



**DIYABETİK PERİFERAL NÖROPATİ
HASTALARINDA BAZI ANTİOKSİDAN ENZİM
POLİMORFİZMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

MESUT KOYUNCU

Doktora Tezi

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ

Doç. Dr. Ahmet İNANIR

2015

Her hakkı saklıdır

**T.C.
GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

DOKTORA TEZİ

**DİYABETİK PERİFERAL NÖROPATİ HASTALARINDA
BAZI ANTIOKSİDAN ENZİM POLİMORFİZMLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

MESUT KOYUNCU

**TOKAT
2015**

Her hakkı saklıdır

Bu tez çalışması;

**Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013/40 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ ve Doç. Dr. Ahmet İNANIR danışmanlığında, Mesut KOYUNCU tarafından hazırlanan bu çalışma 06.03.2015 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Necmettin YILMAZ

İmza: 

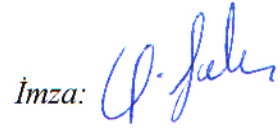
Üye : Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ

İmza: 

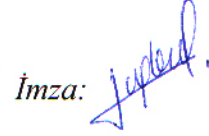
Üye : Yrd. Doç. Dr. Ali AKBAŞ

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Osman ŞALIŞ

İmza: 

Üye : Yrd. Doç. Dr. Tuğba GÜRKÖK

İmza: 

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet Ali SAKİN

Enstitü Müdürü

23/12/2015

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Mesut KOYUNCU

ÖZET

Doktora Tezi

DİYABETİK PERİFERAL NÖROPATİ HASTALARINDA BAZI ANTİOKSİDAN ENZİM POLİMORFİZMLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Mesut KOYUNCU

Gaziosmanpaşa Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışmanlar: Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ
Doç. Dr. Ahmet İNANIR

Diyabetik nöropati, yüksek hastalık ve ölüm oranı ile seyreden ve diyabetik hastaların yaşam kalitesini düşüren önemli bir komplikasyondur. Görülme sıklığı, yapılan nöropati çalışmalarının toplum veya hastane kaynaklı olması ve tespit için kullanılan yöntemlerdeki farklılığa dayalı olarak %10 ila 90 arasında değişmektedir. Bu araştırmada; SOD2 (veya Mn-SOD) ve GPx-1 enzimlerini kodlayan genler üzerinde gözlenen ve enzim aktivitelerinde değişikliğe neden olan SOD2 Ala-9Val (veya Ala(-9)Val veya Ala9Val) ve GPx-1 Pro198Leu, polimorfizmlerinin Diyabetik Nöropati hastalığındaki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın hasta ve kontrol gruplarının her birinde 100 birey bulunmaktadır. Çalışmada tam kandan DNA izolasyonu yapılmıştır. Genotipleme Real-Time PCR yöntemi ile hibridizasyon problemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonunda erime eğrisi analizi yapılarak SOD2 Ala(-9)Val ve GPX1 Pro198Leu polimorfizmleri tespit edilmiştir. Mn-SOD genindeki Ala-9Val ve GPX1 genindeki Pro198Leu genotipleri hasta ve kontrollerden elde edilen verilere bakıldığında Diyabetik Nöropati ile genel olarak ilişkilidir. SOD2 Ala9Val polimorfizmlerinin allel ve genotip frekans dağılımları hasta grubunda, Ala9Ala için %12.1, Ala9Val için %52.5 ve Val9Val için %35.4 olarak tespit edilmiştir. GPX1 genindeki Pro198Leu hasta grubunda ise bu oranlar; %49 Pro/Pro, %43 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak bulunmuştur. Hasta gruplarında retinopati olanlarda Mn-SOD genindeki Ala(-9)Val değişimi %9.7 Ala/Ala, %64.5 Ala/Val, %25.8 Val/Val olarak tespit edilirken, GPX1 genindeki Pro198Leu genotipleri ise %56.3 Pro/Pro, %34.4 Pro/Leu, %9.4 Leu/Leu olarak belirlenmiştir. En önemli verilerden biri olan hasta gruplarında sigara içenlerde, Mn-SOD genindeki Ala(-9)Val değişimi %15.8 Ala/Ala, %73.7 Ala/Val, %10.5 Val/Val, GPX1 genindeki Pro198Leu genotipleri ise %47.4 Pro/Pro, %42.1 Pro/Leu, %10.5 Leu/Leu olarak tespit edilmiştir.

2015, 97 sayfa

Anahtar Kelimeler: Diyabetik periferik nöropati, Polimorfizm, SOD2, GPx1

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

EVALUATION OF SOME ANTIOXIDANT ENZYME POLYMORPHISMS IN DIABETIC PERIPHERAL NEUROPATHY PATIENTS

Mesut KOYUNCU

Gaziosmanpaşa University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisors: Assoc. Prof. Dr. İskender PARMAKSIZ
Assoc. Prof. Dr. Ahmet İNANIR

Diabetic neuropathy is an important complication with high morbidity and mortality rate and reduces the quality of life of diabetic patients. Its incidence varies between 10-90%, depending on the identification methods used and whether the studies conducted were community or hospital based. The aim of this study was to investigate the role of SOD2 Ala-9Val (or Ala(-9)Val, or Ala9Val) and GPx-1 Pro198Leu polymorphisms in diabetic neuropathy. These are polymorphisms that are found on genes coding for SOD2 (or Mn-SOD) and GPx-1 enzymes, respectively, and cause changes in enzyme activities. The patient and the control groups each were comprised of 100 individuals. DNA isolation was carried out from whole blood samples. Genotyping was realized by Real-Time PCR and hybridization probes. At the end of the study, melting curve analysis was carried out and SOD2 Ala-9Val and GPX1 Pro198Leu polymorphisms were identified. When the data obtained from both the patients and the control group were analysed, it was seen that Ala-9Val and Pro198Leu genotypes are associated with diabetic neuropathy in general. Allele and genotype frequency distributions in SOD2 Ala9Val polymorphisms in the patient group were determined as 12.1% for Ala9Ala, 52,5% for Ala9Val and 35.4% for Val9Val. The ratios for Pro198Leu in the patient group were determined as 49% for Pro/Pro, 43% for Pro/Leu and 8% Leu/Leu. Ala(-9)Val change on Mn-SOD gene in individuals with retinopathy in the patient group were observed as 9.7% for Ala/Ala, 64.5% for Ala/Val and 25.8% for Val/Val, while Pro198Leu genotypes on GPX1 gene were as 56.3% for Pro/Pro, 34.4% for Pro/Leu and 9.4% for Leu/Leu. One of the most important data in the study was the one obtained from smokers in the patient group. Ala(-9)Val change on Mn-SOD gene in smokers were as 15.8% for Ala/Ala, 73.7% for Ala/Val and 10.5% for Val/Val, while Pro198Leu change on GPX1 gene were as 47.4% for Pro/Pro, 42.1% for Pro/Leu and 10.5% for Leu/Leu.

2015, 97 pages

Keywords: Diabetic peripheral neuropathy, Polymorphism, SOD2, GPx1

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında akademik ve manevi anlamda beni her zaman destekleyen, saygı değer danışman hocalarım Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ'a ile Doç. Dr. Ahmet İNANIR'a, tez izleme komitesinde yer alan Prof. Dr. Necmettin YILMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Ali AKTAŞ'a, çalıőmamda büyük emeği olan Öğr. Gör. Dr. İsmail BENLİ ve Öğr. Gör. Dilek SABANCI'ya, manevi destekleri ve teőviklerinden dolayı Prof. Dr. Zekeriya ALTUNER, Doç. Dr. İbrahim TÜRKEKUL ve tüm Biyoloji Bölümü öğretim yesi ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Mesut KOYUNCU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Diabetes Mellitus	2
2.1.1 Tanım.....	2
2.1.2 Epidemiyoloji	2
2.1.3 Tanı.....	3
DM'un tanı kriterleri	3
DM'un sınıflandırılması	5
2.1.4 Tip 1 ve Tip 2 DM.....	7
Tip 1 DM	7
Tip 1 DM'ta semptom ve bulgular	8
Tip 2 DM	9
2.1.5 DM'un Komplikasyonları	10
2.2 Diyabetik nöropati	11
2.2.1 Tanım.....	11
2.2.2 Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması.....	11
2.2.3 Diyabetik nöropatide klinik.....	13
Semptom ve bulgular.....	13
2.2.4 Diyabetik nöropatide tanı ve ayırıcı tanı	13
2.3 Tip 2 diyabetin patogenezi.....	14
2.4 Diyabet, Diyabetik Nöropati ve Oksidatif Stres	18
2.4.1 Oksidatif stres.....	18
2.4.2 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT).....	19

	<u>Sayfa</u>
Süperoksit Anyonu	20
Hidrojen Peroksit	20
Hidroksil Radikali	21
2.5 Antioksidan Sistem	22
2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar	24
Süperoksit Dismutaz (SOD)	24
Glutasyon Peroksidaz (GPx)	25
Katalaz (CAT)	26
Antioksidan Genlerdeki Değişiklikler	26
2.6 Diyabet ve Oksidatif Stres	27
2.6.1 Hiperglisemi	28
2.6.2 Hiperinsülinemi (kanda aşırı insülin)	31
2.6.3 İnsülin yetersizliği	31
2.6.4 Diyabet Koşullarında Çeşitli Yolaklar aracılığıyla Reaktif Oksijen Türlerinin Artması	32
2.6.5 Tip 2 diyabette pankreas β -hücresi bozukluğunun ilerlemesinde ROT'ların rolü.....	32
2.6.6 Tip 2 Diyabette İnsülin Direncinin İlerlemesinde ROT'ların Rolü.....	34
2.6.7 Bozuk antioksidan savunma sistemi.....	36
2.6.8 Diyabetes mellitusun patogenezinde oksidatif stresin rolü	36
2.6.9 β -hücresi fonksiyon bozukluğunda oksidatif stresin rolü.....	37
2.6.10 İnsülin direncinde oksidatif stresin rolü	37
2.7 Diyabetik nöropati etiopatogenezi	39
2.7.1 Diyabetik nöropati ve hiperglisemi	39
2.8 Diyabetik Nöropati ve Antioksidan Enzim Polimorfizmleri	46
2.8.1. Diyabetik Nöropati ve SOD2	46
2.8.2. Diyabetik Nöropati ve GPX1	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM	55
3.1. Çalışma Grubunun Seçimi	55
3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması	55
3.3. DNA İzolasyonu	55

	<u>Sayfa</u>
3.4. Polimorfizmlerin Tespit Edilmesi.....	56
3.4.1. SOD2 Ala-9Val Gen Polimorfizminin Tespit Edilmesi.....	58
3.4.2. GPX1 Pro198Leu Gen Polimorfizminin Tespit Edilmesi.....	61
3.5. İstatistik Analizler.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. Demografik Özellikler	66
4.2. Genotip Frekansları.....	66
4.2.1. Diyabetik nöropati hastalarında cinsiyete göre genotip frekansları	67
4.2.1. Diyabetik nöropati hastalarının ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları.....	68
4.2.2. Diyabetik nöropati hastalarında Retinopati olup olmamasına göre genotip frekansları.....	70
4.2.3. Diyabetik nöropati hastalarında hipertansiyon olup olmamasına göre genotip frekansları.....	71
4.2.4. Diyabetik nöropati hastalarında sigara içip içmemeye göre genotip frekansları.....	72
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	74
5.1. Diyabetik Nöropati ve MnSOD Ala-9Val	74
5.2. Diyabetik Nöropati ve GPX1.....	77
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	95

SİMGELER **AÇIKLAMA**

°C	:	Santigrat
µL	:	Mikrolitre
mL	:	Mililitre
mM	:	Milimol
sn	:	Saniye

KISALTMALAR **AÇIKLAMA**

ADA	:	Amerikan Diyabet Birliği
AGE	:	İleri Glikolizasyon Son Ürünü
Ala	:	Alanin
APG	:	Açlık Plazma Glukozu
BAG	:	Bozulmuş açlık glukozu
CAT	:	Katalaz
DCCT	:	The Diabetes Control and Complications Trial
DM	:	Diabetes Mellitus
DN	:	Diyabetik nöropati
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DPN	:	Diyabetik periferel nöropati
EASD	:	Avrupa Diyabet Çalışma Birliği
EDTA	:	Etilen diamin tetra asetikasit
GLP-1	:	Glukagon-benzeri peptit 1
GPx	:	Glutasyon peroksidaz
GSH	:	Glutasyon
HPLC	:	Yüksek performanslı likid kromatografi
IDF	:	Uluslar arası Diyabet Federasyonu
IRS	:	İnsülin reseptör substrat
JNK	:	c-Jun Nterminal kinaz
Leu	:	Lösin

MnSOD	:	Manganez süperoksit düsmutaz
mRNA	:	Messenger RNA
NADH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NF-κB	:	Nükleer faktör kappa B
NGSP	:	National Glycohemoglobin Standardization Program
NO	:	Nitrik oksit
OGTT	:	Oral Glukoz Tolerans Testi
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDX-1	:	Pankreatik ve duodönal homeobox-1
PKC	:	Protein kinase C
PPAR g	:	Peroksizom proliferatör-aktif reseptör g
Pro	:	Prolin
PUFA	:	Çoklu doymamış yağ asidi
RAGE	:	AGE reseptörü
RAT	:	Reaktif azot türü
ROT	:	Reaktif oksijen türü
RT	:	Reaktif türler
SOD	:	Süperoksit dismutaz
SPSS	:	Statistical Package for the Social Sciences
TCA	:	Trikarboksilik asit
TCF7L2	:	Transkripsiyon faktörü 7-benzeri 2
TEMĐ	:	Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği
TNFα	:	Tümör nekroz faktörü alfa
Val	:	Valin

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1: İnsülin sinyal ağı.	17
Şekil 2.2: Mitokondride elektron taşıma zincirinde süperoksit oluşumu.....	20
Şekil 2.3: Antioksidan savunma sistemi tarafından reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması.....	23
Şekil 2.4: Mitokondriyel antioksidan ağı	23
Şekil 2.5: Mitokondride ROT üretimi ve uzaklaştırılması.	27
Şekil 2.6: Hiperglisemi tarafından hücrelerde çok sayıda sinyal mekanizmasının aktivesi.	29
Şekil 2.7: Glukoz metabolizması yolları	30
Şekil 2.8: Hipergliseminin tetiklediği aşırı mitokondriyel ROT üretimi sonucu, diyabetik hücre hasarına yol açan ana yolların aktive edilmesi.	41
Şekil 2.9: Glikasyon son ürünleri (AGE) kaynaklı hasarın genel mekanizması	43
Şekil 2.10: Hiperglisemi ve oksidatif stres şartlarında meydana gelen değişikliklerle, RAGE'in reaksiyonuyla ortaya çıkan hücre içi ve hücre dışı sinyal iletim yollarının sonuçları.....	45
Şekil 3.1. SOD2 Ala-9Val için amplifikasyon eğrisi	60
Şekil 3.2. SOD2 Ala-9Val için erime eğrisi	60
Şekil 3.3. SOD2 Ala-9Val için erime pikleri.....	61
Şekil 3.4. GPX1 Pro198Leu için amplifikasyon eğrisi	63
Şekil 3.5. GPX1 Pro198Leu için erime eğrisi	64
Şekil 3.6. GPX1 Pro198Leu için erime pikleri.....	64

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1: GPX1 geni Pro198Leu ve Pro197Leu genotiplerinin çeşitli araştırmacılarda etnik dağılımı.....	46
Çizelge 2.2: GPX1 geni Pro198Leu ve Pro197Leu genotiplerinin çeşitli araştırmacılara göre etnik dağılımı.....	52
Çizelge 3.1. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin dizileri.....	58
Çizelge 3.2. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR koşulları.....	58
Çizelge 3.3. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR prosedürü...	59
Çizelge 3.4. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin dizileri.....	61
Çizelge 3.5. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR koşulları ..	62
Çizelge 3.6. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR prosedürü.....	62
Çizelge 4.1. Kontrol ve Diyabetik Nöropati hastalarının demografik özellikleri	66
Çizelge 4.2. MnSOD Ala9Val genotip frekansları.....	66
Çizelge 4.3. GPX1 Pro198Leu genotip frekansları.....	67
Çizelge 4.4. MnSOD Ala9Val hastalarda cinsiyetlerine göre genotip frekansları.....	67
Çizelge 4.5. GPX1 Pro198Leu hastalarda cinsiyetlerine göre genotip frekansları	68
Çizelge 4.6. MnSOD Ala9Val hastalarda ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları.....	69
Çizelge 4.7. GPX1 Pro198Leu hastalarda ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları.....	69
Çizelge 4.8. MnSOD Ala9Val hastalarda Retinopati olup olmamasına göre genotip frekansları.....	70
Çizelge 4.9. GPX1 Pro198Leu hastalarda Retinopati olup olmamasına göre genotip frekansları.....	70
Çizelge 4.10. MnSOD Ala9Val hastalarda hipertansiyon olup olmamasına göre genotip frekansları.....	71
Çizelge 4.11. GPX1 Pro198Leu hastalarda hipertansiyon olup olmamasına göre genotip frekansları.....	72
Çizelge 4.12. MnSOD Ala9Val hastalarda sigara içip içmemeye göre genotip frekansları.....	73
Çizelge 4.13. GPX1 Pro198Leu hastalarda sigara içip içmemeye göre genotip frekansları.....	73

1. GİRİŞ

Diyabetik nöropati, yüksek hastalık ve ölüm oranı ile seyreden ve diyabetik hastaların yaşam kalitesini düşüren önemli bir komplikasyondur (Komplikasyon: Bir hastalığın seyri esnasında oluşan ikinci bir hastalık, mevcut hastalığa eklenen diğer bir hastalık veya bozukluk). Görülme sıklığı, yapılan nöropati çalışmasının toplum veya hastane kaynaklı olması ve tespit için kullanılan yöntemlerdeki farklılığa dayalı olarak %10 ila 90 arasında değişmektedir (Shaw ve Zimmet, 1999).

Diyabetik nöropati'nin patogenezi tam olarak anlaşılmış değildir, etkin ve ideal bir tedavisi halen mevcut değildir. Diyabetik nöropati için kullanılan ilaçlar semptomatik tedavi amaçlı olup, ağrıyı hafifletmekle birlikte asıl tedavi hedefi olan hastalık seyri üzerinde etkisi yoktur.

Oksidatif stresin, diyabetik komplikasyonların patogenezinde merkezi bir rol oynadığı düşünülmektedir. Diyabetik nöropatide serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres, sinirlerde oksijen azlığı ve fonksiyon bozukluğuna yol açmaktadır. Patogeneizde suçlanan bir başka mekanizma da protein glikozillenmesi olup, diyabetle birlikte artan protein glikolizasyonunun diyabet komplikasyonlarının esas sebepleri arasında olduğu bilinmektedir (Goh ve Cooper, 2008).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Diabetes Mellitus

2.1.1 Tanım

Diabetes Mellitus (DM), kronik hiperglisemi (kan şekeri düzeyinin normal değerlerin üstüne çıkması) ile karakterize metabolik hastalıkların heterojen bir grubu olarak tanımlanmaktadır. Kronik hiperglisemi, insülin sekresyonunda, insülin etkisinde veya her ikisindeki bozukluklar sonucunda karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasındaki bozukluğa bağlı olarak gelişmektedir (Bennett ve Knowler 2008). Diyabet, ömür boyu süren akut ve kronik komplikasyonları olan, yaşam süresini ve kalitesini olumsuz etkileyen ve multidisipliner yaklaşılması gereken kronik bir hastalıktır.

2.1.2 Epidemiyoloji

DM (diyabet), tüm dünyada görülen küresel bir hastalık konumunda bulunmaktadır. 1980 yılında dünyadaki diyabetli hasta sayısı 30 milyon iken, bu rakam günümüzde 371 milyona ulaşmış durumdadır (Guariguata 2012). Türkiye’de, toplumun yetişkin bireylerinde diyabet görülme sıklığı 1997 yılında yapılan TURDEP-I çalışmasında %7,2 olarak bulunmuşken, 540 merkezde 2010 yılında yapılan TURDEP-II çalışmasında bu oranın %13.7’ye çıktığı tespit edilmiştir (Satman ve ark., 2013). Türkiyede diyabet sıklığı 12 yılda %90 artış göstererek Dünya Sağlık Örgütünün 2030 yılı hedeflerini aşmıştır. DM’un tanınması, tedavi programlarının belirlenmesi, erken dönemde tanı konulabilmesi ve bu konuda toplumsal sağlık politikalarının oluşturulabilmesi için hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin bilinmesi gerekir.

2.1.3 Tanı

Diyabet tanısı dört yöntemle konulabilir. Bunlar; açlık plazma glukozu (APG), 75 gram oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonrası 2. saat plazma glukozu, diyabet semptomları ile birlikte rastgele plazma glukozu ve HbA1C'dir.

DM'un tanı kriterleri

Aşağıdaki kriterlerden sadece biri DM tanısı için yeterlidir:

- Açlık plazma glukozu ≥ 126 mg/dl (açlık için en az 8 saat kalori alınmamalıdır)
- 75 gram oral glukoz tolerans testinin 2. saatinde plazma glukozu ≥ 200 mg/dl
- Hipergliseminin klasik semptomları + rastgele plazma glukozu ≥ 200 mg/dl
- HbA1C $\geq 6,5$ (DCCT verilerine göre standardize edilmeli)

Bu yöntemler içerisinde APG'nin daha kolay uygulanabilmesi ve ucuz olması klinik pratikte kullanımını artırmaktadır. Amerikan Diyabet Birliği'ne (ADA) göre diyabet tanısı, açlık kan şekerinin venöz plazmada ardışık en az iki ölçümde 126 mg/dl veya üzerinde olması ile konur (Expert Committee, 1997). Ayrıca günün herhangi bir saatinde açlık ve tokluk durumuna bakılmaksızın venöz plazmada ölçülen kan şekerinin 200 mg/dl'nin üzerinde olması ve buna polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı gibi diyabet semptomlarının eşlik etmesi de tanı koymak için yeterlidir. Bir test ile DM tanısı konduktan sonra tanı ayrı bir gün ikinci bir test ile doğrulanmalıdır. Tercih edilen aynı testin tekrarlanmasıdır. Bir testin tanı kriterlerinin üstünde, diğerinin altında olması durumunda test 3-6 ay sonra tekrarlanmalıdır (American Diabetes Association, 2011). Ancak belirgin DM kliniği varlığında rastgele plazma glukozu ile tanı konmuşsa ikinci bir test ile doğrulamaya gerek yoktur.

