antikor
<b>BB</b>	: Beta Blokör
<b>BKO</b>	: Bel Kalça Oranı
<b>DAG</b>	: Diaçilgliserol
<b>DKA</b>	: Diyabetik Ketoasidoz
<b>DKB</b>	: Diyastolik Kan Basıncı
<b>DM</b>	: Diyabetes Mellitus
<b>DN</b>	: Diyabetik Nefropati
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>DRP</b>	: Diyabetik Retinopati
<b>ECM</b>	: Ekstra Cellüler Matriks
<b>EGF</b>	: Epidermal Büyüme Faktörü
<b>GAPDH</b>	: Gliseraldehit-3 Fosfat Dehidrogenaz
<b>GBM</b>	: Glomerüler Bazal Membran
<b>GDM</b>	: Gestasyonel Diyabetes Mellitus
<b>GFR</b>	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
<b>GPR9</b>	: G-Protein Bağlı Metabolik Reseptör
<b>HbA1c</b>	: Glikolize Hemoglobin
<b>HDL-K</b>	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol
<b>HHD</b>	: Hiperglisemik Hiperosmolar Durum
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	: Hipoksinin İndüklediği Faktör-1 alfa
<b>HT</b>	: Hipertansiyon
<b>IAA</b>	: İnsülin Antikorları
<b>ICA</b>	: Adacık Hücre Antikoru

<b>ICSA</b>	: Adacık Hücresi Yüzey Antikorları
<b>IDF</b>	: Uluslar Arası Diyabet Federasyonu
<b>IGF-1</b>	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1
<b>JAK-STAT</b>	: Janus Kinaz Sinyal Transdüseri ve Transkripsiyon Aktivatörü
<b>KAH</b>	: Koroner Arter Hastalığı
<b>KBH</b>	: Kronik Böbrek Hastalığı
<b>KKB</b>	: Kalsiyum Kanal Blokörü
<b>KKH</b>	: Koroner Kalp Hastalığı
<b>LADA</b>	: Latent Otoimmün Diyabet
<b>LDL-K</b>	: Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol
<b>MI</b>	: Miyokart İnfarktüsü
<b>MiRNA</b>	: MikroRNA
<b>MCP-1</b>	: Monosit Kemotaktik Protein-1
<b>NFκB</b>	: Nükleer Faktör Kappa-Hafif Zincir Güçlendiricisi
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>PAH</b>	: Periferik Arter Hastalığı
<b>PAI-1</b>	: Plasminojen Aktivatör İnhibitörü-1
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PI3K</b>	: Fosfoinositid 3 Kinaz
<b>PIGF</b>	: Plasental Büyüme Faktörü
<b>PKC</b>	: Protein Kinaz C
<b>PPI</b>	: Proton Pompa İnhibitörü
<b>PTM</b>	: Post Transyonel Histon Mıdifikasyonları
<b>RAAS</b>	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
<b>RISC</b>	: RNA Kaynaklı Susturma Kompleksi
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>RNaz III</b>	: RNA Polimeraz III
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Radikalleri
<b>SDBY</b>	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
<b>SGLT-2</b>	: Sodyum Glukoz Kotransporter-2
<b>SKB</b>	: Sistolik Kan Basıncı
<b>STIM1</b>	: Stromal Etkileşim Molekülü 1

<b>SVH</b>	: Serebro Vasküler Hastalık
<b>T1DM</b>	: Tip 1 Diyabetes Mellitus
<b>T2DM</b>	: Tip 2 Diyabetes Mellitus
<b>TG</b>	: Trigliserit
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
<b>TK</b>	: Total Kolesterol
<b>TLR</b>	: Tool Like Reseptör
<b>TNF</b>	: Tümör Nekrozis Faktörü
<b>TRBP</b>	: Transaktivasyondan Sorumlu RNA Bağlayıcı Protein
<b>TURDEP</b>	: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevelans Çalışması
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
<b>VKI</b>	: Vücut Kitle İndeksi
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Diyabetes Mellitus Sınıflandırması.....	4
<b>Tablo 2.</b> Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri .....	6
<b>Tablo 3.</b> Diyabetik Nefropati Sınıflandırması .....	8
<b>Tablo 4.</b> Diyabetik Nefropatide MiRNA'ların Değişimi .....	25
<b>Tablo 5.</b> CDNA İzolasyon Protokolü .....	31
<b>Tablo 7.</b> RT-PCR bileşenleri .....	32
<b>Tablo 8.</b> RT-PCR Döngü Protokolü .....	32
<b>Tablo 9.</b> Grupların Kan Basıncı Düzeyleri.....	36
<b>Tablo 10.</b> Grupların Hemogram ve ALT Düzeyleri.....	36
<b>Tablo 11.</b> Grupların AKŞ, HbA1c ve Diyabet Süreleri.....	37
<b>Tablo 14.</b> Grupların VEGF ve TGF- $\beta$ Düzeyleri .....	39
<b>Tablo 15.</b> Grupların MikroRNA Relatif Ekspresyon Düzeyleri .....	40
<b>Tablo 16.</b> Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar .....	41
<b>Tablo 17.</b> Diyabetik Nefropati Gelişimi Üzerine MiRNA ile Diğer Değişkenlerin Etkisi .....	42
<b>Tablo 18.</b> Diyabetik Nefropati Tanısını Koymada MiRNA'ların Rolü .....	43

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. VEGF ve Anjiogenez.....	13
Şekil 2. TGF- $\beta$ ve Glomerüloskleroz.....	14
Şekil 3. Diyabetik Nefropatide Patofizyolojik Değişiklikler.....	17
Şekil 4. MiR-375 ve Diyabetes Mellitus.....	22
Şekil 5. Grupların Cinsiyet Dağılımları .....	35
Şekil 6. Diyabetik Grupların Sağlıklı Kontrollere Göre Relatif miRNA İfadeleri ....	40
Şekil 7. Diyabetik Nefropati Tanısı için miR-203'ün ROC Eğrisi .....	43
Şekil 8. Diyabetik Nefropati Tanısı için miR-196-3p'nin ROC Eğrisi .....	44



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Diyabetes mellitus (DM), insülin eksikliği, insülin direnci veya her ikisindeki defekt nedeniyle oluşan hiperglisemi ile karakterize kronik bir hastalıktır. Kronik hiperglisemi uzun dönemde özellikle göz, böbrek, sinirler, kalp ve vasküler sistemde hasar ve disfonksiyona yol açmaktadır. Artan prevalansı ve seyri sırasında oluşan akut ve kronik komplikasyonları ile DM önemli morbidite ve mortalite sebepleri arasında yer almaktadır (1). Diyabetik nefropati (DN) son dönem böbrek yetmezliğinin (SDBY) en önemli sebeplerinden birisidir (2). DN patogenezinde hiperglisemi; diaçilgliserol (DAG)–protein kinaz C (PKC) yolu, ileri glikasyon son ürünleri (AGE), poliollu yol, heksosamin yolağı ve oksidatif stres gibi hücrel sinyal yollarının aktifleştığı ve birbirleriyle etkileşime girdiği inflamatuvar süreçler rol oynar (3). Bahsedilen inflamatuvar süreçlerde vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve transforme edici büyüme faktörünün (TGF- $\beta$ ) sırasıyla neoanjiyogenezise neden olması ve profibrotik bir sitokin olarak görev yapmasıyla DN patogenezinde etkileri kanıtlanmıştır(4-7).

Biyokimyasal mekanizmaların yanında deoksiribonükleik asit (DNA) metilasyonu, kodlama yapmayan ribonükleik asit (RNA)'lar ve histon modifikasyonları gibi epigenetik düzenlemeler de DN patogenezinde rol oynamaktadırlar (8, 9). MikroRNA (miRNA)'lar 22 nükleotid uzunluğunda tek iplikçikli, kodlama yapmayan, ilgili genin protein translokasyonunu sağlayan, çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerin düzenleyicileridir. MiRNA'ların DM ve bununla ilişkili komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (10, 11).

Çalışmamızdaki öncelikli amacımız DN'li tip 2 DM (T2DM) hastalarında miR-184, miR-98, miR-185, miR-196a-3p ve miR-203 ekspresyon düzeylerinde farklılık olup olmadığını saptamaktır. Bununla birlikte diğer bir amacımız mikroRNA'lardaki olası değişiklikler ile hastalık şiddeti arasında ilişkiyi değerlendirmektir. Ayrıca DN patofizyolojik süreçte rolü kanıtlanmış olan serum VEGF ve TGF- $\beta$  düzeyleri ile mikroRNA düzeyleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek de diğer bir amacımızdır.

Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma ile SDBY'nin en önemli sebeplerinden biri olan DN'nin gelişim sürecinde mikroRNA'ların etkinliğinin belirlenebilirliği ile tanı ve tedavi sürecinde yeni ufuklar aması hedeflenmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diyabetes Mellitus

#### 2.1.1. Tanımı

DM, insülin eksikliği, insülin direnci veya her ikisindeki defekt nedeniyle oluşan hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (1).

#### 2.1.2. Epidemiyoloji

Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) 2017 verilerine göre dünyada 425 milyon erişkinde DM hastalığı vardır. 2040'ta ise bu sayının 629 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir (12).

2017 tarihli Centers for Disease Control and Prevention (CDC) raporunda, Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 'nde 2015 yılı itibarıyla, her yaştan 30.3 milyon insanın veya nüfusun %9.4'ünün (18 yaş ve üzeri 30.2 milyon yetişkininin veya yetişkin nüfusunun %12.2'sinin) DM'li olduğu tahmin edilmektedir. Ayrıca 84.1 milyon yetişkin (yetişkin nüfusun %33.9'u) prediyabetiktir. Yine bu rapora göre 5 Amerikalıdan 2'sinin yaşamları boyunca T2DM gelişeceği tahmin edilmektedir. Yeni tanı konulan DM vakalarının yarısından fazlası 45-64 yaşları arasındadır (13). ABD'de, DM prevalansı son 30 yılda iki kattan fazla artmıştır. Diyabetli kişilerin sayısındaki sıralamada ilk 10 ülke şu anda Hindistan, Çin, ABD, Endonezya, Japonya, Pakistan, Rusya, Brezilya, İtalya ve Bangladeş'tir (14).

Ülkemizde Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalansı Çalışması-II (TURDEP-II) saha araştırması Ocak 2010-Haziran 2010 tarihleri arasında 15 ilden 540 merkezin katılımı ile yapılmıştır. 2011'de yayınlanan bu çalışmaya göre Türkiye'de 20 yaş ve üzeri nüfus baz alındığında, diyabet oranı %13.7 (6.503.027 kişi) olarak saptanmıştır, bunlardan bilinen diyabetli birey sayısı 3.547.401 kişi (%54.6) ve yeni diyabetli birey sayısı 2.955.626 kişi (%45.5) olarak saptanmıştır. 1988'de yapılan TURDEP-I'e göre, yeni tanımlanan TURDEP-II çalışmasında Türkiye'de 12 yılda diyabet sıklığı %90 artmıştır (15, 16).

### 2.1.3. Sınıflaması

Amerikan Diyabet Derneği (ADA), 1997 yılında diyabet için tanı ve sınıflandırma ölçütlerini yayınlamış, 1999'da ise Dünya sağlık örgütü (WHO) tarafından küçük düzeltmelerle kabul edilmiştir. ADA 2003'te bozulmuş açlık glukozu için revizyon yapsa da WHO ve IDF 1999 kriterlerini değiştirilmemesini bildirmiştir (17).

ADA'nın 2019 yılında yaptığı son diyabet sınıflandırılması şu şekildedir (Tablo 1) (18):

**Tablo 1.** Diyabetes Mellitus Sınıflandırması (18)

1.	Tip 1 Diyabetes Mellitus
2.	Tip 2 Diyabetes Mellitus
3.	Gestasyonel Diyabetes Mellitus
4.	Diyabetin Diğer Spesifik Tipleri; a.Monogenik Diyabet Sendromları (Neonatal Diyabet ve MODY gibi) b.Ekzokrin Pankreas Hastalıkları (Kistik Fbrozis ve Kronik Pankreatit gibi) c.İlaç ve Kimyasal Kaynaklı Diyabet (Glukokortikoid kullanımı, HIV / AIDS tedavisinde kullanılan ilaçlar veya organ transplantasyonundan sonra kullanılan ilaçlar gibi)

#### 2.1.3.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

T1DM, DM'li hastaların %5-10'unu oluşturmaktadır. Pankreas  $\beta$  hücrelerinin otoimmün yıkımı nedeniyle geliyorsa tip 1a olarak adlandırılır. Otoimmünite kanıtının ve  $\beta$  hücresi yıkımı için bilinen başka bir nedenin olmadığı mutlak insülin yetmezliği olan bazı hastalarda idiopatik veya tip 1b DM olarak ifade edilir (19).

$\beta$  hücresinin immün yıkımının belirteçleri, adacık hücre antikoru (ICA), insülin antikoru (IAA), glutamik asit dekarboksilaza karşı antikor (Anti GAD), antitirozin fosfataz antikoru (IA-2, IA-2 beta) ve adacık hücresi yüzey antikoru (ICSA)'dır (20).

$\beta$  hücrelerin %80-90'ı yıkıldıktan sonra hiperglisemi gelişir ve diyabet teşhis edilebilir. T1DM hastalarının yaklaşık %85'inde dolaşımda adacık hücresi antikoru bulunur (21).

Yetişkinlerin %2-12'sinde bulunan, klinik olarak T2DM'ye benzeyen, başlangıçta insüline bağımlı olmayan ama sonrasında otoimmün aracılı insülin yetmezliği gelişen diyabet, latent otoimmün diyabet (LADA) olarak adlandırılır (22, 23).

### **2.1.3.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus**

T2DM yetişkinlerde en sık görülen diyabet türü olup tüm diyabetli hastaların %90'dan fazlasını kapsamaktadır. Hiperglisemi birlikte değişken derecelerde insülin eksikliği ve insülin direnci varlığı ile karakterizedir. Dünya genelinde, T2DM prevalansı yetişkinlerde %6.4 olarak tahmin edilse de bu oran bölgelere göre %3.8 ile %10.2 arasında değişebilmektedir (24, 25).

T2DM gelişiminde genetik, çevresel ve metabolik faktörler etkilidir. Güçlü bir aile öyküsü olan bireylerde ileri yaş, obezite ve fiziksel inaktivitenin varlığı en önemli risk faktörleridir. Gestasyonel diyabet (GDM) tanısı alanlar ve bu kişilerin çocukları da T2DM'ye ilerleme riski altındadır (26).

Hiperinsülinemi, aterojenik dislipidemi, glukoz intoleransı, hipertansiyon (HT), hiperürisemi ve polikistik over sendromu gibi durumlar da T2DM gelişimini kolaylaştırmaktadır (26).

T2DM'de insülin direncinin sonucu olarak kas hücrelerine glikoz transportu azalmakta, hepatik glikoz üretimi artmakta, lipoliz artmakta ve buna bağlı olarak serbest yağ asiti plazmada yükselmektedir (27). T2DM'nin, sebep olduğu miyokard infarktüsü (Mİ), inme, SDBY, retinopati, ayak ülserleri gibi hastalıklar ABD'de sağlık harcamalarının %14'ünü oluşturmaktadır (28).

Genellikle 30'lu yaşlardan itibaren tanı almaya başlayan T2DM'li hastaların birçoğu obezdir (29). Obezitenin yaygınlaşmasıyla çocukluk ve adölesan döneminde de T2DM görülmeye başlamıştır. Genetik yatkınlığın etkisi kuvvetlidir. Hastalık genellikle sinsi başlangıçlıdır. Hastaların çoğu asemptomatik olup, hipergliseminin klasik semptomları olan poliüri, polidipsi, noktüri, bulanık görme ve seyrek olarak kilo kaybı, el ve ayaklarda uyuşma, tekrarlayan enfeksiyonlar hastalarda görülebilir. Serum glukoz konsantrasyonu 180 mg /dl (1 mmol/l) böbrek eşik değerini aşınca üriner

glukoz atımı poliüriye, gelişen osmotik diürez hipovolemi dolayısıyla polidipsiye neden olur (30-32).

#### **2.1.4. Tip 2 Diyabetes Mellitus**

##### **2.1.4.1. Tanı**

Diyabet tanısı için aşağıdaki kriterlerden biri gerekmektedir (Tablo 2) (33):

**Tablo 2.** Diyabetes Mellitus Tanı Kriterleri

1.HbA1c $\geq$ %6.5
2.Açlık plazma glukozunun $\geq$ 126 mg/dl (7.0 mmol/l) (En az 8 saatlik açlık sonrası)
3.75 gr OGTT sonrası 2. saat plazma glukoz düzeyinin $\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) olarak ölçülmesi
4.Rastgele plazma glukoz ölçüm düzeyinin $\geq$ 200 mg/dl (11.1 mmol/l) ölçülmesi ve buna hiperglisemi semptomlarının eşlik etmesi

##### **2.1.4.2. Komplikasyonlar**

###### **2.1.4.2.1. Akut Komplikasyonlar**

Diyabetik Ketoasidoz (DKA), Hiperglisemik Hiperosmolar Durumu (HHD), hipoglisemi ve laktik asidoz diyabetin akut komplikasyonlarıdır (34). HHD'nin yarattığı mortalite riski DKA'ya göre 10 kat daha fazladır. DKA ve HHD hastalarının prognozunu dehidratasyonun ciddiyeti, komorbidite varlığı ve yaş belirler (35).

###### **2.1.4.2.2. Kronik Komplikasyonlar**

Kronik komplikasyonlar mikrovasküler (retinopati, nöropati ve nefropati) ve makrovasküler komplikasyonlar (koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalık ve serebrovasküler hastalık) olarak sınıflandırılmaktadır (36).

Diyabet komplikasyonları morbidite ve mortaliteyi artırmakla birlikte özellikle gelişmekte olan ülkeler başta olmak üzere tüm ülke ekonomileri için bir tehdit de oluşturmaktadır (37).

Diyabetli hastaların yaşam beklenti ve kalitesinin bozulmasının temel nedeni aterosklerozdur. DN, SDBY'nin ve diyabetik retinopati (DRP) de erişkin körlüğünün en sık sebebidir. Diyabetik vasküler komplikasyonların önlenmesinde temel tedavi prensipleri olarak nefropati ve retinopati riskini azaltan hiperglisemi kontrolü, yine nefropati ve retinopati riskinin azaltılmasının yanısıra kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltan antihipertansif tedavi, DRP progresyonunu yavaşlatan VEGF hedefleyici ajanlar ve panretinal fotokoagülasyon ile statin tedavisi yer alır. Bütün bu tedavi ve gelişmelere rağmen diyabetin prevelansındaki beklenen artışın da etkisiyle diyabet komplikasyonları önemli bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir (38).

#### **2.1.4.2.2.1. Makrovasküler Komplikasyonlar**

Diyabetin makrovasküler komplikasyonları koroner arter hastalığı (KAH), periferik arter hastalığı (PAH) ve serebrovasküler hastalık (SVH)'tir. Diyabette kontrolsüz hipergliseminin neden olduğu metabolik patolojik süreçler koroner kalp hastalığı (KKH) riskini artırmaktadır. MI öyküsü olmayan diyabetik hastalarda 7 yıllık MI geçirme riski %20.2 iken diyabetik olmayanlarda %3.5'tir. Benzer şekilde MI öykülü diyabetiklerde yeniden MI riski %45, diyabetik olmayanlarda %18.8'dir (39).

Diyabet KKH dışında stroke riskini de artırmaktadır. Yirmiiki ülkede yapılan interstroke çalışması akut stroke öyküsü olan ve olmayan grupların ele alındığı bir vaka kontrol çalışması olup diyabet öyküsü olan hastalarda stroke riskinde %35 artış olduğunu göstermiştir (40).

Alman Epidemiyolojik Ayak Bileği Brakiyal İndeksi Deneme Çalışmasında 65 yaş ve üstü hastalarda diyabetik olanların 2 kat daha yüksek PAH'a sahip olduğunu göstermiştir (41).

#### **2.1.4.2.2.2. Mikrovasküler Komplikasyonlar**

##### **Diyabetik Retinopati**

DRP; 20-74 yaş arası yetişkinlerde körlüğün en önemli sebebi olup vasküler geçirgenliğin arttığı, kapiller mikroanevrizmaların, kapiller dejenerasyonun ve neovaskülarizasyonun görüldüğü retinal lezyon değişikliklerini barındırır. Hastalığın

erken evrelerinde görülen hiperglisemi kaynaklı intramural perisit ölümü ve bazal membran kalınlaşması retinal damarlarda, kan-retina bariyerinde değişikliğe, vasküler permeabilite artışına neden olur. Retinal kılcalların dejenerasyonu ve tıkanması hastalığı, retinada neovaskülarizasyon ve sıvı birikiminin görüldüğü makula ödemeine ilerleyebilir. Hipertansiyon ve glisemik kontrolle birlikte laser fotokoagulasyon, steroid enjeksiyonu ve VEGF antagonistleri tedavi seçenekleri arasındadır (42, 43).

### **Diyabetik Nöropati**

Diyabetik hastaların yaklaşık %50'sini etkileyen diyabetik nöropatide periferik, motor ve otonomik sinirler etkilenebilmektedir (44).

Diyabet, periferik sinir sistemini daha çok etkilemekte ve en sık distal simetrik polinöropatiye yol açmaktadır. Bunun yanı sıra, radikülopati, radikülopleksopati, mononöropati, mononöritis multipleks ve otonom nöropatiye de neden olabilmektedir. Distal polinöropatili hastalar tipik olarak simetrik tarzda ayaklardan başlayan ve proksimal yayılan eldiven-çorap tarzında uyuşma, karıncalanma, ağrı ve/veya güçsüzlük görülmektedir (45).

Diyabetik polinöropatili hastalar ülserasyon ve alt ekstremitte amputasyonları için risk altındadır (46).

Diyabetik otonom nöropati gastroparezi, konstipasyon, idrar retansiyonu, erektil disfonksiyon ve kardiyak aritmiler olarak kendini gösterebilmektedir. Diyabetik otonom nöropatili hastalarda mortalite riski 2 kat artmıştır (47).

### **2.2. Diyabetik Nefropati**

DN, T1DM ve özellikle T2DM'de görülen mikrovasküler komplikasyonlardan biridir (48). Mogensen ve ark. 1983'te T1DM hastalarında yapılan çalışmalara dayanarak DN sınıflandırmasını geliştirmişlerdir (Tablo 3) (49).

**Tablo 3.** Diyabetik Nefropati Sınıflandırması

Evre 1	Hiperfiltrasyon
Evre 2	Glomerüler Bazal Membran Kalınlaşması
Evre 3	Mikroalbuminüri (30-299)
Evre 4	Makroalbuminüri ( $\geq 300$ )
Evre 5	SDBY

Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)'nda ilerleyici artışın görüldüğü hiperfiltrasyon DN'nin erken belirtisidir (50). Hastalığın erken döneminde mikroalbuminüriye neden olan glomerüler hiperfiltrasyon zamanla makroalbuminüriye ve sonuç olarak renal replasman tedavisi gerektiren SDBY'ne neden olur (2).

Hem ülkemizde hem de dünyada yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere diyabet sıklık ve prevalansının giderek arttığı düşünüldüğünde SDBY'ne neden olan DN önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olan toplumsal bir problemdir. DN'li hastalar KAH'a sahip hastalar gibi yüksek kardiyovasküler risklere sahiptirler (51, 52).

### **2.2.1. Epidemiyoloji**

DN, kronik böbrek hastalığının önde gelen nedenidir (53). Avrupa ve Japonya ile benzer bir eğilime sahip ABD'de son 10 yılda DN insidansı %150 artmıştır (54). Diyabet, ABD ve Japonya'daki SDBY'nin en yaygın nedeni olup, vakaların sırasıyla %45 ve %37'sini oluşturmaktadır (55).

Diyalize giren diyabetli hastalar girmeyen diyabetli hastalara göre, 1 yıl ve 5 yıl içinde sırasıyla %22 ve %15 daha yüksek mortaliteye sahiptir (56).