Açlık plazma glukozu 100-125 mg/dl ise (bozulmuş açlık glukozu-BAG), 2 saatlik 75 g OGTT sonrası 2. saat plazma glukozu 140-199 mg/dl (bozulmuş glukoz toleransı- BGT) prediyabet olarak adlandırılır. Dünya sağlık örgütü ve Uluslararası Diyabet

Federasyonunun (IDF) 2006 yılı raporunda APG 100-110 mg/dl arasında bulunan kişilerin çok azında diyabet olabileceğinden bu kişilere yapılması gereken OGTT'nin maliyeti gözönüne alındığında APG için üst sınırın 110 mg'dl olması gerektiği belirtilmişti. Buna karşılık ADA ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD) 2007 yılında yayınladıkları konsensus raporunda 2003 yılındaki revizyona uygun olarak APG üst sınırının 100 mg/dl olması gerektiğini savunmuşlardır.

Uzun yıllardır DM tanısı APG ve 2 saatlik 75 g OGTT ile konurken 2009 yılında ADA, IDF ve EASD, HbA1C'nin tanıda kullanılmasını önermişlerdir (International Expert Committee, 2009). HbA1c'nin açlık gerektirmemesi, preanalitik stabilitesinin fazla olması ve akut hastalık ve stres durumlarından etkilenmemesi APG ve OGTT'ye olan üstünlükleridir. Ancak daha pahalı olup plazma glukoz ölçümü kadar yaygın kullanılmamaktadır. Kan kaybı, hemoliz, gebelik, hemoglobinopatiler ve anemilerden etkilenip etnik kökene göre normal referans aralıkları farklılıklar gösterebilmektedir. Ayrıca glisemik değişkenliği belirgin olan hastalarda ortalama glisemiye yansıttığından HbA1C değerleri normal bulunabilmektedir. HbA1C ölçüm yönteminin, 'Ulusal Glikohemoglobin Standardizasyon Programı' (NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program) tarafından sertifikalandırılması ve diyabet kontrol ve komplikasyon çalışmasında (DCCT) kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen yüksek performanslı lipid kromatografi (HPLC) yöntemine göre kalibre edilmesi şart koşulmaktadır. Bu kriterlere uyulması koşulu ile HbA1C için tanı eşiği %6,5 olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda HbA1C düzeyi arttıkça DM gelişme riskinin de arttığı gösterilmiştir (Selvin ve ark., 2010). Bu nedenle HbA1C, %5,7-6,4 arasındaki değerler prediyabet olarak kabul edilmiştir (American Diabetes Association, 2011).

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneğinin (TEMED) 2013'de yenilenen 'Diabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzunda' ülkemizde HbA1c'nin standardizasyon çalışmalarına hız verilmesi gerektiği ve yeterlilik belgesi alan laboratuvarlarda ölçülmek koşulu ile HbA1c testi diyabet tanısında kullanılabilir olabileceği belirtilmiştir.

DM dört sınıfa ayrılır:

- Tip 1 DM: Beta hücre hasarına bağlı mutlak insülin eksikliği gelişir.
- Tip 2 DM: İnsülin direnci zemininde ilerleyici pankreas beta hücre hasarı ve insülin salınım defekti gelişir.
- Gestasyonel DM: İlk kez gebelik esnasında tanı konulan diyabettir.
- Diğer spesifik diyabet tipleri: Beta hücre veya insülin fonksiyonundaki genetik defektler, endokrinopatiler, egzokrin pankreas hastalıkları, ilaca bağlı DM bunlar arasında sayılabilir.

DM'un sınıflandırılması

1. Tip 1 DM

A. Otoimmün

B. İdiyopatik

2. Tip 2 DM

3. Gestasyonel DM

4. Diğer spesifik tipler

A. Beta-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları):

- 20. Kromozom , HNF-4a (MODY1)
- 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2)
- 12. Kromozom, HNF-1a (MODY3)
- 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4)
- 17. Kromozom, HNF-1b (MODY5)
- 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6)
- 2. Kromozom, KLF11 (MODY7)
- 9. Kromozom, CEL (MODY8)
- 7. Kromozom, PAX4 (MODY9)
- 11. Kromozom, INS (MODY10)
- Mitokondriyal DNA

- 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu)
- Diğerleri

B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler:

- Leprechaunizm
- Lipoatrofik diyabet
- Rabson-Mendenhall sendr.
- Tip A insülin direnci
- Diğerleri

C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları:

- Fibrokalkülöz pankreatopati
- Hemokromatoz
- Kistik fibroz
- Neoplazi
- Pankreatit
- Travma/pankreatektomi
- Diğerleri

D. Endokrinopatiler :

- Akromegali
- Aldosteronoma
- Cushing sendr.
- Feokromositoma,
- Glukagonoma
- Hipertiroidi
- Somatostatinoma

E. İlaç veya kimyasal ajanlar:

- Atipik anti-psikotikler

- Anti-viral ilaçlar (HIV tedavisi)
- b-adrenerjik agonistler
- Diazoksid
- Fenitoin
- Glukokortikoidler
- a-İnterferon
- Nikotinic asit
- Pentamidin
- Proteaz inhibitörler
- Tiyazid grubu diüretikler
- Tiroid hormonu
- Vacor
- Diğerleri (post transplant diyabet)

2.1.4 Tip 1 ve Tip 2 DM

Tip 1 DM

Tip 1 DM; genellikle çocuk yaş grubunda daha sık rastlanan, pankreasta bulunan ve insülin üreten beta hücrelerinin kronik otoimmün veya otoimmün olmayan sebeplerle tahrip olması neticesinde gelişen, insülin eksikliği ve hiperglisemi ile karakterize olan kronik metabolik bir hastalıktır (Alemzadeh ve Wyatt, 2004; Todd, 2010). DM, %75-80 oranında 30 yaşından önce ortaya çıkmaktadır. Tip 1 DM; tip 1A ve tip 1B şeklinde iki gruba ayrılır. Tip 1A; Tip 1 DM'nin %90'ını, tip 1B ise %10'unu oluşturmaktadır (American Diabetes Association, 2011). Tip 1 DM, hastalığa yatkın bir genetik yapıya çevresel faktörlerin etkisi ile, beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ve gelişen inflamatuvar olaylar sonucu insülitis oluşumuyla ortaya çıkmaktadır (Atkinson ve Eisenbarth, 2001; In't Veld, 2011). Tek yumurta ikizlerinde diyabetin birlikte görülme sıklığının %30-50 arasında değişmesi diyabet gelişmesinde genetik dışı faktörlerin de etkili olduğunu göstermektedir. Sorumlu tutulan çevresel etkenler; kimyasal ajanlar, virüsler ve gıda bileşikleridir (Barnett ve ark.,

1981; Redondo ve ark., 2001). Bennet ve Knowler'a göre (2005) Tip 1 DM klinik olarak dört evreye ayrılabilir:

Preklinik evre, genetik olarak yatkın bireylerde çevresel faktörlerin etkisi ile beta hücresine karşı otoimmün olayın tetiklendiği ve klinik semptomların ortaya çıkıncaya kadar geçtiği süreçtir. Beta hücrelerine yönelik dolaşımdaki antikorlar Tip 1 DM'nin asemptomatik olduğu preklinik evrede saptanabilir (Satman ve Gürol, 2003).

Erken klinik evre; Tip 1 DM'de hiperglisemi ve klinik semptomların başladığı ancak beta hücre rezervinin bir miktar korunduğu evredir. Tip 1 DM'de klinik başlangıç şekli hastanın yaşıyla ilişkilidir. Çocukluk döneminde gürültülü bir klinik varken, ileri yaşlarda çok yavaş bir şekilde ortaya çıkabilir. Erken klinik evreye ait kesin tanı kriterleri, kan şekeri yüksekliği ve idrarda glukozun varlığıdır.

Remisyon evresi; balayı dönemi olarak da bilinir. Otoimmün yıkımdan geriye kalan hücrelerin tedaviyi takiben kendilerini yenilemeleri ve araya giren insülin ihtiyacını artıran faktörlerin tedavi edilmesi ile endojen insülinin yeterli hale gelmesi söz konusudur. Ekzojen insülin ihtiyacının azaldığı ve hastanın endojen insülini ile glisemi regülasyonunun sağlandığı evredir. İki hafta gibi bir süreden bir kaç yıla kadar uzayabilir (Günöz, 2010).

Klinik evre; semptomların tam olarak yerleştiği ve beta hücre rezervinin çok azaldığı evredir. Bu evrede hiperglisemi ve osmotik diürece, insülin eksikliğine, enfeksiyonlara yatkınlığa ve kalori eksikliğine bağlı semptom ve bulgular gelişir.

Tip 1 DM'ta semptom ve bulgular

1. Hiperglisemi ve osmotik diürece bağlı semptomlar ve bulgular

Poliüri, noktüri

Susama hissi artışı, polidipsi

Görme bozukluğu

Dehidratasyon, halsizlik, yorgunluk, uyku hali

2. İnsülin eksikliğinin semptom ve bulguları

Hiperglisemi ve glikozüri

Aşırı yorgunluk

Kas erimesi

Kilo alamama veya kilo kaybı

Ketoasidozis

3. Enfeksiyonlara yatkınlığa bağlı semptom ve bulgular

Tekrarlayan cilt enfeksiyonları

Tekrarlayan genital enfeksiyonlar ve kaşıntı

4. Kalori eksikliğine bağlı semptom ve bulgular.

İştah artışı

Kilo kaybı

Tip 2 DM

Tip 2 DM, bütün diyabetik hastaların yaklaşık %85'ini oluşturmaktadır. Uzun sürebilen ve semptomların görülmediği bir dönem genellikle mevcuttur. Tip 2 DM gelişiminde beta hücre fonksiyon bozukluğu, insülin direnci ve hepatik glikoz üretimi artışı gibi üç ana metabolik bozukluk rol oynar (Weyer ve ark., 1999). Birincil defekt olarak insülin direnci ve/veya insülin eksikliği ön plana çıkmaktadır. Tip 2 DM'de poligenik bir genetik yatkınlık da söz konusudur. Tip 2 DM hastalarının %39'unda en az bir ebeveynde diyabet bulunduğu rapor edilmektedir (Klein ve ark., 1996).

Monozigotik ikizlerde de etkilenmeyen ikizde diyabet gelişme riski yaklaşık %90'dır (Barnett ve ark., 1981). İnsülin direnci, sebebi halen anlaşılmamış olangenetik bozukluklarla birlikte, çevresel etmenlerin etkisi ile ortaya çıkmaktadır. Çevresel etmenlerden en başlıcaları arasında obezite ve fiziksel aktivite eksikliği yer almaktadır. Obezite, çevre dokularında insülin aracılığıyla gerçekleşen glukoz alımına direnç gelişmesine

ve beta hücrelerin glukozduyarlılığında azalmaya sebep olmaktadır (Friedman ve ark., 1992).

2.1.5 DM'un Komplikasyonları

Diyabetin akut ve kronik komplikasyonları aşağıda sıralanmıştır.

A) Akut (Metabolik) Komplikasyonlar:

- Diyabetik ketoasidoz
- Hiperosmolor non-ketotik koma
- Laktik asidoz koması
- Hipoglisemi koması

B) Kronik (Dejeneratif) Komplikasyonlar:

1) Makrovasküler komplikasyonlar:

- Kardiyovasküler hastalıklar (Hipertansiyon, Koroner kalp hastalığı)
- Serebrovasküler hastalıklar
- Periferik damar hastalığı

2) Mikrovasküler Komplikasyonlar:

- Diyabetik nöropati
- Diyabetik nefropati
- Diyabetik retinopati

3) Diğer Kronik Komplikasyonlar:

- Diyabetik ayak
- Erektile disfonksiyon ve diğer seksüel fonksiyon bozuklukları
- Gastrointestinal problemler
- Kemik ve mineral metabolizma bozuklukları
- Psikolojik problemler ve psikiyatrik bozukluklar

2.2 Diyabetik nöropati

2.2.1 Tanım

Diyabetik nöropati (DN), yüksek morbidite ve mortalite ile seyreden ve diyabetik hastaların yaşam kalitesini azaltan önemli bir komplikasyondur. Diyabetik nöropati, proksimal veya distal sinirleri ve duyu, motor veya otonom sinirleri farklı şekillerde etkileyerek heterojen bir klinik Çizelge oluşturur. Birçok çalışmada diyabetik nöropati prevalansının %28,5-50 arasında değiştiği gösterilmiştir (Young ve ark., 1993). Yüksek diyabetik nöropati oranı alt ekstremitelerde enfeksiyonları, ülserasyonları ve amputasyonlarını içeren önemli morbiditeler ile sonuçlanmaktadır. Diyabetik ayak problemleri diğer diyabet komplikasyonlarına göre daha fazla hastane yatışını gerektirmektedir (Edwards ve ark., 2008). Diyabetik nöropati, tek bir klinik durum olmaktan ziyade bir çok klinik ve subklinik belirtinin eşlik ettiği sendromlar bütünüdür.

2.2.2 Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması

Diyabetik nöropati sinir sisteminin belli bölgelerini tek veya birlikte tutan bir grup klinik sendromdur. Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması 1988 yılında San Antonio'da düzenlenen diyabet konferansında gerçekleştirilmiş ve aşağıda görüldüğü gibi sınıflandırılmıştır (Consensus Panel, 1988).

A. Subklinik nöropati

1. Anormal diagnostik testler

a. Sinir ileti hızında azalma

b. Uyarılmış kas veya sinir aksiyon potansiyelinin azalması

2. Anormal kantitatif duyu testi

a. Vibrasyon-dokunma

b. Sıcak-soğuk testi

c. Diğer

3. Anormal otonomik fonksiyon testleri

a. Sinüs aritmisi

b. Sodomotor fonksiyonda azalma

c. Pupiller latans artışı

B.Klinik nöropati

1. Yaygın nöropati

a. Distal simetrik sensorimotor polinöropati (İnce lif nöropatisi, Kalın lif nöropatisi, Karışık tip)

b. Otonom nöropati

- anormal pupil fonksiyonu (myozis ve dilatasyon bozuklukları),
- lakrimal gland disfonksiyonları,
- kardiyovasküler bozukluklar (ortostatik hipotansiyon, istirahat taşikardisi, ağrısız miyokard infarktüsü, uzamış QT düzeyine bağlı ani ölüm)
- sudomotor fonksiyon bozukluğu,
- genitoüriner otonomik nöropati (mesane fonksiyon bozukluğu, seksüel fonksiyon bozukluğu),
- gastrointestinal otonomik nöropati (mide atonisi, safra kesesi atonisi, diyabetik ishal, hipogliseminin varlığından habersizlik, hipoglisemiye duyarsızlık)

2. Fokal nöropati

a. Mononöropati (üst veya alt ekstremité)

b. Mononöropati multipleks

c. Poliradikülopati (L2, L3, L4 kökleri; diyabetik amyotrofi, T4-T12 kökleri; diyabetik torasik radikülopati, S1 (S2) kökleri, C5-C6 (C7,T1) kökleri)

d. Kranial nöropati

e. Pleksopati

2.2.3 Diyabetik nöropatide klinik

Diyabetik periferik polinöropati başlangıçta distal alt ekstremiteleri etkileyen primer olarak simetrik bir duysal polinöropatidir. Hastalığın ilerlemesi ile birlikte duyu kaybı proksimale ilerler ve ellerin tutulumu gözlenir. Böylece ‘eldiven-çorap’ tarzı duyu kaybı oluşmuş olur. Motor defisit ise daha ciddi vakalarda gelişmektedir.

Semptom ve bulgular

Diyabetik polinöropatinin en erken belirtileri hem büyük hem de küçük myelinize ve myelinize olmayan sinir liflerinin bütünlüğünün kademeli kaybını yansıtmaktadır. Böylece büyük sinir liflerinin kaybı ile vibrasyon duyusunda kayıp ve propriosepsiyon duyusunda değişiklik, küçük sinir liflerinin kaybı ile de ağrı, ısı ve hafif dokunmada bozulma olmaktadır (Vinik ve Erbas, 2002).

Ayak bileği refleksinin azalması veya kaybı erken diyabette gözlenirken geniş refleks kayıpları ve motor kuvvetsizlik diyabetin ilerlemesi ile gözlenmektedir.

Semptomlar iki tipdir: Negatif semptomlar; nöronal hipofonksiyon ile gelişir. Taktil ve diğer mekanoreseptör duyularda kayıp, duysal ataksi, termal ve ağrı duyuları kaybı, erkeklerde empotans, gastroparezi, sudomotor kayıp gibi otonomik bozukluklar ve atrofidir. Pozitif semptomlar; olasılıkla nöronal hiperfonksiyon nedeniyledir. Karıncalanma, sıkıca bastırılma duyusu, parmak ve ayakların altında pamuk varmış hissi veya ağrıdır.

2.2.4 Diyabetik nöropatide tanı ve ayırıcı tanı

Geçmişte diyabetik polinöropatinin tanısı semptom ve bulguların subjektif değerlendirilmesine dayanmaktaydı. 1988’de diyabetologlar ve nörologlar, diyabetik nöropati tanı ve takibi için San Antonio Konsensus bildirisini yayınladılar (Consensus

Panel, 1988). Mayo klinik de, benzer belirti skorlarını, kantitatif incelemeleri ve elektrofizyolojik ölçümleri kullanarak diyabetik nöropati için kriterler geliştirdi. Her iki gruba ait kriter de rutin klinik kullanım için pratik değildir. Basitleştirilmiş kriterleri içeren iki tarama testi geliştirilmiştir. Bunlar, Birlesik Krallık tarama testi ve Michigan nöropati tarama testidir. Diyabete özgü polinöropati yoktur. Diyabetik nöropati tanısı için öykü ve fizik muayene bulgularının ve hastanın klasik klinik değerlendirmesinin yanısıra; morfolojik, ve elektrofizyolojik incelemeler, kantitatif sensoryal testlerin yapılması büyük önem taşır. Diyabetik nöropati teşhisi Birleşik Krallık tarama testi, Michigan Nöropati tarama testi, elektrodiagnostik ölçümlerle konmaktadır.

2.3 Tip 2 diyabetin patogenezi

Tip 2 diyabet, periferel insülin direnci nedeniyle pankreas β -hücrelerinden salgılanan insülinin kan glukoz seviyelerini normal sınırlar içinde tutamaması sonucu ortaya çıkan epidemik bir hastalıktır. Diyabetin patofizyolojisinde çeşitli sebepler rol almakla birlikte, pankreas β -hücrelerinin fonksiyonlarını kaybetmesi karşımıza çıkan ana faktördür (DeFronzo, 1997; Halban ve ark., 2001). Travma, inflamasyon ve aşırı beslenme gibi fizyolojik stresler, çeşitli dokularda insüline verilen post-reseptör tepkisini bozan yolları aktive etmek suretiyle Tip 2 diyabete yol açmaktadır (Hotamisligil, 2006; Petersen ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar Tip 2 diyabetin iskelet kaslarındaki insülin direnci ile başladığını göstermekle birlikte (Cline ve ark., 1994), periferel insülin direnci hastalığın gerçekleşmesinde yeterli olmayabilir. Çünkü kas insülin direncine sahip olmayan transgenik ratlar veya hasarlı mRNA splicing yüzünden kas insülin direnci olan hastalar normalde diyabet geliştirmemektedir (Bruning ve ark., 1998; Savkur ve ark., 2001). Tip 2 diyabetin genetik kökenleri olduğunu gösteren kanıtlar olmasına rağmen, bu hastalıktan sorumlu olan genleri net olarak tespit etmekte zorluk yaşanmaktadır (Burghes ve ark., 2001).

Tip 2 diyabetin patogenezi, insülin salgılanmasını (pankreas β -hücre fonksiyonunu) olumsuz etkileyen faktörlerle dokuların insüline verdikleri tepkileri etkileyen faktörler

(insülin hassasiyeti) arasındaki etkileşim sonucu ortaya çıkmaktadır. Bozuk β -hücre fonksiyonu ve insülin direnci Tip 2 diyabetin başlangıcında önce görülür ve hastalığın habercisidir (Weyer ve ark., 2000; Kahn, 2001; Pratley ve Weyer, 2001). Tip 2 diyabet çok genli bir hastalıktır ve sayısı henüz bilinmeyen çeşitli genetik polimorfizmin birlikte etki etmesinin hastalığın gelişmesi için gerekli olduğu düşünülmektedir. Ancak, çevresel risk faktörlerinin etkisi olmaksızın bu etkilerin yeterli olmayabileceği de ileri sürülmektedir (Hamman, 1992).

İnsülini düzenleyen çeşitli proteinlere dayalı olarak yapılan aday gen araştırmaları bir “diyabet geni” veya “diyabet genleri” bulmada genel anlamda başarılı olamamıştır. Şimdiye kadar birkaç polimorfizm diyabette risk faktörü olarak nispeten net bir şekilde tespit edilmiştir. Bunlardan biri, insülinin hedef dokularında ve β -hücrelerinde ifade edilen peroksizom proliferatör-aktif reseptör g (PPAR g)’deki Pro 12 Ala polimorfizmidir (Stefan ve ark., 2001). Bu polimorfizm, serbest yağ asitlerinin insülin salınımı üzerindeki negatif etkilerine karşı hassasiyete sebep olmaktadır. İkinci bir polimorfizm, insülin salınımını ve kas dokusu ile yağ dokuları üzerinde insülinin etkilerini düzenleyen bir sistein proteaz olan kalpain-10’u kodlayan gende görülmektedir (Horikawa ve ark., 2000). Üçüncü olarak ise, KIR6.2 geninin (içerik taşıyan potasyum kanalı J11 geni) E23K varyantıdır. Büyük bir çalışmada bu polimorfizmin Tip 2 diyabet riskini artırdığı gösterilmiştir. Riskteki bu artışın; polimorfizmin, β -hücrelerinin potasyum kanalını ve dolayısıyla da insülin salınımını etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Gloyn ve ark., 2003; Florez ve ark., 2007). Transkripsiyon faktörü 7-benzeri 2 geni (TCF7L2) varyantlarının da yüksek Tip 2 diyabet riski ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Florez ve ark., 2006; Grant ve ark., 2006; Zhang ve ark., 2006). Riskli allelleri taşıyanlarda insülin salınımı azalmaktadır (Florez ve ark., 2006). Bağırsak endocrin hücrelerindeki insan glukagon geni tarafından kodlanan bir peptit olan glukagon-benzeri peptit 1 (GLP-1)’in ekspresyonu TCF7L2 tarafından düzenlenmektedir (Yi ve ark., 2005). Farelerde knockout teknikleriyle yapılan bazı çalışmalar insülin sinyal zincirinde bazı öğeler belirlemiştir. Bunların, genetik polimorfizmlerin β -hücre fonksiyonlarını etkileyebileceği potansiyel bölgeler olma ihtimali vardır (Saltiel ve Kahn, 2001).

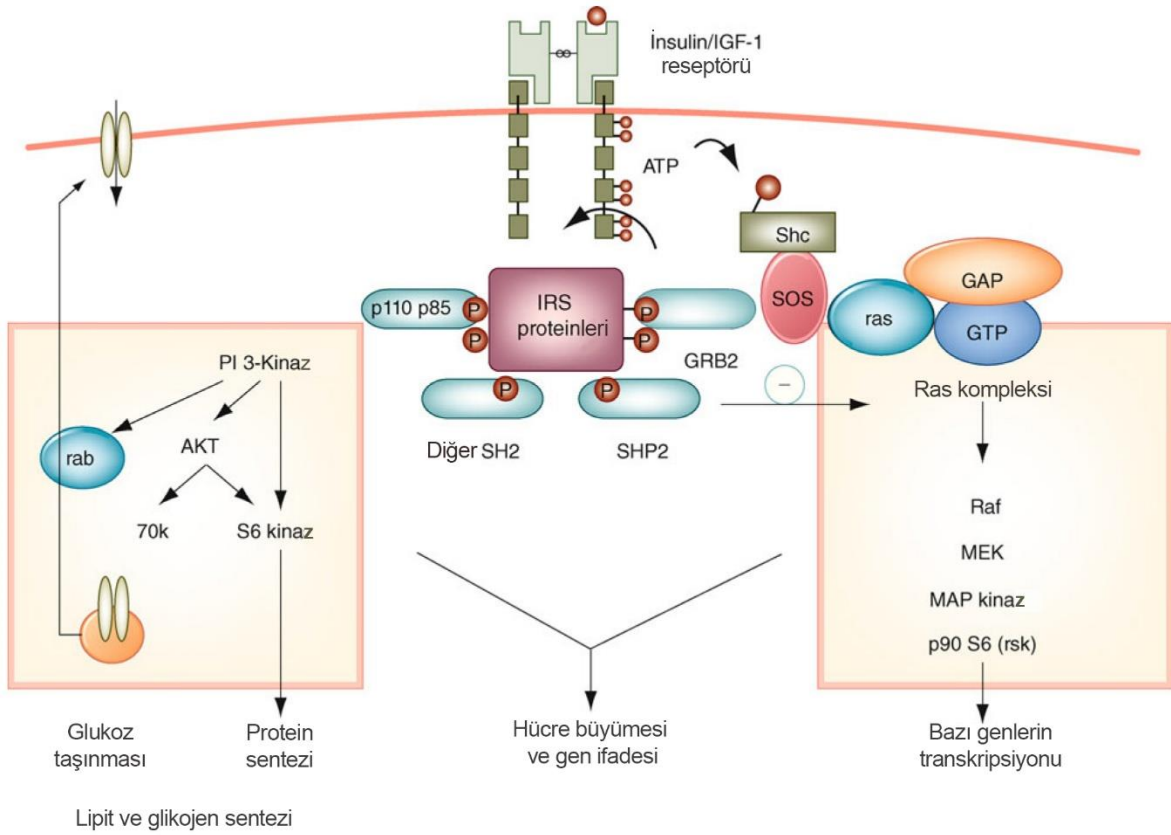
Kalıtısal faktörlerin önemi, anne ve babası Tip 2 diyabet açısından homozigot olan ikizlerin bu hastalığı geliştirme riskinin %80 olduğunu gösteren çalışma ile ortaya konmuştur (Gloyn, 2001). Tip 2 diyabetli bir anne, baba veya kardeşin olması durumunda bu risk %30 civarındadır ve bu rakam normal nüfusun 2-4 katı bir risk anlamına gelmektedir (Shatten ve ark., 1993; Shaw ve ark., 1999). Normal glukoz toleransı olan ve genetik olarak Tip 2 diyabet geliştirmeye yatkın (yani birinci dereceden bir akrabasında Tip 2 diyabet olan) insanlarda en erken tespit edilebilen sorun β -hücre fonksiyonu bozukluğudur (Gerich ve Van Haefen, 1998; Kahn, 2001; Pratley ve Weyer, 2001).

Ancak, çevresel faktörler de diyabet geliştirilmesinde önemli faktörlerdir çünkü bu etkiler olmaksızın genetik faktörler Tip 2 diyabetin ortaya çıkmasında tek başına yeterli olmayabilir. En önemli faktörler insülin hassasiyetini etkileyen faktörlerdir: obezite, fiziksel aktivite eksikliği, aşırı yağlı düşük lifli beslenme, sigara alışkanlığı ve düşük doğum kilosu bu faktörler arasındadır (Shatten ve ark., 1993; Marshall ve ark., 1994; Rich-Edwards ve ark., 1999; Wei ve ark., 2000; Choi B, Shi, 2001; Hu ve ark., 2001; Wannamethee ve ark., 2001). Çok sayıda araştırma; kalori kısıtlaması, beslenme değişikliği ve fiziksel aktivitenin artırılmasıyla Tip 2 diyabet geliştirme riskinin %60 oranında azaltılabileceğini göstermiştir (Eriksson ve Lindgarde, 1991; Pan ve ark., 1997; Eriksson ve ark., 2001; Tuomilehto ve ark., 2001; Wenying ve ark., 2001; Buchanan ve ark., 2002; Knowler ve ark., 2002; Torgerson ve ark., 2004).

Tip 2 diyabet hastası olan kişilerin %90'ından fazlası obez (dolayısıyla da insüline karşı dirençli) olmakla birlikte, insüline dirençli insanların birçoğu diyabetik değildir. Diyabet hastası olan obez bireylerle olmayanları birbirinden ayıran şey, artan insülin salgılanmasıyla ortaya çıkan insülin direncini tolere edebilmeleridir (Porte ve Kahn, 2001). Literatürde, insülin direncinin yokluğunda ve sadece insülin salınımındaki bozukluk sonucu ortaya çıkan çok sayıda Tip 2 diyabet örneği mevcuttur (Kalant ve ark., 1982; Neshar ve ark., 1987; Campbell ve ark., 1988; Bonora ve ark., 1993; Groop ve ark., 1993; Nosadini ve ark., 1994; Banerji ve ark., 1995; Byrne ve ark., 1996; Carey ve ark., 1996). Tip 2 diyabet hastalarında görülen insülin direncinin neredeyse tamamı, obezite, fiziksel aktivite yokluğu,

aşırı yağlı beslenme ve glukoz ve lipit toksisitesi gibi çevresel faktörlere verilebilir (Gerich, 1998).

İnsülin ilgili reseptöre bağlandıktan sonra karmaşık bir dizi olayı tetiklemektedir (Şekil 2.1). Obezitede görülen insülin direnci, insülin reseptörlerinin sayısının azalması, insülin reseptör kinaz aktivitesinin azalması, insülin sinyal proteinlerinin aktivasyonunun ve glukoz taşınmasının azalması olaylarıyla ilişkilidir (Dohm ve ark., 1988).



Şekil 2.1: İnsülin sinyal ağı. (GAP: GTPaz-aktivasyon proteini, GRB2: büyüme-faktörü reseptör bağlayıcı protein 2, GTP: guanozin trifosfat, IGF: insülin benzeri büyüme faktörü, MEK: MAP-Erk kinaz. (Alsahli ve Gerich, 2012)

İnsülin sinyal ağı oldukça karmaşıktır ve 5 seviyeye ayrılabilir: 1) insülin reseptörü tirozin kinazın ve buna bağlı olayların aktivasyonu, 2) Bir substrat protein ailesinin fosforilasyonu, 3) SH2 (src homoloji 2) ve diğer tanıma bölgeleri aracılığıyla çeşitli aracı sinyal

molekülleriyle reseptörün ve substratlarının aktivasyonu, 4) serin ve lipit kinazların aktivasyonu ve geniş çaplı fosforilasyon-defosforilasyon olaylarının gerçekleşmesi ve 5) glukoz taşınımı, lipit sentezi, gen ifadesi ve mitogenez gibi insülinin etkisini düzenleyen nihai biyolojik olaylar. SH2 proteinleri; insülin reseptör substrat (IRS) proteinlerini, MAP kinazlar, S6 kinazlar ve protein fosfataz-1A gibi serin/teorin kinaz ve fosfatazları içeren bir dizi kademeli reaksiyonla bağlantılıdır. Bu serin kinazlar; glikojen sentaz, transkripsiyon faktörleri ve diğer bazı enzimler üzerinde etki eder ve hormonun nihai biyolojik etkisinin ortaya çıkmasını sağlar. Yağ ve kas dokusunda, insülin uyarısı aynı zamanda, hücre içinde bulunan bir glukoz transporter havuzunun plazma zarına translokasyonunu sağlamak suretiyle glukoz alınımını da artırır. Bu işlemin fosforilasyon reaksiyon kademeleriyle tam olarak nasıl bağlantılı olduğu bilinmemektedir. İnsülinin glikojen ve lipit sentezi gibi diğer etkileri, bu reaksiyonlara katılan enzimleri aktive etmek için gerçekleşen başka hücre içi olaylar sonucunda ortaya çıkmaktadır.

2.4 Diyabet, Diyabetik Nöropati ve Oksidatif Stres

Diyabet ve diyabetin uzun dönemli komplikasyonlarıyla ilgili yapılan çok sayıda popülasyon çalışması, diyabetle oksidatif stres arasında bir ilişki olduğu görüşünü desteklemektedir (Tsfaye ve ark., 1996; Vincent ve ark., 2004; Said, 2007; Vincent ve ark., 2011).

2.4.1 Oksidatif stres

Oksidatif stres, “oksidanlarla antioksidanlar arasında, oksidanlar lehine gerçekleşen ve zarara yol açma potansiyeli olan dengesizlik” olarak tanımlanabilir (Sies, 1991). Oksidatif stres, reaktif türlerin (RT) üretimi ile antioksidan savunma sistemi arasında ciddi bir dengesizlik olarak görülmektedir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Reaktif türlerin artan miktarda üretilmesi ve/veya antioksidan savunma sistemi tarafından yok edilmelerinde bir azalma sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir. Oksidatif stres, genellikle oksidatif hasara yol açmaktadır. Oksidatif hasar “canlı organizmaları oluşturan yapılara RT

tarafından verilen biyomoleküler hasar” olarak tanımlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

2.4.2 Serbest Radikaller ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT)

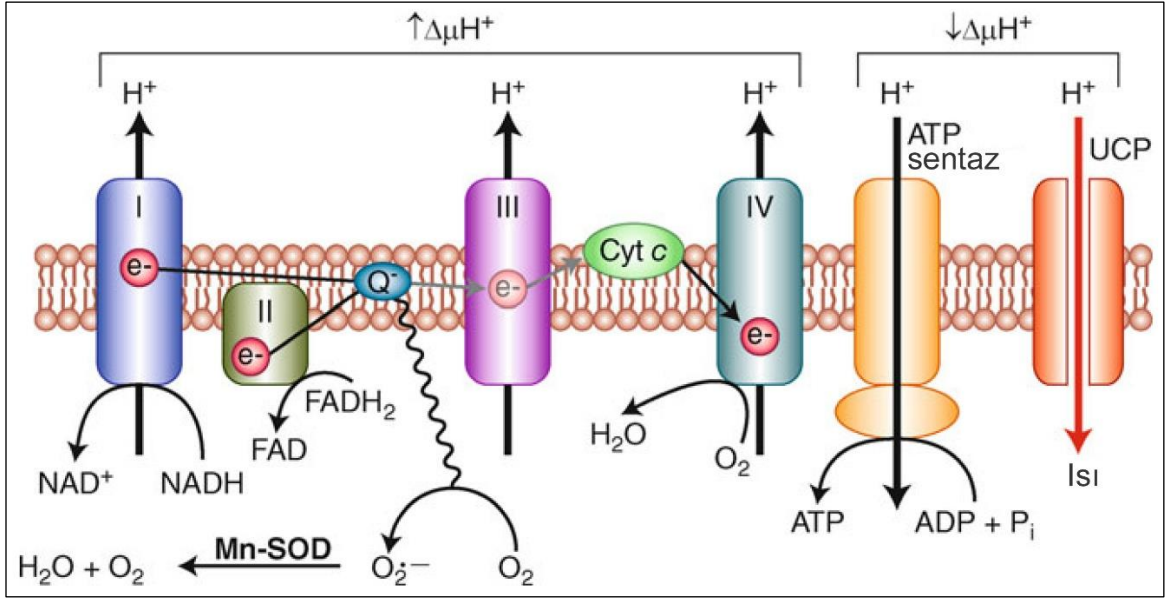
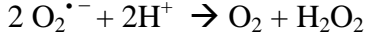
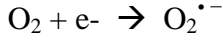
Biyolojik açıdan önemli olan reaktif türler, ya reaktif oksijen türü (ROT) ya da reaktif azot türüdür (RAT). ROT’lar, süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) ve hidroksil ($\bullet OH$) gibi serbest radikalleri ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest olmayan radikalleri içermektedir. Reaktif azot türleri ise, nitrik oksit ($\bullet NO$) ve azot dioksit ($NO_2^{\bullet -}$) gibi serbest radikalleri ve peroksinitrit ($OONO-$) gibi serbest olmayan radikalleri içerir (Sies, 1991, Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Aerobik organizmalarca RT üretimi, metabolizmanın yan ürünleri olarak (örneğin elektron transfer zincirinde), organizma tarafından bilinçli olarak (örneğin inflamasyon gibi) veya kimyasal olayların bir sonucu olarak (örneğin dopamin gibi dengesiz moleküllerin ootoksidasyonu sonucunda) meydana gelebilmektedir (Halliwell, 2011). Tüm RT’lerin içinden, özellikle $O_2^{\bullet -}$, $\bullet NO$ ve $OONO-$ ’in kardiyovasküler rahatsızlıklarda rol aldıkları düşünülmektedir (Johansen ve ark., 2005).

Oksidatif stresin meydana getirdiği oksidatif hasarın önlenmesi için, fazla RT’nin elimine edilmesi gerekmektedir. Hücre bileşenlerine verilen oksidatif hasar hücresel işlevleri bozmaktadır. Toksik etkilerinin yanısıra, ROT’lar birçok fizyolojik fonksiyon için gereklidir. Örneğin inflamasyon esnasında fagositler, işgalci bakterileri öldürmek üzere ROT üretmektedirler. Hafif veya orta seviyede yapılan egzersizler esnasında üretilen ROT’lar, egzersizin meydana getirdiği sağlık fayda mekanizmaları arasında yer almaktadır (Sachdev ve Davies, 2008).

Süperoksit Anyonu

Süperoksit anyonu canlı dokularda çeşitli şekillerde üretilmekle birlikte, ana kaynağı mitokondrilerdeki elektron taşıma zinciridir (Nohl ve Hegner, 1978; Sohal, 1997). Süperoksit oluşur oluşmaz dismutasyon reaksiyonu geçirir ve hidrojen peroksit (H_2O_2) meydana gelir (Şekil 2.2). Bu reaksiyon, süperoksit dismutaz (SOD) enzim ailesi tarafından önemli ölçüde hızlandırılır (Fridovich, 1989). Bu yüzden SOD önemli bir antioksidan enzim olarak kabul edilir (Touati, 1989).



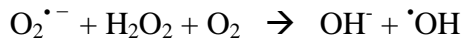
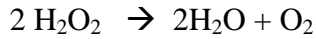
Şekil 2.2: Mitokondride elektron taşıma zincirinde süperoksit oluşumu. (Giacco ve Brownlee., 2012.)

Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2), hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmadığı sürece toksik etki oluşturmaz. H_2O_2 hücre zarlarından kolayca diffüze olmakta ve bu yüzden

üretildiği yerlerden uzak kısımlara ulaşabilmektedir. Fe^{2+} ve Cu^{1+} gibi geçiş metallerinin varlığında Haber Weiss veya Fenton reaksiyonuyla hidroksil radikaline indirgenir (Imlay ve ark., 1988; Halliwell ve Gutteridge, 1990; Yamazaki ve Piette, 1991).

Çoğu hücrede H_2O_2 , iki önemli antioksidan enzim olan katalaz (CAT) ve selenyuma bağlı glutatyon peroksidaz (GPx) aracılığıyla zararsız ürünlere dönüştürülür (Jain ve ark., 1991).

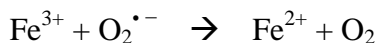


Hidroksil Radikali

Hidroksil radikali (OH^\bullet) oluşur oluşmaz birkaç angströmlük (\AA) mesafede bulunan herhangi bir molekülle reaksiyona girer. Bu yüksek reaktivitesi yüzünden çok kısa bir yarılanma ömrü vardır. Hidroksil radikali, çekirdek ve mitokondri DNA'sında, membran lipitlerinde ve karbohidratlarında hasara yol açmaktadır (Cochrane, 1991).

DNA hasarına neden olduğu iki mekanizma bilinmektedir. Birçok durumda H_2O_2 , DNA'nın hemen civarında bulunan moleküllere bağlı olan Fe^{2+} veya Cu^{1+} ile reaksiyona girmekte ve toksik hidroksil radikali oluştuğunda, ilk hedef olarak bitişindeki DNA'yı hedef alarak hasar oluşturmaktadır (Halliwell ve Aruoma, 1991).

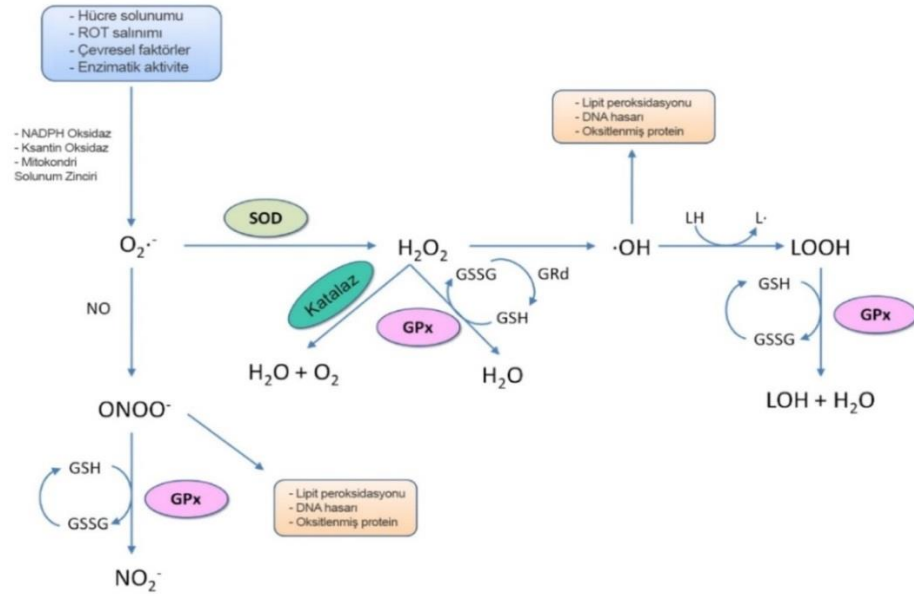
Alternatif mekanizmada ise, nöronlar nörotransmitterlerle uyarıldığında hücreler arasında büyük miktarda ortaya çıkan serbest Ca^{2+} nükleer enzimleri aktive etmekte ve hidroksil radikali oluşturarak sonuçta DNA hasarına neden olmaktadır (Orrenius ve ark., 1989). Hidroksil radikali ayrıca, membran lipitleriyle etkileşerek, lipit peroksidasyonunu başlatır (Halliwell ve Gutteridge, 1990).