Ülkemizde renal replasman tedavisi gören hasta sayısı hızla artmaktadır. Türk Nefroloji Derneği'nin 2013 yıl sonu raporuna göre ülkemizde 66711 hastanın renal replasman tedavisi aldığı tespit edilmiştir. SDBY prevalansı milyon nüfus başına 870, insidansı ise 138 olarak hesaplanmıştır. Burada SDBY olgularının etiyolojik dağılımlarına bakıldığında, DN oranının %36'ya çıktığını göstermektedir. Bu veriler diyabeti, en önemli SDBY nedeni olarak belirlemektedir (57).

### **2.2.2. Diyabetik Nefropati Risk Faktörleri**

#### **2.2.2.1. Arteriyel Hipertansiyon**

Diyabetli hastalar, neovaskülarizasyondan kaynaklanan artmış periferik arter direncine, hiperinsülinemi ve hiperglisemiye bağlı artmış vücut sıvı hacmine sahiptir. Her iki mekanizma da sistemik kan basıncını yükseltir (58). Bu sebeple, diyabetik popülasyonda hipertansiyon gelişme riski 1,5-3 kat daha fazladır (59, 60).

T2DM'li hastalarda kan glukoz ve kan basıncı kontrolünün komplikasyon gelişimi üzerine etkisini araştırmak üzere tasarlanmış prospektif bir çalışmada, 4.031 kişi yaklaşık 15 yıl boyunca izlenmiştir. Hastaların %38'inde albuminüri ve %29'unda böbrek yetmezliği gelişmiş olup, özellikle hipertansif aralıkta, nefropatinin ve daha yüksek sistemik basınçların gelişimi arasındaki ilişki gözlenmiştir (61). Buna ek olarak, anormal sirkadiyen kan basıncı profilinin, albuminüri varlığı ile kuvvetle ilişkili olduğu ve T2DM'de böbrek ve kardiyovasküler olayların bir öngörücüsü olduğu bulunmuştur (62).

#### **2.2.2.2. Hiperglisemi**

Sıkı glisemik kontrol DN gelişme riskini azaltmasının yanısıra yerleşmiş nefropatisi olanlarda da progresyonu yavaşlatmaktadır (63, 64).

#### **2.2.2.3. Sigara**

Sigara içimi, DN gelişimi için bağımsız bir risk faktörüdür (65). Sigara kullanımının büyüme faktörlerinin artışı, endotel disfonksiyonu, oksidatif stres gibi mekanizmalarla DN'de renal hasarlanmaya ve progresyona neden olduğu düşünülmektedir (66).

#### **2.2.2.4. Cinsiyet**

Gall ve ark. tarafından yapılan T2DM'li 176 hastayı kapsayan prospektif bir gözlemsel çalışmada, erkeklerde DN gelişme riskinin 2.6 kat daha fazla olduğunu saptamışlardır (67). Başka bir prospektif diyabet çalışmasında erkek cinsiyetin mikroalbuminüri gelişimi için bağımsız risk faktörü olduğu gösterilmiştir (61).

#### **2.2.2.5. Dislipidemi**

T2DM hastalarında renal disfonksiyon gelişimi için risk faktörlerinin araştırıldığı UKPDS çalışmasında lipidlerin glomerüler hasarın gelişiminde ve ilerlemesinde rol oynayabileceği ve artmış bel çevresi, yükselmiş plazma trigliserit (TG), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-K) düzeyleri de albuminüri için risk faktörleri arasında olduğu gösterilmiştir (61). Ravid ve ark. T2DM'li hastalarda hem tanı anında hem de beş yıllık bir izlem sürecinde kolesterol düzeyinin, idrar albümin

atılımıyla pozitif ilişkili olduğunu saptamışlardır (68). Gall ve ark. yaptıkları çalışmalar da bu sonucu destekler niteliktedir (67).

#### **2.2.2.6. Aşırı Protein Alımı**

Kronik böbrek hastalığında (KBH) diyetle protein kısıtlamasının rolü tartışmalıdır (69-71). Bununla birlikte, T1DM'li nefropati hastaları ile yapılan bir çalışmada protein (günde 0.6 g protein/kg) ve fosfor (günde 0,5-1 g/kg) kısıtlamasının, GFR'deki azalmayı yavaşlattığı, kan basıncını düşürdüğü ve böbrek fonksiyonlarını stabilize ettiği gösterilmiştir (72). Ulusal Böbrek Vakfı da GFR<29 mL/dk/1.773m<sup>2</sup> olan hastaların günlük protein alımının 0.6 g/kg olmasını önermektedir (73).

#### **2.2.2.7. Hiperürisemi**

Kronik hiperürisemi, renin anjiyotensin aldosteron sistemini (RAAS) uyarak ve endotelial nitrik oksit (NO) salınımını engelleyerek renal vazokonstriksiyona ve kan basıncı artışına neden olur. Bu durum yüksek ürik asit düzeyinin interstisyel inflamasyonda ve böbrek hastalığının progresyonunda patojenik bir rolünün olabileceğini düşündürmektedir (74, 75).

#### **2.2.2.8. Yaş**

Gall ve ark. ileri yaşın, artmış üriner albümin atılım oranı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (67).

#### **2.2.2.9. Genetik Yatkınlık**

Ardışık iki kuşakta T2DM'nin bulunduğu Pima Hintli ailelerde yapılan bir çalışmada, ebeveynlerinde proteinüri olmayanların çocuklarında nefropati gelişme olasılığı %14, bir ebeveynde proteinüri varsa bu olasılık %23 ve her iki ebeveynde de proteinüri varsa bu olasılık %46 olarak saptanmıştır (76).

DN'ye yatkınlık yaratan genlerin RAAS, NO, aldoz redüktaz yolu veya lipoprotein metabolizmasında rol oynayan genler olması olasıdır (77). Örneğin T2DM hastalarında, anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) genotipinin DD (homozigot delesyon genotip) polimorfizmi ile DN, daha şiddetli proteinüri ve progresif böbrek

yetmezliği gelişimi ilişkili bulunmuştur (72, 78). Başka bir çalışmada T1MD’de aldoz redüktaz geninin Z-2 aleli için homozigotluk DN ile ilişkilendirilmiştir (73).

### **2.2.3. Diyabetik Nefropati Patolojisi**

#### **2.2.3.1. Diyabetik Nefropati Patolojik Sınıflandırma:**

DN hastalarının renal biyopsilerinde diffüz veya nodüler mezenşiyal genişlemeler ve glomerüler bazal membran (GBM) kalınlaşması gibi glomerüler değişiklikler görölmektedir (79). En erken gelişen değişiklik mezenşiyal genişlemedir (80). Hastalığın ilerleyen evrelerinde mezenşiyal matriks genişlemesinin artışıyla Kimmelstiel-Wilson nodülleri de denilen nodüler birikimler oluşmaktadır (81). Glomerüler lezyonların yanında tübüler atrofi, interstisyel inflamasyon, tübülointerstisyel fibrozis gibi ekstraglomerüller lezyonlar da hastalığın ilerlemesinde etkilidir (82).

#### **2.2.3.2. Diyabetik Nefropati Patofizyoloji**

Glukoz kontrolündeki dengesizlikler; DAG–PKC yolu, AGE, poliol yolu, heksosamin yolağı ve oksidatif stres gibi hücre sel sinyal yollarını aktive eder. Bu faktörler birbirleriyle etkileşime girerek inflamatuvar süreçleri kolaylaştırır ve diyabetik koşullar altında glomerülosklerozun gelişmesine yol açar (3). Renal hemodinamik değişiklikler, iskemi ve glukoz metabolizması anormallikleri ile ilişkili oksidatif stres, inflamatuvar süreçler ve RAAS aktifleşmesi DN’deki fibrozisin sebebidir (83).

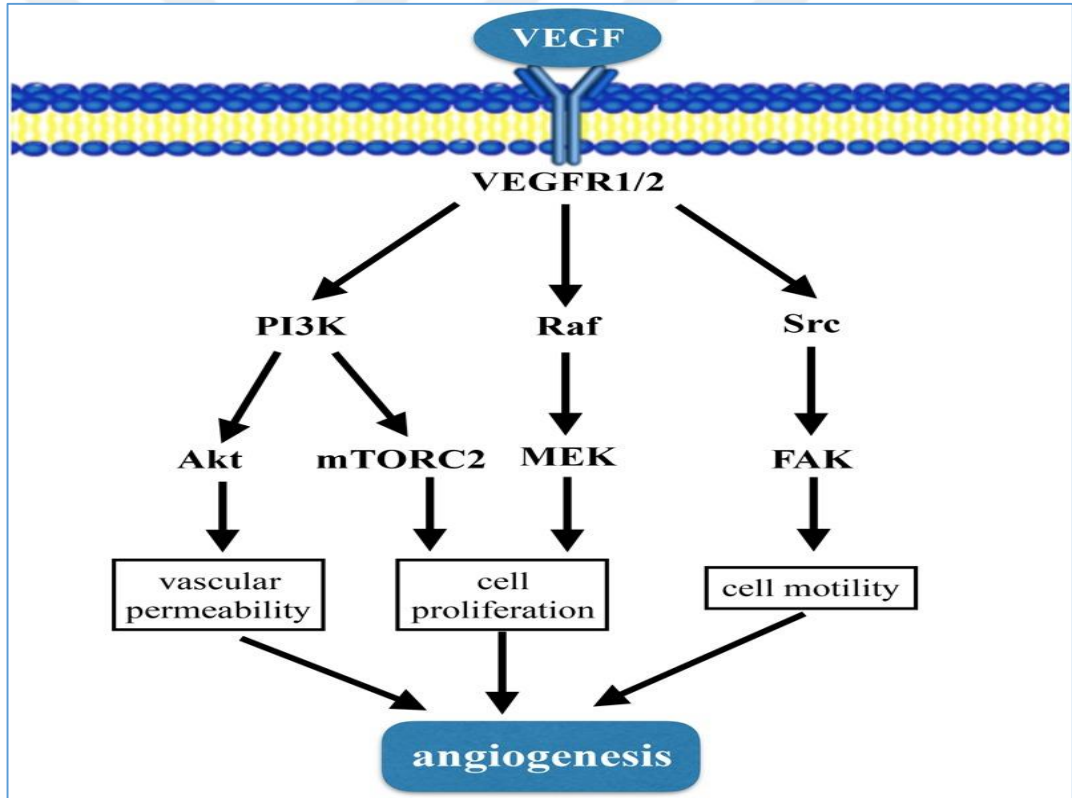
#### **2.2.3.3. VEGF ve TGF $\beta$**

VEGF en güçlü proanjyogenik faktörlerden biridir. Memelilerde VEGF ailesini, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve plasental büyüme faktörü (PlGF) oluşturur (84). VEGF-A, ailenin bir prototip üyesi olup fizyolojik ve patolojik anjiyogenezde çok önemlidir. VEGF-A’nın çeşitli fonksiyonları vardır. En önemlisi endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve göçünü teşvik ederek anjiyogenezi uyarmasıdır (şekil 1) (85, 86).

DN’nin ana özelliklerinden biri kabul edilen anjiogenezdeki artışı tetikleyen birincil büyüme faktörü VEGF’dir. VEGF glomerüler bütünlük ve fonksiyonun

korunması için önemli bir büyüme faktörü olarak kabul edilirken, DN'de endotelial disfonksiyon ve düşük NO düzeylerinde, VEGF etkilerinin artışı olumsuz sonuçlar doğurmaktadır (4, 5).

VEGF-A, tirozin kinaz reseptörleri VEGFR-1 (Flt-1) ve VEGFR-2'ye (KDR / Flk-1) bağlanır ve aktive eder (84). VEGF-A, VEGFR-2'ye bağlandıktan sonra dimerizasyon ve tirozin fosforilasyonuna uğrar; bu reaksiyon, fosfoinositid 3-kinaz (PI3K) ve Ras GTPaz aktivasyon proteinleri dahil olmak üzere çeşitli hedeflerin fosforilasyonunu sağlar (87). Ayrıca Fosfolipaz C $\gamma$  aktivasyonu ve sonrasında PKC aktivasyonuna neden olur, PKC aktivasyonu da endotelial proliferasyon için Raf-MEK hücre dışı sinyal yollarını aktive eder (88). Ek olarak VEGFR-2'nin aktivasyonu, PI3K-Akt yolu ile endotel hücrelerinin apoptozunu inhibe eder (89).

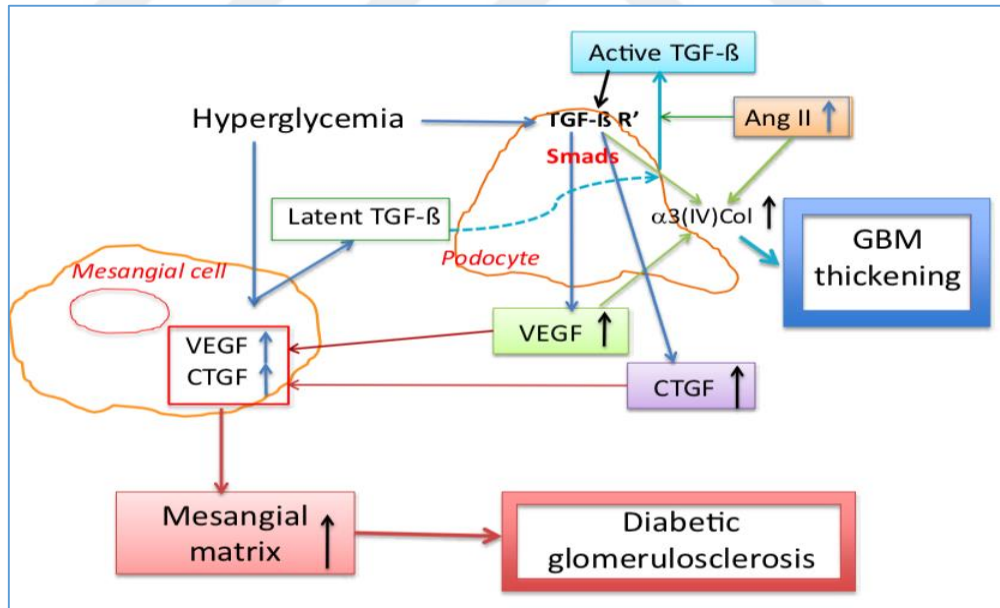


Şekil 1. VEGF ve Anjiogenez (86)

T2DM'li hastalarda VEGF ekspresyon artışının glisemik kontrol, C-reaktif protein, ve albuminüri ile korele olduğu, dolayısıyla VEGF'nin diyabette nefropati ve inflamasyon belirteci olduğu gösterilmiştir (90).

T2DM'liler ile yapılan bir başka çalışmada DN patogenezinde rol oynayan dolaşımdaki hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) serum seviyeleri ve VEGF-A seviyeleri arasında pozitif korelasyon olduğu gösterilmiştir (91).

Hiperglisemi mezangial hücrelerde Ang-II sentezinin ve anjiyotensin reseptör ekspresyonunu artırır. Hiperglisemi aynı zamanda oksidatif stresi artırarak TGF- $\beta$  ekspresyonunu ve podositlerde TGF- $\beta$  R' ifadesini de uyarmaktadır. Artan Ang-II ve TGF- $\beta$ , podositlerden VEGF ve konnektif doku büyüme faktörünün ekspresyonunu artırır. Böylece glomerüler bazal membran kalınlaşması ve glomerüloskleroza indükler (Şekil 2) (92). Ayrıca TGF- $\beta$ 1 hem proksimal tübüllerde hem de glomerülerde geçirgenliği artırarak idrar albümin atılımını düzenlediği gösterilmiştir. TGF- $\beta$ 1 hem normal hem diyabetik koşullarda tübüler geri emilimi baskılayarak üriner su, elektrolit ve glukoz atılımını artırır. Tip 2 reseptörü olmayan transgenik farelerde anti TGF- $\beta$  antikollarının uygulanmasının mezangiyal birikim ve renal hasarlanmayı önlediği gösterilmiştir (93-97).



Şekil 2. TGF- $\beta$  ve Glomerüloskleroza (92)

### 2.2.3.3. Hemodinamik Değişiklikler

DN'nin ilk aşaması hiperfiltrasyondur. Glisemik kontrole paralel olarak diyabetin erken evrelerinden itibaren tübüler fonksiyon değişiklikleri görülmektedir. Hiperglisemi etkisiyle sodyum glukoz kotransporter-2 (SGLT-2)'nin upregülasyonu

proksimal túbülde hem glukozun hem de sodyumun geri emilimini artırmaktadır. Bunun sonucunda distal túbüllerin makula densa hücrelerine sodyum sunumu azalır, túbüloglomerüler feedback ile afferent arteriöl dilatasyonuna neden olur. Ayrıca hiperglisemi, IGF-1, glukagon, NO, VEGF ve prostaglandin gibi vasoaktif mediatörlerin salınması da afferent arteriöl dilatasyonuna katkıda bulunur. Lokal olarak yükselen Ang-II düzeyleri efferent arteriölde vazokonstriksiyon oluşturur. Sonuç olarak afferent arteriöl vazodilatasyonu ve efferent arteriöl vazokonstriksiyonundan kaynaklanan intraglomerüler basınç artışı nedeniyle glomerüler hiperfiltrasyon oluşur (98).

#### **2.2.3.4 İskemi ve İnflamasyon**

Klinik çalışmalar hiperglisemi, oksidatif stres ve diyabetik komplikasyonlar arasında yakın bir ilişki olduğunu göstermiştir (99). Hiperglisemi, glikoz metabolizması ve oksidasyon ile doğrudan, AGE oluşumu ile dolaylı olarak reaktif oksijen türevleri (ROS)'ni aktive eder. ROS; TGF- $\beta$ 1, plazminojen aktivatör inhibitörü-1 (PAI-1) ve ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin glomerüler mezengial hücreler tarafından upregüle edilmesini sağlar ve böylece mezengial genişlemeye yol açar. ROS; PKC, mitojenle aktive olan protein kinaz, nükleer faktör kappa-hafif zincir güçlendiricisi (NF- $\kappa$ B) gibi transkripsiyon faktörlerini, sinyal moleküllerini de aktifler (100, 101).

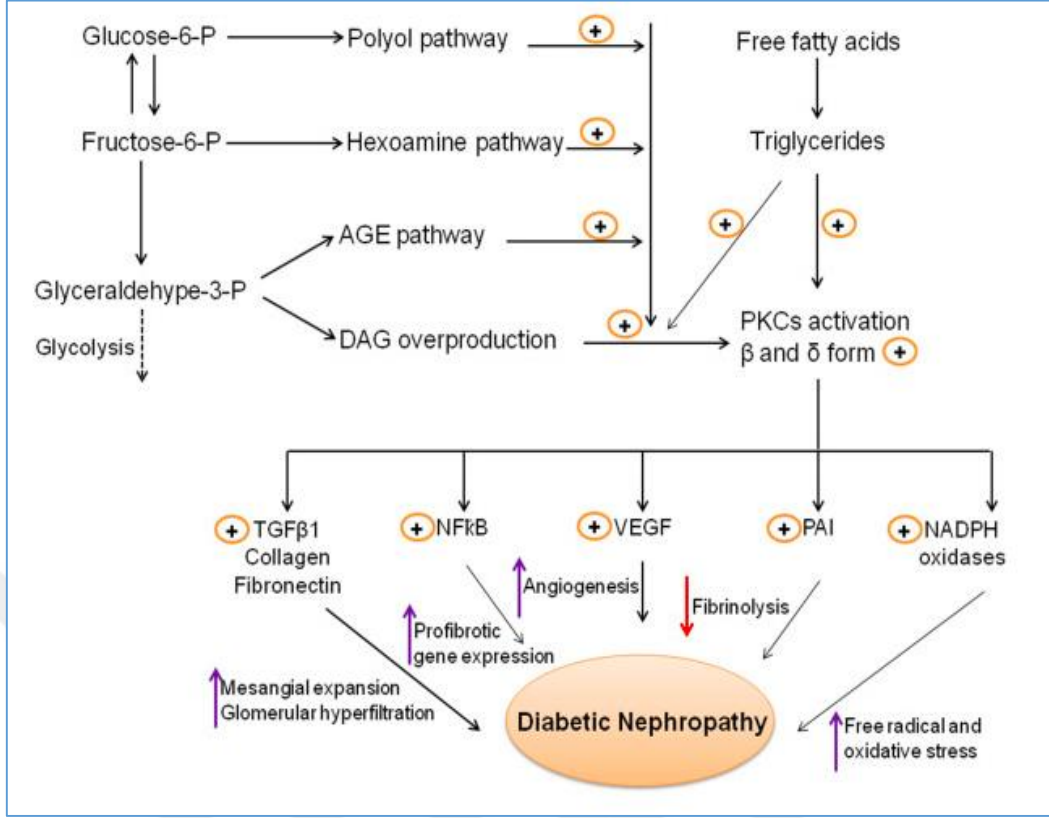
Hiperglisemi altında, glikolitik ara aşamalar sırasında oluşan DAG ve AGE'den sonra üretilen ROS ile hücre içi  $Ca^{+2}$  artışı ve DAG'deki artış fosfolipaz C'nin aktivitesini artırarak PKC'yi aktive eder. PKC aktivasyonu NO üretimini azaltır, endotelin-1 ve VEGF ekspresyon artışına neden olarak endotel disfonksiyonuna yol açar (102-104). Bozulan endotel fonksiyonu, endotelden salınan vasoaktif maddelerin salınımında dengesizliğe yol açar. Endotelin-1, vasküler dengenin düzenlenmesinde en güçlü vasokonstriktör mediyatördür. Hiperglisemide hiperinsülinemi ile birlikte Endotelin-1 sekresyonu artar. Vasokonstriksiyon etkisiyle vasküler disfonksiyona neden olur (105). Endotelin reseptörünün aktivasyonu, vasokonstriksiyon ile birlikte podosit hasarı, oksidatif stres, enflamasyon ve fibrozis ile ilişkilidir (106).

DN’de glomerüler ve vasküler değişiklikler, oksijenlenmeyi engelleyerek renal medullada hipoksiye ve túbüler disfonksiyona yol açar. DN’nin ileri evrelerinde çeşitli mekanizmalarla NO üretimi azalır, kompensatuar mekanizma olarak nefronların oksijen gereksinimi artar. Oksijenlenmenin bozulması ve serbest radikallerin üretimi ile renal tahribat artar. Hipoksik duruma yanıt olarak oluşan HIF aktivasyonunun hiperglisemi nedeniyle engellenmesi renal fibrozisi kolaylaştırır (107-109).

AGE'lerin diyabetik vasküler hasarın gelişiminde ve ilerlemesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (110). AGE’ler protein disfonksiyonu ile hücre dışı matriks metabolizmasını hem matriks-matriks hem de hücre-matriks etkileşimlerini değiştirerek bozar ve glomeruloskleroz sürecinde yer alır (111, 112).

NF-κB, DN patofizyolojisinde anahtar rol oynayan enflamatuar etmenlerin temel düzenleyicisidir. NF-κB proteinüri ve interstisyel inflamatuvar hücrelerin inflamasyonu ile de ilişkilidir. DN’de artmış olan tümör nekroz faktörü (TNF) ve ROS, fosforilasyon ile NF-κB'yi aktive eder. (113). NF-κB artışı profibrotik gen ekspresyonunu indükler. Artan NF-κB ve PAI-1 ekspresyonu, plazmalemmal NADPH oksidoredüktaz tarafından üretilen ilave ROS ile daha da arttırılan lokal bir doku enflamatuar yanıtına ve trombotik mikroanjyopatiye neden olur (104, 114).

DN patogenezinde yer alan iskemik, inflamatuvar değişiklikler şekil 3’te şematize edilmiştir (114).