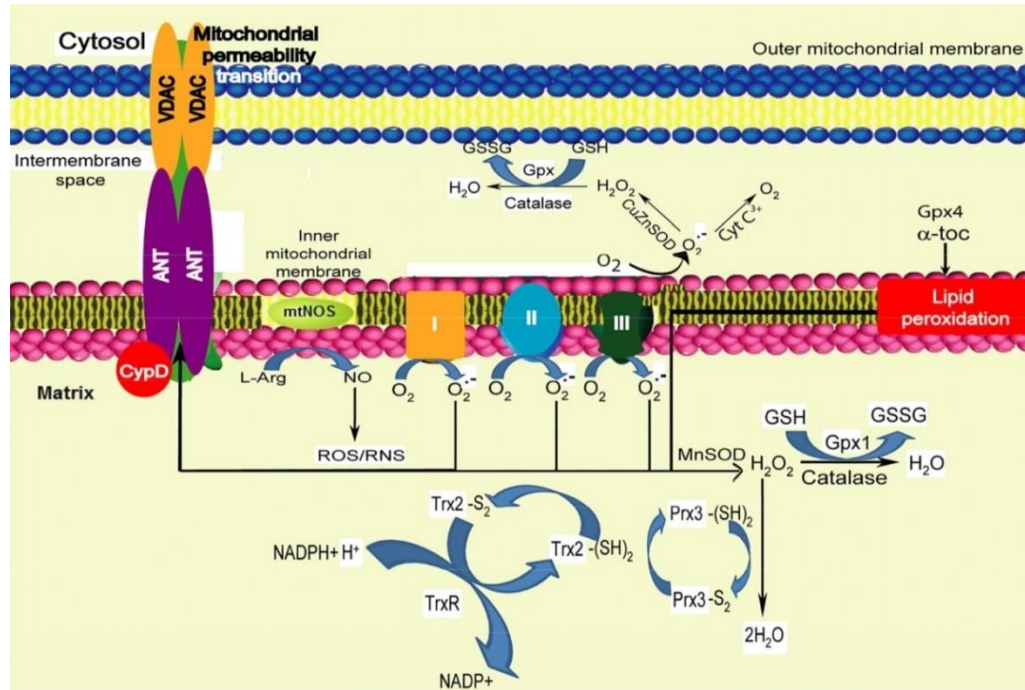
2.5 Antioksidan Sistem

Hücre ve dokuların oksidatif strese dayanabilmesi, büyük oranda antioksidan sistemin, fizyolojik rollerine zarar vermeksizin fazla ROT'ları temizleyebilmedeki etkinliğine bağlıdır (Halliwell, 2011). Antioksidan savunma sistemi; antioksidan enzimler, glutatyon, vitaminler, bazı küçük moleküller ve mikrobeyinlerden oluşmaktadır (Sies, 1991, Halliwell ve Gutteridge, 2007). Antioksidan bir madde, “hedef bir molekülde oluşacak oksidatif hasarı geciktirecek, önleyecek veya giderecek herhangi bir madde” şeklinde tanımlanmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 2007).

Antioksidan enzimler, biyolojik süreçler esnasında üretilenler de dahil olmak üzere çeşitli reaktif türleri gideren enzimlerdir (Sies, 1991, Halliwell ve Gutteridge, 2007). Temel antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir (Halliwell, 2011). SOD; $O_2^{\bullet-}$ 'i daha kararlı bir ROT olan H_2O_2 'e dönüştürerek hücredeki $O_2^{\bullet-}$ seviyelerini fizyolojik konsantrasyonlarda tutar (Halliwell ve Gutteridge, 2007, Fukai ve Ushio-Fukai, 2011). CAT; H_2O_2 'i $O_2^{\bullet-}$ 'e ve H_2O 'ya metabolize eder (Halliwell ve Gutteridge, 2007). GPx; bir hidrojen verici olan glutatyonu (GSH) kullanarak enzimatik olarak H_2O_2 'i $O_2^{\bullet-}$ 'e ve H_2O 'ya indirger. Glutatyon, glutatyon disülfid'e (GSSG) oksitlenir (Lubos ve ark., 2011) (Şekil 2.3 ve Şekil 2.4).



Şekil 2.3: Antioksidan savunma sistemi tarafından reaktif oksijen türlerinin uzaklaştırılması. (Tan ve ark., 2012)



Şekil 2.4: Mitokondriyel antioksidan ağı. (α -toc: α -tokoferol; Cyt c3+ (indirgenmiş sitokrom c); CuZnSOD: bakır-çinko süperoksit dismutaz; Gpx: glutatyon peroksidaz; GSH: indirgenmiş glutatyon, GSSG: oksidize glutatyon; L-Arg: L-arginin; mtNOS: mitokondriyel nitrik oksit sentaz, NO: nitrik oksit; Prx3-(SH)₂: peroksiredoksin 3 indirgenmiş, Prx3-S₂: peroksiredoksin 3 oksidize; ROS: reaktif oksijen türleri, RNS: reaktif azot türleri.) (Hernández-Reséndiz ve ark., 2012)

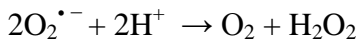
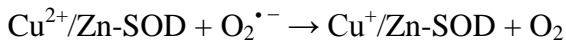
2.5.1 Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit radikalının yıkımını katalizleyen spesifik enzimler SOD, CAT ve GPx'tir. Bu enzimlerin başlıca görevi serbest radikalleri nötralize etmek ve süperoksit radikallerinin hidroksil radikallerine dönüşmesini önlemektir (Yıldırım ve ark., 2009). Süperoksit radikallerinin toksik etkilerine karşı en önemli savunma hattını, süperoksit radikallerinin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalizleyen SOD oluşturmaktadır.

Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD (EC 1.15.1.1), McCord and Fridovich tarafından keşfedilen ve oksijene maruz kalan hücrelerin savunma mekanizmasında önemli rolü olan bir enzimdir (McCord ve Fridovich 1969). SOD, süperoksit anyon radikalının ($O_2^{\bullet -}$) bir oksijen molekülü ile bir hidrojen peroksite dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Bu reaksiyon, hücreleri süperoksit toksisitesine karşı koruyan bir antioksidan sistemidir. Süperoksit dismutaz, oksidatif strese karşı ilk savunma hattıdır. Süperoksit radikalının, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar, böylece hücre içindeki süperoksit radikali düzeylerini azaltır (Yalçın, 1998). Enzimdeki metal iyonuna bağlı olarak ve vücutta hangi dokularda bulduklarına göre memelilerde başlıca üç SOD izoformu tespit edilmiştir (Zelko 2002).

SOD1 (Cu/Zn-SOD) memelilerde; sitoplazma, lizozom ve çekirdekte bulunur (Keller ve ark., 1991; Crapo ve ark., 1992; Liou, 1993). İnsanlarda, karaciğerde oldukça yüksek oranda SOD1 aktivitesi görülür (Halliwell ve Gutteridge, 2007). İnsan SOD1'i, her biri 153 amino asitten oluşan iki tane 16–kDa'lık alt biriminde bir bakır iyonu ile bir çinko iyonu içeren bir homodimerdir. SOD1 aşağıdaki reaksiyonu katalizler:



İnsanlardaki SOD2 (Mn-SOD), aktif merkezinde bir Mn iyonu barındıran, 22-kDa'lık tek bir alt ünitesi olan bir homotetramerdir (Weisiger ve Fridovich, 1973). SOD2 genellikle mitokondri matriksinde bulunur ve SOD1 ile aynı reaksiyonu katalizler.

SOD3 (hücre dışı (EC)-SOD), plazma ve lenf gibi hücre dışı sıvılarında bulunan ve 30-kDa'lık alt ünitelerden oluşan bir tetramerdir (Nozik – Grayck ve ark., 2005). SOD3 de bir bakır ve bir çinko iyonu içeren ve hücreleri oksidatif hasardan koruyan bir enzimdir.

İnsanlarda, SOD genlerinin kromozomlardaki lokasyonu şu şekildedir: SOD1: 21q22.1, SOD2: 6q25.3 ve SOD3: 4p15.3-p15.1 (Bag ve Bag, 2008).

Glutasyon Peroksidaz (GPx)

GPx (EC 1.11.1.9), her alt biriminin aktif merkezinde bir selenosistein kalıntısı barındıran bir glikoproteindir. GPx, biyolojik organizmaları oksidatif hasardan korumak üzere, hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitleri suya ve alkole indirgeme reaksiyonunu katalizler (Matés ve ark., 1999):



Bu reaksiyonda, indirgenmiş monomerik glutasyon (GSH) hidrojen donörüdür ve glutasyon disülfid (GSSG) şeklinde oksitlenir. Memelilerdeki temel izozimleri; *yapıları* (amino asit dizini ve alt birim), *dokulardaki dağılımları* (karaciğer, böbrek, alyuvar, kan plazması), *buldukları yer* (sitoplazma, hücre dışı sıvı) ve *substrat spesifitesi* (hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitler) açısından sınıflandırılır (Halliwell ve Gutteridge 2007). GPx1 kromozom 3 (3p21.3), GPx2 kromozom 14 (14q24.1), GPx3 ise kromozom 5 (5q23) üzerinde yer alır (Mak ve ark., 2007, Zhang ve ark., 2011a).

Hücrede sitoplazma ve mitokondride daha yoğun olarak bulunur. Hidrojen peroksit ile organik hidroperoksitleri indirger. GPx fagositik hücrelerde önemli işlevler gerçekleştirir. Solunum esnasında, serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar

görmelerini engeller. Eritrositlerde de GPx, oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır. GPx aktivitesinde görülen bir azalma, hidrojen peroksitin artmasına ve önemli hücre hasarına neden olur (Akyol, 2004).

GPX'in kardiyovasküler sistemde anti inflamatuvar etkisinin olduğu ileri sürülmüştür (Chu ve ark., 1993). Sitozolde GPx artışı, daha düşük kardiyovasküler hastalığa yol açmaktadır (Blankenberg ve ark., 2003). Diyabet koşullarında, GPx aktivitesi kan, alyuvar, aort, karaciğer, böbrek ve pankreasta artmakta, retina ve kalpte ise azalmaktadır (Maritim ve ark., 2003). Diyabetle GPx aktivitesi arasındaki ilişkiyi düzenleyen mekanizma hala net olarak ortaya konmuş değildir.

Katalaz (CAT)

Katalaz, GPx ile birlikte hücre içindeki hidrojen peroksitin ortadan kaldırılmasında veya atılmasında rol alır. Katalazın doku dağılımı, süperoksit dismutaz gibi geniştir. Hücrede sitozolde de görülmekle birlikte, daha ziyade peroksizomlarda bulunur. Katalaz, özellikle hidrojen peroksitin çoğaldığı durumlarda etkindir .Oksijen ve suya dönüştürerek hidrojen peroksiti ortadan kaldırır (Finaud, 2006).

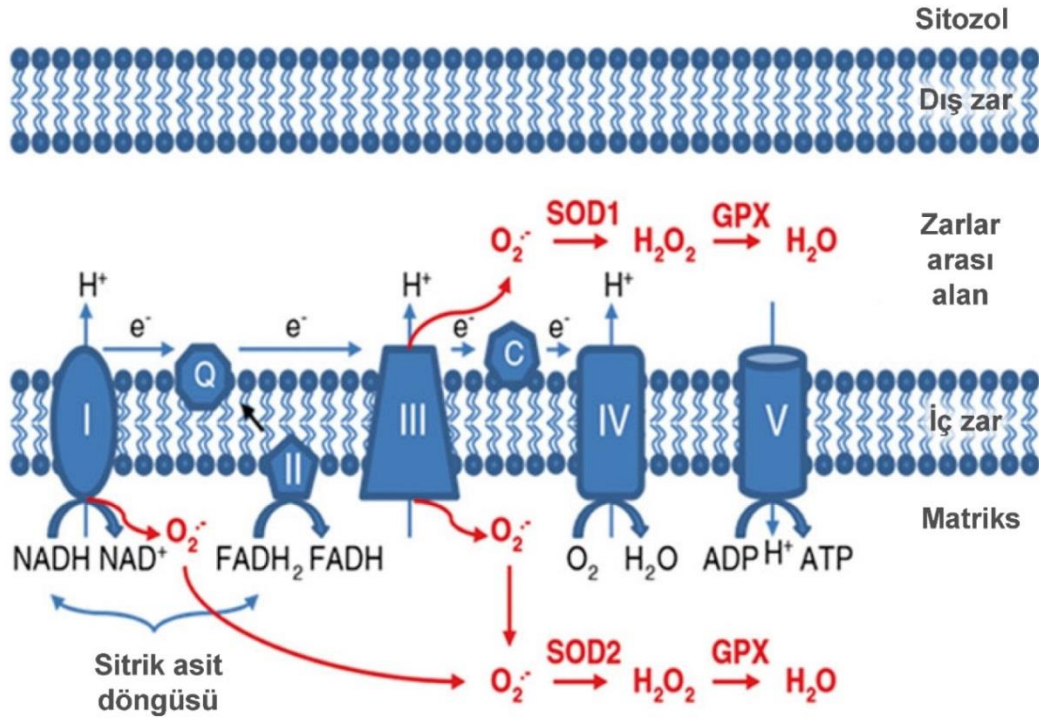
Antioksidan Genlerdeki Değişiklikler

SOD, CAT ve GPx enzimlerini kodlayan antioksidan genlerde meydana gelebilecek genetik değişiklikler, bu enzimlerin aktivitesinin düzenlenmesinde azalma veya bozulmalara yol açmakta ve ROT'ların oluşturduğu toksisitenin giderilmesinde problemlere sebep olabilmektedir. SOD genetik polimorfizmi, enzim aktivitesini azaltır ve süperoksit anyonunun birikmesine yol açar. Süperoksit anyonu NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Hem süperoksit hem de peroksinitrit son derece sitotoksik türlerdir. GPx ve CAT genetik polimorfizmleri, bu enzimlerin aktivitesini azaltarak hidrojen peroksit birikmesine yol açar. Hidrojen peroksit, geçiş metalleri ile reaksiyona girerek, hücre açısından toksik olan hidroksil radikallerini oluşturur. ROT'lardaki artış da oksidatif stresi

artırır ve sonuçta protein, DNA ve lipit gibi biyolojik moleküllerin oksitlenmesi gerçekleşir (Zhang ve ark., 2011b).

2.6 Diyabet ve Oksidatif Stres

Normal koşullar altında ve diyabet dahil olmak üzere birçok hastalıkta, reaktif türlerin ve oksidatif stresin ana kaynağı mitokondridir. Fizyolojik koşullar altında, yani mitokondriyel oksidatif metabolizmada, oksijenin büyük bir kısmı suya indirgenir ve oksijenin %2'sinden az bir kısmı $O_2^{\bullet -}$ 'ye dönüştürülür (Brand, 2010). $O_2^{\bullet -}$ önemli bir reaktif oksijen türüdür (ROT), çünkü H_2O_2 , OH and $ONOO^-$ gibi diğer reaktif türlere dönüştürülebilmektedir (Andreyev ve ark., 2005) (Şekil 2.5).

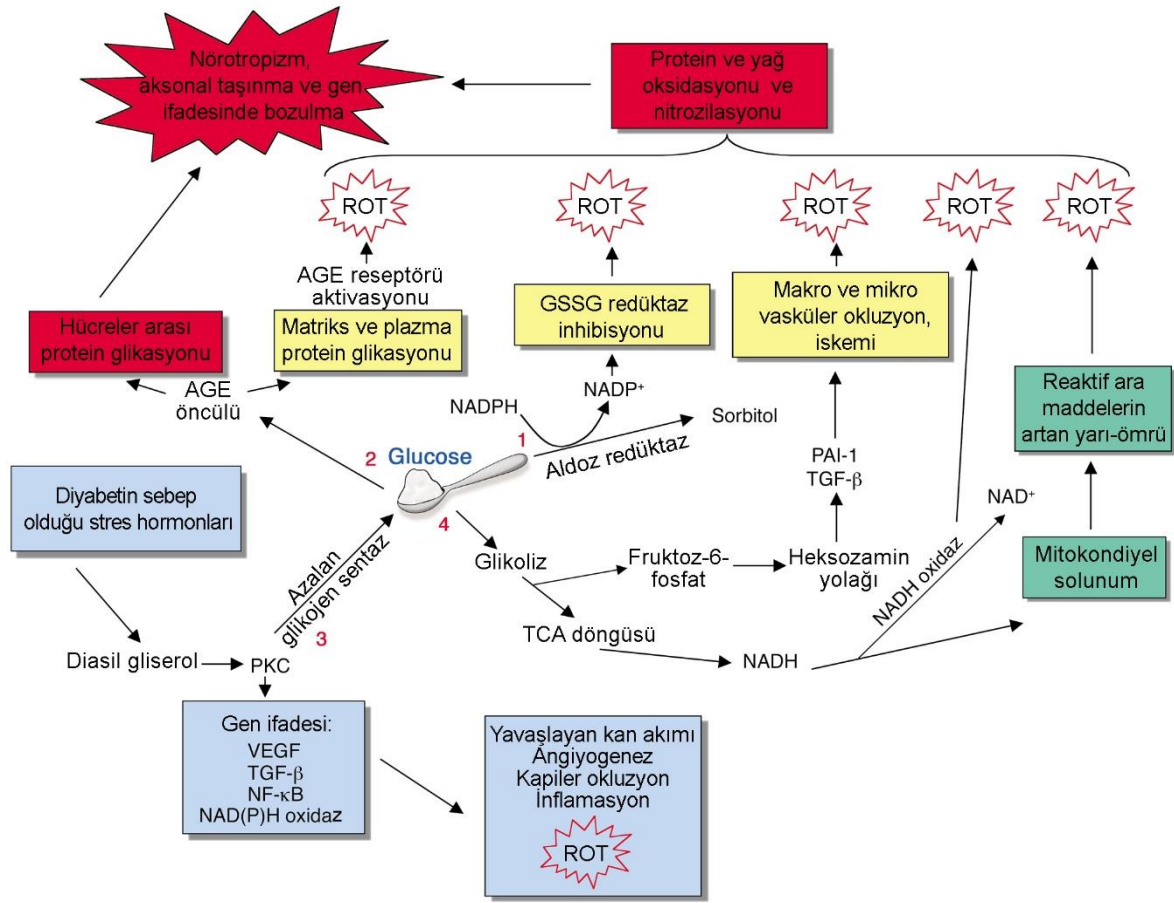


Şekil 2.5: Mitokondride ROT üretimi ve uzaklaştırılması. NADH and $FADH_2$ 'den gelen elektronlar (e^-), electron taşıma zincirinden geçer ve nihayetinde kompleks 4'de H_2O oluşturmak üzere O_2 'e indirgenir. Kompleks I ve III'de süperoksit ($O_2^{\bullet -}$) oluşturmak üzere elektron sızıntısı meydana geldiğinde mtROS oluşur. Süperoksit, kompleks I'deki matrikste üretilirken, kompleks III'te hem matrikse hem de membranlar arası boşluğa salınır. Üretildikten hemen sonra süperoksit, süperoksit dismutaz 1 (SOD1) tarafından membranlar arası boşlukta, SOD2 tarafından ise matriks içinde H_2O_2 'ye dismüte edilir. Bunu takiben, glutatyon peroksidaz (GPx) tarafından tamamen suya indirgenir. (Mani , 2015)

Fizyolojik koşullarda, vücut bu serbest radikallerin zararlı etkilerinden bir antioksidan savunma sistemi sayesinde korunmaktadır. Ancak, diyabetes mellitusta bu savunma mekanizması bozulmakta ve kronik hiperglisemi durumu daha da kötüleştirmektedir. Kronik hiperglisemi, ROT üretilmesine ve dolayısıyla da oksidatif strese yol açmaktadır. Diyabette, ROT ve oksidatif stres kaynaklarından bazıları şu şekilde sıralanabilir:

2.6.1 Hiperglisemi

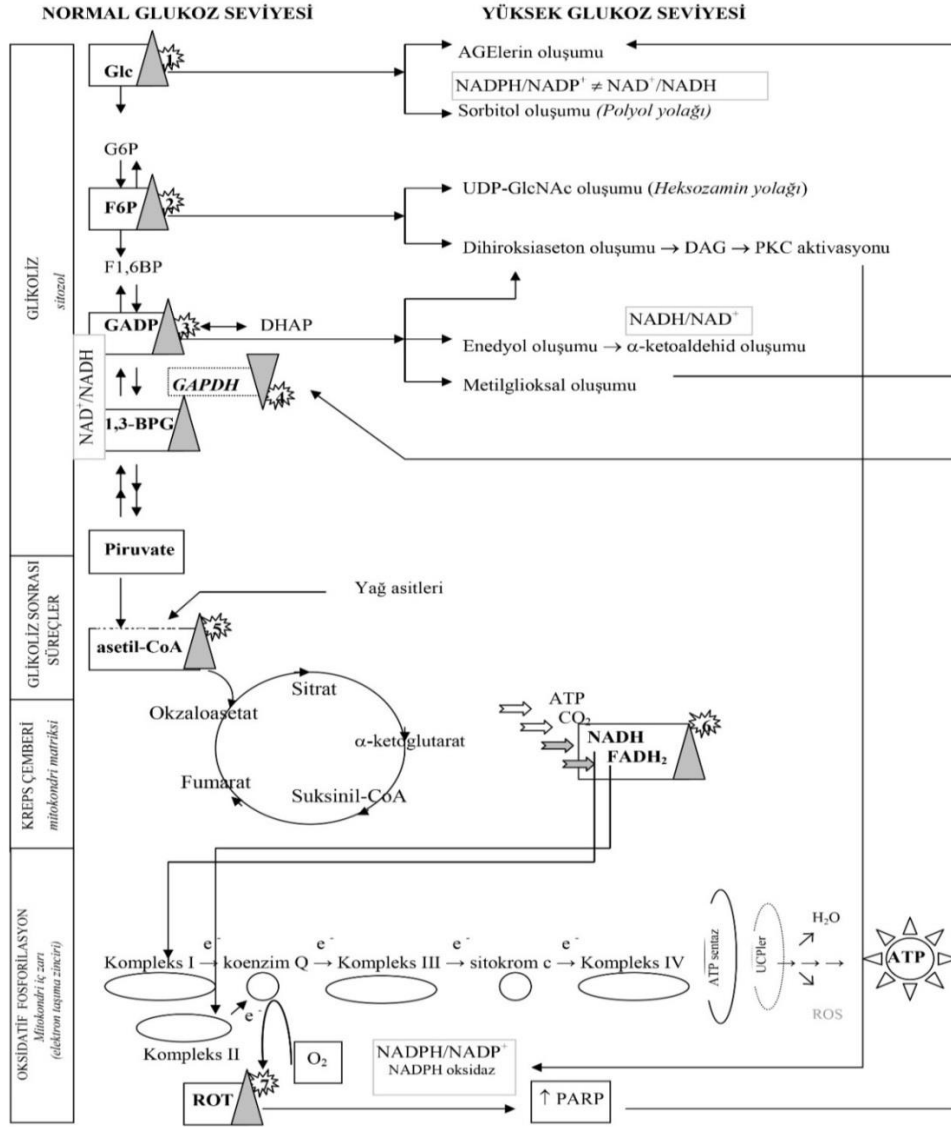
Kronik hiperglisemi diyabetes mellitusun karakteristik özelliklerinden biridir. Kanıtlar, mitokondri tarafından üretilen $O_2^{\bullet -}$ 'nin önemli bir ROT kaynağı olduğunu göstermektedir (Andreyev ve ark., 2005). Kronik hiperglisemi ile birlikte, aşırı miktarda glukoz hücrelere girmektedir. Bu durum, glikoliz yoluyla aşırı glukoz akışına ve trikarboksilik asit (TCA) döngüsüne yol açmaktadır (Drews ve ark., 2010). Bu olay da, mitokondride elektron taşıma zincirinin aşırı çalışmasına ve mitokondriyel SOD'ın giderebileceğinden daha fazla $O_2^{\bullet -}$ üretilmesine sebep olmaktadır (Wiernsperger, 2003, Brand, 2010). Bu da, mitokondriyel ROT üretimi ile mitokondriyel ROT giderilmesi arasındaki hassas dengenin mitokondriyel ROT üretimi lehine bozulmasına götürmekte ve böylece oksidatif stres başlamaktadır (Brand, 2010) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Hiperglisemi tarafından hücrelerde çok sayıda sinyal mekanizmasının aktive edilmesi. Burada, hiperglisemi koşullarında nihai olarak hücre hasarına yol açan dört önemli yolak gösterilmiştir. 1) Aşırı miktardaki glukoz, sitosolik NADPH’i ve ardında da GSH’yi tüketecek şekilde poliyol yolağını etkiler. 2) Aşırı glukoz ayrıca otooksidasyon geçirir ve AGE’leri üretir. AGE’ler, protein fonksiyonunu bozar ve ikinci ulak olarak ROT’ları kullanan RAGE’leri aktive eder. 3) PKC aktivasyonu, hem hiperglisemiyi artırır hem de doku hipoksisini daha da kötü hale getirir. 4) Elektron taşıma zincirinin aşırı yüklenmesi ve yavaşlaması neticesinde reaktif ara maddelerin kaçmasına ve O₂ üretilmesine yol açar. Ayrıca yine O₂ üreten NADH oksidaz da aktive edilir. (Feldman EL., 2003)

Yapılan çalışmalar, hipergliseminin sebep olduğu aşırı mitokondriyel O₂^{•-} üretimini, diyabette diğer reaktif türlerin üretilmesinde de önemli bir rol oynadığını göstermektedir (Nishikawa ve ark., 2000b). Diyabette görülen yüksek seviyedeki glukoz lipitlerle de reaksiyona girebilmekte ve reaktif türlerin oluşmasına yol açabilmektedir (Johansen ve ark., 2005). Enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonu aracılığıyla glukoz proteinlerle reaksiyona girebilmekte ve Amadori ve Sciff baz ürünleri gibi ara ürünler oluşturduktan sonra ileri glikasyon ürünlerini (AGE’ler) üretmektedir (Johansen ve ark., 2005). Kanıtlar bu

reaksiyonların her adımında ROT üretildiğini göstermektedir. Ayrıca yine, diyabette görülen aşırı glukozun, sorbitol ve heksozamin yolağı gibi diğer yollara yönlendirildiği ve bu yollar aracılığıyla da metabolize edilerek ROT oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Johansen ve ark., 2005, Figueroa-Romero ve ark., 2008, Giacco ve Brownlee, 2010) (Şekil 2.7)



Şekil 2.7: Glukoz metabolizması yollarını (normal ve hiperglisemik şartlarda). Artan glukoz seviyelerine cevaben gelişen ve oksidatif stresin hızlanmasına katkıda bulunan olaylar. (Glc: Glukoz, G6P: Glukoz -6- fosfat, F6P: Fruktoz-6- fosfat, F1,6BP: Fruktoz -1,6-bis-fosfat, GADP: D-gliseraldehit 3- fosfat, DHAP: Dihidroksiaseton fosfat, GAPDH: gliseraldehit -3- fosfat dehidrogenaz, 1,3-BPG: 1,3-bisfosfogliserat, ROT: reaktif oksijen türü, PARP: poli(ADP-riboz) polimeraz, UCPler: uncoupling proteinleri, AGEler: ileri glikasyon son ürünleri, DAG: diaçilgliserol, PKC: protein kinaz C, UDP GlcNAc: üridin difosfat N-asetilglukozamin.) (Piwowara ve Żurawska-Płaksejb, 2014)

2.6.2 Hiperinsülinemi (kanda aşırı insülin)

Tip 2 diyabet hastalarının çoğunluğunda rastlanılan insülin direnci hiperinsülinemi ile karakterizedir. İnsülin, reseptörlerini aktive ederken H_2O_2 salınımını tetiklemektedir (Wiernsperger, 2003). H_2O_2 , serbest olmayan bir radikal olmakla birlikte zardan geçebilmekte ve üretildiği bölgeden başka yerlere difüze olabilmektedir (Sies, 1991; Halliwell ve Gutteridge, 2007). Kronik hiperinsülinemi, diyabette bozuk olan antioksidan sistemle bir araya geldiğinde H_2O_2 'in yetersiz bir şekilde yıkılmasına yol açmaktadır. Bakır ve demir gibi geçiş metallerinin varlığında, H_2O_2 Fenton reaksiyonu geçirmekte ve $\bullet OH$ üretmektedir. $\bullet OH$ 'nin, lipit peroksidasyonunun başlaması ve artmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla, H_2O_2 oluşturması aracılığıyla hiperinsülinemi, RT'leri artırabilir ve diyabette oksidatif strese yol açarak hasar oluşturabilir. Ayrıca, insülinin birçok nörotransmitterin salınımını uyardığı bilinmektedir. Bu nörotransmitterlerin birçoğu ROT üretmekte ve oksidatif stresi tetiklemektedir (Wiernsperger, 2003).

2.6.3 İnsülin yetersizliği

İnsülin yetersizliği, diyabet hastalıklarında sıklıkla görülen bir durumdur. Bazı Tip 2 diyabet hastalarında, hiperglisemiye kontrol edebilmek için insülin enjeksiyonunu gerektirecek kadar ciddi olabilmektedir (Turner ve ark., 1999; Cook ve ark., 2005). İnsülin yetersizliği yağ açıl koenzim A oksidazın aktivitesini artırır. Yağ açıl koenzim A oksidaz, yağ asitlerinin oksidasyonundan sorumlu olan bir enzimdir ve artan miktarda H_2O_2 oluşumuna yol açar (Schonfeld ve ark., 2009). H_2O_2 ; proteinler, nükleik asit ve çoklu doymamış yağ asitleri de (PUFA'lar) dahil olmak üzere lipitler gibi çeşitli hücrel bileşenler üzerinde zararlı etkiler oluşturmasıyla tanınmaktadır (Sies, 1991; Halliwell and Gutteridge, 2007). H_2O_2 'in bu zararlı etkileri doğrudan ya da $\bullet OH$ oluşumu aracılığıyla veya serbaet radikallerin saldırısına karşı çok açık olan toksik aldehytler oluşturacak şekilde, bakır ve demir gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girmek suretiyle gerçekleşebilmektedir (Sies, 1991; Halliwell ve Gutteridge, 2007). Bu durum, daha fazla

serbest radikalın veya reaktif türün oluşmasına sebep olan bir zincir reaksiyonunu tetiklemekte ve sonuçta oksidatif stresin etkilerini artırmaktadır.

2.6.4 Diyabet Koşullarında Çeşitli Yolaklar aracılığıyla Reaktif Oksijen Türlerinin Artması

Diyabet şartlarında çeşitli dokularda reaktif oksijen türlerinin üretildiği gösterilmiştir (Dandona ve ark, 1996; Baynes ve Thorpe, 1999). Hücrelerdeki ROT, enzimatik olmayan glikolizasyon reaksiyonu (Sakurai ve Tsuchiya, 1988), mitokondrideki elektron taşıma zinciri (Brownlee, 2001) ve membrana bağlı NADPH oksidaz (Mohazzab ve ark., 1994; Harrison ve ark., 2003) gibi çeşitli kaynaklardan gelmektedir. Diyabetik hayvanlarla yapılan çalışmalarda çeşitli doku ve organlarda glikasyon reaksiyonu gözlemlenmiş ve bu reaksiyon aracılığıyla enzimatik olmayan yollarla glikozillenmiş hemoglobin, albümin ve lens kristalin gibi çeşitli glikatlı proteinler tespit edilmiştir. Bu reaksiyon, Schiff bazı, Amadori ürünü ve son olarak da ileri glikolizasyon son ürünleri (AGE'ler) üretmektedir. Bu esnada ROT da üretilmektedir. Mitokondrideki elektron taşıma zinciri de önemli bir ROT üretim yolağıdır. Diyabetik koşullar altında, elektron taşıma zinciri aktive edilmekte ve daha çok miktarda ROT üretimine yol açmaktadır. Membrana bağlı NADPH oksidazın da önemli bir ROT üretim kaynağı olduğu gösterilmiştir. NADPH oksidaz, AGE'ler, insülin ve angiotensin II gibi çeşitli uyarılar tarafından aktive edilmektedir. Bu uyarıların hepsi de muhtemelen diyabetik şartlar altında uyarılmaktadır (Brownlee, 2005).

2.6.5 Tip 2 diyabette pankreas β -hücresi bozukluğunun ilerlemesinde ROT'ların rolü

β -hücrelerinin yüksek glukoz konsantrasyonlarına akut olarak maruz kalması insülin geninin ifadesini uyarmakta, kronik olarak maruz kalması ise çeşitli β -hücresi fonksiyonlarını olumsuz etkilemektedir. Ancak kronik hiperglisemi, insülin biyosentezi ve salgılanmasının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu olay, diyabetik koşullar altında sıklıkla gözlenen ve β -hücresi glukoz toksisitesi adı verilen bir süreçtir. Diyabette, hiperglisemi ve ardından gerçekleşen ROT üretimi insülin geni ifadesini ve salgılanmasını azaltmakta ve

nihayetinde apoptoza yol açmaktadır (Kaneto ve ark., 1996; Weir ve ark., 2001). İnsülin gen ifadesinin kaybolmasına, transkripsiyon faktörleri olan pankreatik ve duodönal homeobox-1 (PDX-1) (Kaneto ve ark., 1999, Tanaka ve ark., 2002) ve MafA'nın (Moran ve ark., 1997; Poytout ve Robertson, 2002; Harmon ve ark., 2005) ekspresyonunda ve/veya DNA bağlanma aktivitelerinde bir azalmanın eşlik ettiği gösterilmiştir. Yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra bu iki transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ve/veya DNA bağlanma aktivitesi azalmaktadır. PDX-1'in; pankreas gelişimi, β -hücreleri farklılaşması ve olgun β -hücresinin devamında önemli bir rol oynadığına dikkat çekilmektedir. MafA ise, yakın zamanlarda izole edilmiş β -hücrelerine özgü bir transkripsiyon faktörüdür ve insülin geninin transkripsiyonunda güçlü bir aktivatör olarak işlev görmektedir (Olbrot ve ark., 2002; Matsuoka ve ark., 2007).

Diyabetik şartlar altında, ROT'lar indüklenmekte ve β -hücresinin glukoz toksisitesinde yer almaktadır (Matsuoka ve ark., 1997; Holland ve ark., 2002). β -hücreleri, bir yüksek-Km glukoz taşıyıcısı olan GLUT2'yi eksprese eder ve bu yüzden yüksek glukoz konsantrasyonlarına maruz kaldığında yüksek seviyeli glukoz alınımı gerçekleşir. ROT markörleri olan 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG) ve 4- hidroksi-2, 3-nonenal (4-HNE)'nin ekspresyonunun diyabetik koşullar altında adacıklarda arttığı gösterilmiştir (Ihara ve ark., 1999; Gorogawa ve ark., 2002). Bunlara ilaveten, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin nispeten düşük ekspresyonu nedeniyle β -hücreleri ROT'lara karşı oldukça hassastır (Lenzen ve ark., 1996; Tiedge ve ark., 1997). Dolayısıyla; ROT'lar diyabetlerde görülen β -hücreleri sorunlarında muhtemelen yer almaktadır. β -hücrelerinden elde edilen hücre hatları veya ratlardan izole edilen adacıklar ROT'lara maruz bırakıldığında, insülin geni promoter aktivitesi ve mRNA ekspresyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Kaneto ve ark., 1999; Tanaka ve ark., 2002). Ek olarak, bunlar ROT'a maruz bırakıldıklarında PDX-1 ve/veya MafA'nın insülin gen promotoruna bağlanması önemli oranda azalmıştır. Ayrıca, yüksek glukoz konsantrasyonuna kronik olarak maruz kaldıktan sonra gerçekleşen insülin geni ekspresyonundaki azalmanın, antioksidan tedavisi ile engellendiği gösterilmiştir (Ihara ve ark., 1999; Kaneto ve ark., 1999; Tanaka ve ark., 1999; Tanaka ve ark., 2002).

Yüksek glukoz kronik maruz kalmanın yol açtığı PDX-1 ve MafA'nın ekspresyonu ve DNA'ya bağlanma aktivitelerinde görülen azalmanın da antioksidan tedavisi ile engellendiği gösterilmiştir. Bu sonuçlar; kronik hipergliseminin, artan ROT nedeniyle insülin biyosentezini ve salgılanmasını baskıladığını ve önemli iki pankreatik transkripsiyon faktörü olan PDX-1 ve MafA'nın ekspresyonu ve DNA'ya bağlanma aktivitelerinde azalmanın bu olaya eşlik ettiğini göstermektedir. Transkripsiyon faktörlerinde görülen bu gibi değişiklikler, insülin biyosentezi ve salgılanmasının baskılanmasını kısmen açıklamakta ve dolayısıyla β -hücreleri glukoz toksisitesinde yer almaktadırlar. Gerçekten de, N-asetil-L-sistein, C vitamini ve E vitamini ile yapılan antioksidan tedavisinin, glukozun uyardığı insülin salınımını sürdürdüğü ve obez diyabetik farelerde glukoz toleransını kısmen düzelttiği gösterilmiştir (Kaneto ve ark., 1999). β -hücre kitlesi antioksidan uygulanan farelerde önemli ölçüde daha büyük olduğu ve antioksidan uygulanması insülin içeriğini koruduğu tespit edilmiştir. Antioksidan uygulanmasını takiben, PDX-1 ekspresyonu β -hücrelerinin çekirdeklerinde daha açık olarak görülmüştür (Kaneto ve ark., 1999). Benzer etkiler, Tip 2 diyabet hastalığında model hayvan olarak kullanılan Zucker diyabetik şişman farelerde de gözlenmiştir (Tanaka ve ark., 1999.). Dolayısıyla, antioksidan uygulamasının β -hücrelerini glukoz toksisitesine karşı koruyacağı düşünülebilir.

Lipotoksitenin, Tip 2 diyabette görülen β -hücrelerinin işlevinin bozulmasında yer aldığı bilinmektedir. Adacık hücreleri veya β -hücrelerinden elde edilen hücre hatları serbest yağ asitlerine (SYA) maruz bırakıldıklarında ROT'lar indüklenmiş ve bu durum insülin salınımında azalmaya ve sonuç olarak da β -hücre bozukluğuna yol açmıştır (Carlsson ve ark., 1999; Bikopoulos ve ark., 2008).

2.6.6 Tip 2 Diyabette İnsülin Direncinin İlerlemesinde ROT'ların Rolü

Tip 2 diyabetin göstergesi insülin direnci ve pankreas β -hücrelerinin işlevlerinde görülen bozukluklardır. Diyabet koşullarında; karaciğer, kas ve yağ gibi çeşitli insülin hedef dokuları insüline dirençli hale gelmektedir. İnsülin direncinin patofizyolojisi karmaşık bir

insülin sinyal ağı içermektedir. İnsülin, hücre yüzeyindeki insülin reseptörüne bağlandıktan sonra, insülin reseptörü ve substratı fosforillenmekte ve bu olay çeşitli insülin sinyal yollarının aktivasyonuna yol açmaktadır (Kahn ve Flier, 2000; Shulman, 2000; Saltiel ve Kahn, 2001). ROT'ların, insülin direnci ve pankreas β -hücrelerinin fonksiyon bozukluğunda yer aldığı gösterilmiş durumdadır (Evans ve ark., 2002). ROT'un, insülin reseptör substratı-1'in (IRS-1) ve fosfatidilinositol-3-kinazın (PI 3-K) hücre içinde yeniden dağılımını engellediği ve böylelikle 3T3-L1 adiposit hücrelerde insülince indüklenen GLUT4 translokasyonunu bozduğu rapor edilmiştir (Rudich ve ark., 1998). Ayrıca, N-asetil-L-sistein ve taurin antioksidanlarıyla yapılan muamelenin *in vivo* olarak hipergliseminin yol açtığı insülin direncini önlediği bildirilmiştir (Haber ve ark., 2003). Tip 2 diyabet hastalarında, bir antioksidan olan α -lipoik asitin verilmesi insülin direncini artırmıştır. Bu olay da, insülin direncinin ilerlemesinde ROT'ların bir rolünün olduğunu düşündürmektedir (Jacob ve ark., 1999; Konrad ve ark., 1999).

Diyabetik şartlar altında, hiperglisemi ROT'ların artmasına neden olmakta, bu durum da muhtemelen c-Jun Nterminal kinaz (JNK) yolağının aktivasyonuna yol açmaktadır (Kaneto ve ark., 2002). Ayrıca, serbest yağ asitleri, tümör nekroz faktörü alfa (TNF α) gibi çeşitli inflamatuvar sitokinler ve endoplazmik retikulum stresi diyabetik koşullar altında artmakta ve JNK yolağının aktivasyonu gerçekleşmektedir. JNK yolağının aktivasyonunun, diyabetik hastalarda görülen pankreas β -hücresi bozukluğunda ve insülin direncinde de yer aldığı ileri sürülmüştür (Hotamisligil, 2005; Wellen ve Hotamisligil, 2005). JNK yolağının, obez Tip 2 diyabet farelerin karaciğer, kas ve adipoz dokularında anormal derecede aktive edildiği ve JNK-KO farelerde insülin direncinin önemli ölçüde azaldığı rapor edilmiştir (Hirosumi ve ark., 2002). JNK-KO farelerle kontrol grubu fareler yüksek yağlı ve yüksek kalorili bir diyetle beslendiklerinde, obez JNK-KO farelerin kan glukoz seviyeleri obez yabanıl tip farelere kıyasla önemli oranda daha düşük olduğu görülmüştür. Sonuçlar, JNK-KO farelerin beslenme ve obezite kaynaklı insülin direncinin gelişmesinden korunduğunu göstermiştir. JNK1 yetersizliğinin muhtemelen, diyabetin hem genetik hem de beslenme modellerinde obezite, hiperglisemi ve hiperinsülinemiye karşı direnç sağladığı ileri sürülmüştür. Bu sonuçlar, Tip 2 diyabette görülen insülin direncinin gelişiminde JNK

yolağının aktivasyonunun önemli bir rol oynadığını düşündürmektedir (Hirosumi ve ark., 2002).

2.6.7 Bozuk antioksidan savunma sistemi

Azalmış antioksidan seviyeleri, normalin dışında antioksidan enzim aktiviteleri (artma/azalma) ve MDA gibi oksidatif stres markörlerinin seviyesinin artması gibi bozuk bir antioksidan savunma sistemini gösteren durumlar DM'ta oldukça yaygındır (Maritim ve ark., 2003; Johansen ve ark., 2005; Rahimi ve ark., 2005; Erejuwa ve ark., 2010a). Diyabette, bozuk bir antioksidan savunma sisteminin neticesi olarak RT'nin yeterince giderilememesi artan oranda oksidatif strese neden olabilir. Diyabette görülen antioksidan savunma sisteminin bozukluğuna yol açan mekanizmalar henüz iyi bir şekilde anlaşılmış değildir. Çalışmalar, antioksidan enzimlerin birlikte fonksiyon gördüklerinde optimum düzeyde bir koruma sağladıklarını göstermektedir (Michiels ve ark., 1994). Dolayısıyla, antioksidan enzimlerin herhangi birinin glikasyonu, antioksidan savunma sisteminin tamamının etkinliğini bozabilir. Örneğin, eğer SOD aktivitesi bozulursa, bu durum $O_2^{\bullet -}$ birikmesine yol açabilir. Öte yandan, eğer SOD aktivitesi up-regüle edilirse, bu durum H_2O_2 miktarlarının artmasına neden olabilir. Her iki durumda da, CAT veya GPx aktivitesi etkilenecektir.