**Şekil 3.** Diyabetik Nefropatide Patofizyolojik Değişiklikler (114)

Böbrek hasarını ve böbrek fonksiyonlarının azalmasını hızlandıran immün yanıtların gösterilmesi ile DN’de oluşan inflamasyonun doğal immüntenin kompleks bir süreciyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (115). Janus kinaz sinyal transdüseri ve transkripsiyon aktivatörü (JAK – STAT) proteinleri, kemokinler, sitokinler ve anjiotensin reseptörleri aracılığıyla doğal immün sistemin yanıtına yardımcı olur. Hayvan çalışmalarında podositlerde JAK2’nin artırılmış ekspresyonunun DN patolojisine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. DN’nin hangi evresinde olursa olsun podositlerde ve tübülointerstisyumda JAK-STAT gen ifadeleri artmaktadır (116).

### 2.2.3.5. RAAS Aktifleşmesi

RAAS, kan basıncının ana düzenleyicilerinden biridir. Kalp, damarlar ve böbrekler üzerine koordineli etkileriyle sıvı ve elektrolit dengesini kontrol eder. Angiotensin II, RAAS’ın esas efektif kısmı olup postglomerüler arterioller üzerine vazokonstriktör etkisiyle glomerüler hidrostatik basıncı ve plazma proteinlerinin ultrafiltrasyonunu artırarak kronik renal hasarın başlama ve ilerleme sürecine katkıda

bulunur. Buna ilave tüm RAAS elemanları, hücre büyümesi, inflamasyon ve fibrozisi direkt olarak hızlandırabilir (117).

Hayvan modelleri çalışmaları ve randomize klinik çalışmalardan elde edilen kanıtlar, RAAS inhibisyonunun DN'deki bu ilerlemeyi yavaşlattığını göstermektedir (118). Hiperglisemi ve AGE'ler; ROS ve böbrek spesifik G protein-bağlı metabolik reseptör (GPR9) yoluyla renal hücrelerde renin ve anjiyotensinojen ekspresyonunu indükler (119). Hiperglisemi nedeniyle glomerüllerde ve renal matriks hücrelerinde ekspresyonu artan TGF- $\beta$ 1 ve Ang-II, böbrek tübül disfonksiyonu ve atrofisi, kapiller atrofi ve kronik hipoksiyi içeren renal fibrozis süreçlerinde rol oynar (120).

Aldosteronun ayrıca, PAI-1 ve TGF- $\beta$  gibi pro-sklerotik büyüme faktörlerinin upregülasyonu dahil olmak üzere gen ekspresyonu ve diğer mekanizmaları düzenleyerek DN'nin patofizyolojisinde önemli roller oynadığı belirlenmiştir (121).

#### **2.2.3.6. Podosit Otofaji**

GBM'nin dış kısmında bulunan ve glomerüler filtrasyon bariyerinin ana bileşenlerinden olan podositlerin patolojik değişiklikleri ve glomerüler filtrasyon bariyerinin striktürel değişiklikleri DN'de proteinürinin sebebidir. Diyabetin sebep olduğu podosit hasarında ve DN'de renoprotektif patogeneze otofajinin rol oynadığı, ve otofajinin, proteinleri ve peroksidazları bozmasının yanında, intrasellüler çevrenin homeostazisini koruyarak stoplazmik kontrol yaptığı gösterilmiştir. Son çalışmalar podositlerdeki otofaji aktivasyonunun DN'deki ilerlemeyi önleyebileceği yönündedir (122-124).

#### **2.2.3.7. Mitokondri Disfonksiyonu**

Hiperglisemiyle elektron taşıma zinciri yüklenmesi artar ve ROS üretimiyle birlikte DNA hasarına ve gliseraldehit-3-Fosfat dehidrogenaz (GAPDH) aktivitesinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak glikolizin seyri bozulur ve glikolitik yolun ara maddelerinin birikimi artar. Metabolik süreç poliol ve hekzosamin yolağında aktivite artışı, AGE öncülleri üretimi artışı, PKC aktivasyonu gibi alternatif yollara ilerler. Dolayısıyla bu süreç hücresel disfonksiyon, anjiyogenez, enflamasyon, fibrozis, azalmış oksidatif stres savunmasına ve böbrek hasarına neden olur (125-127).

### 2.2.3.8. Epigenetik Düzenlemeler

DN patofizyolojisinde rolü bilinen hiperglisemi, hipoksi ve inflamasyon çeşitli epigenetik değişikliklere neden olmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar, DNA nükleotid dizisinde değişikliğe yol açmayan fakat nasıl kopyalanacağını değiştiren dinamik değişiklikleri ifade eder. Bu modifikasyonlar tek başına veya işbirliği içinde genlerin ve dolayısıyla hücre fonksiyonlarının transkripsiyonunu düzenleyecek biçimde kaydetme, saklama, tutma ve hatırlama görevi görür (128).

Hiperglisemi, büyüme faktörleri, oksidan stres ve enflamatuar faktörler dahil diyabetik komplikasyonların patolojisi ile ilişkili faktörler, endotel, vasküler düz kas, retina ve kalp hücreleri gibi hedef hücrelerde patolojik genlerin ekspresyonunu değiştirmek için DNA sekansında değişiklik olmadan bu epigenetik mekanizmaların düzensizliğine yol açabilir (129).

DNA metilasyonu, kodlama yapmayan RNA'lar ve post-transyonal histon modifikasyonları (PTM) gibi epigenetik ve genetik mekanizmalar ikinci bir gen düzenleme aşaması oluşturarak DN patogenezinde rol oynamaktadırlar (8, 9). En iyi bilinen ve tanımlanan epigenetik mekanizma sitozini, 5-metil-sitozine dönüştüren DNA metilasyonudur (130). DNA metilasyonu, gen aktivasyonu veya susturulması, transkripsiyon uzamasının düzenlenmesi ve alternatif ekleme dahil çeşitli görevler almaktadır. Bunu kısmen transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını değiştirerek ve/veya genleri susturmak için transkripsiyonel baskılayıcıları kullanarak gerçekleştirmektedir (128).

Vasküler endotel hücrelerinin hiperglisemiye maruz kalması, endotel hücre disfonksiyonunda yer alan birçok gende DNA metilasyonunda değişikliklere yol açmıştır (131). T2DM hastalarını DN olan ve olmayanlar ile karşılaştırmalı değerlendirildiğinde bazı genlerde beligin metilasyon olduğu gösterilmiştir. Bu genlerden biri de hipergliseminin bir sonucu olarak glomerüler hücrelerde apoptoza aracılık ettiği ileri sürülen UNC13B genidir (128).

DNA metilasyonunun renal fibrozis ve TGF- $\beta$  eylem sürecinde rol oynadığı gösterilmiştir. Wibke ve ark. Ras onkoproteininin bir inhibitörünü kodlayan RASAL1'in fibrotik fare böbreklerinde kontrol grubuna göre hipermetile edildiğini, böbrekteki fibroblast aktivasyonunun ve fibrogenezinin devam etmesiyle ilişkili

olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışma ile TGF- $\beta$ 'ye kısa süreli maruziyette Rasal1'in metilasyon olmadan reversible şekilde suprese olduğu, uzun süreli TGF- $\beta$  maruziyetinin Rasal 1 promotörünün metilasyonuna neden olduğu belirlenmiştir (132).

Histon PTM'leri gen ekspresyonu kromatin yapısını düzenler. Histonun önemli PTM'leri arasında lizin asetilasyonu (Kac), lizin metilasyonu (Kme) ve fosforilasyon bulunur (133). Histon PTM'leri, diyabet açısından karakterize edilen epigenetik modifikasyonlar arasındadır. DN'deki histon PTM'lerin rolü in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. Mezanjiyal hücrelerde histon H3 lizin metilasyonunun (H3Kme) TGF- $\beta$  aracılı ECM gen ekspresyonundaki fonksiyonel rolü, normal ve yüksek glukoz HG koşulları altında gösterilmiştir(134). Ayrıca histon modifikasyonlarının microRNA ile bağlantıları bildirilmiştir. Akt tarafından aktive edilen p300 ile histon asetilasyonu, DN'de miR-192'nin indüklenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir (135).

#### **2.2.4. MikroRNA (miRNA)**

Lee ve ark. tarafından keşfedilen miRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid büyüklüğünde tek iplikçikli, kodlama yapmayan RNA'lardır (136, 137). İnsan genomunda 1000 den fazla miRNA bulunmaktadır (138).

##### **2.2.4.1. MiRNA Sentezi**

Hücre çekirdeğinde başlayan miRNA'ların üretimine RNA polimeraz II ve bazı durumlarda RNA polimeraz III (RNaz III) aracılık eder (139). Büyük diziler halinde sentezlenen ve primer miRNA (pri-mirna) olarak adlandırılan bu yapının 5'cap ve 3'poli A bölgesi bulunur. Pri-miRNA'nın Drosha (RNaz III enzimi) tarafından kesilmesi ile öncül molekül olan pre-miRNA oluşur. Pre-miRNA, eksportin 5 ile sitoplazmaya taşınır. Stoplazmada pre-mirna, trans aktivasyonundan sorumlu RNA bağlayıcı protein (TRBP) ve Dicer (RNaz III enzimi) tarafından işlenir. Bir zinciri kılavuz miRNA, diğer zinciri ona eşlenmiş diziye sahip çift zincirli molekül oluşur. Kılavuz zincir ile RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) birleşir. miRNA'yı içeren RISC kompleksi, mesenger RNA (mRNA)'yı hedefleme yeteneğine sahiptir. RISC içindeki miRNAlar, hedef mRNAları 3' UTR bölgelerindeki baz eşleşmesine göre belirler. Hedeflediği mRNAnın inhibisyonuna neden olup translasyonunu

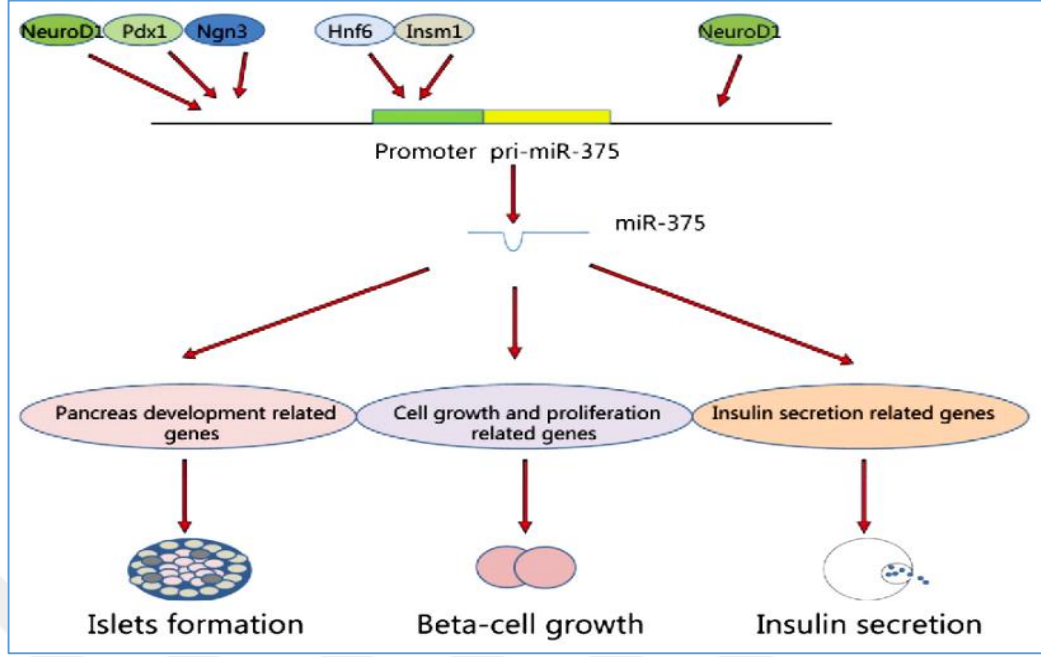
engeller. MiRNA çekirdek dizisinin hedef mRNA'nın translosyane edilmemiş 3' kısmı (3'UTR) arasındaki tamamlayıcılığın benzerliği, miRNA'nın hedef mRNA'yı baskılama gücü ve şeklini belirler (11, 140, 141).

MiRNA'ların mRNA hedeflerine bağlanması tam bir tamamlayıcılık gerektirmediği için her bir miRNA için 100'den fazla mRNA'yı hedef alabilmesini olanak sağlamaktadır. Bu özellik ile miRNA'lar birçok fizyolojik ve patolojik biyolojik süreçlere katılabilirler (142, 143). MiRNA'lar gen ekspresyonlarını posttranslasyonel düzenleyerek hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptozis, anjiyogenez ve onkogenез regülasyonunda rol alırlar. Bir mikroRNA molekülü, binlerce genin ekspresyonunu düzenleyebilir. Bu nedenle miRNA'lar, çok sayıda genin ekspresyonunu modüle etme ve böylece çeşitli hastalıkların gelişimini veya ilerlemesini potansiyel olarak etkileyen hücresel ve biyokimyasal fonksiyonları değiştirme konusunda büyük bir potansiyele sahiptir (144, 145).

#### **2.2.4.2. MiRNA ve Diyabet**

MiRNA'ların keşfinden bu yana diyabet patogenezinde rolü araştırılmaktadır. İskelet kası, yağ dokusu, pankreas  $\beta$  hücreleri gibi insüline duyarlı organ kaynaklı bazı miRNA'ların insülin sekresyonu, pankreas  $\beta$  hücreleri ve adiposit doku farklılaşması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (146). İlk olarak 2004 yılında Poy ve ark. tarafından miR-375'in insülin sekresyonunu doğrudan düzenleyen miRNA olduğu gösterilmiştir (147). Pankreas adacık hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen miR-375 pankreas gelişimi, insülin salgılanması, hücre büyümesi ve çoğalmasında rol alır (148).

MiR-375, PI3-kinaz yolunda anahtar bir molekül olan 3'-fosfoinositide bağımlı kinaz 1 mRNA'yı doğrudan hedefleyerek insülin sekresyonunu azaltır. MiR-375 ekspresyonundaki azalma, hedef genlerinin baskılanmasını ortadan kaldırarak insülin sekresyonunu artırır (Şekil 4) (149).



**Şekil 4.** MiR-375 ve Diyabetes Mellitus (149)

T2DM'lilerde pankreas adacık hücrelerinde miR-124a'nın ifadesinin artması glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunu azaltmaktadır (150).

MiR-9'un aşırı ekspresyonunun bir transkripsiyon faktörü olan Onecut2'yi hedefleyerek insülin ekzositozunu azalttığı gösterilmiştir. Onecut2, doğrudan promotörüne bağlanarak Granuphilin / Slp4'ün ifadesini baskılar. Granuphilin, salgı granülleri ile ilişkili olan ve insülin salınımı negatif olarak düzenleyen bir Rab GTPase efektörüdür (151). Granuphilin seviyelerini modüle ettiği gösterilen başka bir mikroRNA, miR-96'dır. MiR-96'nın, Granuphilin mRNA'sı ve protein seviyelerinin upregülasyonu ile insülin sekresyonunu düşürdüğü gösterilmiştir (152). MiR-29'un da onecut2'nin ekspresyonunu azaltarak insülin salınımını engellediği gösterilmiştir (153).

MiRNA'lar insülin üretimi ve salgılanması süreçlerine dahil olması yanında hedef dokularda insülin sinyalleşmesinde de yer almaktadır. Örneğin diyabetik sıçanlarda miR-29 ailesi üyelerinin, kas, yağ ve karaciğer gibi insüline duyarlı üç dokuda ifadelerinin arttığı ve aynı çalışmada artmış miR-29 seviyelerinin, yüksek glukoz ve yüksek insülin ile inkübe edilen hücrelerde insülin direncini taklit eden insülin direncine yol açtığı gösterilmiştir (154).

### 2.2.4.3. MiRNA ve Diyabetik Nefropati

DN fizyopatogenezinde rol alan birçok yolak ve mekanizmalar ortaya çıkarılmasına rağmen halen net anlaşılamamıştır. Hiperglisemi, AGE'ler, oksidatif stres, sitokin ve kemokinler ile epigenetik mekanizmalar gibi faktörler mezenşial genişleme, ECM proteinlerinin glomerüler ve tübüler kompartmalarda çökmesi, podosit sayısında azalma ve podosit apoptozisi DN'nin temel patolojik özellikleridir (155). Bahsedilen patolojik süreçlerde yer alan miRNAların tesbiti diyabete bağlı böbrek yetmezliğini önlemede ve tedavi seçenekleri geliştirmede bir hedef haline gelebilir. Diyabetojenik faktörlerin ve büyüme faktörlerinin miRNAlar gibi non-coding RNA'ları da indükleyebileceği ve ECM proteinleri ve DN'nin erken dönemleriyle ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik edebilmeleri ile miRNA'ların bu fırsatı sunacakları düşünülmektedir (156). DN gelişiminde miRNA'ların rolü miRNA üretiminde görev alan Dicer'in podosit spesifik delesyonu olan fare çalışmalarında vurgulanmıştır (157, 158). Anormal miRNA ekspresyonu mezangial hücreler, podositler ve hiperglisemik koşullar ve TGF- $\beta$  kullanılarak proksimal tübüler epitel hücreleri dahil olmak üzere kültürlenmiş böbrek hücrelerinde in vitro diyabet modellerinde de gösterilmiştir (159, 160). Beş miRNA'nın, yani miR192, miR194, miR204, miR215 ve miR216'nın, diğer organlara göre böbreklerde özellikle yaygın olduğu bulunmuştur (161). Bazı miRNA'ların diyabetik böbreklerde düzensiz olduğu ve DN patogenezine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. Tanımlanan miRNA'lar içinde miR-192'nin streptozotosinle indüklenen diyabetik farelerin glomerüllerinde anlamlı şekilde yükseldiği bildirilmiştir (162). TGF- $\beta$ 1, DN gelişiminde önemli bir rol oynayan renal fibrozisin ana modülatörüdür. Yapılan in vitro bir çalışmada miR-192'nin TGF- $\beta$ 1 ile indüklendiği, ZEB2 ekspresyonu azaltarak mezenşial hücrelerde kollagen birikimine aracılık ettiği gösterilmiştir (162). Başka çalışmalarda DN'nin erken dönemlerinde miR-192 seviyesinin arttığı ve fare modelinde bu miRNA'nın ekspresyonun baskılanmasıyla DN'nin önlenebileceği gösterilmiştir (163, 164).

MiR-192'nin, miR-216a/miR-217 ve miR-200b/c gibi diğer miRNA'ları da düzenleyebildiği bildirilmiştir. MiR-200 Zeb1'i inhibe ederek fare mezenşial hücrelerinde TGF  $\beta$ 1'in otoregülasyonunu ve kollajen ekspresyonunu düzenleyebilir. Dahası miR-216/miR-217 DN'nin önemli bir bileşeni olan TGF  $\beta$ 1 indüklü Akt aktivasyonu ve hücrel hipertrofi ile ilişkilidir (165).

MiR-21 in artmış ifadesi diyabetli fare modelinde ve DN hastalarının renal biyopsilerinde gösterilmiştir. MiR-21, TGF- $\beta$ 1/Smad3 yolunun negatif düzenleyicisi olan Smad7 yi hedef alarak PTEN ekspresyonunu inhibe eder ve Akt yolunu indükler (159). Diyabetik böbrek hastalığı ile ilişkili olarak T2DM'li fare modelinde miR-21'in yıkımı ile TGF- $\beta$ 1 ve NF- $\kappa$ B sinyal yolunun aktivasyonunun baskılandığı gösterilmiştir (166).

DN hastalarının serum örnekleri ile böbrek dokusunda ve böbrek fibrozu ve mikroalbüminürlü fare modellerinde belirgin şekilde yükseldiği gözlenen miR-135a'nın ECM birikiminde kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (167).

Bir başka örnek de anti-fibrotik etkileri bildirilen mir-29 aile üyeleri içindir. MiR-29a transgenini eksprese diyabetik farelerin vahşi tip diyabetik farelere kıyasla böbrek fonksiyonlarının daha iyi olduğu gösterilmiştir (168). DN ile ilgili tanımlanmış birkaç miRNA kısa açıklamalarıyla birlikte tablo 4'de verilmiştir (169).

**Tablo 4.** Diyabetik Nefropatide MiRNA'ların Değişimi (169)

Hücre Tipi	Etkileyen Durum	miRNA'lar	Değişen Durum		
Podosit	Hiperglisemi	miR25 ↓	Nox4 ↓	Oksidan stres ↑	
		miR29a ↓	HDAC ↓	Apoptozis ↑	
		miR29c ↑	Spry1 ↓	Rho kinaz ↓	Apoptozis ↑
	TGF-β1	miR29b/c ↓	Kollojen ↓	ECM ↑	
Proksimal Tübül Epitel Hücreleri	TGF-β1	let7b/c ↓	TGFR-β1 ↓		
			Kollojen ↓	ECM ↑	
		miR21 ↑	Smad7 ↓	TGF-β1 ↓	
			PTEN ↓	PI3K/AKT ↓	Hipertrofi ↑
		miR 29a ↓	Kollojen ↓	ECM ↑	
		miR 29b ↓			
		miR 29c ↓			
		miR30e ↓	UCP2 ↓	ECM ↑	Fenotipik değişim ↑
		miR192 ↓	Zeb1/2 ↓	E-Kadherin ↓	Fenotipik değişim ↑
		miR200b ↓	Fibronektin ↓	ECM ↑	
miR215 ↓	Zeb1/2 ↓	E-Kadherin ↓	Fenotipik değişim ↑		
Mezengial Hücreler	TGF-β1	miR21 ↑	Smad7 ↓	TGF-β1 ↓	
			PTEN ↓	PI3K/AKT ↓	Hipertrofi ↑
		miR29 ↓	Kollojen ↓	ECM ↑	
		miR135a ↑	TRPC1 ↓	ECM ↑	
				Hipertrofi ↑	
				Oksidan stres ↑	
		miR192 ↑	TGF-β1 ↑		
			miR200b/c ↑		
			miR216a ↑		
			miR217 ↑		
			Zeb1/2 ↓	ECM ↑	
		miR200b/c ↑	TGF-β1 ↑		
		Zeb1/2 ↓	ECM ↑		
	miR216a ↑	PTEN ↓	PI3K/AKT ↓	Hipertrofi ↑	
Ybx1 ↓		Kollojen ↓	ECM ↑		
miR217 ↑	PTEN ↓	PI3K/AKT ↓	Hipertrofi ↑		
miR377 ↑	PAK1 ↓	Fibronektin ↓	ECM ↑		
	SOD1/2 ↓	Fibronektin ↓	ECM ↑		
miR433 ↑	TGF-β1 ↑				
Hiperglisemi	miR451 ↑	YWHA ↓			
		P38 MAPK ↓			
Renal Biyopsi (DN'li fare)	miR30c ↓	CTGF ↑	ECM ↑		
			Hipertrofi ↑		
			Oksidan stres ↑		
	miR130b ↓	Snail Sinyali ↑	ECM ↑		
Hipertrofi ↑					
		Oksidan stres ↑			

### 3. MATERYAL METOD

#### 3.1. Çalışmaya Alınacak Olguların Seçimi

Bu çalışma Şubat 2018 ve Mayıs 2019 tarihleri arasında kesitsel tipte bir çalışma olarak gerçekleştirilmiş olup, çalışmaya bu tarihlerde Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniğine başvuran 18-65 yaş arası 40 mikroalbuminürisi olan DN'li T2DM'li hasta, 35 makroalbuminürisi olan DN'li T2DM'li hasta, 40 normoalbuminürili T2DM'li hasta çalışmaya alındı. Ayrıca kontrol grubu olarak hastalık ve ilaç kullanım öyküsü olmayan 35 sağlıklı kişi çalışmaya dahil edildi. Bu kişiler randomize olarak seçilen gönüllü kişilerdi ve inflamasyona neden olabilecek hastalık (akut enfeksiyöz hastalıklar, maligniteler, inflamatuvar romatizmal hastalıklar gibi), gebelik, malignite, akut ve kronik karaciğer hastalığına sahip olanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Gruplar cinsiyet açısından değerlendirildiğinde sağlıklı kontrol grubunda 21 (%60) erkek, 14 (%40) kadın; normoalbuminürili T2DM'li hastalarda 27 (%67.5) erkek, 13 (%32.5) kadın; mikroalbuminürili T2DM'li hastalarda 28 (%70) erkek, 12 (%30) kadın; makroalbuminürili T2DM'li hastalarda 23 (%65.7) erkek, 12 (%34.3) kadın hasta mevcuttu. Ek hastalıkları değerlendirildiğinde normoalbuminürili DM grubunda 10 hastada (%25) HT, 3 hastada (%7.5) KAH ve 11 hastada (%27.5) hiperlipidemi; mikroalbuminürili DM grubunda 19 hastada (%47.5) HT, 6 hastada (%15) KAH ve 6 hastada (%15) hiperlipidemi; makroalbuminürili DM grubunda 21 hastada (%60) HT, 9 hastada (%25.7) KAH ve 8 hastada (%22.8) hiperlipidemi mevcuttu.

Hasta grupları aldıkları tedaviler açısından değerlendirildiğinde; DM'li hastaların aldıkları antidiyabetik ve insülin tedavilerine ilaveten normoalbuminürili DM grubunda 6 hasta proton pompa inhibitörü (PPI), 13 hasta antihiperlipidemik, 6 hasta antiagregan, 12 hasta ACEi-ARB, 2 hasta kalsiyum kanal blokörü (KKB), 1 hasta Beta-blokör (BB); mikroalbuminürili DM grubunda 9 hasta PPI, 13 hasta antihiperlipidemik, 10 hasta antiagregan, 18 hasta ACEi-ARB, 3 hasta KKB, 5 hasta BB, 2 hasta diüretik; makroalbuminürili DM grubunda 8 hasta PPI, 17 hasta antihiperlipidemik, 11 hasta antiagregan, 18 hasta ACEi-ARB, 9 hasta KKB, 10 hasta BB, 6 hasta diüretik tedavisi almaktaydı.

### 3.2. Antropometrik Ölçümler

Çalışmaya katılan tüm katılımcıların sistolik kan basıncı (SKB) ve diyastolik kan basıncı (DKB) 30 dk içinde çay ve sigara içmemiş ve 5 dk istirahat etmiş olması dikkate alınarak oturur vaziyette her 2 koldan civalı sifingomanometre ile ölçüldü. Tüm katılımcıların vücut ağırlıkları ve boy ölçümleri yapıldı. Vücut ağırlığı hastaların üzerinde hafif giyecekler varken, ayakkabısız olarak, kalibrasyonu yapılmış, Seca marka (Almanya) tartı ile ölçüldü. Boy ölçümleri hasta ayakta durmaktayken, ayakkabısız olarak Seca marka (Almanya) tartı ile yapıldı. Tüm çalışma grubunun vücut kitle indeksi (VKI) vücut ağırlığı boyun karesine bölünerek hesaplandı ( $\text{kg/m}^2$ ).

### 3.3. Biyokimyasal Analizler

Çalışma grubunun hepsinden 12 saatlik açlık sonrası sabah 08:00-08:30 arasında biyokimyasal tetkikler için brakial venden 10 cc venöz kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden açlık kan şekeri (AKŞ), glikolize hemoglobin (HbA1c), yüksek dansiteli lipoprotein-kolesterol (HDL-K), LDL-K, TG, total kolesterol (TK), kreatinin, alanin aminotransferaz (ALT), ürik asit, hemogram ölçümleri yapıldı. 24 saatlik idrar örneklerinden mikroprotein, mikroalbumin ve kreatinin düzeyi hesaplandı. VEGF ve TGF- $\beta$  düzeyleri çalışılmak üzere 12 saat açlık sonrası alınan venöz kan örnekleri jelli biyokimya tüplerine alındıktan sonra 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek serum kısmı elde edilmiştir. Daha sonra numuneler eppendorf tüplerine üç porsiyona ayrılarak -80°C'de çalışma gününe kadar saklanmıştır.

Çalışmada; Santrifüj cihazı Nüve-NF 1200 R model soğutmalı (Türkiye) ve Eppendorf 5415 R eppendorf (Almanya), Otomatik pipetler eppendorf (Almanya) ve gilson (Fransa), Derin dondurucu: Kirsch Bosch -80°C (Almanya), ELISA plate yıkayıcı: Bio-tek marka ELx 50 model otomatik strip yıkayıcı (ABD), ELISA okuyucu: Rayto RT-6000 Microplate Reader (Çin), Vorteks cihazı: Nüve NM 100 (Türkiye), Elabscience ELISA Kiti Katalog no: E-EL-H0110 (Wuhan, Çin), Elabscience VEGF-A ELISA Kiti Katalog no:E-EL-H0111 (ÇİN) kullanıldı. TK, HDL-K, TG ölçümleri Beckman Coulter AU 5800 kimyasal analizler kullanılarak ölçüldü.

LDL-K düzeyleri Freidewald formülüne (Freidewald formülü:  $LDL-K = TK - (HDL-K + TG/5)$ ) göre hesaplandı (170).

#### **3.4. VEGF Düzeylerinin Belirlenmesi**

VEGF-A seviyesinin kantitatif ölçümü enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile ticari kit (Elabscience, Wuhan, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit 7 nokta kalibratör içermektedir (31,25pg/ml, 62,5pg/ml, 125pg/ml, 250pg/ml, 500pg/ml, 1000pg/ml, 2000pg/ml). Tüm standartlar duplike çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alındı. Prosedür sonunda standartların optik dansite- konsantrasyon grafiği çizilmiş ve tüm numunelerin konsantrasyonları bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

#### **3.5. TGF- $\beta$ Düzeylerinin Belirlenmesi**

TGF- $\beta$ 1 seviyesinin kantitatif ölçümü enzim-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi ile ticari kit (Elabscience, Wuhan, China) kullanılarak yapılmıştır. Kit prosedürüne uygun olarak çalışma öncesinde tüm numunelerin aktivasyonu 1 M HCl ile 30 dakika inkübasyon sonrası 1.2 M NaOH/0.5 M HEPES kullanılarak yapıldı. Kit 7 nokta kalibratör içermektedir (31,25pg/ml, 62,5pg/ml, 125pg/ml, 250pg/ml, 500pg/ml, 1000pg/ml, 2000pg/ml). Tüm standartlar duplike çalışılarak bu konsantrasyonlara karşılık gelen optik dansite verileri alındı. Prosedür sonunda standartların optik dansite-konsantrasyon grafiği çizilmiş ve tüm numunelerin konsantrasyonları bu grafikten yararlanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/ml olarak ifade edildi.

#### **3.6. MiRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi**

Hastalardan EDTA'lı tüplere 4cc kan alındı. Alınan kanlar 1-2 saat içinde soğutmalı santrifüjde 15.000 rpm'de 10 dk döndürülerek plazma kısmı cDNA izolasyonu yapılana kadar -80 C'de muhafaza edildi.

### 3.6.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Kimyasallar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada; soğutmalı santrifüj (Thermo), mikrosantrifüj (Thermo), -80C derin dondururucu (Thermo), vorteks (Nüve), spektrofotometre (NanoDrop ND-1000), termal Cycler (Thermo), mikropipetler (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl ) (Eppendorf Research), çeker ocak, distile su cihazı (Barnstead), buzdolabı (Profilo), güç kaynağı (Apelex), real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) (Applied Biosystems StepOnePlus) cihazları kullanıldı.

Çalışmada; RiboEx™ solüsyon (GeneAll), Buffer SW1 (GeneAll), Buffer RBW (GeneAll), Buffer RNW (GeneAll), RNase-free water (GeneAll), GeneAll® Column type B (red ring) (with collection tube) (GeneAll), GeneAll® Column type W (blue ring) (with collection tube) (GeneAll), 2 ml collection tube (GeneAll) ve 1.5 ml collection tube (GeneAll) Hybrid-R miRNA izolasyon kiti (GeneAll) olarak kullanılmıştır.

### 3.6.2. Primerler

Kontrol olarak U6 gen bölgesine ait diziler kullanılmıştır. Yetkili firma tarafından Erika Varkonyi-Gasic and Roger P. Hellens'in Quantitative Stem Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs makalesi kaynak alınarak RT, Forward ve Reverse primerleri tasarlanmıştır (171). Çalışmada kullanılan primer dizileri aşağıda belirtilmiştir.

#### **Hsa-miR-184:**

R: CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

F: TGGACGGAGAACTGATAAGGGT

#### **Hsa-miR-98-5p:**

R: CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

F: TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT

#### **Hsa-miR-185-5p:**

R: CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

F: TGGAGAGAAAGGCAGTTCCTGA

**Hsa-miR-203:**

R: CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

F: AGTGGTTCTTAACAGTTCAACAGTT

**Hsa-miR-196a-3p:**

R: CGAGGAAGAAGACGGAAGAAT

F: CGGCAACAAGAACTGCCTGAG

**U6 snRNA:**

R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT

F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT

**3.6.3. Total RNA Kalitesinin ve Miktarının Tayini**

Kaliteli total RNA istatistiksel olarak doğru karşılaştırılma yapılması için gereklidir. İzole edilen total RNA'ların nanodrop spektrofotometre cihazıyla ölçümleri yapıldı. A260/280 oranı 1.8'in altındaki veya A260/230 oranı 2.0'in altında olan örnekler çalışmaya dâhil edilmedi.

**3.6.4. miRNA İzolasyon Protokolü**

MiRNA izolasyon protokolünde 200µL serum+500µL RiboEx pipetaj yaparak eklendi. 5 dk oda ısısında inkübe edildi. 1,5ml lik tüp üzerine 100µl kloroform eklendi. Kloroform RiboEx ve serum örneğine karışması için alt üst yapıldı ve 2 dk oda ısısında bekletildi. 12,000g de dk 4°C de santrifüj yapıldı ve sulu faz başka bir eppendorfa aktarıldı. Alınan sulu faz kadar üzerine %50 etanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Elde edilen mix type B (kırmızı kapaklı olan) 700µL olacak şekilde kolona aktarıldı. 11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Altta kalan tüpün üzerine kalan sıvının hacmi kadar %100 etanol eklendi. Pipetaj yapıldı. Bu karışım (yaklaşık 650µL) type W kolona aktarıldı. 11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Not: geriye kalan örnek varsa bir önceki iki basamak tekrarlanır. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500µL RBW Buffer eklendi. 11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500µL RNW Buffer eklendi.

11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine 500µL RNW Buffer eklendi. 11,000rpm de 1 dk oda ısısında santrifüj edildi. Collection tüp yenisi ile değiştirildi ve üzerine hiçbirşey eklenmeden 11,000rpm de 2 dk santrifüj edildi. Daha sonra membranın tam merkezine gelecek şekilde 50µL RNase-free su eklendi ve 2dk oda sıcaklığında bekletildi. 11,000rpm de 2 dk santrifüj edildi. Elde edilen örnek -20°C ye kaldırıldı. Daha sonra elde edilen miRNA ile complementer DNA(cDNA) sentezi yapıldı.

### 3.6.5. cDNA İzolasyon Protokolü

MiRNA ekspresyon miktarının tayini için, elde edilen total miRNA'dan çalışılacak her bir miRNA için ayrı ayrı stem loop primeriyle cDNA elde edildi (Tablo.5). Bu işlem WizScript™ cDNA Synthesis Kit (High Capacity) W2211 kiti ile gerçekleştirildi.

**Tablo 5.** CDNA İzolasyon Protokolü

<b>BİLEŞENLER</b>	<b>MİKTAR</b>
10X Reaction Buffer	2 µl
Stem-loop primer	2 µl
20X dNTP mix	1 µl
miRNA	1 µl
WizScript™ RTase	1 µl
RNase Inhibitor	1 µl
RNase free Water	2 µl
<b>TOTAL</b>	<b>10 µl</b>

PCR mix bileşenleri tabloda verilen oranlarda PCR striplerine koyuldu. Ardından stripler Applied Thermal Cyler cihazına yerleştirildi. Tablo 6'de verilen PCR döngü protokolü uygulandı. Örnekler daha sonra çalışılmak üzere -20C'ye kaldırıldı.

**Tablo 6.** PCR Döngü Protokolü

25°C	10 dakika
37°C	120 dakika
85°C	5 dakika
4°C	+ ∞

### 3.6.6. Real Time PCR Protokol

Çalışmaya başlamadan önce ilk olarak plate dizaynı yapıldı. cDNA hariç bütün PCR bileşenleri mix yapıldı. PCR bileşenleri Tablo 7’de verildi. Her bir kuyuya karışımdan eşit miktarda koyuldu. cDNA örneği ise dizayna göre her bir kuyuya eklendi (örneğin; 16ul mix+4ul cDNA). Plate sailing film ile kapatıldı. Ardından RT-PCR cihazına yerleştirildi. RT-PCR döngü protokolü Tablo 8’de verildi.

Her bir örnek için gerçek zamanlı PZR işlemi en az iki tekrarlı olacak şekilde yapılarak ortalama Ct değerleri elde edildi. Primerlerin de sağlıklı bir dizaynı olup olmadığını görmek adına melt curve analizi yapılarak analiz edildi.

**Tablo 7.** RT-PCR bileşenleri

PCR BİLEŞENLERİ	1X
2X SYBR GREEN MASTER MIX	10µL
F(10pm)	1µL
R(10pm)	1µL
ROX	1µL
cDNA	4µL
WATER	3 µL
<b>TOTAL</b>	<b>20µL</b>

**Tablo 8.** RT-PCR Döngü Protokolü

PCR KOŞULLARI		
95°C	10 dakika	
95°C	15saniye	<b>X40</b>
60°C	1 dakika	

Rölatif kantitasyon analizi “ $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Yöntemi” metodu kullanılarak tanımlandı. Bunun için; miRNA ekspresyon kantifikasyonu küçük nüklear ribonükleoprotein olan U6 snRNA referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edildi. Her bir örneğe ait, her bir genin Ct değerleri, o örneğin housekeeping Ct (U6 CT) değerinden çıkartılacak delta siklus eşiği ( $\Delta Ct$ ) değerleri hesaplandı. Daha sonra her bir hastanın  $\Delta Ct$  değerleri kontrol grubunun ortalama Ct değerinden çıkartılacak deltadelta siklus eşiği ( $\Delta\Delta Ct$ ) değerleri hesaplandı. Son olarak; her bir miRNA'nın ne kadar eksprese olduğu hesaplamak için, son değer başlangıca olan oranı alınarak (fold change)  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri belirlendi.  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  değeri 2'nin üzerindeyse artış, 1'in altındaysa ekspresyonda azalma olmuştur şeklinde yorumlandı.

### 3.7. İstatiksel Analiz

Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluk kontrolünde Shapiro Wilk testi kullanılmıştır. İki den fazla normal dağılıma uymayan bağımsız grup karşılaştırılmasında Kruskal Wallis testi ve Dunn çoklu karşılaştırma testleri (tansiyon değerleri, ALT, AKŞ, HbA1c düzeyleri, DM süreleri, TG, TK, Cr, ürik asit, albuminüri, VEGF, TGF  $\beta$ ), normal dağılıma uyanlarda ise ANOVA (yaş, VKİ, BKO, hemogram, lökosit, platelet düzeyleri, HDL-K, LDL-K) testi kullanılmıştır. Normal dağılıma sahip değişkenlerin 2 bağımsız grup karşılaştırılmasında Student t Testi, normal dağılıma sahip olmayan değişkenler için Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Kategorik verilerin karşılaştırılması ki-kare testi ile yapılmıştır (cinsiyet). Değişkenler arasındaki ilişki Spearman korelasyon analizi ile belirlenip, DN gelişimi üzerinde miRNA'ların bağımsız etkisi lojistik regresyon analizi ile değerlendirilmiştir. DN'de miRNA'ların tanısallık gücü ROC curve analizi kullanılmıştır.

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 22.0 paket programı kullanılmış ve  $P < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

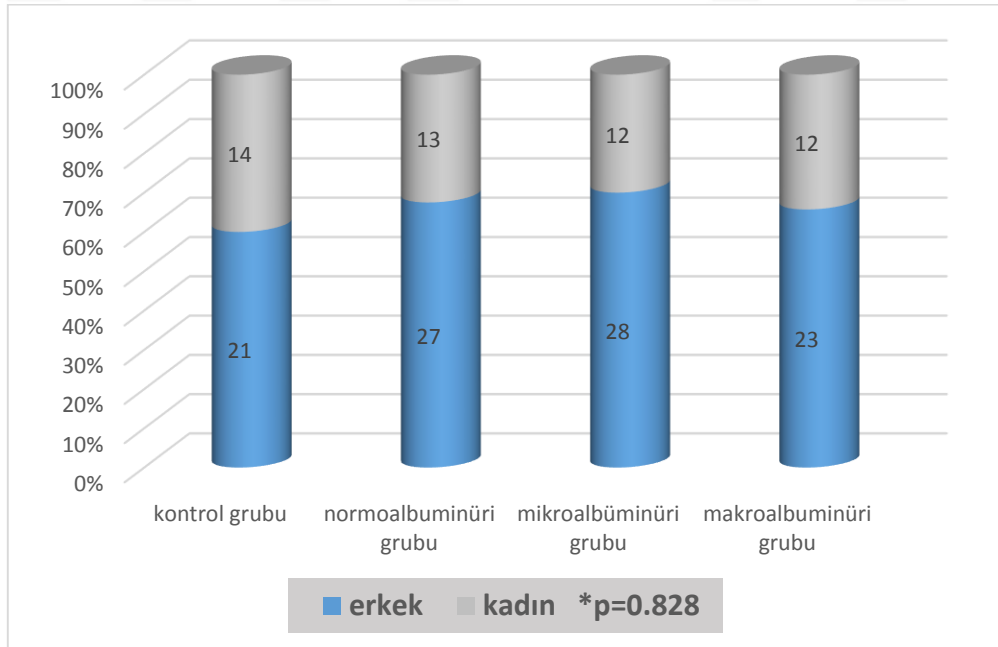
Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan 14.02.2018 tarih ve 32 sayılı karar numarasıyla onay alınmıştır. Çalışmaya alınması planlanan tüm kişiler araştırma hakkında sözel ve yazılı olarak ayrıntılı bilgilendirilmiş ve çalışmayı kabul edenlerden ‘bilgilendirme ve onay imzaları’ alındıktan sonra çalışmaya dahil edilmiştir.

Bu tez çalışması Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğünün TTU-2018-6675 nolu proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.



#### 4. BULGULAR

Yaş, cinsiyet, VKİ gibi demografik verilerin gruplara göre dağılımı incelendiğinde kontrol grubunda hastaların ortalama yaşı  $54.8 \pm 6.8$ ; normoalbuminüri grubunda  $52.6 \pm 7.7$ ; mikroalbuminüri grubunda  $53.3 \pm 7.7$  ve makroalbuminüri grubunda  $55.4 \pm 8.0$  olarak bulundu. Gruplar arasında yaş açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0.366$ ). Kontrol grubunda hastaların ortalama VKİ  $28.5 \pm 4.2$ ; normoalbuminüri grubunda  $30.5 \pm 5.0$ ; mikroalbuminüri grubunda  $32.4 \pm 5.3$  ve makroalbuminüri grubunda  $32.6 \pm 7.1$  olarak bulundu. Gruplar arasındaki bu fark anlamlıydı ( $p=0.05$ ) ve yapılan post hoc testlerde farkın kontrol grubu ile sırayla mikroalbuminüri ve makroalbuminüri grupları arasından kaynaklandığı görüldü (sırasıyla  $p=0.013$  ve  $p=0.011$ ). Gruplar bel kalça oranlarına (BKO) göre incelendiğinde kontrol grubunda hastaların ortalama BKO  $0.96 \pm 0.09$ ; normoalbuminüri grubunda  $0.94 \pm 0.07$ ; mikroalbuminüri grubunda  $0.97 \pm 0.09$  ve makroalbuminüri grubunda  $0.97 \pm 0.07$  olarak bulundu. Gruplar arasından BKO açısından istatistiksel bir fark saptanmadı ( $p=0.343$ ). Gruplar arasında cinsiyet dağılımı açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0.828$ , Şekil 5).



Şekil 5. Grupların Cinsiyet Dağılımları

Gruplar kan basınçlarına göre değerlendirildiğinde makroalbuminüri grubu sağ sistol, sağ diyastol ve sol sistol değerleri bakımından anlamlı olarak normoalbuminüri

ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu (tümü için  $p<0.05$ ). Sağ diyastol düzeyleri arasındaki fark post hoc testlerde kayboldu ve gruplar arası fark saptanamadı (Tablo 9).

**Tablo 9.** Grupların Kan Basıncı Düzeyleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>Sağ Sistol (mm Hg)</b>	120.0±0.0	120.0±20.0	130.0±10.0	130.0±20.0 <sup>a,b</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Sağ Diyastol (mm Hg)</b>	80.0±10.0	75.0±10.0	80.0±10.0	80.0±15.0 <sup>a,b</sup>	<b>0.001</b>
<b>Sol Sistol (mm Hg)</b>	120.0±0.0	120.0±20.0	130.0±10.0	130.0±15.0 <sup>a,b</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Sol Diyastol (mm Hg)</b>	75.0±10.0	75.0±13.7	80.0±10.0	80.0±15.0	<b>0.036</b>

Veriler ortanca±ÇAA olarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ).

#### 4.1. Grupların Hemogram ve ALT Düzeyleri Açısından Değerlendirilmesi

Makroalbuminüri grubunun hemoglobin değerleri mikroalbuminüri ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha düşüktü (sırasıyla;  $p=0.007$  ve  $p=0.014$ ). Lökosit düzeyi kontrol grubunda normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve makroalbuminüri grubuna göre düşük bulundu (sırasıyla;  $p=0.011$ ,  $p=0.037$ ,  $p=0.003$ ). ALT düzeyi makroalbuminüri grubunda mikroalbuminüri ve normoalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla;  $p=0.022$  ve  $p=0.021$ ). Platelet düzeylerinde gruplar arası bir farklılık saptanmadı ( $p=0.111$ ). Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 101.** Grupların Hemogram ve ALT Düzeyleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>Hemoglobin(gr/dl)</b>	14.8±1.2	14.6±1.6	14.8±1.4	13.7±1.9 <sup>a,c</sup>	<b>0.005</b>
<b>Lökosit</b>	6720.0±2310.2	8195.0±2114.0 <sup>a</sup>	7992.5±1773.8 <sup>a</sup>	8422.8±1894.7 <sup>a</sup>	<b>0.002</b>
<b>Platelet</b>	237542.9±50854.1	245550.0±56182.2	229800.0±53373.5	263457.1±81010.6	0.111
<b>ALT*(mg/dl)</b>	18.5±9.3	22.5±16.5	24.5±20.8	18.0±10.0 <sup>b,c</sup>	<b>0.002</b>

Veriler ortalama±SS ve \*ortanca±ÇAA olarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). Alanin transaminaz, ALT

## 4.2. Grupların AKŞ, HbA1c ve Diyabet Süreleri Açısından Değerlendirilmesi

AKŞ ve HbA1c normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve makroalbuminüri grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. DM süreleri ise makroalbuminüri grubunda normoalbuminüri ve mikroalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla;  $p=0.002$  ve  $p<0.001$ ; Tablo 11).

**Tablo 11.** Grupların AKŞ, HbA1c ve Diyabet Süreleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>AKŞ*(mg/dl)</b>	95.0±12.0	160.5±75.0 <sup>a</sup>	187.0±107.0 <sup>a</sup>	193.0±142 <sup>a</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Hba1c (%)</b>	5.4±0.4	8.2±2.1 <sup>a</sup>	9.0±2.4 <sup>a</sup>	9.4±2.4 <sup>a</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>DM süre* (yıl)</b>		5.5±8.5	6.0±7.7	15.0±12.3 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.001</b>

Veriler ortalama±SS ve ortanca±ÇAA\*olarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). Açlık Kan Şekeri, AKŞ

## 4.3. Grupların Lipid Düzeyleri Açısından Değerlendirilmesi

HDL-K düzeyleri kontrol grubunda mikroalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.020$ ). LDL-K düzeyleri açısından gruplar arası fark saptanmadı (herbiri için;  $p<0.05$ ). TG düzeyi makroalbuminüri grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). TK düzeyi ise makroalbuminüri grubunda mikroalbuminüri grubuna göre yüksekti ( $p=0.006$ ; Tablo 12).