2.6.8 Diyabetes mellitusun patogenezinde oksidatif stresin rolü

Kanıtlar, diyabetes mellitusun çeşitli gelişim safhalarında - diyabet öncesinden, glukoz toleransının bozulmasına, oradan tokluk hiperglisemisinden orta haldeki diyabet ve nihayetinde de tam diyabetes mellitusa kadar - oksidatif stresin rol oynadığını göstermektedir (Ceriello ve ark., 1998). β -hücre fonksiyonunun kaybı her iki tip diyabetin patogenezinde de görülen bir olgudur (Drews ve ark., 2010). β -hücre fonksiyon bozukluğunun yanısıra, insülin direnci de Tip 2 diyabetin önemli karakteristik özelliklerindedir (Evans ve ark., 2003). Oksidatif stres, hem β -hücre fonksiyon

bozukluğu hem de insülin direnci patogenezinde önemli bir rol oynamaktadır (Evans ve ark., 2003; Drews ve ark., 2010).

2.6.9 β -hücre fonksiyon bozukluğunda oksidatif stresin rolü

β -hücreleri, SOD, GPX ve CAT gibi antioksidan enzimleri düşük seviyelerde ekspres ederler ve dolayısıyla oksidatif strese karşı hassas bir konumda bulunurlar (Tiedge ve ark., 1997). β -hücrelerindeki yüksek mitokondriyel ROT üretimi, glikoliz ve TCA döngüsü aracılığıyla artan glukoz veya yağ asidi akımından kaynaklanmaktadır. Bu durum, $O_2^{\bullet -}$ üretilmesine, o da diğer ROT ve reaktif azot türlerinin üretilmesine yol açmaktadır. Antioksidan enzimlerin bu ROT'ları gidermede yetersiz kalması oksidatif strese sebep olmaktadır. Mitokondrilerin yanısıra, NADPH oksidazlar, nitrik oksit sentazlar ve fagositler de β -hücrelerinde önemli ROT kaynaklarıdır (Drews ve ark., 2010). Kanıtlar Tip 1 diyabette, otoimmün reaksiyonlar, sitokinler ve inflamatuvar proteinlerin yol açtığı β -hücre bozukluğunda ROT'ların bir rolü olduğunu göstermektedir (Drews ve ark., 2010).

Benzer şekilde Tip 2 diyabette de, β -hücre bozukluğu ve insülin direncinde ROT'lar rol oynamaktadır (Drews ve ark., 2010). β -hücre bozukluğunda glukotoksisitesinin rolü, yüksek glukoz konsantrasyonlarının diyabet hastası olmayan deneklerde insülin salınımını bozduğunu gösteren çalışmalarla ortaya konmuştur (Marchetti ve ark., 2008). Bunun tersine, iyi glisemik (kandaki şeker düzeyi) kontrol Tip 2 diyabet hastalarında insülin salgılanmasını artırmaktadır (Marchetti ve ark., 2008). Antioksidanların, yüksek glukozun insülin mRNA'sı, insülin içeriği ve salgılanma ekspresyonu üzerindeki toksisitesini azaltması veya engellemesi, glukotoksisitenin toksik etkilerinin ortaya çıkmasında oksidatif stresin rolü olduğu fikrini desteklemektedir (Tanaka ve ark., 1999).

2.6.10 İnsülin direncinde oksidatif stresin rolü

İnsülin direnci, diyabetin başlangıcından önce gerçekleşir ve genetik yapı, yüksek kalori tüketimi, hareketsiz bir yaşam tarzı, obezite, hamilelik ve aşırı derecede yükselmiş hormon

seviyeleri gibi çeşitli çevresel faktörler tarafından etkilenir (Evans ve ark., 2003). Oksidatif stresin insülin direnci patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2006). Hem piruvat hem de yağ asitleri kaslarda ve yağ dokularında enerji substratı olarak iş görürler. Piruvat, glukoz ve diğer şekerlerden, yağ asitleri ise yağlardan elde edilir. Bu yakıt substratları hücrelerde mitokondri zarından içeri taşındıktan sonra, mitokondriyel enzimlerce asetil CoA'ya dönüştürülür. Sitrik asit döngüsü esnasında, asetil CoA'daki karbon atomlarının oksidasyonu sonucunda CO₂ üretilir. CO₂ yanısıra, sitrik asit döngüsü tarafından NADH ve FADH₂ ile taşınan yüksek enerjili elektronlar oluşturulur. Kas ve yağ dokularına yüksek seviyelerde enerji substratı alınımı sitrik asit döngüsünün aktivitesini artırır. Bu durum, gerekenden daha fazla mitokondriyel NADH üretir. Bu olay da, yüksek hızda oksidatif fosforilasyona ve sonuçta mitokondri zarının proton gradiyentinde artışa neden olur. Yüksek enerjili bu elektronlar O₂'e aktarılır; bu, O₂^{•-} oluşumuna ve daha sonra da diğer ROT'ların üretilmesine yol açar. Böylece bu olay, oksidatif strese zemin hazırlar (Talior ve ark., 2003). Yapılan çalışmalarda, yüksek yağ içerikli bir diyetle beslenme sonucu insülin direnci geliştiren farelerin iskelet kaslarının daha fazla miktarda mitokondriyel H₂O₂ ürettiği ve kontrollere göre normal redoks dengesini korumada başarılı olamadığı bildirilmiştir (Anderson ve ark., 2009). İnsüline dirençli, morbit obez insanlarda da benzer bulgular gözlemlenmiştir (Anderson ve ark., 2009).

Oksidatif stresin, insülin direncine yol açabileceği çeşitli mekanizmalar tespit edilmiştir. Bu mekanizmalar şunlardır: oksidatif stres – insülin bozukluğu – yağ dokusu hücrelerinde GLUT4 translokasyonu (Rudich ve ark., 1998), oksidatif stres – insülin protein kinaz B'nin insülince uyarılmasının bozulması ve yağ dokusu hücrelerine glukoz taşınması (Rudich ve ark., 1999), oksidatif stres – PI3-kinaza bağlı sinyal yolağıyla p38 MAPK aktivasyonu arasındaki etkileşimin tetiklenmesi (Kim ve ark., 2006), ve yağ dokusu hücrelerinde insülin reseptörü substrat-1 ve fosfatidilinositol 3-kinazın insülince gerçekleştirilen hücresel dağılımının bozulması (Tirosh ve ark., 1999). Diğer çalışmalar oksidatif stresin doğrudan; glukoz alınımı, insülin sinyali ve glikojen sentezini bozmak suretiyle iskelet kaslarında önemli oranda insülin direncine yol açabileceğini göstermektedir (Dokken ve ark., 2008). Oksidatif stresin neden olduğu bu insülin direnci, kısmen insülin tarafından gerçekleştirilen

glikojen sentaz kinaz-3'ün (GSK-3beta) baskılanmasının azalmasından kaynaklanmaktadır (Dokken ve ark., 2008; Henriksen, 2010).

Yüksek seviyelerdeki glukozun yol açtığı oksidatif strese karşı koruma amaçlı olarak (Talior ve ark., 2003), hücreler daha fazla enerji veya substratın hücreye erişimini kısıtlamak suretiyle cevap verir. Oksidatif fosforilasyon için gerekli olan NADH miktarını sınırlandırmak için, α -ketoglutarat dehidrogenaz'ın baskılanması gibi çeşitli mekanizmalar devreye girmektedir. Dolayısıyla, besinlerin insüline bağlı alınımını sınırlandırmak için, insülin reseptörleri insüline karşı duyarlılıklarını gittikçe kaybetmektedir. Bu olay insülin direncinin başlangıcını belirlemektedir. İnsülin direncinde, normal seviyelerdeki insülin, iskelet kası ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokulardaki glukoz taşıma sistemini artık aktive edemez hale gelir. Bu durum, kandaki glukoz seviyelerinin sürekli yüksek olmasıyla sonuçlanır. Bu koşullardaki insülin direncinin, daha fazla glukoz ve yağ asidinin alınmasını önlemek için hücreler tarafından kullanılan bir telafi mekanizması olduğunu savunanlar da vardır (Hoehn ve ark., 2009). Bu telafi mekanizması, reaktif türlerin oluşumu ve birikiminin azalmasını ve sonuçta oksidatif stresin ve hasarın azalmasını sağlıyor olabilir. Sürekli yüksek seviyelerde kalan kan glukozu ile birlikte, hiperglisemi başlamakta ve Tip 2 diyabete yol açmaktadır.

2.7 Diyabetik nöropati etiyopatogenezi

Diyabetik nöropatinin patogenezinde birçok mekanizma öne sürülmüştür. Bunlar arasında; direkt sinir hasarı yapan metabolik süreçler, endonöral mikrovasküler hasar, otoimmün inflamasyon ve azalmış nörotrofik destek sayılabilir. Epidemiyolojik çalışmalar Tip 1 ve Tip 2 DM hastalarında hiperglisemi süre ve ciddiyetinin diyabetik nöropati gelişiminde majör risk olduğunu göstermiştir (Genuth, 2006).

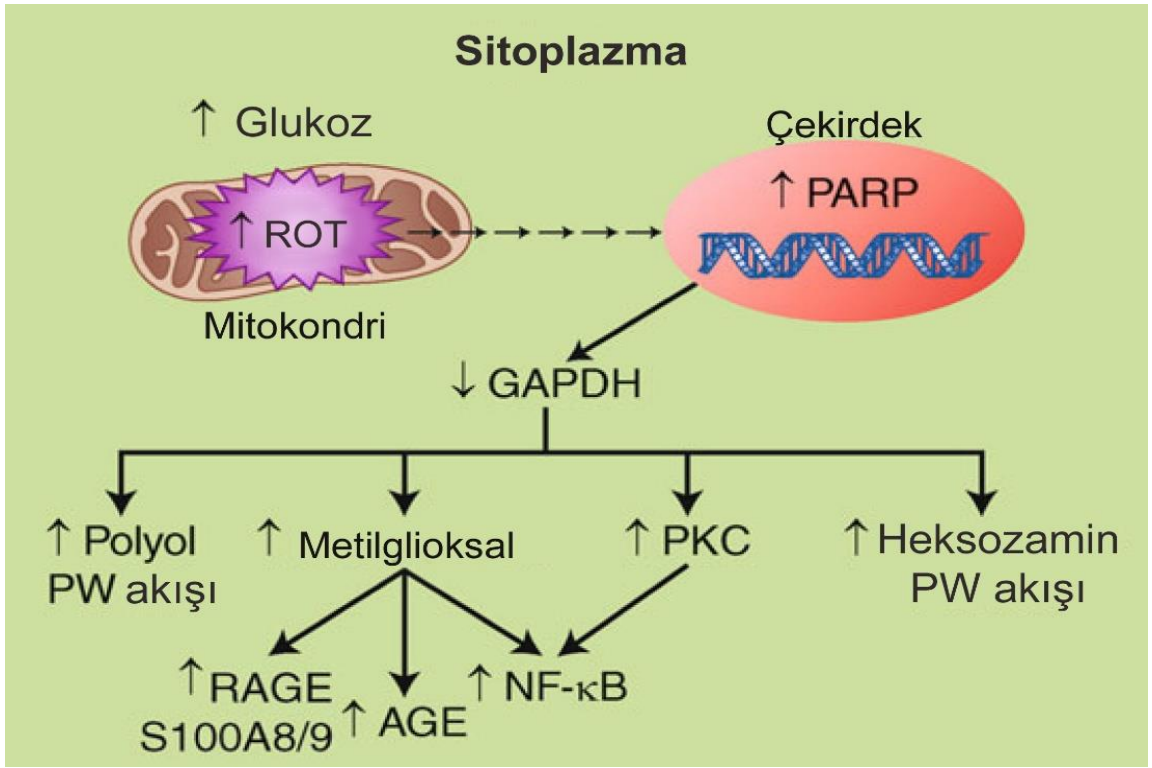
2.7.1 Diyabetik nöropati ve hiperglisemi

Hem Tip1 DM hem de Tip2 DM, hem küçük (mikroanjyopati) hem de büyük kan damarlarını (makroanjyopati) etkileyen spesifik bazı lezyonların oluşmasına doğru

seyreden yavaş bir süreçle karakterizedir. Diyabetin klasik mikrovasküler komplikasyonları; diyabetik retinopati (yetişkinlerde körlüğün birincil sebebi), gelişmiş ülkelerde diyaliz ve böbrek nakillerinin ana nedeni olan diyabetik böbrek rahatsızlıkları ve tez konumuz olan diyabetik nöropatidir. Çalışmalar; kronik hipergliseminin bu komplikasyonlarda, özellikle de mikroanjiyopatide, görülen diyabetik doku hasarının başlıca nedeni olduğunu göstermektedir (DCCT Research Group, 1993; UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998). Aynı şekilde, diyabetik periferik nöropatinin (DPN) gelişmesindeki ana faktör kronik hipergliseminin kümülatif etkisidir, yani diyabetin süresi ve metabolik kontrol düzeyidir. Gittikçe artan deliller kronik hiperglisemi sonucunda görülen oksidatif stres ve endotel bozukluğunun, hipergliseminin zararlı etkilerinin ortaya çıkmasında anahtar rol oynadığını düşündürmektedir. Hiperglisemi, kronik diyabetik komplikasyonların gelişmesinde başlıca risk faktörü olmakla birlikte, genetik faktörler de önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. Bazı genetik faktörler, tüm mikrovasküler komplikasyonlarda (diyabetik retinopati, diyabetik böbrek rahatsızlıkları ve diyabetik nöropati) ortak payda olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunlara ek olarak, yüksek tansiyon ve insülin direnci gibi bazı metabolik olaylar da hızlandırıcı faktörler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Ancak, DPN'in gelişmesinde katkısı olan epidemiyolojik ilişkilerin açığa çıkarılmasında önemli ilerlemeler gerçekleştirilmesine rağmen, altta yatan moleküler patogenezi ve gelişme mekanizmaları hala tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Mevcut bilgiler; DPN'in, sinirsel dokuyu beslemekten sorumlu mikrodamarların hasar görmesinden kaynaklandığını düşündürmektedir. Bu da, sinirsel yapıların doğrudan zarar görmesiyle ilişkili olarak, mikroanjiyopatinin bir rolü olduğunu düşündürmektedir. Her iki olay da, kronik hiperglisemi ve oksidatif stress gibi metabolik olaylarla, sinir-kan damarlarının mikroanjiyopatisi gibi faktörlerin arasındaki bir etkileşimin ve sinir dokusunun tamir mekanizmasının bozulmasının sonucu ortaya çıkmaktadır (Boulton, 2007). Vasküler ve metabolik mekanizmalar eş zamanlı olarak etki göstermekte ve bir diğerinin etkisini artırmaktadır. Sinirsel mikroanjiyopatinin mevcudiyeti, DPN'in diyabetin kronik mikrovasküler komplikasyonlarından biri olarak kabul edilmesinin ana nedenidir.

DPN'in gelişmesindeki başlıca faktör, süregiden hiperglisemidir (diyabetin süresi ve metabolik kontrol düzeyi) (Vinik ve ark., 2000; DCCT Research Group, 1993; Tesfaye ve ark., 2005). Kronik hiperglisemi DPN'in gelişimine, diğer tüm mikrovasküler komplikasyonlarda görülen mekanizmayla yol açmaktadır. Brownlee ve ark. tarafından ileri sürülen bir mekanizmaya göre; bu olaydaki kilit element, oksidatif fosforilasyon esnasında mitokondriyel elektron taşıma zinciri tarafından süperoksit (O_2^-) anyonlarının aşırı üretilmesinin yol açtığı hiperglisemidir (Brownlee, 2005; Nishikawa ve ark., 2000) (Şekil 2.8)



Şekil 2.8: Hipergliseminin tetiklediği aşırı mitokondriyel ROT üretimi sonucu, diyabetik hücre hasarına yol açan ana yolların aktive edilmesi. (PARP: PoliADP-riboz polimeraz, GAPDH: Gliseraldehid-3-Fosfat Dehidrogenaz, PKC: protein kinaz C, AGE: glikasyon son ürünleri, RAGE: glikasyon son ürünleri reseptörü). (Giacco ve Brownlee, 2012)

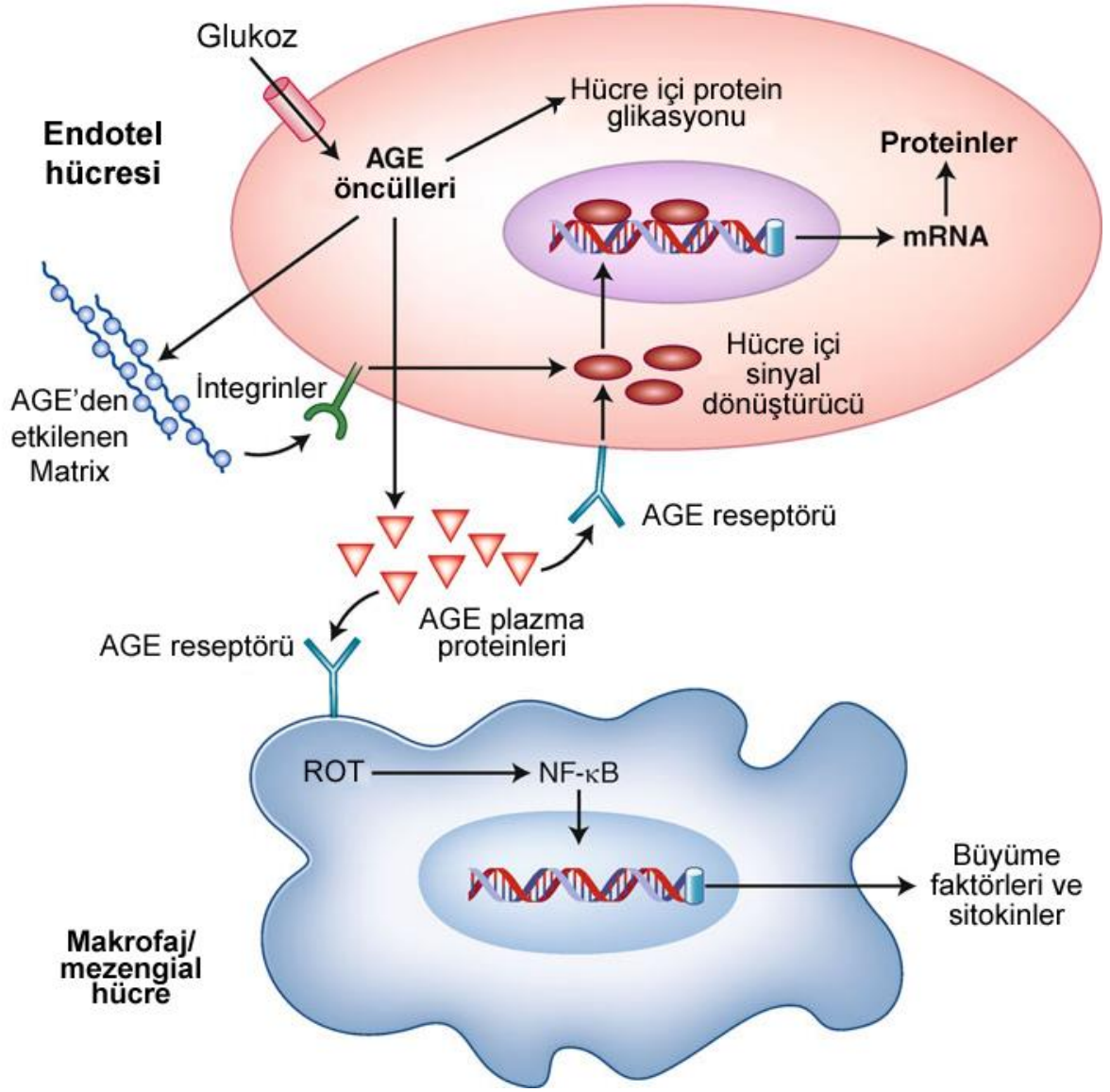
Bu modele göre; hiperglisemi ROT'ların mitokondride üretimini artırmakta, bunu çekirdek DNA iplikçığının bozulması izlemekte, bu olay da poli ADP-riboz polimeraz enzimini

aktive etmekte ve sonuç olarak diyabetik komplikasyonlara yol açan dört ana yolağın aktive edilmesini netice veren bir olaylar zincirine yol açmaktadır. Bu yolaklar:

1. Artan aldoz redüktaz aktivitesi ve polyol yolağının aktivasyonu: sinirsel ödem, sinir iletiminde bozukluk ve nihayetinde apoptoz gibi ozmotik etkilere yol açan artan sorbitol birikimi (Boulton, 2007). Sürekli olan hiperglisemi, sinirlerde sorbitol ve früktozun birikmesiyle polyol yolağının aktivitesini artırmakta ve henüz bilinmeyen mekanizmalarla sinirlerde hasara yol açmaktadır. Bu olaya, azalan myoinositol alınımı ve Na⁺/K⁺ - adenozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesinin inhibisyonu eşlik etmekte ve Na⁺ tutulması, ödem, miyelin şişmesi ve sinirlerin dejenerasyonuna sebep olmaktadır.

2. Protein kinaz C (PKC) ve ardından nükleer faktör kappa B (NF-κB) yolağının aktivasyonu: hipergliseminin diaçilgliserol oluşumunu uyardığı ve bunun da PKC'nin aktivasyonuna yol açtığı bilinmektedir (Tesfaye ve ark., 2005). PKC de, birçok genin ekspresyonunun modifikasyonundan sorumlu olan transkripsiyon faktörü NF-κB'yi aktive etmektedir (Cameron ve Cotter, 2008). NF-κB; çok sayıda uyaran tarafından aktive edilen bir transkripsiyon faktörüdür ve çok sayıda çeşitli inflamatuvar ve immün faktörün transkripsiyonunu başlatmakla yükümlüdür.