**Tablo 12.** Grupların Lipid Düzeyleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>HDL-K (mg/dl)</b>	51.5±13.1	46.8±11.5	43.2±9.4 <sup>a</sup>	49.7±15.2	<b>0.021</b>
<b>LDL-K (mg/dl)</b>	129.1±33.7	119.6±29.3	115.1±32.7	133.6±50.9	0.123
<b>TG* (mg/dl)</b>	109.5±83.0	144.0±99.0	151.5±131.0	180.0±241.0 <sup>a</sup>	<b>0.001</b>
<b>TK* (mg/dl)</b>	205.0±50.0	211.0±58.0	198.0±47.0	255.0±114.0 <sup>c</sup>	<b>0.008</b>

Veriler ortalama±SS ve ortanca±ÇAA\*olarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). Yüksek Dansiteli Lipoprotein Kolesterol, HDL-K; Düşük Dansiteli Lipoprotein Kolesterol, LDL-K; Trigliserit, TG; Total Kolesterol, TK.

#### 4.4. Grupların Böbrek Fonksiyonları Açısından Değerlendirilmesi

Gruplar böbrek fonksiyonlarına göre değerlendirildiğinde makroalbuminüri grubu tüm gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek Cr ve daha düşük GFR değerlerine sahipti (hepsi için,  $p<0.05$ ). Ürik asit düzeyleri makroalbuminüri grubunda normoalbuminüri ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksekti (sırasıyla;  $p=0.040$  ve  $p=0.003$ ; Tablo 13).

**Tablo 13.** Grupların Renal Fonksiyonları

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>Cr (mg/dl)</b>	0.8±0.2	0.9±0.2	0.9±0.2	1.2±0.8 <sup>a,b,c</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Ürik asit (mg/dl)</b>	4.7±1.8	5.1±2.0	5.2±2.2	6.5±1.9 <sup>a,b</sup>	<b>0.004</b>
<b>GFR (ml/dk)</b>	92.0±9.3	85.0±24.5	86.0±33.8	71.0±42.0 <sup>a,b,c</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Proteinüri (gr/gün)</b>	0.08±0.04	0.09±0.05	0.19±0.14 <sup>a,b</sup>	1.70±2.93 <sup>a,b,c</sup>	<b>&lt;0.001</b>
<b>Albuminüri (mg/gün)</b>	2.8±5.9	9.8±9.7	64.5±75.8 <sup>a,b</sup>	707.0±750.0 <sup>a,b,c</sup>	<b>&lt;0.001</b>

Veriler ortanca±ÇAAolarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). Kreatinin, Cr; Glomerüler Filtrasyon Hızı, GFR

#### 4.5. Grupların VEGF ve TGF β Düzeylerinin Değerlendirilmesi

Grupların VEGF ve TGF-β düzeyleri Tablo14'de verilmiştir. Kontrol ve normoalbuminüri gruplarında VEGF düzeyleri mikroalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla;  $p=0.016$  ve  $p=0.001$ ). Makroalbuminüri grubu ile kontrol grubu arasında VEGF düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanamazken, normoalbuminüri grubu makroalbuminüri grubuna göre yüksek VEGF düzeylerine sahipti (sırasıyla;  $p=0.977$  ve  $p=0.001$ ). Makroalbuminüri ile mikroalbuminüri grupları arasında VEGF düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0.064$ ).

Makroalbuminüri ve mikroalbuminüri grupları normoalbuminüri ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek TGF-β düzeylerine sahipti (herbiri için;  $p<0.001$ ). Makroalbuminüri ve mikroalbuminüri grupları arasında ise TGF-β düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı ( $p=0.574$ ).

**Tablo 14.** Grupların VEGF ve TGF- $\beta$  Düzeyleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	P
<b>VEGF (pg/ml)</b>	255.5 $\pm$ 187.1	239,6 $\pm$ 157.2	137.2 $\pm$ 192.1 <sup>a,b</sup>	239.6 $\pm$ 273.9	<b>&lt;0.001</b>
<b>TGF-<math>\beta</math> (pg/ml)</b>	61.1 $\pm$ 42.1	5743.3 $\pm$ 2004.8 <sup>a</sup>	10372.8 $\pm$ 6070.4 <sup>a,b</sup>	9160.7 $\pm$ 4648.5 <sup>a,b</sup>	<b>&lt;0.001</b>

Veriler ortanca $\pm$ ÇAAolarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ). <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ).

#### 4.6. Grupların MikroRNA Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi

Grupların miRNA relatif ekspresyon düzeyleri Tablo 15’te ve diyabetik grupların sağlıklı kontrollere göre relatif miRNA ifadeleri Şekil 6’ da verildi.

Normoalbuminuri ve makroalbuminüri gruplarında kontrol grubuna göre miR-98 ekspresyonu anlamlı olarak downregüle saptandı ( $p=0.011$ ). Sağlıklı kontrol ve mikroalbuminüri grupları arasında miR-98 ekspresyonu açısından farklılık saptanmadı ( $p=0.305$ )

MiR-184 ekspresyon düzeyleri normoalbuminurisi olan diyabetiklerde sağlıklı kontrollere göre yüksek saptansa da bu istatiksel olarak anlamlı değildi. Makroalbuminüri ve mikroalbuminürisi olan DM gruplarında normoalbuminürisi olanlara göre miR-184 ekspresyonu anlamlı olarak upregüleydi (sırasıyla;  $p=0.003$  ve  $p=0.010$ ).

MiR-185 ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (her biri için;  $p>0.05$ ).

MiR-196a-3p ekspresyon düzeyleri normoalbuminurik diyabetik grupta sağlıklı kontrol gruba göre down regüleydi. Makroalbuminüri ve mikroalbuminürisi olan diyabetik gruplarda miR-196a-3p ekspresyon düzeyleri normoalbuminurik diyabetik gruba göre upregüleydi (sırasıyla;  $p=0.001$  ve  $p=0.049$ ). Ayrıca makroalbuminüri grubundaki miR-196a-3p upregülasyonu mikroalbuminüri grubuna göre daha belirgindi ( $p=0.017$ ).

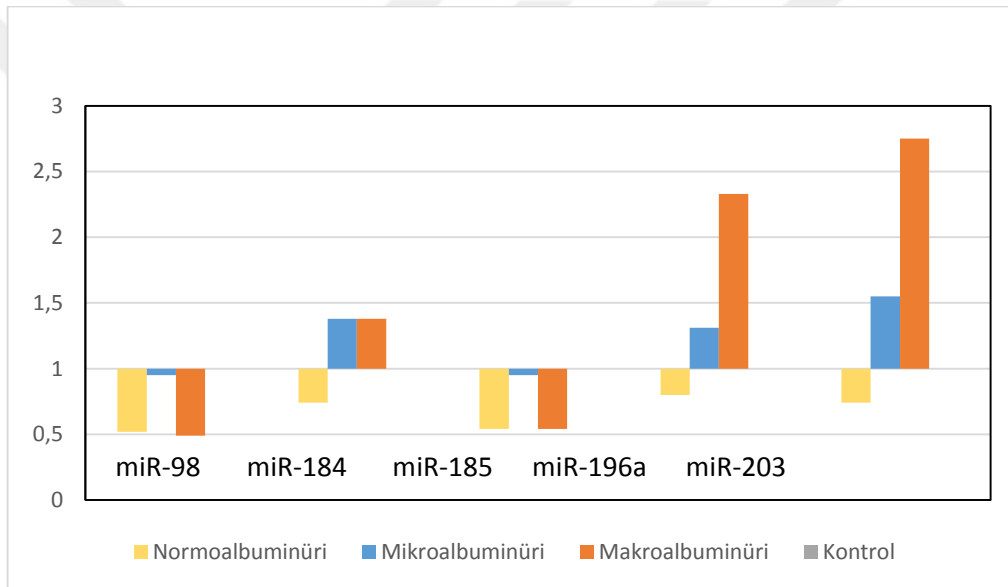
MiR-203 ekspresyon düzeyleri makroalbuminüri grubunda mikroalbuminüri, normoalbuminüri ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak upregüleydi ( $p=0.00$ , herbiri

için). Mikroalbuminüri grubundaki miR-203 ekspresyonu normoalbuminüri grubuna göre de upregüle olduğu saptandı ( $p=0.001$ ).

**Tablo 15.** Grupların MikroRNA Relatif Ekspresyon Düzeyleri

	Kontrol Grubu	Normoalbuminüri Grubu	Mikroalbuminüri Grubu	Makroalbuminüri Grubu	p
<b>MİR-98 <math>\Delta</math>CT</b>	-20.0 $\pm$ 3.3	-18.4 $\pm$ 2.9	-19.32 $\pm$ 3.3	-18.3 $\pm$ 2.4 <sup>a</sup>	<b>0.01</b>
<b>MİR-184 <math>\Delta</math>CT</b>	0.5 $\pm$ 2.6	0.9 $\pm$ 2.2	-0.1 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	-0.5 $\pm$ 1.5 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.05</b>
<b>MİR-185 <math>\Delta</math>CT</b>	-18.3 $\pm$ 3.2	-17.4 $\pm$ 2.3	-18.1 $\pm$ 1.7	-18.0 $\pm$ 1.8	>0.05
<b>MİR-196.3p <math>\Delta</math>CT</b>	-18.9 $\pm$ 2.6	-17.9 $\pm$ 1.6	-18.3 $\pm$ 2.2 <sup>b</sup>	-19.3 $\pm$ 1.8 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.05</b>
<b>MİR-203 <math>\Delta</math>CT</b>	-17.9 $\pm$ 2.4	-17.5 $\pm$ 1.9	-18.5 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>	-19.1 $\pm$ 1.2 <sup>a,b,c</sup>	<b>0.001</b>

Veriler ortanca $\pm$ ÇAAolarak verildi. <sup>a</sup>kontrol grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>b</sup>normoalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ), <sup>c</sup>mikroalbuminüri grubundan anlamlı olarak farklı ( $p<0.005$ ).



**Şekil 6.** Diyabetik Grupların Sağlıklı Kontrollere Göre Relatif miRNA İfadeleri

#### 4.7. Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar

Değişkenler arasındaki korelasyonlar Tablo 16'da verilmiştir. TGF- $\beta$  düzeyi ile miR-98 ve albuminüri düzeyi arasında pozitif korelasyon, miR-203 arasında negatif korelasyon saptandı (sırasıyla;  $r=0.192$ ,  $p=0.018$ ;  $r= 0.710$ ,  $p<0.001$ ;  $r=-0.251$ ,  $p=0.002$ )

MiR-98 ekspresyonu, miR-184, miR-185, miR-196a.3p, miR-203 ile pozitif koreleydi (sırasıyla;  $r=0.478$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.455$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.354$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.445$ ,  $p<0.001$ ).

MiR-184 ekspresyonu, miR-185, miR-196a-3p, miR-203 ile pozitif, albuminüri düzeyi ile negatif koreleydi (sırasıyla;  $r=0.596$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.695$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.758$ ,  $p<0.001$ ;  $r=-0.201$ ,  $p=0.014$ ). MiR-185 ekspresyonuyla, miR-196a.3p, miR-203 arasında (sırasıyla,  $r=0.619$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.586$ ,  $p<0.001$ ), miR-196a.3p ekspresyonuyla, miR-203 arasında pozitif yönde korelasyon saptandı ( $r=0.721$ ,  $p<0.001$ ). Ayrıca miR-203 ekspresyonu albuminüri düzeyi ile negatif yönde anlamlı yönde bir korelasyon gösterdi ( $r=-0.364$ ,  $p<0.001$ ).

**Tablo 162.** Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar

	VEGF	TGF- $\beta$	MİR-98 $\Delta$ CT	MİR-184 $\Delta$ CT	MİR-185 $\Delta$ CT	MİR-196a.3p $\Delta$ CT	MİR-203 $\Delta$ CT	M.ALB
<b>VEGF</b>								
<b>R</b>		-0.053	0.074	0.024	0.027	0.004	0.015	-0.082
<b>P</b>		0.520	0.370	0.773	0.745	0.958	0.858	0.317
<b>TGF-<math>\beta</math></b>								
<b>R</b>			<b>0.192</b>	-0.111	0.023	0.020	<b>0.251</b>	<b>0.710</b>
<b>P</b>			<b>0.018</b>	0.175	0.779	0.806	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>MİR-98 <math>\Delta</math>CT</b>								
<b>R</b>				<b>0.478</b>	<b>0.455</b>	<b>0.354</b>	<b>0.445</b>	0.118
<b>P</b>				<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.150
<b>MİR-184 <math>\Delta</math>CT</b>								
<b>R</b>					<b>0.596</b>	<b>0.695</b>	<b>0.758</b>	<b>-0.201</b>
<b>P</b>					<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.014</b>
<b>MİR-185 <math>\Delta</math>CT</b>								
<b>R</b>						<b>0.619</b>	<b>0.586</b>	0.071
<b>P</b>						<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.386
<b>MİR-196a- 3p <math>\Delta</math>CT</b>								
<b>R</b>							<b>0.721</b>	-0.140
<b>P</b>							<b>&lt;0.001</b>	0.088
<b>MİR-203 <math>\Delta</math>CT</b>								
<b>R</b>								<b>-0.364</b>
<b>P</b>								<b>&lt;0.001</b>

#### 4.8. DN Gelişiminde MiRNA'ların Etkisi

DN gelişimi üzerinde her bir miRNA'nın diğer risk faktörleriyle birlikte bağımsız etkileri lojistik regresyon analizi değerlendirildi. MiRNA-196a-3p, miRNA-

98 ve miRNA-203'ün VKİ, VEGF ve TGF- $\beta$  ekspresyonundaki değişikliklerin DN gelişiminde riski artıran bağımsız risk faktörleri olduğu tespit edildi (Tablo 17).

ROC analizi ile yapılan değerlendirme sonucunda plazma miRNA-184, miRNA-196a-3p, miRNA-203, VEGF ve TGF- $\beta$ 'nın DN'yi öngörmeye tanısıl değeri olduğu görüldü (her biri için;  $p < 0.05$ ; Tablo 18; Şekil 7, Şekil 8).

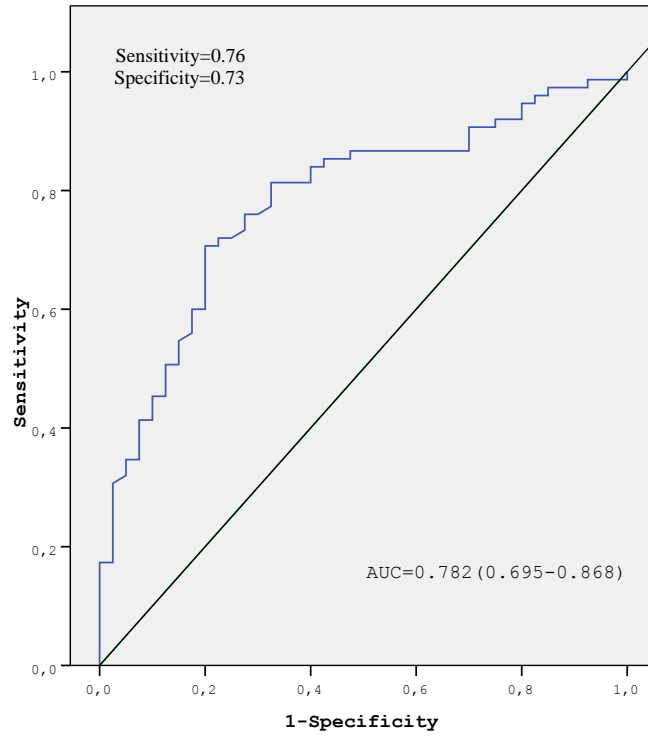
**Tablo 17.** Diyabetik Nefropati Gelişimi Üzerine MiRNA ile Diğer Değişkenlerin Etkisi

		OR	p
<b>Model 1</b>	<b>MİR-196-3p <math>\Delta</math>CT</b>	0.450	<b>0.007</b>
	LDL	1.052	0.226
	VEGF	0.987	<b>&lt;0.001</b>
	TGF- $\beta$	1.001	<b>&lt;0.001</b>
	HbA1c	1.344	0.117
	TG	1.012	0.108
	VKİ	1.110	0.138
	Ürik Asit	1.324	0.241
	Diyabet Süresi	1.009	0.857
	Yaş	0.976	0.674
<b>Model 2</b>	<b>MİR-98 <math>\Delta</math>CT</b>	0.697	<b>0.044</b>
	LDL	1.067	0.126
	VEGF	0.989	<b>0.001</b>
	TGF- $\beta$	1.001	<b>&lt;0.001</b>
	HbA1c	1.277	0.139
	TG	1.014	0.065
	VKİ	1.153	<b>0.045</b>
	Ürik Asit	1.284	0.245
	Diyabet Süresi	1.049	0.332
	Yaş	1.003	0.955
<b>Model 3</b>	<b>MİR-203 <math>\Delta</math>CT</b>	0.373	<b>0.005</b>
	LDL	1.059	0.209
	VEGF	-0.015	<b>0.001</b>
	TGF- $\beta$	0.986	<b>&lt;0.001</b>
	HbA1c	1.372	0.102
	TG	1.014	0.090
	VKİ	1.191	<b>0.029</b>
	Ürik Asit	1.362	0.207
	Diyabet Süresi	1.018	0.731
	Yaş	0.950	0.402
TK	0.967	0.384	

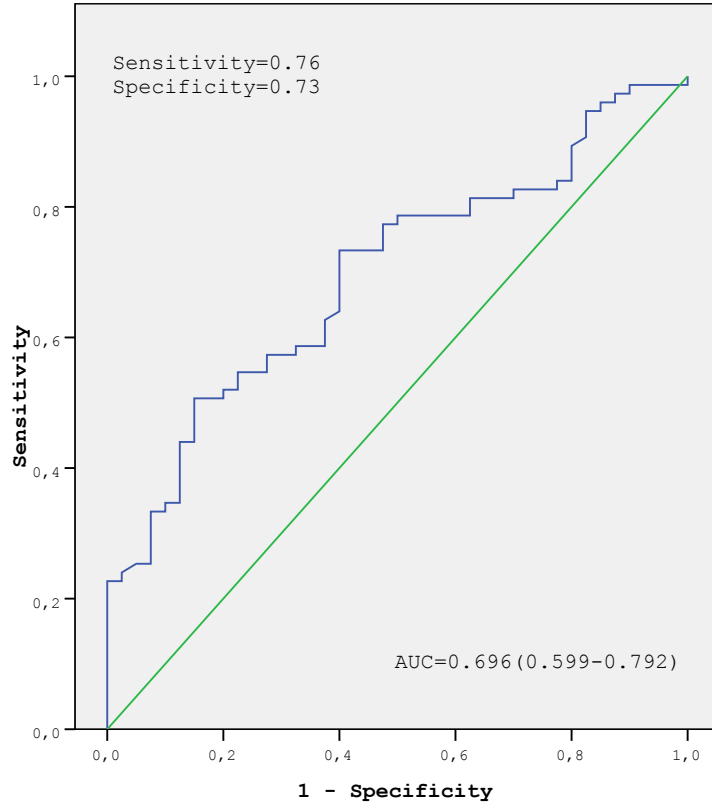
Düşük Dansiteli Lipoprotein, LDL; Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, VEGF; Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta, TGF- $\beta$ ; Glikolize Hemoglobulin, HbA1c; Trigliserit, TG; Vücut Kitle İndeksi, VKİ; Total Kolesterol, TK.

**Tablo 18.** Diyabetik Nefropati Tanısını Koymada MiRNA'ların Rolü

	AUC	p
<b>MİR-98 ΔCT</b>	0.447	0.350
<b>MİR-184 ΔCT</b>	0.318	<b>0.001</b>
<b>MİR-185 ΔCT</b>	0.424	0.181
<b>MİR-196a-3p ΔCT</b>	0.305	<b>0.001</b>
<b>MİR-203 ΔCT</b>	0.218	<b>&lt;0.001</b>
<b>VEGF</b>	0.338	<b>0.004</b>
<b>TGF-β</b>	0.866	<b>&lt;0.001</b>



**Şekil 7.** Diyabetik Nefropati Tanısı için miR-203'ün ROC Eğrisi



**Şekil 8.** Diyabetik Nefropati Tanısı için miR-196-3p'nin ROC Eğrisi

## 5. TARTIŞMA

Diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan DN; SDBY'nin ilk sıralardaki nedenlerinden biri olup önemli bir kardiyovasküler risk faktörüdür (172). DN risk faktörleri ve patofizyolojik basamaklarıyla ilgili birçok mekanizmayı aydınlatmıştır. DN gelişiminde kötü glisemik kontrol, diyabet süresi, obezite, dislipidemi, hipertansiyonun yanısıra etnik köken ve genetik gibi bir çok faktör sorumlu tutulmaktadır (173). Ancak DN'nin gelişim ve ilerlemesi her diyabetli için aynı olmamaktadır. DN patogenezinin multifaktöriyel yapısı moleküler düzeyde birçok bilinmezliği doğurmaktadır. Bu bilinmezlikler içinde DN'ye ilerleme sürecini, hastalığın prognozunu öngörmeye ve tedavi seçimi ile yanıt değerlendirmesinde biyobelirteçlerin tespiti önemlidir. DN'yi erken tespit etmede ve prognozunu tahmin etmede altın standart biyobelirteç mikroalbuminuridir. Ancak DN progresyonunu öngörmeye mikroalbuminuri her zaman doğru bilgi verememektedir. Çünkü mikroalbuminurisi olan tüm hastalar SDBY'e ilerlememekte ve mikroalbuminurisi olanların %30'u normoalbuminuriye dönmektedir. Ayrıca bazı DN'lerde proteinüri gelişmeden GFR'de azalma olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle DN'yi belirlemek için yeni biyobelirteçler üzerinde çalışılması gerekmektedir (48, 174).

Diyabet süresinin DN için risk faktörü olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Avustralya'da rastgele seçilen 42 bölgeden 25 yaş ve üstü 11.247 kişi ile yapılan Avustralya Diyabet, Obezite ve Yaşam Biçimi Çalışmasında yaş, diyabet süresi, sistolik kan basıncı, mevcut sigara içimi, VKİ ve HbA1c düzeyi, albuminüri için bağımsız risk faktörleri olarak tanımlanmıştır (175). Thakur ve ark.nın 217 DM'li hasta ile yaptığı çalışmada mikroalbuminüri varlığı ve diyabet süresi arasında anlamlı ilişki bulunmuştur ( $p<0.001$ ) (176). Ademola ve ark. diyabet sürelerine göre sınıflandırdıkları yeni tanı 50 DM hastası, 5-10 yıllık diyabet süresi olan 50 DM hastası, 10 yıldan uzun süreli DM'si olan 50 hasta ve 30 kişilik sağlıklı kontrol grubuyla yaptıkları çalışmalarında albuminürinin şiddeti ve ilerlemesini, daha uzun diyabet süresi ile ilişkili bulmuşlardır (177). Başka bir çalışmada Jiji ve ark. yine diyabet sürelerine göre sınıflandırdıkları 120 kişilik çalışma grubunda diyabet süresinin uzamasıyla proteinüri, kreatinin artışı ile değerlendirilen renal fonksiyonların bozulduğunu göstermişlerdir (178). Bizim çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak

makroalbuminüri grubunun DM süresi normoalbuminüri ve mikroalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla;  $p=0.002$  ve  $p<0.001$ ).