3. Hücre içinde ileri glikasyon son ürünlerin (AGE) üretilmesi (Brownlee, 2005): AGE'ler; enzimatik olmayan reaksiyonlarla protein, yağ ve nükleik asitlerin serbest amino gruplarıyla şekerlerin indirgenmesi sonucunda oluşan heterojen bir grup moleküldür. Hiperglisemi, proteinlerin ve AGE'lerin enzimatik olmayan glikasyonunu indükler ve bu da NF-κB'yi aktive eder. Süperoksitlerin lokal olarak üretilmesi, α-ketoaldehitli proteindeki L-lizin'in (ve muhtemelen diğer amino asitlerin) kalıntılarının etkileşmesi sonucu olarak da oluşur ve proteinlerle diğer biyomoleküllerin oksidatif olarak modifikasyonu ile sonuçlanır. Sinir liflerinin yapısal ve işlevsel değişikliği aracılığıyla hücre iskeleti proteinlerinin glikasyonu da DN patogenezinde rol almaktadır (Şekil 2.9).

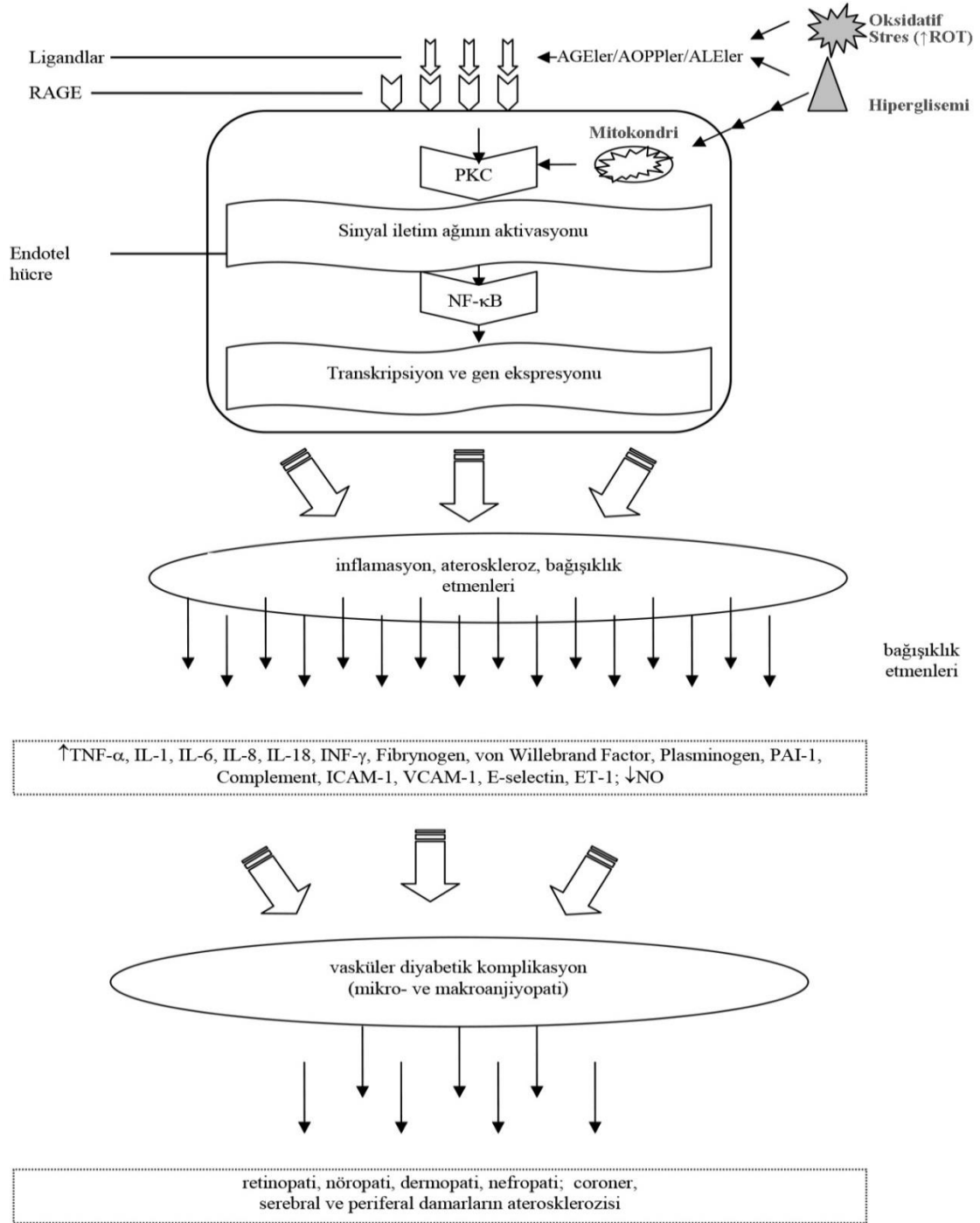


Şekil 2.9: Glikasyon son ürünleri (AGE) kaynaklı hasarın genel mekanizması (Giacco ve Brownlee, 2012)

Çeşitli araştırmalar periferel sinirlerdeki ve bunları besleyen mikrodamarlardaki oksidatif stresin sinirlerde bozulmaya, nörotrofik desteğin zayıflamasına ve aynı zamanda da sinirlerde karakteristik nöropatik morfolojik değişikliklere yol açtığını göstermiştir (Hounsom ve ark., 2001). Çoğu morfolojik, histolojik ve elektrofizyolojik araştırma, DN'ye yapısal sinir değişikliklerinin (karakteristik segmental demiyelinizasyon ve aksonlarda dejenerasyon) ve fonksiyonel değişikliklerin eşlik ettiğini göstermektedir (Said, 2007).

Schwann hücreleri tarafından glukoz alınımı insülden bağımsız olarak gerçekleştiği için, glukoz nöronlara girmekte, orada birikmekte ve aldoz redüktaz yolağını harekete geçirmektedir. Bu metabolik yolak da, sorbitol ve fruktozun birikmesine ve myo-inositolün tüketilmesine yol açmakta ve glutatyon döngüsüne ve Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesine zarar vermektedir.

Nöronlardaki fazla glukoz, serbest radikal oluşumu ve yetersiz antioksidan koruma sisteminin birleşimi sonucu oksidatif stresin artmasına sebep olmaktadır. Mitokondriyel solunum zinciri, NADPH oksidaz ve ksantin redüktaz tarafından üretilen çoğu ROT'ların (O₂⁻, OH, H₂O₂), ve NO sentez enzimi NO-sentaz tarafından üretilen reaktif azot türlerinin (NO, peroksinitrit, ONOO⁻), streptozotocin (STZ) ile muamele edilen farelerde DPN'nin gelişiminde yer aldığı gösterilmiştir (Vincent ve ark., 2004). Bu farelerde serbest radikallerin, hem Schwann hücreleri hem de nöronlar üzerinde zararlı etkiler oluşturduğu gösterilmiştir. ROT zincir reaksiyonları her zaman süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutatyon peroksidaz ile nötralize edilmektedir, ancak bunların dokulardaki miktarları diyabet hastalarında artan oksidatif strresi gidermeye yetecek seviyelerde değildir (Bierhaus ve ark., 2004; Vincent ve ark., 2004) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: Hiperglisemi ve oksidatif stres şartlarında meydana gelen değişikliklerle, RAGE'in reaksiyonuyla ortaya çıkan hücre içi ve hücre dışı sinyal iletim yollarının sonuçları. (RAGE: AGE reseptörü, AGEler: ileri glikasyon son ürünleri, AOPPler: ileri oksidasyon son ürünleri, ALEler: ileri lipoksidasyon son ürünleri, PKC: protein kinaz C, NF- κ B: nükleer faktör kappa B, IL-1,-6,-8,-18: interlökinler-1,-6,-8,-18, TNFC: tümör nekroz faktörü C, IFN γ : interferon I, ICAM-1: hücrelerarası hücre adezyon molekülü-1, VCAM-1: vasküler hücre adezyon molekülü-1, ET-1: endotelin 1, NO: azot oksit.) (Piwowara ve Żurawska-Płaksej, 2014)

2.8 Diyabetik Nöropati ve Antioksidan Enzim Polimorfizmleri

2.8.1. Diyabetik Nöropati ve SOD2

Siliğ ve ark. (2010) 440 sağlıklı birey ile gerçekleştirdikleri çalışmada, Türk popülasyonunda SOD2 Ala16Val polimorfizmlerinin allel ve genotip frekans dağılımlarını, Ala16Ala için %17,5, Ala16Val için %50,5 ve Val16Val için %32,0 olarak tespit etmişlerdir.

Tian ve ark. (2011) SOD2 geninin C47T (Val16Val) polimorfizmini DM riski açısından inceledikleri meta-analizde Çizelge 2.1'deki dağılımı elde etmişlerdir.

Çizelge 2.1: GPX1 geni Pro198Leu ve Pro197Leu genotiplerinin çeşitli araştırmacılarda etnik dağılımı.

Yazarlar	Yıl	Populasyon	Hasta	Kontrol	Genotipler (TT / TC / CC)				G allel frekansı (%)				Erkek % (hasta/kontrol)	Yaş ortalaması (hasta/kontrol)
					Hasta		Kontrol		Hasta		Kontrol			
					Sayı	<i>P_h</i> değeri	Sayı	<i>P_h</i> değeri	Hasta	Kontrol	<i>p</i> value	OR		
Chistyakov et al. [6]	2001	Russian	DM1	NC	15/104/47	0.001	5/47/36	0.053	59.6	67.6	0.084	0.708	58/67	25.0/28.3
el-Masry et al. [12]	2005	Egyptian	DM1	NC	13/88/49	0.003	3/21/16	0.478	62.0	66.3	0.517	0.831	58/63	16.6/19.0
Flekac et al. [13]	2008	Czech	DM1	NC	79/36/5	0.767	52/90/38	1.000	19.2	46.1	0.000	0.277	48/52	40.0/39.0
Flekac et al. [13]	2008	Czech	DM2	NC	220/80/6	0.825	52/90/38	1.000	15.0	46.1	0.000	0.207	51/52	57.0/39.0
Nomiyama et al. [14]	2003	Japanese	DM2	NC	364/111/3	0.089	190/67/4	0.620	12.2	14.4	0.257	0.831	66/60	59.8/48.1
Lee et al. [15]	2006	Korean	DM2	NC	243/57/4	0.761	152/37/3	0.712	10.7	11.2	0.835	0.949	59/58	53.4/52.1
Yang et al. [16]	2007	Chinese	DM2	NC	114/67/6	0.384	66/27/4	0.503	21.1	18.0	0.440	1.217	52/55	55.0/42.0
Ye et al. [17]	2008	Chinese	DM2	NC	192/18/54	0.000	133/15/50	0.000	23.9	29.0	0.082	0.766	49/54	55.0/52.0
Liu et al. [18]	2009	Chinese	DM2	NC	214/39/4	0.244	134/35/3	0.712	9.1	11.9	0.207	0.744	54/52	65.2/59.6
Kangas-Kontio et al. [19]	2009	Finnish	DM1 and DM2	NC	59/105/58	0.423	132/246/115	1.000	49.8	48.3	0.607	1.062	56/49	58.1/51.4

Chistyakov ve ark., 2001 yılında yaptıkları çalışmada SOD2 genindeki C47T polimorfizmi ile diyabetik nöropati arasında önemli bir ilişki olduğunu ilk defa göstermişlerdir. Ala alleli frekansı DN hastalarında %50.6, DN hastası olmayan kontrollerde %68.5, ($p < 0.002$), Ala/Ala genotipi ise %17.1 ve %39.3 ($p < 0.005$) şeklinde olup, bu rakamlar DN hastalarında önemli oranda düşük bulunmuştur. Bunun tersine, Val alleli (%49.4'e karşı %31.5, $p < 0.002$) ve Val/Val genotipi (%15.9'a karşı %2.4, $p < 0.01$) ile DN hastalarında kontrole karşı daha yüksek çıkmıştır. Sonuç olarak, Mn-SOD genindeki Ala(-9)Val değişiminin Rus popülasyonunda DN ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada Tip 1 diyabet riski ile ilgili önemli bir ilişki tespit edilmemiştir. Bu gen polimorfizminin, Tip 1 ve Tip 2 diyabet, diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve diyabetik polinöropati dahil diyabetik mikrovasküler komplikasyonlar (DMI) ile olan ilişkisi araştırılmıştır.

Zotova ve ark., (2003) Tip 1 diyabet hastalarında mitokondriyal (SOD2) ve hücre dışı (SOD3) süperoksit dismutazların single nükleotit polimorfizmleri ile (SOD2: Ala(-9)Val ve SOD3: Arg213Gly) diyabetik polinöropati arasındaki ilişkiyi inceledikleri çalışmalarında, SOD2 ve SOD3'ün Tip 1 DM'de diyabetik polinöropati ile ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. SOD2 Val allelinin polinöropatili hastalarda daha sıklıkla görüldüğünü rapor etmişlerdir. Çalışmada DPN hastaları n = 86 ve kontrol n = 94 olmak üzere, allel değerlerini Ala için hasta: 0.506, kontrol: 0.645, (p: 0.010), Val için hasta: 0.494, kontrol: 0.355 (p:0.010); genotip değerlerini ise Ala/Ala için hasta: 0.198, kontrol: 0.344 (p: 0.030), Ala/Val için hasta: 0.616 kontrol: 0.602 (p: >0.05) ve Val/Val için hasta: 0.186, kontrol: 0.054 (p:0.009) olarak vermişlerdir. Enzimatik olmayan glikasyonun sebep olduğu oksidatif stresin, Tip 1 DM'deki DPN'in önemli risk faktörleri arasında olduğunu bildiren E. V. Zotova ve ark., mitokondrilerinde Mn-SOD (Ala alleli) ile kanlarında EC-SOD (Gly alleli) enzimlerinde daha yüksek aktiviteye yol açacak olan SOD2 ve SOD3 allelleri taşıyan kişilerin SOD2 Val alleli ve SOD3 Arg alleli taşıyanlara göre DPN'den daha iyi korunacaklarını yazmışlardır.

Strokov ve ark. (2003), Tip 1 diyabetik hastası olan Ruslarla yaptıkları çalışmada, SOD2'nin Ala(-9)Val polimorfizmi ve SOD3'ün Arg213Gly polimorfizmi ile diyabetik polinöropati arasındaki ilişkiyi incelemişler ve Mn-SOD extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) enzimlerini kodlayan genlerle diyabetik polinöropati patogenezi arasında bağlantı olduğunu bulmuşlardır. DPN hastaları ve kontrol her ikisi de n=54 olmak üzere, allel değerlerini Ala için hasta: 43, kontrol: 51, (p: 0.002), Val için hasta: 11, kontrol: 3 (p:0.02); genotip değerlerini ise Ala/Ala için hasta: 8, kontrol: 17 (p: 0.03), Ala/Val için hasta: 35 kontrol: 34 (p: NS) ve Val/Val için hasta: 11, kontrol: 3 (p:0.02) olarak vermişlerdir. Ala alleli ve Ala/Ala genotipinin diyabetik polinöropatili (DP) Tip 1 DM

hastalarında önemli oranda seyrek görüldüğünü ve düşük DP riski ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu grupta Val alleli ve Val/Val genotipinin daha yüksek olduğunu, dolayısıyla yüksek DP riski ile ilişkili olduğunu rapor etmişlerdir. Sonuç olarak, SOD2 Ala(-9)Val polimorfizminin Tip 1 DM hastalarında DP ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Nomiyama ve ark. (2003), 478 Japon Tip 2 DM hastasını inceledikleri çalışmalarında, Mn-SOD Val(16)Ala polimorfizminin diyabet ve diyabetik nefropati ile ilişkisini ele almışlardır. Analizleri sonucunda, nefropatili DM hastalarında Val/Val genotipinin frekansının Ala/Ala veya Val/Ala genotipinden daha yüksek olduğunu, sonuçta Mn-SOD'un Val(16)Ala polimorfizminin Tip 2 diyabet etiyojisi ile ilişkisiz olduğunu fakat Japon Tip 2 diyabet hastalarında diyabetik nefropati ile ilişkili gibi görüldüğünü ortaya koymuşlardır.

El-Masry ve ark. (2005), 65 Mısırlı Tip 1 diyabetik çocukla yaptıkları çalışmada, Mn-SOD2 geni Ala(-9)Val polimorfizminin diyabetik nöropati ile ilişkili olduğunu, nefropati oluşumunda ise önemli bir faktör olmadığını belirlemişlerdir. Mn-SOD2 geni allel frekansları DN hasta grubunda, Ala için %48.80, Val için %51.20 şeklinde, genotip frekansları ise Val/Val için %17.50, Val/Ala için %67.50 ve Ala/Ala 15.00 şeklinde gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda allel frekansları, Ala için %66.30, Val için %33.70 olarak, genotip frekansları ise Val/Val için %7.50, Val/Ala için %52.50 ve Ala/Ala 40.00 olarak bulunmuştur. Ala allelinin ve Ala/Ala genotipinin diyabetik nöropatili hastalarda önemli ölçüde daha düşük olduğunu, bunun tersine Val alleli ve homozigot Val/Val genotipinin DN'li hastalarda kontrol grubuna göre önemli oranda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.

Lee ve Choi (2006), 304 Koreli Tip 2 DM hastası ile gerçekleştirdikleri araştırmada, Mn-SOD2 geni V16A polimorfizminin Tip 2 DM gelişimi ve diyabetik retinopati (DR) ve diyabetik maculer edema'nın (DME) ilerlemesi arasında bir ilişki olup olmadığını incelemişlerdir. Sonuçta, V16A polimorfizminin diyabet gelişimi ve DR'nin ilerlemesi ile ilişkili olmadığını, ama DME ile alakalı olduğunu bulmuşlardır.

Lee ve ark. (2006), 371 Koreli Tip 2 DM hastası ile gerçekleştirdikleri çalışmada, Mn-SOD geninin V16A polimorfizminin diyabetin patogenezi ve diyabet hastalarında albuminurinin aşamaları ile ilişkili olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışma sonunda, V16A polimorfizminin diyabetin patogenezi ile ilişkili olmadığını ve fakat Tip 2 diyabetteki albuminurinin aşamaları ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Möllsten ve ark. (2007), 1510 Finli ve İsveçli hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmada, MnSOD (V16A, rs4880) polimorfizminin tek başına veya sigara içme ile birlikte diyabetik nefropati gelişimine katkıda bulunup bulunmayacağını araştırmışlardır. Sigara içen ve Val/Val genotipli yüksek riskli grubun, hiç sigara içmemiş olan ve Val/Ala veya Ala/Ala genotipine sahip olan düşük risk grubuna göre 2.52 kat daha fazla diyabetik nefropati riskine sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Sonuç olarak, sigara içme ve MnSOD Val allel homozigotlu olmanın artan diyabetik nefropati riski ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Flekac ve ark. (2008), bazı antioksidan enzimlerin polimorfizmleri ile DMun (DM) vasküler komplikasyonları arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, makroangiyopati hastalarla bu rahatsızlığı taşımayanlar arasında önemli derecede SOD2 gen polimorfizmlerinin allel ve genotip farklılığı bulunduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, SOD1 ve SOD2'nin genotip dağılımının DM'lu hastalarla hasta olmayanlar arasında farklılık sergileyeceğini ortaya koymuşlardır.

Nakanishi ve ark. (2008), diyabet hastası olmayan ve 75 g oral glukoz tolerans testi (OGTT) uygulanan 523 Japon asıllı Amerikalıyı ortalama 9.9 yıl takip etmişlerdir. MnSOD Ala16Val polimorfizminin Tip 2 diyabet geliştirme konusunda bir risk oluşturup oluşturmadığını araştırmışlardır. Takip periyodunda 65 katılımcı Tip 2 diyabet geliştirmiştir. Ala alleli taşıyanlara kıyasla, Val homozigotlu bireylerin önemli oranda diyabet hastalığı geliştirme riski taşıdığını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, Japon asıllı Amerikalılar arasında MnSOD Ala16Val polimorfizminin Tip 2 diyabet geliştirme ile alakalı olabileceğini vurgulamışlardır. Reaktif oksijen türlerinin yetersiz uzaklaştırılmasının glukoz intoleransına yatkınlık ifade edebileceği yorumunu yapmışlardır.

Petrovic ve ark. (2008), 426 Sloven hastayla gerçekleştirdikleri çalışmalarında Mn-SOD geninin V16A polimorfizminin VV genotipinin hasta grubunda önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Bu genotipin Tip 2 diyabet hastalarındaki retinopati ile ilişkili olduğu ve diyabetik retinopatinin genetik markırı olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Tiwari ve ark. (2009); Hindistan'ın kuzey (149) ve güneyinden (75) iki farklı grup üzerinde yaptıkları ve kronik diyabetik böbrek yetersizliği (CRI) ile gen polimorfizleri arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında, SOD2 Ala9Val polimorfizmi ile güney Hindistan hastalarında bulunan CRI arasında önemli ilişki olduğunu bulmuşlardır. Bu ilişkinin kuzeyli hastalarda hiç bulunmadığını ve bunun diyabetik CRI riski açısından, Hindistan'ın farklı iki bölgesinden olan hasta gruplarının farklı genetik yatkınlık sergilediği anlamına gelebileceğini bildirmişlerdir.

Möllsten ve ark. (2009) Danimarkalı hastalarla yaptıkları çalışmalarında, MnSOD V16A polimorfizmi V allelinin Tip 1 diyabette nefropati gelişimi ile ilişkili olduğunu ve takip evresinde kardiyovasküler hastalık göstergesi olduğunu tespit etmişlerdir.