DN gelişiminde ve ilerlemesinde kötü glisemik kontrolün rolü çalışmalarla kanıtlanmıştır. Örneğin ADVANCE çalışmasında yoğun glisemik kontrol ile ( $HbA1c \leq \%6.5$ ) T2DM'lilerde SDBY riskinin %65, makroalbuminürin %30, mikroalbuminürinin %9 oranında düşürüldüğü ve renal iyileşme sağlandığı gösterilmiştir (179). Benzer şekilde DCCT/EDIC çalışmasında, yoğun glisemik strateji ile tedavi edilen hastalarda, geleneksel glisemik kontrol ile tedavi edilenlere göre, böbrek fonksiyonlarında bozulma riski önemli ölçüde düşük bulunmuştur (180). Buna karşılık 2 ila 15 yıl boyunca izlenmiş T2DM'li 28065 yetişkin ile yapılan yedi çalışmanın metaanalizinde, sıkı glisemik kontrolün albuminüri riskini azalttığı, ancak SDBY'ye ilerleme veya böbrek hastalığına bağlı mortalite gibi olumsuz renal sonuçlar için riski azaltmadığını gösterilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada yoğun glisemik kontrol ve konvansiyonel tedavi grupları arasındaki belirgin HbA1c farkının hem mikroalbuminüri hem de makroalbuminüri ile daha olumlu sonuçlar doğurduğunu ortaya koymuştur (181). Bu çalışmada AKŞ ve HbA1c düzeyleri değerlendirilmiş ve makroalbuminüri grubu ile mikroalbuminüri ve normoalbuminüri grupları arasında HbA1c düzeyleri açısından fark saptanmamıştır ( $p=0.81$ ,  $p=0.054$ ). Bunun nedeni kötü glisemik kontrolü olan T2DM hastalarının çalışmaya dahil edilmemesi olabilir.

Serum ürik asit düzeyleri ile DN ve renal fonksiyonlarda bozulma arasındaki ilişki bir çok çalışmada gösterilmiştir (182-184). Jelal ve ark. 6 yıllık takip süresince mikroalbuminüri veya makroalbuminüri gelişimini belirlemek için 455 normoalbuminürik T1DM hastasını 6 yıl süre ile takip etmiş ve serum ürik asit düzeyleri artışının albuminüri gelişimini öngördüğünü bildirmiştir (182). Zoppini ve ark. hiperüriseminin erkeklerde  $\geq 7.0$  mg/dL, kadınlarda  $\geq 6.5$  mg/dL kabul edildiği 1449 T2DM'liyi kapsayan çalışmasında 5 yıllık izlem sonunda hiperürisemililerin %29.5'inde, hiperürisemi olmayanların %11.4'ünde KBH geliştiğini ve hiperüriseminin, KBH gelişimi için 2.5 kat risk artışı oluşturduğunu bulmuştur (185). Chang ve ark. KBH'ı olan 2367 T2DM hastayı 3 yıl ve daha fazla süre boyunca takip sonunda KBH progresyonu ve serum ürik asit düzeyi arasında pozitif bir ilişki saptamış. Serum ürik asit düzeyinin  $>6.3$  mg/dl olmasını KBH progresyonu için bağımsız bir risk faktörü olarak belirlemişlerdir (186). Bu çalışmada makroalbuminüri

grubunun ürik asit düzeyleri normoalbuminüri ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek (sırasıyla  $p=0.040$ ,  $p=0.003$ ) bulunmuştur. Makroalbuminüri ile mikroalbuminüri grupları arasında fark saptanmamıştır.

Dislipidemi DN risk faktörleri arasındadır. Ademola ve ark. TK, TG, HDL-K ve LDL-K/HDL-K oranını, albuminüri için bağımsız belirleyiciler olarak saptamışlardır (177). ADVANCE çalışmasında serum HDL-K düzeyi düşüklüğünün DN gelişimi ve progresyonu açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu saptanılmıştır (187). T1DM'li hastalar ile yapılan çalışmaların bir metaanalizde yüksek serum HDL-K düzeyinin DN gelişimi açısından düşük risk oluşturduğu gösterilmiştir (188). Suudi Diyabetik Böbrek Hastalığı (SAUDI-DKD) çalışmasında DN'si olan diyabetiklerde olmayanlara göre glikolize LDL-K düzeyi 3 kat yüksek olduğu ve LDL-K düzeyi ile DN progresyonu arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanılmıştır (189). Çalışmamızda HDL-K düzeyleri kontrol grubunda, mikroalbuminüri grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ( $p=0.020$ ). LDL-K düzeyleri açısından gruplar arası fark saptanmazken; TG düzeyi makroalbuminüri grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksekti ( $p<0.001$ ). TK düzeyi ise makroalbuminüri grubunda mikroalbuminüri grubuna göre yüksekti ( $p=0.006$ ). Kolesterol değerleri açısından literatürle uyumlu sonuçların ortaya çıkmamasının sebebi diyabeti olan hastaların bir çoğunun lipid düşürücü tedaviler alması olabilir.

Diyabetik hastalarda hipertansiyonun birlikte görülmesi, koroner kalp hastalığı, felç, nefropati ve retinopati risklerini önemli ölçüde arttırmaktadır (190-193). 100354 T2DM'linin dahil edildiği 24 çalışmanın metanalizi T2DM hastalarında antihipertansif tedavi ile vasküler hastalık gelişimi arasındaki ilişkiyi saptamayı amaçlamıştır. SKB'deki her 10 mm Hg azalmanın albuminüri oluşum riskini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (194). Güney Hindistanda yapılan gözlemsel bir çalışmada başlangıçta normal böbrek fonksiyonu olan hastaların 12 yıllık gözlem sonucunda %44,1'inin DN geliştirdiği, kontrolsüz DM'liler ve kan basıncında artış gösterenlerde nefropati geliştirme riskinin daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada DN gelişen hastaların başlangıç glukoz, HbA1c, SKB, TG ve üre seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır (195). Bu çalışmada hastaların mevcut tedavileri altındaki kan basıncı değerleri kaydedilmiş makroalbuminüri grubunun sağ

sistol, sağ diyastol ve sol sistol değerleri bakımından anlamlı olarak normoalbuminüri ve kontrol grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ( $p<0.05$ ).

VEGF, endotel hücre çoğalmasını, farklılaşmasını ve sağ kalımını uyaran, endotel bağımlı vazodilatasyona aracılık eden, mikrovasküler hiperpermeabiliteye neden olan ve interstisyel matriks remodelingine katılan endotel spesifik bir büyüme faktörüdür (196). Çeşitli çalışmalarda, hem T1DM hemde T2DM'de DN'nin erken evrelerinde serum VEGF düzeylerinin arttığı saptanılmıştır (197-203). VEGF'nin DN'nin potansiyel bir aracı olduğuna dair kanıtlar VEGF antikoru tedavisinin DN'nin hem erken dönem hem de geç dönem değişikliklerini iyileştirdiğini gösteren deneysel çalışmalardan da gelmektedir (204-206). Tüm bunlara karşılık olarak DN'li hastaların böbrek interstitiumundaki patojenik yolların moleküler belirteçlerini araştırmayı amaçlayan Lindenmeyer ve ark. çalışmalarında bazı kemirgen modellerinin aksine, VEGF-A ve epidermal büyüme faktörü (EGF) büyüme faktörleri DN'de mRNA ekspresyonunda bir azalma göstermiştir. Aynı zamanda VEGF-A ile proteinüri ve EGF ile proteinüri arasında anlamlı bir ters korelasyon ve VEGF-A ile HIF-1 $\alpha$  mRNA arasında pozitif bir korelasyon bulmuşlardır. Dolayısıyla, insan DN'sinde, bazı kemirgen modellerinde tarif edilen artış yerine, VEGF-A'nın azalmasının renal bozukluğa katkıda bulunacağını öne sürmüşlerdir (207). VEGF/VEGFR'nin erken DN'de aktivasyonu neoanjiyogenez ve glomerüler hasara neden olurken, daha sonraki aşamalarda VEGF ekspresyonunun azalmasının podosit kaybına bağlı olabileceği düşünülmüştür (208). Çalışmamızda mikroalbuminurisi olan diyabetik grupta VEGF düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre düşük saptandı. Makroalbuminurisi olan diyabetiklerde sağlıklı kontrollere benzer düzeylerde VEGF düzeyleri saptandı. Bu sonuçlar literatürle uyumlu değildi. Ancak lojistik regresyon analizinde VEGF düzeylerindeki değişikliğin nefropati gelişiminde bağımsız risk faktörü olduğu gösterildi.

TGF- $\beta$ ; hücre büyümesinin düzenlenmesi, diferansiyasyon, inflamasyon ve apoptozisde de dahil olmak üzere pleotropik etkileri olan, DN'nin iyi bilinen merkezi bir aracısıdır. TGF- $\beta$  ligand bağlanması ardından hücre zarındaki aktive olmuş TGF- $\beta$  reseptörleri, hedef genlerin transkripsiyonunu kanonik Smad bağımlı ve nonkanonik Smad bağımsız sinyalleme yolları boyunca indükler (209). DN'de DAG üretimi, PKC'nin aktifleşmesi, hücre içi glukozamin üretiminin artması, vazoaktif

ajanların renal üretimini artırması ve hiperglisemik koşullar altında AGE ve ROS üretimi, RAS komponentleri gibi çeşitli araçlar tarafından TGF- $\beta$  sinyali başlatılır (210, 211). TGF- $\beta$  artışı da DN'deki podosit kaybı, mezenşiyal genişleme ve interstisyel fibrozis gelişiminde rol oynar (212-214). Renal hücrelerde yüksek glukoz ortamında TGF- $\beta$  ya da reseptörünün ekspresyonunun ve biyoaktivitesinin artışının gösterildiği bir çok çalışma yapılmıştır (215-219). Bu çalışmalara ek olarak TGF- $\beta$  antikörlerinin kullanıldığı deneysel çalışmalar ile TGF- $\beta$  sinyalinin inhibisyonunun, proteinüri ve DN'de renal hasarlanmayı durdurduğu ve diyabet hastaları için tedaviye ve remisyona yeni bir yol sağladığı düşünülmüştür (220-222). Buna karşılık James ve ark.'nın yaptığı çalışma ise randomize çift kör bir çalışma olup DN'li hastalarda RAS inhibisyonuna ek olarak TGF- $\beta$ 1 spesifik monoklonal antikör tedavisinin renal fonksiyon kaybını yavaşlatmada plasebodan daha etkin olup olmadığını araştırmışlardır. Serum kreatinin değerini bazal seviyelerine göre 12 ay sonra değerlendirdiklerinde plasebo ve monoklonal antikör grubunda serum kreatinin düzeylerindeki değişikliklerin farklılık göstermediğini bulmuşlar ve bu nedenle RAS inhibitörlerine eklenen TGF- $\beta$ 1 mAb'nun, DN ilerletmesini yavaşlatmadığını öne sürmüşlerdir (223). Çalışmamızda da literatürle uyumlu olarak diyabetik kişilerde serum TGF- $\beta$  düzeyleri kontrollere göre yüksek saptandı. Ayrıca nefropatisi olan diyabetiklerde nefropatisi olmayanlara göre serum TGF- $\beta$  düzeyi daha yüksekti. Lojistik regresyon analizinde de diyabetik nefropati gelişimi açısından risk faktörü olduğu gösterildi.

Çeşitli biyolojik süreçlerin güçlü regülatörleri olan mikroRNA'ların dolaşımında kan ve idrar gibi vücut sıvılarında bol miktarda bulunması, oldukça kararlı yapı göstermesi ve plazmada RNAaz'lara dirençli olması nedeniyle klinik hastalıkların tanı ve prognozunda önemli biyobelirteçler olarak kabul edilmektedir (10, 11). Bununla birlikte tek bir miRNA, çok sayıda miRNA'nın ekspresyonunu düzenleyebilmektedir. Bundan dolayı bir ya da birkaç miRNA'nın hedeflenmesi çok sayıda gen ekspresyonunu düzenlemek için çok önemli fırsat olup RNA temelli tedavi geliştirilmesinde önemlidir (156, 224). DN patogenezinde yer alan bir çok miRNA gösterilmiştir (169). Gösterilen miRNA'lar DN için bir biyobelirteç olarak kabul edilmekte ve değişim gösteren yeni miRNA'ların keşfi için araştırmalar gerekmektedir. Bu çalışmada DN gelişiminde etkinliği kanıtlanan VEGF ve TGF  $\beta$ 'yı

hedefleyen ya da fibrotik süreçlerde farklı mekanizmalarla etkisi tesbit edilen daha önce DN'li kişilerde düzeyleri değerlendirilmemiş olan miR-184, miR-98, miR-185, miR-196a-3p ve miR-203 ekspresyonlarını değerlendirdik.

MiR-98 ekspresyonunun erken DN'ye cevaben upregüle olduğu tip 2 diyabetik sıçanlarda Xie ve ark. tarafından gösterilmiştir (225). T2DM'ye bağlı vasküler komplikasyonlarının patolojisinde siklin D2'nin rolü vardır. Yüksek glukoz verilen ratların aort endotel hücrelerinde siklin D2'nin up-regüle, miR-98'in ise downregüle olduğu ve sonuç olarak endotel hücrelerinde proliferasyona yol açtığı gösterilmiştir. MiR-98'in siklin D2'yi düzenleyerek endotel hücre proliferasyonunu inhibe edebileceği ve T2DM'nin vasküler komplikasyonları için yeni terapötik hedefler sağlayabileceği öne sürülmüştür (226). Başka bir çalışmada GDM'de miR-98'in ekspresyonel durumu ve fonksiyonel durumu incelenmiş, miR-98'in GDM hastalarından alınan plasentalarda normal plasentalara kıyasla daha fazla düzenlendiğini gösterilmiştir. MiR-98'in plasental dokularındaki up-regülasyonu, metil bağlayıcı bir protein olan Mecp2'yi hedef alarak DNA metilasyon seviyesinin artışıyla ilişkili bulunmuştur (227). Bugüne kadar DN'li kişilerin serum miR-98 ekspresyon düzeyleri değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada normoalbuminurisi olan diyabetik kişilerde sağlıklı kişilere göre serum miR-98 ekspresyonu downregüle olduğu gösterildi. Mikroalbuminurisi olan diyabetik kişilerde bu miR-98 ekspresyonları sağlıklı kontroller ile benzerlik gösterirken makroalbuminurisi olan diyabetik kişilerde downregüle olduğu saptandı. Ayrıca serum miR-98 ekspresyon düzeylerindeki değişikliğin DN gelişimi açısından bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterildi. Mikroalbuminurisi olan diyabetiklerde miR-98 downregülasyonunun olmaması DN'nin erken dönemde hastalığın progresyonunu önlemek için koruyucu bir mekanizma olabilir. Serum miR-98 ekspresyon ve TGF- $\beta$ 1 düzeyleri arasında pozitif korelasyon olması miR-98 ekspresyon düzeylerinde ki değişimin DN gelişimindeki etkisini TGF- $\beta$ 1 üzerinden gösterebileceğini düşündürmektedir. Cheng R ve ark. insan kalp fibroblastlarında yaptıkları çalışmada TGF- $\beta$ 1'in miR-98 seviyesini zamana ve konsantrasyona bağlı bir şekilde azaltabileceğini, miR-98 upregülasyonunun TGF- $\beta$  indüklü hücre farklılaşması ve fibroblast hücrelerindeki kollajen birikimini dramatik bir şekilde düşürdüğünü, biyoinformatik analiz ile miR-98'in doğrudan TGFBR1'i hedefleyebildiğini, miR-98'in upregülasyonunun TGF- $\beta$ 1

aracılığıyla indüklenen kardiyak fibrosis gelişimine karşı koruyucu olduğunu saptamışlardır (228).

Zanchi ve ark. Zucker diyabetik sıçanlarda miRNA'ların ekspresyon düzeylerini değerlendirdiği çalışmada en güçlü upregülasyonun miR-184'te olduğunu tespit etmiştir. MiR-184'ün tübüler lokalizasyonunun lipid fosfat fosfataz 3'ün (LPP3) ekspresyonunun azalması ve kollajen birikimi ile proksimal tübül fibrozisini uyardığı görülmüştür. Ayrıca albuminüriyi azaltmak için verilen ACEi'lerinin LPP3/miR-184 modülasyonu ilişkili olduğu görülmüştür. TGF- $\beta$ 'nın da miR-184 ekspresyonu için indükleyici bir güç olduğu gösterilmiştir (229). Başka bir çalışmada ise miRNA-184'ün HIF1AN'a bağlanarak böbrek fibrozisini teşvik ettiği gösterilmiştir (230). Bu çalışmada normoalbuminurik diyabetik kişilerde sağlıklı kontrollere göre miR-184 düzeyleri yüksek saptansa da bu istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak mikro ve makroalbuminurisi olan diyabetik gruplarda normoalbuminurik olanlara göre miR-184 ekspresyonu down regüleydi. Lojistik regresyon analizinde DN gelişimi üzerinde etkisi olmadığı gösterilse de ROC analizinde DN için tanısal bir faktör olarak düşünülebileceği saptandı.

Delic ve ark. Zucker diyabetik yağlı ratlarda T2DM gelişimi ve progresyonu süresince miRNA değişikliklerinin araştırıldığı bir çalışmada DM gelişmeden önce ve geliştikten 11 hafta sonra bazı miRNA'ların düzeylerini değerlendirmişler. DM sürecinde miR-122, miR-133, miR-210 ve miR-375 ekspresyonlarının arttığı, miR-185, miR-203, miR-140, miR-151-3p, miR-434-3p ve miR-450a ekspresyonlarının ise azaldığını tespit edilmişlerdir. MiR-185 ve miR-203 ekspresyonlarında ki azalma daha belirgin olduğunu saptamışlardır (231). Ho ve ark. in vitro ve in vivo olarak kronik hipoksinin Dicer ekspresyonunu ve aktivitesini bozduğunu, böylece miRNA biyogenezi üzerinde değişikliklere yol açtığını, Dicer'in downregülasyonun, HIF- $\alpha$  alt birimlerinin ekspresyonu ve fonksiyonunun anahtarı olduğunu göstermiştir. Daha spesifik olarak hipoksi durumunda miR-185'in Dicer bağımlı olarak downregülasyonu EPAS1/HIF-2 $\alpha$ 'nın düzenleyicisi olduğunu göstermişlerdir (232). Ayrıca miR-185, anormal mikrovasküler rejenerasyon ile bağlantılı hastalıklarda, anjiyogenik disfonksiyonun tedavisi için potansiyel terapötik hedeflerdendir. Hipoksik koşullar altında endotel hücrelerinde değiştirilmiş ekspresyonu gösterilen miR-185'in anjiyogenezdeki rolünü araştıran bir çalışmada

Hou ve ark. miR-185'in, stromal etkileşim molekülü 1 (STIM1)'in ekspresyonunun inhibisyonu yoluyla anjiyogenezin negatif bir regülatörü olarak işlev gördüğünü ve proliferasyon, göç ve tüp oluşumu gibi mikrovasküler endotelial hücrelerde birçok fenotipik anjiyogenez prosesini bozduğunu göstermişlerdir (233). Bu çalışmada gruplar arasında serum miR-185 ekspresyon düzeyleri açısından anlamlı bir fark saptanmadı.

Toll like reseptörler (TLR) doğal ve adaptif immün yanıt aktivasyonunda rol oynarlar (234). Diyabetik durumda artan TLR2 ve TLR4 ekspresyonu, NF- $\kappa$ B aktivitesinin upregülasyonu ve IL-6, TNF- $\alpha$ , monosit kemotaktik protein-1 (MCP-1) ve IL-1 gibi çeşitli biyomediyatörlerin artışıyla da ilişkilidir. Hem TLR2 hem de TLR4 ekspresyonu ve aktivitesi, diyabetik mikrovasküler hastalığı olan, özellikle nefropatili hastalarda daha da artmaktadır. TLR4 ekspresyonundaki artışın mezengial hücrelerin aşırı proliferasyonuna yol açıp DN oluşumuna sebep olabileceği vurgulanmıştır (235). TLR4'ün lusiferaz raportör deneyi ile doğrulanarak miR-203'ün hedef geni olduğunun gösterildiği bir çalışmada, miR-203 ekspresyonu, DN'li farelerin böbreklerinde önemli ölçüde azaldığı, aksine TLR4 ifadesi önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. İn-vitro deneylerin sonuçları, miR-203'ün TLR4'ün 3'UTR bölgesine bağlanabileceğini göstermiştir. miR-203'ün aşırı ekspresyonunun, TLR4 mRNA ve protein seviyelerini önemli ölçüde azalttığı aynı çalışmanın sonuçlarındandır (236). Öte yandan miR-203'ün plesentada VEGF ekspresyonunu inhibe ederek anjiyogenezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (237). Bugüne kadar DN'li kişilerde serum miR-203 ekspresyon düzeyleri değerlendirilmemiştir. Bu çalışmada nefropatisi olmayan diyabetik kişilerde serum miR-203 ekspresyon düzeyleri sağlıklı kontrollerle benzer düzeylerde saptandı. Nefropatisi olan gruplarda ise miR-203 ekspresyonunda upregülasyon saptandı. Lojistik regresyon analizinde miR-203 ekspresyon düzeyindeki upregülasyonun DN gelişimi açısından bağımsız risk faktörü olduğu saptandı. Ayrıca makroalbuminurisi olanlarda mikroalbuminurisi olanlara göre upregülasyon daha belirgin olması nedeniyle hastalığı ilerlemesinde de etkili olabileceği düşünüldü.

Solexa derin dizilim analizi kullanılarak fare organlarının miRNA ekspresyon profilini tarayan bir çalışmada miRNA-196a ve miR-196b'nin böbrekte selektif olarak eksprese edildiği gösterilmiştir. Tek taraflı üreteral obstrüksiyon kaynaklı fare renal

fibrozisi sırasında, böbrek miR-196a/b seviyeleri hızla azaldığı belirlenmiştir. Mekanistik çalışmalar, TGF $\beta$ R2'nin miR-196a ve miR-196b'nin ortak bir hedefi olarak tesbit edildiğini göstermiştir. Tek taraflı üreteral obstrüksiyon modelinde miR-196a/b, TGF $\beta$ -S-Smad sinyalini susturup, kollajen 1 ekspresyonunu da azaltmış, dolayısıyla böbrek fibrozisini ilerlemede inhibe edici bir rol oynamıştır (238). İdrardaki miR-196a seviyesinin fokal segmental glomerülosklerozlu hastalarda anlamlı şekilde arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (239). Bu çalışmalarla miR-196a ile fibrosis arasındaki bağlantılar kurulurken An ve ark. biyopsi ile kanıtlanmış DN tanılı 209 hasta ile yaptıkları kohort çalışmasında böbrek hasarının ilerlemede idrar miR-196a'nın rolünü incelemişlerdir. Hastalar ortalama 54 ay takip edilmiş ve üriner miR-196a düzeyleri ile proteinüri, DM süresi, SKB ile pozitif korelasyon, GFR ve hemoglobin düzeyi ile negatif korelasyon gösterdiğini belirlemişlerdir. Üriner miR-196a, yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi, ortalama arter basıncı ve HbA1c seviyesinden bağımsız olarak SDBY'ne ilerleme ve bazal eGFR'de % 40 azalma ile ilişkili bulunmuştur (240). Bu çalışmada normoalbuminürik diyabetik kişilerde miR-196a-3p ekspresyonu sağlıklı kontrollere göre downregüle olduğu, ancak mikroalbuminurisi olanlarda bunun upregüle olduğu, makroalbuminurisi olanlarda ise bu upregülasyonun daha da belirginleştiği gösterildi. Logistik regresyon analizinde DN gelişimi açısından bağımsız risk faktörü olduğu gösterildi.

Sonuç olarak; DN gelişiminde rolü bilinen risk faktörleri olan yaş, vücut kitle indeksi, diyabet süresi, HbA1c, ürik asit ve lipit düzeyleri ile DN fizyopatolojisinde rolü bilinen VEGF ve TGF- $\beta$  düzeylerinden bağımsız olarak serum miR-203, miR-196a-3p ve miR-98 ekspresyon düzeylerindeki değişiklik DN gelişimi açısından bağımsız risk faktörleridir. Ayrıca bu miRNA'lar DN açısından tanısal bir marker olarak kullanılabilir. Serum miR-203 ve 196a-3p'nin ekspresyonlarının düzeylerinde ki artış DN progresyonu açısından risk oluşturabilir. miR-203, miR-196a-3p ve miR-184 ekspresyonları arasında çok güçlü bir korelasyon olması DN gelişiminde birlikte rol alabileceğini de düşündürmektedir.

## ÖZET

### **Diyabetik Nefropatili Hastalarda miR-184, miR-98, miR-185, miR-196A-3p ve miR-203 Ekspresyon Düzeyleri ve Hastalık Şiddeti ile İlişkisinin Değerlendirilmesi**

**Amaç:** Çalışmamızın amacı diyabetik nefropati (DN)'si olan tip 2 diyabetes mellitus (T2DM) hastalarında miR-98, miR-184, miR-185, miR-203 ve miR-196a-3p ekspresyonlarında değişikliklerin olup olmadığını belirlemek ve bu mikroRNA'lar da olası değişimlerinin hastalık şiddeti ile ilişkisini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya kliniğimize başvuran 18-65 yaş arası 35 sağlıklı kişi, normoalbuminürlü 40 T2DM hastası, mikroalbuminürlü 40 T2DM hastası ve makroalbuminürlü olan 35 T2DM hastası alındı. Grupların metabolik laboratuvar parametreleri ölçüldü. Serum VEGF-A ve TGF- $\beta$ 'nin seviyeleri enzim-linked immunosorbent assay yöntemi ile kantitatif olarak ölçüldü. miRNA ekspresyon düzeyleri Real-time PCR tekniği ile hesaplandı.

**Bulgular:** Makroalbuminürlü ve mikroalbuminürlü grupları normoalbuminürlü ve kontrol gruplarına göre anlamlı olarak yüksek TGF- $\beta$  düzeylerine sahipti (herbiri için;  $p<0.001$ ).

Normoalbuminürlü ve makroalbuminürlü gruplarında kontrol grubuna göre miR-98 ekspresyonu anlamlı olarak downregüle saptandı ( $p=0.011$ ). Makroalbuminürlü ve mikroalbuminürlü olan DM gruplarında normoalbuminürlü olanlara göre miR-184 ekspresyonu anlamlı olarak downregüleydi (sırasıyla;  $p=0.003$  ve  $p=0.010$ ). MiR-185 ekspresyon düzeyleri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (herbiri için;  $p>0.05$ ). MiR-196a-3p ekspresyon düzeyleri normoalbuminürlü diyabetik grupta sağlıklı kontrol gruba göre down regüleydi. Makroalbuminürlü ve mikroalbuminürlü olan diyabetik gruplarda miR-196a-3p ekspresyon düzeyleri normoalbuminürlü diyabetik gruba göre upregüleydi (sırasıyla;  $p=0.001$  ve  $p=0.049$ ). Ayrıca makroalbuminürlü grubundaki miR-196a-3p upregülasyonu mikroalbuminürlü grubuna göre daha belirgindi ( $p=0.017$ ). MiR-203 ekspresyon düzeyleri makroalbuminürlü grubunda mikroalbuminürlü, normoalbuminürlü ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak upregüleydi (sırasıyla;  $p=0.001$ ,  $p=0.001$  ve  $p<0.001$ ). Mikroalbuminürlü grubundaki miR-203 ekspresyonu normoalbuminürlü grubuna göre de upregüle olduğu saptandı ( $p=0.001$ ).

Logistik regresyon analizinde; miRNA-98, miRNA-203 ve miRNA-196a-3p'nin VKİ, VEGF ve TGF- $\beta$  ekspresyonundaki değişiklikler ile birlikte DN gelişiminde riski artıran bağımsız risk faktörleri olduğu tespit edildi. ROC analizi ile yapılan değerlendirme sonucunda plazma miRNA-184, miRNA-196a-3p, miRNA-203, VEGF ve TGF- $\beta$ 'nin DN'yi öngörmede tanısal değeri olduğu görüldü (her biri için;  $p<0.05$ )

**Sonuçlar:** Serum miR-203, miR-196a-3p ve miR-184 ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler DN gelişimi açısından bağımsız risk faktörleridir. Ayrıca bu miRNA'lar DN açısından tanısal bir marker olarak kullanılabilir. Serum miR-203 ve 196a-3p'nin ekspresyonlarının düzeylerinde ki artış DN progresyonu açısından risk oluşturabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik Nefropati, VEGF, TGF- $\beta$ , MikroRNA

## ABSTRACT

### Evaluation OF MIR-184, miR-98, miR-185, miR-196A-3p and miR-203 Expression Levels and Relationship Between Disease Activity in Patients with Diabetic Nephropathy

**Aim:** The aim of our study was to determine whether there were changes in miR-98, miR-184, miR-185, miR-203 and miR-196a-3p expressions in type 2 diabetes mellitus (T2DM) patients with diabetic nephropathy (DN) and to evaluate the relationship between possible changes in these microRNAs and disease severity.

**Material and Method:** The study included 35 healthy controls, 40 T2DM patients with normoalbuminuria, 40 T2DM patients with microalbuminuria and 35 T2DM patients with macroalbuminuria. Metabolic laboratory parameters of the groups were measured. Levels of VEGF-A and TGF- $\beta$  were quantitated by enzyme-linked immunosorbent assay. miRNA expression levels were calculated by Real-time PCR technique.

**Results:** Macroalbuminuria and microalbuminuria groups had significantly higher TGF- $\beta$  levels than normoalbuminuria and control groups (for each;  $p < 0.001$ ).

In normoalbuminuria and macroalbuminuria groups, miR-98 expression was significantly downregulated compared to the control group ( $p = 0.011$ ). In DM groups with macroalbuminuria and microalbuminuria, miR-184 expression was significantly downregulated compared to normoalbuminuria ( $p = 0.003$  and  $p = 0.010$ , respectively).

There was no significant difference between the groups in terms of MiR-185 expression levels (for each;  $p > 0.05$ ). MiR-196a-3p expression levels were downregulated in normoalbuminuric diabetic group compared to healthy control group. In diabetic groups with macroalbuminuria and microalbuminuria, miR-196a-3p expression levels were upregulated compared to normoalbuminuric diabetic group ( $p = 0.001$  and  $p = 0.049$ , respectively). Furthermore, miR-196a-3p upregulation in the macroalbuminuria group was more prominent than the microalbuminuria group ( $p = 0.017$ ). MiR-203 expression levels were significantly upregulated in microalbuminuria group compared to macroalbuminuria, normoalbuminuria and control group ( $p = 0.001$ ,  $p = 0.001$  and  $p < 0.001$ , respectively). MiR-203 expression in microalbuminuria group was upregulated compared to normoalbuminuria group ( $p = 0.001$ ).

In logistic regression analysis; miRNA-98, miRNA-203 and miRNA-196a-3p were found to be independent risk factors that increased risk of DN development with changes in BMI, VEGF and TGF- $\beta$  expression. As a result of the evaluation made by ROC analysis; plasma miRNA-184, miRNA-196a-3p, miRNA-203, VEGF and TGF- $\beta$  were found to have diagnostic value in predicting DN ( $p < 0.05$  for each).

**Conclusion:** Changes in expression levels of serum miR-203, miR-196a-3p and miR-184 are independent risk factors for DN development. In addition, these miRNAs can be used as a diagnostic marker for DN. Increased levels of serum miR-203 and 196a-3p expression may pose a risk for DN progression.

**Key Words:** Diabetic Nephropathy, VEGF, TGF- $\beta$ , MicroRNA

## KAYNAKLAR

1. Association AD. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2018. *Diabetes Care*. 2018;41(Suppl 1):S13-s27.
2. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenenti P. Clinical practice. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2002;346(15):1145-51.
3. Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya KJH, Histopathology. Signaling pathways in diabetic nephropathy. 2016;31(10):1059-67.
4. Nakagawa T, Sato W, Kosugi T, Johnson RJJodr. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy. 2013;2013.
5. Tanabe K, Maeshima Y, Sato Y, Wada JJBri. Antiangiogenic therapy for diabetic nephropathy. 2017;2017.
6. Mou X, Zhou D-Y, Zhou D-Y, Ma J-R, Liu Y-H, Chen H-P, et al. Serum TGF- $\beta$ 1 as a biomarker for type 2 diabetic nephropathy: a meta-analysis of randomized controlled trials. *PloS one*. 2016;11(2):e0149513.
7. Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN. TGF- $\beta$ : the connecting link between nephropathy and fibrosis. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2016;38(1):39-49.
8. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol*. 2010;28(10):1057-68.
9. Lu Z, Liu N, Wang F. Epigenetic Regulations in Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res*. 2017;2017:7805058.
10. Vienberg S, Geiger J, Madsen S, Dalgaard LT. MicroRNAs in metabolism. *Acta Physiol (Oxf)*. 2017;219(2):346-61.
11. Sekar D, Venugopal B, Sekar P, Ramalingam K. Role of microRNA 21 in diabetes and associated/related diseases. *Gene*. 2016;582(1):14-8.
12. Carracher AM, Marathe PH, Close KLJJod. International Diabetes Federation 2017. 2018;10(5):353-6.
13. Control CfD, Prevention %J Atlanta GCfDC, Prevention. National diabetes statistics report, 2017. 2017.
14. Khardori RJMD, Endocrinology. Type 2 diabetes mellitus. 2013.
15. Satman İ, Alagöl F, Ömer B, Kalaca S, Tütüncü Y, Çolak N. türkiye diyabet, hipertansiyon, obezite ve endokrinolojik hastalıklar prevalans çalışması-II.(TURDEP II). 2011.
16. Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, et al. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes care*. 2002;25(9):1551-6.

17. Gillett MJ. International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *Clin Biochem Rev.* 2009;30(4):197-200.
18. Care ADAJD. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes-2019. 2019;42(Suppl 1):S13.
19. Aathira R, Jain V. Advances in management of type 1 diabetes mellitus. *World journal of diabetes.* 2014;5(5):689-96.
20. Pietropaolo M, Towns R, Eisenbarth GSJCSHpim. Humoral autoimmunity in type 1 diabetes: prediction, significance, and detection of distinct disease subtypes. 2012;2(10):a012831.
21. Pilia S, Casini M, Cambuli V, Ibba A, Civolani P, Zavattari P, et al. Prevalence of Type 1 diabetes autoantibodies (GAD and IA2) in Sardinian children and adolescents with autoimmune thyroiditis. 2011;28(8):896-9.
22. Merger S, Leslie R, Boehm BJDM. The broad clinical phenotype of type 1 diabetes at presentation. 2013;30(2):170-8.
23. Karjalainen J, Salmela P, Ilonen J, Surcel H-M, Knip MJNEJoM. A comparison of childhood and adult type I diabetes mellitus. 1989;320(14):881-6.
24. Yang W, Lu J, Weng J, Jia W, Ji L, Xiao J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. 2010;362(12):1090-101.
25. <http://www.worlddiabetesfoundation.org/composite-35.htm>. Accessed on June 19, 2012.
26. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs.* 2002;16(2):17-23.
27. Unger RH, Orci LJPotnaoS. Paracrinology of islets and the paracrinopathy of diabetes. 2010:201006639.
28. Mokdad AH, Ford ES, Bowman BA, Dietz WH, Vinicor F, Bales VS, et al. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. 2003;289(1):76-9.
29. Bogardus C, Lillioja S, Mott D, Hollenbeck C, Reaven GJAJoP-E, *Metabolism.* Relationship between degree of obesity and in vivo insulin action in man. 1985;248(3):E286-E91.
30. Banerji MA, Chaiken RL, Huey H, Tuomi T, Norin AJ, Mackay IR, et al. GAD antibody negative NIDDM in adult black subjects with diabetic ketoacidosis and increased frequency of human leukocyte antigen DR3 and DR4: Flatbush diabetes. 1994;43(6):741-5.
31. Umpierrez G, Casals MM, Gebhart SS, Mixon PS, Clark WS, Phillips LJD. Diabetic ketoacidosis in obese African-Americans. 1995;44(7):790-5.
32. Gavin III JR, Alberti K, Davidson MB, DeFronzo RAJDC. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. 2001;24:S5.
33. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2011;34 Suppl 1:S62-9.

34. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı TvİK.2018, 10. Baskı.
35. Umpierrez G, Korytkowski MJN. Diabetic emergencies—ketoacidosis, hyperglycaemic hyperosmolar state and hypoglycaemia. 2016;12(4):222.
36. Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Med Sci Monit.* 2006;12(7):Ra130-47.
37. Naslaski A, Sestier FJ. Diabetes mellitus related morbidity, risk of hospitalization and disability. 2003;35(2):102-13.
38. Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. 2013;17(1):20-33.
39. Haffner SM, Lehto S, Rönnemaa T, Pyörälä K, Laakso M. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. 1998;339(4):229-34.
40. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the Interstroke study): a case-control study. 2010;376(9735):112-23.
41. Lange S, Diehm C, Darius H, Haberl R, Allenberg J, Pittrow D, et al. High prevalence of peripheral arterial disease and low treatment rates in elderly primary care patients with diabetes. 2004;112(10):566-73.
42. Frank RN. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* 2004;350(1):48-58.
43. Hirai FE, Tielsch JM, Klein BE, Klein R. Ten-year change in vision-related quality of life in type 1 diabetes: Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. *Ophthalmology.* 2011;118(2):353-8.
44. Tong PC, Kong AP, So W-Y, Ng MH, Yang X, Ng MC, et al. Hematocrit, independent of chronic kidney disease, predicts adverse cardiovascular outcomes in Chinese patients with type 2 diabetes. 2006;29(11):2439-44.
45. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: clinical manifestations and current treatments. 2012;11(6):521-34.
46. Gordois A, Scuffham P, Shearer A, Oglesby A, Tobian JA. The health care costs of diabetic peripheral neuropathy in the US. 2003;26(6):1790-5.
47. Soedamah-Muthu SS, Chaturvedi N, Witte DR, Stevens LK, Porta M, Fuller JH. Relationship Between Risk Factors and Mortality in Type 1 Diabetic Patients in Europe. *Diabetes Care.* 2008;31(7):1360.
48. Uwaezuoke SN. The role of novel biomarkers in predicting diabetic nephropathy: a review. 2017;10:221-31.
49. Mogensen C, Christensen C, Vittinghus E. The stages in diabetic renal disease: with emphasis on the stage of incipient diabetic nephropathy. *Diabetes.* 1983;32(Supplement 2):64-78.
50. Deferrari G, Repetto M, Calvi C, Ciabattini M, Rossi C, Robaudo C. Diabetic nephropathy: from micro- to macroalbuminuria. *Nephrol Dial Transplant.* 1998;13 Suppl 8:11-5.

51. Tonelli M, Muntner P, Lloyd A, Manns BJ, Klarenbach S, Pannu N, et al. Risk of coronary events in people with chronic kidney disease compared with those with diabetes: a population-level cohort study. 2012;380(9844):807-14.
52. Lancet CKDPCJT. Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. 2010;375(9731):2073-81.
53. USRDS UJB, MD: National Institutes of Health, National Institute of Diabetes, Digestive, Diseases K. Annual data report: atlas of end-stage renal disease in the United States. 2003.
54. National Institutes of Health %J Bethesda M, National Institute of Diabetes, Digestive, Diseases K. US Renal Data System: USRDS 2000 Annual Data Report. 1999.
55. Kurokawa K, Nangaku M, Inagi R, Miyata TJN. Perspectives of chronic renal failure. 2002;7:S145-S50.
56. Remuzzi G, Schieppati A, Ruggenti PJNEJoM. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. 2002;346(15):1145-51.
57. Seyahi N, Altıparma MR, Süleymanlar GJS, Gültekin–Ateş, Kenan–Seyahi, Nurhan , Türkiye’de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon-Registry. Türkiye’de Renal Replasman Tedavilerinin Güncel Durumu: Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi 2013 Yılı Özet Raporu Current Status of Renal Replacement Therapy in Turkey: A Summary of Turkish Society of Nephrology 2013 Annual Registry Report. 2014.
58. Ohishi M. Hypertension with diabetes mellitus: physiology and pathology. Hypertens Res. 2018;41(6):389-93.
59. Arauz-Pacheco C, Parrott MA, Raskin P. The treatment of hypertension in adult patients with diabetes. Diabetes Care. 2002;25(1):134-47.
60. Diabetes ADAJC. Treatment of hypertension in adults with diabetes. 2003;21(3):122-7.
61. Retnakaran R, Cull CA, Thorne KI, Adler AI, Holman RR. Risk factors for renal dysfunction in type 2 diabetes: U.K. Prospective Diabetes Study 74. Diabetes. 2006;55(6):1832-9.
62. Nakano S, Fukuda M, Hotta F, Ito T, Ishii T, Kitazawa M, et al. Reversed circadian blood pressure rhythm is associated with occurrences of both fatal and nonfatal vascular events in NIDDM subjects. Diabetes. 1998;47(9):1501-6.
63. Mogensen CE. Microalbuminuria, blood pressure and diabetic renal disease: origin and development of ideas. Diabetologia. 1999;42(3):263-85.
64. Mulec H, Blohmé G, Grände B, Björck SJN, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis, Association TA-ER. The effect of metabolic control on rate of decline in renal function in insulin-dependent diabetes mellitus with overt diabetic nephropathy. 1998;13(3):651-5.

65. Stegmayr B, Joim A. A study of patients with diabetes mellitus (type 1) and end-stage renal failure: tobacco usage may increase risk of nephropathy and death. *1990;228(2):121-4.*
66. Phisitkul K, Hegazy K, Chuahirun T, Hudson C, Simoni J, Rajab H, et al. Continued smoking exacerbates but cessation ameliorates progression of early type 2 diabetic nephropathy. *Am J Med Sci. 2008;335(4):284-91.*
67. Gall M-A, Hougaard P, Borch-Johnsen K, Parving H-HJB. Risk factors for development of incipient and overt diabetic nephropathy in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus: prospective, observational study. *1997;314(7083):783.*
68. Ravid M, Neumann L, Lishner M. Plasma lipids and the progression of nephropathy in diabetes mellitus type II: effect of ACE inhibitors. *Kidney Int. 1995;47(3):907-10.*
69. Li Z, Treyzon L, Chen S, Yan E, Thames G, Carpenter CL. Protein-enriched meal replacements do not adversely affect liver, kidney or bone density: an outpatient randomized controlled trial. *Nutr J. 2010;9:72.*
70. Larsen RN, Mann NJ, Maclean E, Shaw J. The effect of high-protein, low-carbohydrate diets in the treatment of type 2 diabetes: a 12 month randomised controlled trial. *Diabetologia. 2011;54(4):731-40.*
71. Ko GJ, Obi Y, Tortorici AR, Kalantar-Zadeh K. Dietary protein intake and chronic kidney disease. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2017;20(1):77-85.*
72. Yoshida H, Kuriyama S, Atsumi Y, Tomonari H, Mitarai T, Hamaguchi A, et al. Angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *1996;50(2):657-64.*
73. Vander Jagt DL, Griffith JK, Eaton RP, Shah VO, Yacoub M, Dorin RI, et al. Z-2 Microsatellite Allele Is Linked to Increased Expression of the Aldose Reductase Gene in Diabetic Nephropathy<sup>1</sup>. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1998;83(8):2886-91.*
74. Feig DI, Kang D-H, Johnson RJJNEJoM. Uric acid and cardiovascular risk. *2008;359(17):1811-21.*
75. Johnson RJ, Kang D-H, Feig D, Kivlighn S, Kanellis J, Watanabe S, et al. Is there a pathogenetic role for uric acid in hypertension and cardiovascular and renal disease? *2003;41(6):1183-90.*
76. Pettitt DJ, Saad MF, Bennett PH, Nelson RG, Knowler WC. Familial predisposition to renal disease in two generations of Pima Indians with Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia. 1990;33(7):438-43.*
77. Marre MJDC-AV-. Genetics and the prediction of complications in type 1 diabetes. *1999;22:B53-B8.*
78. Kunz R, Bork J, Fritsche L, Ringel J, Sharma AJJotASoN. Association between the angiotensin-converting enzyme-insertion/deletion polymorphism and diabetic nephropathy: a methodologic appraisal and systematic review. *1998;9(9):1653-63.*

79. Najafian B, Alpers CE, Fogo AB. Pathology of human diabetic nephropathy. *Diabetes and the Kidney*. 170: Karger Publishers; 2011. p. 36-47.
80. Pourghasem M, Shafi H, Babazadeh ZJCjoim. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy. 2015;6(3):120.
81. Tervaert TWC, Mooyaart AL, Amann K, Cohen AH, Cook HT, Drachenberg CB, et al. Pathologic classification of diabetic nephropathy. 2010;21(4):556-63.
82. Gilbert RE, Cooper MEJKi. The tubulointerstitium in progressive diabetic kidney disease: more than an aftermath of glomerular injury? 1999;56(5):1627-37.
83. Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM. *Williams textbook of endocrinology*: Elsevier Health Sciences; 2015.
84. Shibuya M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes & cancer*. 2011;2(12):1097-105.
85. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 1989;246(4935):1306-9.
86. Guo D, Murdoch CE, Liu T, Qu J, Jiao S, Wang Y, et al. Therapeutic Angiogenesis of Chinese Herbal Medicines in Ischemic Heart Disease: A Review. *Frontiers in pharmacology*. 2018;9:428-.
87. Guo D, Jia Q, Song H-Y, Warren RS, Donner DB. Vascular endothelial cell growth factor promotes tyrosine phosphorylation of mediators of signal transduction that contain SH2 domains Association with endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(12):6729-33.
88. Takahashi T, Ueno H, Shibuya M. VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 1999;18(13):2221.
89. Gerber H-P, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, et al. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway requirement for Flk-1/KDR activation. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(46):30336-43.
90. Hanefeld M, Appelt D, Engelmann K, Sandner D, Bornstein S, Ganz X, et al. Serum and plasma levels of vascular endothelial growth factors in relation to quality of glucose control, biomarkers of inflammation, and diabetic nephropathy. *Hormone and Metabolic Research*. 2016;48(08):529-34.
91. Shao Y, Lv C, Yuan Q, Wang Q. Levels of serum 25 (OH) VD3, HIF-1 $\alpha$ , VEGF, vWf, and IGF-1 and their correlation in type 2 diabetes patients with different urine albumin creatinine ratio. *Journal of diabetes research*. 2016;2016.
92. Russo LM, del Re E, Brown D, Lin HY. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF- $\beta$  type II receptor. *Diabetes*. 2007;56(2):380-8.

93. Carranza K, Veron D, Cercado A, Bautista N, Pozo W, Tufro A, et al. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrología (English Edition)*. 2015;35(2):131-8.
94. Tufro A, Veron D, editors. *VEGF and podocytes in diabetic nephropathy. Seminars in nephrology*; 2012: Elsevier.
95. Diamond-Stanic MK, You YH, Sharma K, editors. *Sugar, sex, and TGF- $\beta$  in diabetic nephropathy. Seminars in nephrology*; 2012: Elsevier.
96. N Campbell K, Raij L, Mundel P. Role of angiotensin II in the development of nephropathy and podocytopathy of diabetes. *Current diabetes reviews*. 2011;7(1):3-7.
97. Chang AS, Hathaway CK, Smithies O, Kakoki M. Transforming growth factor- $\beta$ 1 and diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2015;310(8):F689-F96.
98. Tuttle KRJD. Back to the future: Glomerular hyperfiltration and the diabetic kidney. 2017;66(1):14-6.
99. Brown WVJTAjoc. Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. 2008;102(12):10L-3L.
100. Sano T, Umeda F, Hashimoto T, Nawata H, Utsumi HJD. Oxidative stress measurement by in vivo electron spin resonance spectroscopy in rats with streptozotocin-induced diabetes. 1998;41(11):1355-60.
101. Ha H, Lee HBJCdr. Oxidative stress in diabetic nephropathy: basic and clinical information. 2001;1(3):282-7.
102. Kanwar YS, Wada J, Sun L, Xie P, Wallner EI, Chen S, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression. 2008;233(1):4-11.
103. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, Etoh T, Kakimoto M, Sonoda N, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(8 Suppl 3):S227-32.
104. Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(12):785-96.
105. Potenza MA, Gagliardi S, Nacci C, Carratu MR, Montagnani MJCmc. Endothelial dysfunction in diabetes: from mechanisms to therapeutic targets. 2009;16(1):94-112.
106. De Zeeuw D, Coll B, Andress D, Brennan JJ, Tang H, Houser M, et al. The endothelin antagonist atrasentan lowers residual albuminuria in patients with type 2 diabetic nephropathy. 2014;25(5):1083-93.
107. Tessari PJJon. Nitric oxide in the normal kidney and in patients with diabetic nephropathy. 2015;28(3):257-68.
108. Bernhardt WM, Schmitt R, Rosenberger C, Munchenhagen PM, Grone HJ, Frei U, et al. Expression of hypoxia-inducible transcription factors in developing human and rat kidneys. *Kidney Int*. 2006;69(1):114-22.

109. Nordquist L, Friederich-Persson M, Fasching A, Liss P, Shoji K, Nangaku M, et al. Activation of hypoxia-inducible factors prevents diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(2):328-38.
110. Galler A, Muller G, Schinzel R, Kratzsch J, Kiess W, Munch G. Impact of metabolic control and serum lipids on the concentration of advanced glycation end products in the serum of children and adolescents with type 1 diabetes, as determined by fluorescence spectroscopy and nepsilon-(carboxymethyl)lysine ELISA. *Diabetes Care.* 2003;26(9):2609-15.
111. Forbes JM, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes.* 2008;57(6):1446-54.
112. Brownlee M. Lilly Lecture 1993. Glycation and diabetic complications. *Diabetes.* 1994;43(6):836-41.
113. Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy. *Curr Diabetes Rev.* 2008;4(1):39-45.
114. Srivastava SP, Shi S, Koya D, Kanasaki K. Lipid mediators in diabetic nephropathy. *Fibrogenesis & tissue repair.* 2014;7:12-.
115. Wada J, Makino H. Innate immunity in diabetes and diabetic nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12(1):13-26.
116. Brosius FC, Tuttle KR, Kretzler M. JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease. *Diabetologia.* 2016;59(8):1624-7.
117. Remuzzi G, Perico N, Macia M, Ruggenenti P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney International.* 2005;68:S57-S65.
118. Gurley SB, Coffman TM. The Renin-Angiotensin System and Diabetic Nephropathy. *Seminars in Nephrology.* 2007;27(2):144-52.
119. Giacchetti G, Sechi LA, Rilli S, Carey RM. The renin-angiotensin-aldosterone system, glucose metabolism and diabetes. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 2005;16(3):120-6.
120. He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2013;17(4):488-97.
121. Ritz E, Tomaschitz A. Aldosterone, a vasculotoxic agent--novel functions for an old hormone. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24(8):2302-5.
122. Liu N, Xu L, Shi Y, Zhuang S. Podocyte Autophagy: A Potential Therapeutic Target to Prevent the Progression of Diabetic Nephropathy. *J Diabetes Res.* 2017;2017:3560238.
123. Kim WY, Nam SA, Song HC, Ko JS, Park SH, Kim HL, et al. The role of autophagy in unilateral ureteral obstruction rat model. *Nephrology (Carlton).* 2012;17(2):148-59.
124. Zhu J, Wang KZ, Chu CT. After the banquet: mitochondrial biogenesis, mitophagy, and cell survival. *Autophagy.* 2013;9(11):1663-76.

125. Lin Y-C, Chang Y-H, Yang S-Y, Wu K-D, Chu T-SJJotFMA. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney disease. 2018;117(8):662-75.
126. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*. 2010;107(9):1058-70.
127. Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengeller Z, Szabo C, et al. Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. *J Clin Invest*. 2003;112(7):1049-57.
128. Bell CG, Teschendorff AE, Rakyan VK, Maxwell AP, Beck S, Savage DA. Genome-wide DNA methylation analysis for diabetic nephropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genomics*. 2010;3:33.
129. Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia*. 2015;58(3):443-55.
130. Thomas MCJCDr. Epigenetic mechanisms in diabetic kidney disease. 2016;16(3):31.
131. Pirola L, Balcerzyk A, Tothill RW, Haviv I, Kaspi A, Lunke S, et al. Genome-wide analysis distinguishes hyperglycemia regulated epigenetic signatures of primary vascular cells. *Genome research*. 2011;21(10):1601-15.
132. Bechtel W, McGoohan S, Zeisberg EM, Muller GA, Kalbacher H, Salant DJ, et al. Methylation determines fibroblast activation and fibrogenesis in the kidney. *Nat Med*. 2010;16(5):544-50.
133. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007;128(4):693-705.
134. Sun G, Reddy MA, Yuan H, Lanting L, Kato M, Natarajan R. Epigenetic histone methylation modulates fibrotic gene expression. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2010;21(12):2069-80.
135. Kato M, Dang V, Wang M, Park JT, Deshpande S, Kadam S, et al. TGF- $\beta$  induces acetylation of chromatin and of Ets-1 to alleviate repression of miR-192 in diabetic nephropathy. *Sci Signal*. 2013;6(278):ra43-ra.
136. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros VJc. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. 1993;75(5):843-54.
137. Chen L, Magliano DJ, Zimmet PZJNre. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. 2012;8(4):228.
138. Kato M, Castro NE, Natarajan RJFRB, Medicine. MicroRNAs: potential mediators and biomarkers of diabetic complications. 2013;64:85-94.
139. Kim VNJNrMcb. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. 2005;6(5):376.
140. Shomron N, Levy CJBRI. MicroRNA-biogenesis and Pre-mRNA splicing crosstalk. 2009;2009.

141. Bartel DPJc. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. 2004;116(2):281-97.
142. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. 2005;433(7027):769.
143. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DPJGr. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. 2009;19(1):92-105.
144. Ambros VJN. The functions of animal microRNAs. 2004;431(7006):350.
145. Ambros V, Lee RC. Identification of microRNAs and other tiny noncoding RNAs by cDNA cloning. *RNA Interference, Editing, and Modification*: Springer; 2004. p. 131-58.
146. Eliasson L, Esguerra JJAp. Role of non-coding RNA s in pancreatic beta-cell development and physiology. 2014;211(2):273-84.
147. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. 2004;432(7014):226.
148. Li X. MiR-375, a microRNA related to diabetes. *Gene*. 2014;533(1):1-4.
149. El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, Van Obberghen EJD. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic  $\beta$ -cells. 2008;57(10):2708-17.
150. Sebastiani G, Po A, Miele E, Ventriglia G, Ceccarelli E, Bugliani M, et al. MicroRNA-124a is hyperexpressed in type 2 diabetic human pancreatic islets and negatively regulates insulin secretion. 2015;52(3):523-30.
151. Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(37):26932-42.
152. Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biological chemistry*. 2008;389(3):305-12.
153. Roggli E, Gattesco S, Caille D, Briet C, Boitard C, Meda P, et al. Changes in microRNA expression contribute to pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction in prediabetic NOD mice. 2012;61(7):1742-51.
154. He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular endocrinology*. 2007;21(11):2785-94.
155. Thomas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, et al. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15018.
156. Kato M, Natarajan R. MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic targets. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1353:72-88.

157. Shi S, Yu L, Chiu C, Sun Y, Chen J, Khitrov G, et al. Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(11):2159-69.
158. Ho J, Ng KH, Rosen S, Dostal A, Gregory RI, Kreidberg JA. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2008;19(11):2069-75.
159. Wu H, Kong L, Zhou S, Cui W, Xu F, Luo M, et al. The role of microRNAs in diabetic nephropathy. 2014;2014.
160. Long J, Wang Y, Wang W, Chang BH, Danesh FR. MicroRNA-29c is a signature microRNA under high glucose conditions that targets Sprouty homolog 1, and its in vivo knockdown prevents progression of diabetic nephropathy. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(13):11837-48.
161. Sun Y, Koo S, White N, Peralta E, Esau C, Dean NM, et al. Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic acids research*. 2004;32(22):e188-e.
162. Kato M, Zhang J, Wang M, Lanting L, Yuan H, Rossi JJ, et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- $\beta$ -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. 2007;104(9):3432-7.
163. Putta S, Lanting L, Sun G, Lawson G, Kato M, Natarajan RJJotASoN. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. 2012;23(3):458-69.
164. Jia Y, Guan M, Zheng Z, Zhang Q, Tang C, Xu W, et al. miRNAs in urine extracellular vesicles as predictors of early-stage diabetic nephropathy. 2016;2016.
165. Kato M, Arce L, Wang M, Putta S, Lanting L, Natarajan RJKi. A microRNA circuit mediates transforming growth factor- $\beta$ 1 autoregulation in renal glomerular mesangial cells. 2011;80(4):358-68.
166. Zhong X, Chung ACK, Chen H-Y, Dong Y, Meng X, Li R, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. 2013;56(3):663-74.
167. He F, Peng F, Xia X, Zhao C, Luo Q, Guan W, et al. MiR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1. *Diabetologia*. 2014;57(8):1726-36.
168. Lin C-L, Lee P-H, Hsu Y-C, Lei C-C, Ko J-Y, Chuang P-C, et al. MicroRNA-29a promotion of nephrin acetylation ameliorates hyperglycemia-induced podocyte dysfunction. 2014;25(8):1698-709.
169. Sharma S, Mathew AB, Chugh J. miRNAs: Nanomachines That Micromanage the Pathophysiology of Diabetes Mellitus. *Advances in clinical chemistry*. 82: Elsevier; 2017. p. 199-264.
170. Atalay S, Singer R, Kayadibi H, Yekrek MM, Kurcenli S. Analytical performances of sentinel and vitros direct LDL-C assay methods, and classification of patients with Hyperlipidemia. *ed Sci*. 2011:47.

171. Varkonyi-Gasic E, Hellens RP. Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2011;744:145-57.
172. Gnudi L, Coward RJ, Long DA. Diabetic nephropathy: perspective on novel molecular mechanisms. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2016;27(11):820-30.
173. Tziomalos K, Athyros VG, Trods R. Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis. 2015;12(1-2):110.
174. An JH, Cho YM, Yu HG, Jang HC, Park KS, Kim SY, et al. The clinical characteristics of normoalbuminuric renal insufficiency in Korean type 2 diabetic patients: a possible early stage renal complication. *Journal of Korean medical science*. 2009;24(Suppl 1):S75-S81.
175. Tapp RJ, Shaw JE, Zimmet PZ, Balkau B, Chadban SJ, Tonkin AM, et al. Albuminuria is evident in the early stages of diabetes onset: results from the Australian Diabetes, Obesity, and Lifestyle Study (AusDiab). *American journal of kidney diseases*. 2004;44(5):792-8.
176. Thakur SK, Dhakal SP, Parajuli S, Sah AK, Nepal SP, Paudel BD. Microalbuminuria and Its Risk Factors in Type 2 Diabetic Patients. *J Nepal Health Res Counc*. 2019;17(1):61-5.
177. Idowu AA, Ajose AO, Adedeji AT, Adegoke AO, Jimoh KA. Microalbuminuria, Other Markers of Nephropathy and Biochemical Derangements in Type 2 Diabetes Mellitus: Relationships and Determinants. *Ghana medical journal*. 2017;51(2):56-63.
178. Inassi J, Vijayalakshmy R. Role of duration of diabetes in the development of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Nat J Med Res*. 2013;3(1):5-8.
179. Perkovic V, Heerspink HL, Chalmers J, Woodward M, Jun M, Li Q, et al. Intensive glucose control improves kidney outcomes in patients with type 2 diabetes. *Kidney international*. 2013;83(3):517-23.
180. Sun W, Cleary P, Lachin J, Molitch M, Steffes M, Zinman B. Intensive diabetes therapy and glomerular filtration rate in type 1 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2011;365(25):2366-76.
181. Coca SG, Ismail-Beigi F, Haq N, Krumholz HM, Parikh CR. Role of intensive glucose control in development of renal end points in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine*. 2012;172(10):761-9.
182. Jalal DI, Rivard CJ, Johnson RJ, Maahs DM, McFann K, Rewers M, et al. Serum uric acid levels predict the development of albuminuria over 6 years in patients with type 1 diabetes: findings from the Coronary Artery Calcification in Type 1 Diabetes study. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(6):1865-9.
183. Hovind P, Rossing P, Tarnow L, Johnson RJ, Parving H-H. Serum uric acid as a predictor for development of diabetic nephropathy in type 1 diabetes: an inception cohort study. *Diabetes*. 2009;58(7):1668-71.

184. Ficociello LH, Rosolowsky ET, Niewczas MA, Maselli NJ, Weinberg JM, Aschengrau A, et al. High-normal serum uric acid increases risk of early progressive renal function loss in type 1 diabetes: results of a 6-year follow-up. *Diabetes care*. 2010;33(6):1337-43.
185. Zoppini G, Targher G, Chonchol M, Ortalda V, Abaterusso C, Pichiri I, et al. Serum uric acid levels and incident chronic kidney disease in patients with type 2 diabetes and preserved kidney function. *Diabetes care*. 2012;35(1):99-104.
186. Chang YH, Lei CC, Lin KC, Chang DM, Hsieh CH, Lee YJ. Serum uric acid level as an indicator for CKD regression and progression in patients with type 2 diabetes mellitus—a 4.6-year cohort study. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2016;32(6):557-64.
187. Morton J, Zoungas S, Li Q, Patel AA, Chalmers J, Woodward M, et al. Low HDL cholesterol and the risk of diabetic nephropathy and retinopathy: results of the ADVANCE study. *Diabetes care*. 2012;35(11):2201-6.
188. Chen Y, Zhi Y, Li C, Liu Y, Zhang L, Wang Y, et al. HDL cholesterol and risk of diabetic nephropathy in patient with type 1 diabetes: A meta-analysis of cohort studies. *Diabetes research and clinical practice*. 2016;122:84-91.
189. Siddiqui K, George TP, Nawaz SS, Yaslam M, Almogbel E, Al-Rubeaan K. Significance of glycated LDL in different stages of diabetic nephropathy. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 2019;13(1):548-52.
190. Sowers JR, Epstein M, Frohlich ED. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. *Hypertension*. 2001;37(4):1053-9.
191. Govindarajan G, R Sowers J, Stump C. Hypertension and Diabetes Mellitus 2006. 1 p.
192. Bakris GL, Williams M, Dworkin L, Elliott WJ, Epstein M, Toto R, et al. Preserving renal function in adults with hypertension and diabetes: a consensus approach. *American journal of kidney diseases*. 2000;36(3):646-61.
193. Sowers JR, Haffner S. Treatment of cardiovascular and renal risk factors in the diabetic hypertensive. *Hypertension*. 2002;40(6):781-8.
194. Emdin CA, Rahimi K, Neal B, Callender T, Perkovic V, Patel A. Blood pressure lowering in type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Jama*. 2015;313(6):603-15.
195. Viswanathan V, Tilak P, Kumpatla S. Risk factors associated with the development of overt nephropathy in type 2 diabetes patients: A 12 years observational study. *The Indian journal of medical research*. 2012;136(1):46.
196. Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D, Vriese AS. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology. *Kidney international*. 2004;65(6):2003-17.
197. Cooper ME, Vranes D, Youssef S, Stacker SA, Cox AJ, Rizkalla B, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes. *Diabetes*. 1999;48(11):2229-39.

198. Tsuchida K, Makita Z, Yamagishi S, Atsumi T, Miyoshi H, Obara S, et al. Suppression of transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy in rats by a novel advanced glycation end product inhibitor, OPB-9195. *Diabetologia*. 1999;42(5):579-88.
199. Cha DR, Kang YS, Han SY, Jee YH, Han KH, Han JY, et al. Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats. *Journal of Endocrinology*. 2004;183(1):183-94.
200. Chiarelli F, Spagnoli A, Basciani F, Tumini S, Mezzetti A, Cipollone F, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in children, adolescents and young adults with type 1 diabetes mellitus: relation to glycaemic control and microvascular complications. *Diabetic Medicine*. 2000;17(9):650-6.
201. Knöbl P, Schernthaner G, Schnack C, Pietschmann P, Griesmacher A, Prager R, et al. Thrombogenic factors are related to urinary albumin excretion rate in type 1 (insulin-dependent) and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients. *Diabetologia*. 1993;36(10):1045-50.
202. Santilli F, Spagnoli A, Mohn A, Tumini S, Verrotti A, Cipollone F, et al. Increased vascular endothelial growth factor serum concentrations may help to identify patients with onset of type 1 diabetes during childhood at risk for developing persistent microalbuminuria. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2001;86(8):3871-6.
203. Hovind P, Tarnow L, Oestergaard PB, Parving H-H. Elevated vascular endothelial growth factor in type 1 diabetic patients with diabetic nephropathy. *Kidney International*. 2000;57:S56-S61.
204. Flyvbjerg A, Dagnæs-Hansen F, De Vriese AS, Schrijvers BF, Tilton RG, Rasch R. Amelioration of long-term renal changes in obese type 2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody. *Diabetes*. 2002;51(10):3090-4.
205. De Vriese AS, TILTON RG, ELGER M, STEPHAN CC, KRIZ W, LAMEIRE NH. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2001;12(5):993-1000.
206. Sung SH, Ziyadeh FN, Wang A, Pyagay PE, Kanwar YS, Chen S. Blockade of vascular endothelial growth factor signaling ameliorates diabetic albuminuria in mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2006;17(11):3093-104.
207. Lindenmeyer MT, Kretzler M, Boucherot A, Berra S, Yasuda Y, Henger A, et al. Interstitial vascular rarefaction and reduced VEGF-A expression in human diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(6):1765-76.
208. Fu J, Lee K, Chuang PY, Liu Z, He JC. Glomerular endothelial cell injury and cross talk in diabetic kidney disease. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2014;308(4):F287-F97.

209. Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF- $\beta$ -induced epithelial–mesenchymal transition. *Current opinion in cell biology*. 2014;31:56-66.
210. Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu F-y, Chen S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2011;6:395-423.
211. Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- $\beta$  as the major mediator. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2004;15(1 suppl):S55-S7.
212. Kopp JB, Factor VM, Mozes M, Nagy P, Sanderson N, Böttinger EP, et al. Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1996;74(6):991-1003.
213. Schiffer M, Bitzer M, Roberts IS, Kopp JB, ten Dijke P, Mundel P, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and Smad7. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(6):807-16.
214. Schnaper HW, Jandeska S, Runyan CE, Hubchak SC, Basu RK, Curley JF, et al. TGF-beta signal transduction in chronic kidney disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 2009;14:2448.
215. Ziyadeh FN, Sharma K, Ericksen M, Wolf G. Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta. *The Journal of clinical investigation*. 1994;93(2):536-42.
216. HAN DC, ISONO M, HOFFMAN BB, ZIYADEH FN. High glucose stimulates proliferation and collagen type I synthesis in renal cortical fibroblasts: mediation by autocrine activation of TGF- $\beta$ . *Journal of the American Society of Nephrology*. 1999;10(9):1891-9.
217. Hoffman BB, Sharma K, Zhu Y, Ziyadeh FN. Transcriptional activation of transforming growth factor- $\beta$ 1 in mesangial cell culture by high glucose concentration. *Kidney international*. 1998;54(4):1107-16.
218. Rocco MV, Chen Y, Goldfarb S, Ziyadeh FN. Elevated glucose stimulates TGF- $\beta$  gene expression and bioactivity in proximal tubule. *Kidney international*. 1992;41(1):107-14.
219. Isono M, Mogyorósi A, Han DC, Hoffman BB, Ziyadeh FN. Stimulation of TGF- $\beta$  type II receptor by high glucose in mouse mesangial cells and in diabetic kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2000;278(5):F830-F8.
220. Benigni A, Zoja C, Corna D, Zatelli C, Conti S, Campana M, et al. Add-on anti-TGF- $\beta$  antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2003;14(7):1816-24.
221. Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF- $\beta$  by anti-TGF- $\beta$  antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes*. 1996;45(4):522-30.

222. Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, et al. Natural inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature*. 1992;360(6402):361.
223. Voelker J, Berg PH, Sheetz M, Duffin K, Shen T, Moser B, et al. Anti-TGF- $\beta$ 1 antibody therapy in patients with diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(3):953-62.
224. Szeto CC. Urine miRNA in nephrotic syndrome. *Clin Chim Acta*. 2014;436:308-13.
225. Xie S, Xie N, Li Y, Wang P, Zhang C, Li Q, et al. Upregulation of TRB2 induced by miR-98 in the early lesions of large artery of type-2 diabetic rat. *Molecular and cellular biochemistry*. 2012;361(1-2):305-14.
226. Li XX, Liu YM, Li YJ, Xie N, Yan YF, Chi YL, et al. High glucose concentration induces endothelial cell proliferation by regulating cyclin-D2-related miR-98. *J Cell Mol Med*. 2016;20(6):1159-69.
227. Cao J-L, Zhang L, Li J, Tian S, Lv X-D, Wang X-Q, et al. Up-regulation of miR-98 and unraveling regulatory mechanisms in gestational diabetes mellitus. *Scientific reports*. 2016;6:32268.
228. Cheng R, Dang R, Zhou Y, Ding M, Hua H. MicroRNA-98 inhibits TGF- $\beta$ 1-induced differentiation and collagen production of cardiac fibroblasts by targeting TGFBR1. *Human cell*. 2017;30(3):192-200.
229. Zanchi C, Macconi D, Trionfini P, Tomasoni S, Rottoli D, Locatelli M, et al. MicroRNA-184 is a downstream effector of albuminuria driving renal fibrosis in rats with diabetic nephropathy. *Diabetologia*. 2017;60(6):1114-25.
230. Chen B. The miRNA-184 drives renal fibrosis by targeting HIF1AN in vitro and in vivo. *International urology and nephrology*. 2019;51(3):543-50.
231. Delic D, Eisele C, Schmid R, Luippold G, Mayoux E, Grempler R. Characterization of micro-RNA changes during the progression of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(5):665.
232. Ho JD, Metcalf JL, Yan MS, Turgeon PJ, Wang JJ, Chalsev M, et al. Functional importance of Dicer protein in the adaptive cellular response to hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(34):29003-20.
233. Hou J, Liu L, Zhu Q, Wu Y, Tian B, Cui L, et al. MicroRNA-185 inhibits angiogenesis in human microvascular endothelial cells through targeting stromal interaction molecule 1. *Cell biology international*. 2016;40(3):318-28.
234. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature immunology*. 2010;11(5):373.
235. Devaraj S, Jialal I, Yun J-M, Bremer A. Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications. *Metabolism*. 2011;60(2):256-9.

236. Liu Z, Zheng H, Chen L, Li Y, Wang Q, Liao C, et al. Low expression of miR-203 promoted diabetic nephropathy via increasing TLR4. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2018;22(17):5627-34.
237. Liu F, Wu W, Wu K, Chen Y, Wu H, Wang H, et al. MiR-203 Participates in Human Placental Angiogenesis by Inhibiting VEGFA and VEGFR2 Expression. *Reproductive Sciences*. 2018;25(3):358-65.
238. Meng J, Li L, Zhao Y, Zhou Z, Zhang M, Li D, et al. MicroRNA-196a/b mitigate renal fibrosis by targeting TGF- $\beta$  receptor 2. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2016;27(10):3006-21.
239. Zhang C, Liang S, Cheng S, Li W, Wang X, Zheng C, et al. Urinary miR-196a predicts disease progression in patients with chronic kidney disease. *Journal of translational medicine*. 2018;16(1):91.
240. An Y, Zhang C, Xu F, Li W, Zeng C, Xie L, et al. Increased urinary miR-196a level predicts the progression of renal injury in patients with diabetic nephropathy. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2018.