Tian ve ark., 2011 yılında yayınladıkları ve 17 makaleyi dahil ederek gerçekleştirdikleri bir meta-analizde, SOD2 geninin C47T (rs4880) (Val16Ala) polimorfizmi ile Tip 1 Tip 2 DM ve diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve diyabetik polinöropati dahil diyabetik mikrovasculer komplikasyonların (DMI) düşük riski arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Bu meta-analizde, SOD2 geninin C47T polimorfizmi C allelinin diyabetik nefropati, diyabetik retinopati ve DMI riskine karşı koruyucu etkileri olduğu sonucuna varmışlardır.

Chen ve ark. (2012), 168 Çinli hastada MnSOD Val16Ala (T>C), GPX1 Pro198Leu (C>T), ve CAT -262C/T (C>T) fonksiyonel polimorfizmlerinin Tip 2 diyabet hastalığı veya diyabet CVD üzerine etkisini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonunda, yaygın MnSOD,

GPX1, ve CAT TT+CC+CC genotiplerinin Tip 2 diyabet veya diyabetik CVD'li olan Çinli hastalarda hipertrigliseridemi'ye katkıda bulunabileceğini bildirmişlerdir.

Ascencio-Montiel ve ark. (2013), Meksikalı Tip 2 diyabet hastaları ile yaptıkları çalışmalarında, SOD2 geni Val16Ala polimorfizmi (rs4880) ile albuminuria arasında önemli bir ilişki olduğunu bulmuşlardır.

Vats ve ark. (2015), 207 hastada Tip 2 diyabet hastalığı (T2DM) ile SOD1, SOD2 ve GPX1 gen polimorfizmlerinin ilişkisini araştırdıkları çalışmalarında, yaş hariç diğer tüm biyokimyasal parametrelerin T2DM vakaları ile yüksek oranda bağlantılı olduğunu bulmuşlardır. SOD2 + 47C/T genotip/allel frekansı ve 'C' allelini taşıma oranı arasında önemli bir ilişki olduğunu rapor etmişlerdir ($p < 0.05$, < 0.001 ; OR 2.434). GPX1 + 599C/T genotip/allel frekansı ve taşıma oranı herhangi bir ilişki göstermemekle birlikte, GPX1'in 'C' allelinin OR (odds ratio) değerinin, 1.362 kat daha fazla T2DM riski olduğuna işaret ettiğini bildirmişlerdir. SOD2 'CT' ve GPX1 'CC' genotipleri, biyokimyasal parametrelerle maksimum ilişki sergilemiştir. Analizler, SOD2 + 47C/T ve GPX1 + 599C/T genotiplerine sahip bireyler 1.273 kat daha fazla T2DM geliştirme riski taşıdıklarını göstermiştir. Yazarlar sonuç olarak, bir popülasyondaki risk haplotiplerinin belirlenebilmesi için, gen varyantlarının bileşik etkileri ile T2DM arasındaki ilişkinin değerlendirilmesinin önemli olduğunu belirtmişlerdir.

2.8.2. Diyabetik Nöropati ve GPX1

Süzen ve ark. (2010), bir Türk popülasyonunda CAT C-262T ve GPX1 Pro198Leu genotipik varyantların dağılımını inceledikleri çalışmalarında, GPX1 Pro198Leu için genotip frekanslarını 0.416 (CC), 0.44 (CT), ve 0.144 (TT) olarak tespit etmişlerdir. Buldukları sonuçların rapor edilen diğer popülasyonlarla karşılaştırıldığında önemli etnik farklılık sergilediğini bildirmişlerdir. Zhang ve ark. (2014), GPX1'in Pro198Leu ve Pro197Leu polimorfizmlerini kardiyovasküler risk açısından değerlendirdikleri bir meta-

analizde, çeşitli etnik kökenlere göre genotip frekanslarını inceleyip Çizelge 2.2'deki dağılımı elde etmişlerdir.

Çizelge 2.2: GPX1 geni Pro198Leu ve Pro197Leu genotiplerinin çeşitli araştırmacılara göre etnik dağılımı.

GPx-1 Pro198Leu ve Pro197Leu polimorfizmlerinin hasta ve kontrollere göre dağılımı													
	Etnik Köken	Hasta			Kontrol			Hasta		Kontrol		OR (95%CI)	P-HWE
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	T	C	T	C		
Forsberg, ve ark.	Doğu Asyalı Olmayan	56	38	7	113	85	16	52	150	117	311	0.90 (0.45–1.35)	1.00
Sergeeva, ve ark.	Doğu Asyalı Olmayan	56	41	6	27	19	6	53	153	31	73	0.78 (0.13–1.43)	0.97
Hamanishi, ve ark.	Doğu Asyalı	35	18	0	116	15	0	18	88	15	247	3.98 (1.68–9.38)	0.78
Oguri, ve ark.	Doğu Asyalı	84	21	2	315	37	2	25	189	41	667	2.13 (0.72–3.55)	0.69
Nemoto, ve ark.	Doğu Asyalı	6	5	0	65	15	0	5	17	15	145	3.61 (0.75–16.16)	0.57
Tang, ve ark.	Doğu Asyalı	197	65	3	222	43	0	71	459	43	487	1.70 (1.08–2.69)	0.54
Kuzuya, ve ark.	Doğu Asyalı	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	Yok	1.34 (0.90–1.78)	0.27
Ramprasath, ve ark.	Doğu Asyalı Olmayan	101	118	22	137	128	20	162	320	168	402	1.29 (0.84–1.73)	0.35
Chen, ve ark.	Doğu Asyalı	62	23	0	63	20	0	23	147	20	146	1.17 (0.55–2.49)	0.18
Zeikova, ve ark.	Doğu Asyalı Olmayan	79	71	22	206	176	30	115	229	236	588	1.13 (0.73–1.54)	0.99

Hamanishi ve ark. (2004), Tip 2 diyabet hastası 184 Japonda, ateroskleroz ile GPX1 geninin varyantları arasındaki ilişkiyi araştırdırılmışlardır. Ortalama karotid arterlerin intima-media kalınlığının (IMT) ve kardiyovasküler hastalık ile periferik vasküler hastalık prevalansının Pro/Leu grubunda Pro/Pro grubuna kıyasla önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlardır. Gerçekleştirdikleri in vitro analizlerde GPX1 geninin Ala6/198Leu polimorfizminin enzim aktivitesinde %40 azalma tespit etmişlerdir. Bu çalışmada GPX1 geninin işlevsel varyantlarının; diyabet hastalarında karotis intima-media kalınlığının artması ve kardiyovasküler hastalık ve periferik vasküler hastalık riski arasında bir ilişki olduğunu ortaya koymuşlardır.

Dutkiewicz ve ark. (2010), 159 hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmada, hastalara böbrek nakli sonrasında oluşan post-transplant diabetes mellitus (PTDM) ile SOD1 Ala16Val, CAT rs1001179 ve GPX1 Pro200Leu gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Analizleri sonucunda SOD1 ve CAT gen polimorfizmleri ile PTDM arasında herhangi bir ilişki tespit edemezken, GPX1 geninin Pro200Leu polimorfizminin PTDM ile ilişkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Ek olarak, 200Leu (599T alleli) bulunduran hastaların bu komplikasyona karşı daha açık olabileceklerini belirtmişlerdir.

Panduru ve ark. (2011), 238 hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, GPX1 geninin Pro198Leu olarak da bilinen Pro200Leu polimorfizminin Tip 1 diyabet hastalarında diyabetik nefropati gelişimi riski ile ilişkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçların, Pro200Leu polimorfizminin 200Pro allelinin ileri diyabetik nefropati geliştirme riskini artırdığını rapor etmişlerdir. İlişki testinde, ProPro polimorfizminin risk genotip olduğu, LeuLeu genotipinin ise koruyucu tip olduğunu bildirmişlerdir.

Matsuno ve ark. (2011), GPX1 geninin Pro198Leu missense polimorfizminin periferik nöropati ile ilişkili olup olmadığını araştırmışlardır. Diyabetik sensörimotor distal simetrik polinöropati (DSPN) ve diyabetik otonom nöropati (DAN) hastalıklarını ayrı ayrı değerlendirmişlerdir. Pro/Pro, Pro/Leu ve Leu/Leu genotip frekansları tüm diyabetik hastalarda, sırasıyla %86.1, %13.9 ve %0 olarak bulunmuştur. Pro/Leu genotipinin frekansı DSPNli diyabetik hastalarda %21.5 ile kontrol grubuna %7.5, (P=0.0076) göre önemli oranda yüksek bulunmuştur. Pro/Leu genotipinin frekansı açısından, %12.0 Pro/Leu frekansı sergileyen DAN'li diyabet hastaları ile %14.2 Pro/Leu frekansına sahip (P = 0.7696) DAN'siz grup arasında önemli fark bulunmamıştır. 173 Tip 2 diyabet hastası üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmalarının sonucunda, GPX1 geninin Pro198Leu missense polimorfizminin, diyabetik sensörimotor distal simetrik polinöropati (DSPN) ve macrovasküler hastalıklarına (MVD) genetik bir yatkınlık ifade edebileceği kanaatine varmışlardır.

Tang ve ark. (2012), birbirinden bağımsız iki farklı hasta grubu ile yaptıkları çalışmada rs1050450 glutathione peroxidase-1 (C > T) gene varyantı Pro198Leu ile periferik nöropati arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bu çalışmada, birinci grupta yer alan nöropatili hastalarda (558); genotip değerleri CC (Pro/Pro) %47.5, CT (Pro/Leu) %40.1, TT (Leu/Leu) %12.4 olarak, kontrol grubunda ise aynı değerler sırasıyla %37.4, %51.2 ve %11.4 (p=0.01) olarak tespit edilmiştir. İkinci gruptaki nöropatili hastalarda (319); genotip değerleri CC (Pro/Pro) %51.1, CT (Pro/Leu) %43.0, TT (Leu/Leu) %6.0 şeklinde, kontrol grubunda ise sırasıyla %34.9, %60.3 ve %4.8 (p=0.02) şeklinde belirlenmiştir. T alleli taşıyanlarda periferik nöropati göreceli olasılık (OR) oranı, CC genotipine göre 1.61

[1.10e2.28], $p=0.01$ olarak bulunmuştur. Sonuç olarak; T alleli, periferal nöropati ve LDL oksidasyonu arasında kuvvetli bir ilişki bulunduğunu bildirmişlerdir.

Zhang ve ark. (2014), GPX1'in rs1050450, Pro198Leu ve Pro197Leu polimorfizmlerini ele aldıkları meta-analizde, bu polimorfizmlerin özellikle Uzakdoğu Asya popülasyonlarında kardiyovasküler hastalık (CVD) riski açısından, istatistiksel anlamda önemli olmakla birlikte az miktarda ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Etnik farklılıkların genetik çalışmalarda heterojenlik üreten bir faktör olduğuna dikkat çekmişlerdir. Önceki çalışmalarda T allelinin dağılım sıklığının beyazlarda %36, Afrikalılarda %33 ve Japonlarda %5 olarak rapor edildiğini, kendi çalışmalarında ise Doğu Asyalılarda %8.57 ve Doğu Asyalı olmayanlarda %29.56 oranları ile benzerlik bulunduğunu belirtmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bu meta-analizin sonucunda, GPX1 geninin Pro198Leu ve Pro197Leu varyantlarının Doğu Asyalı popülasyonlarda CVD riskini önemli oranda artırdığını ve bu sonuçların diğer etnik gruplardaki çalışmalarla doğrulanması gerektiğini ifade etmişlerdir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubunun Seçimi

Çalışmamız Gaziosmanpaşa Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Hastanesi Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Polikliniği'ne başvuran kişiler arasından seçilmiştir. Diyabetik Nöropati hastalığı tanısı konmuş ve Diyabetik Nöropati hastası tanısı dışında bilinen başka hastalığı olmayan 100 birey çalışmamızın hasta grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise; Diyabetik Nöropati hastası tanısı almamış, bilinen herhangi bir sistemik ve enflamatuvar hastalığı olmayan 100 birey oluşturmaktadır. Çalışmaya başlamadan önce Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na başvuru yapılmış ve 14-KAEK-193 proje numarasıyla etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Saklanması

Çalışma için gerekli koşulları taşıyan bireylere çalışmamız hakkında bilgi verilmiş olup, "Aydınlatılmış Onam Formu" imzalatılarak çalışmaya katılmaları sağlanmıştır. Çalışmaya katılan bireylerin rutin tetkikler için verdikleri EDTA içeren tüplere alınan tam kan örnekleri Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler Biyokimya Laboratuvarı'nda +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Toplanan tam kanlardan elde edilen DNA örnekleri çalışma için gerekli sayıya ulaşana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.3. DNA İzolasyonu

Tam kandan DNA izolasyonu Vivantis marka GF-1 Blood DNA Extraction Kit kullanılarak yapılmıştır. DNA izolasyonu için aşağıdaki prosedür uygulanmıştır.

- EDTA'lı tüpte bulunan tam kan oda sıcaklığına getirildikten sonra alt-üst edilerek homojenize edilmiştir.

- EDTA'lı tüpte bulunan tam kandan 200 µL 1,5 mL hacimli tüpe alınmıştır.
- Tüpe alınan tam kanın üzerine 200 µL binding buffer ve 20 µL proteinaz K konduktan sonra karıştırılmıştır.
- Isıtıcı blokta 10 dakika boyunca 65 °C sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
- Bekleyen karışım üzerine 200 µL saf etanol eklendikten sonra tekrar karıştırılmıştır.
- Filtreli tüpe konulan karışım 1 dk süreyle 5000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- Dipte kalan sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Filtreli tüpe 500 µL wash buffer 1 eklenmiştir.
- Filtreli tüp 1 dk süreyle 5000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- Dipte kalan fazla sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Filtreli tüpe 500 µL wash buffer 2 (yıkama solüsyonu 2) filtreli tüpe eklenmiştir.
- Filtreli tüp 1 dk süreyle 5000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- Dipte kalan fazla sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Filtreli tüpe 500 µL yıkama solüsyonu 2 tekrar eklenmiştir.
- Filtreli tüp 3 dk süreyle 5000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- Dipte kalan fazla sıvı uzaklaştırılmıştır.
- Filtreli tüp 10 saniye süreyle 13.000 rpm' de santrifüj edilmiştir.
- Filtreli tüp yeni bir tüpe alınmıştır.
- Önceden 65 °C sıcaklıkta ısıtılmış 100 µL elution buffer filtreli tüpe konulmuştur.
- 5000 rpm' de 1 dk süreyle santrifüj edilmiş ve filtre uzaklaştırılmıştır.
- Tüp içerisinde kalan sıvıda DNA elde edilmiştir.

3.4. Polimorfizmlerin Tespit Edilmesi

SOD2 Ala-9Val ve GPX1 Pro198Leu polimorfizmlerinin tespiti Real-Time PCR yöntemi ile Floresan Rezonans Enerji Transfer (FRET) hibridizasyon problemleri kullanılmış ve erime eğrisi analizi yapılarak gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon prob yönteminde farklı floresan boylarla etiketli, donör ve akseptör adı verilen istenen diziye özgü oligonükleotit problemler kullanılmıştır. Bu problemler PCR ile çoğalan DNA parçasının hedef dizilerine

hibritleşmektedir. Bu durum floresan boya ile işaretli iki probu birbirine yakın hale getirmektedir. Donör boya uygun uyarma filtresi seçilerek uyarılmaktadır. İki boya birbirine yakinken floresan işaretli akseptör prob farklı bir dalga boyunda floresan ışığı yaymaktadır. Floresan işaretli iki probun arasındaki bu etkileşime FRET denilmektedir. Yayılan floresan ışınım miktarı, PCR sırasında üretilen hedef DNA miktarı ile doğru orantılıdır. Bu sayede PCR ile gerçekleşen DNA artışı gözlemlenebilir hale getirilmektedir. PCR işleminin hemen sonrasında uygulanan erime eğrisi analiziyle polimorfizm tespiti yapılmaktadır. Erime eğrisi analizi PCR ürünlerinin PCR sonrası analizi, PCR ürün karakterizasyonu veya mutasyonların tespiti için kullanılmaktadır. Erime eğrisi analizinin prensibi mutasyon taşımayan hedef diziyeye göre tasarlanmış bir hibridizasyon probunun kendine mükemmel uyan mutasyonsuz diziyeye eşleşmesi durumunda, tek nükleotit polimorfizmi taşıyan hedef diziyeye eşleşmesinden daha yüksek sıcaklıklarda erimesi temeline dayanmaktadır. Çünkü mükemmel olarak eşleştirilmiş prob (örneğin normal tipe özgül prob) daha kararlı olduğundan, yanlış eşleştirilmiş tekli nükleotit mutasyonu taşıyan bir hedef diziyeye bağlı olan probdan daha yüksek sıcaklıkta eriyecektir. Hibridizasyon problemlerinin altındaki sıcaklıklarda, floresan işaretli prob çifti hedef diziyeye eşleşir ve bu donör probu akseptör proba yakınlılaştırarak FRET üretir. Sıcaklık problemlerin erime derecesine yükseldikçe prob çifti ayrılacak ve artık FRET üretmeyecektir. Bu erime floresan sinyalinde düşüşe neden olmaktadır. Sonuçta polimorfizm taşıyan ve taşımayan diziler tespit edilebilmektedir.

Real-Time PCR ve erime eğrisi analizi LightCycler[®] 480 II (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switserland) cihazında, LightCycler[®] 480 Software 1.5.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Uygulanan Real-Time PCR işlemi sonunda DNA miktarındaki artışı gösteren amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi analizi sonucu elde edilen eğrime eğrisi ve erime eğrisinden elde edilen erime piki grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen bu grafiklere göre SOD2 Ala-9Val ve GPX1 Pro198Leu gen polimorfizmlerinin tespiti yapılmıştır.

3.4.1. SOD2 Ala-9Val Gen Polimorfizminin Tespit Edilmesi

SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin belirlenmesi için gerekli primer ve hibridizasyon prob seti (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) daha önce yapılan bir çalışmaya göre (Akbaş, 2009) sentezletirilmiştir. Primer ve probe dizileri Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin dizileri

Primer/Prob	Oligonükleotit Dizisi
İleri Primer:	5'-CAGCCTGCGTAGACGGTCCC
Geri Primer:	5'-CGTGGTGCTTGCTGTGGTGC
Prob1:	5'-CTCCGGCTTTGGGGTATCTG—FL
Prob2:	5'-LC640-GCTCCAGGCAGAAGCACAGCCTCC—PH

SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespiti için PCR karışımı optimizasyonu Çizelge 3.2’deki gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.2. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR koşulları

İçerik	Hacim	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon
İleri Primer	2 mL	5 pmol/mL	0,5 mM
Geri Primer	2 mL	5 pmol/mL	0,5 mM
Prob1	2 mL	1,5 pmol/mL	0,15 mM
Prob2	2 mL	1,5 pmol/mL	0,15 mM
MgCl₂	1,6 mL	25 mM	2 mM
FastStart Master Mix	2 mL	10X	1X
Kalıp DNA	5 mL	40 ng/mL	10 ng/mL
H₂O	3,4 mL	-	-
Toplam hacim	20 mL	-	-

Hazırlanan PCR karışımı polimorfizm tespiti üzere LightCycler 480 II cihazına yerleştirilmiştir. Aşağıdaki Çizelge 3.3.'de gösterilen PCR prosedürü izlenecek şekilde PCR işlemi başlatılmıştır.

Çizelge 3.3. SOD2 Ala-9Val gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR prosedürü

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95 °C	600 sn	1
	95 °C	5 sn	
Amplifikasyon	60 °C	10 sn (Tek Okuma)	32
	72 °C	15 sn	
Erime Eğrisi Analizi	95 °C	30 sn	
	45 °C	30 sn	1
	75 °C	0,19 °C/sn (Sürekli Okuma)	
Soğutma	40 °C	30 sn	1

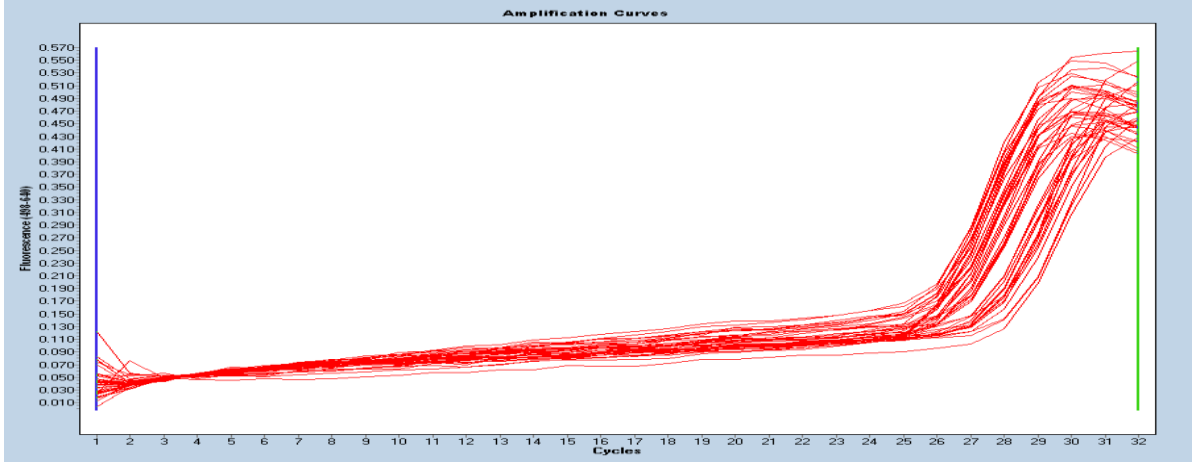
Çalışma sonunda elde edilen amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi ve erime piki grafikleri Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

Çalışma sonunda oluşan erime eğrisinde, pik derecelerine göre hasta ve kontrol grubuna ait bireylerin genotiplendirilmeleri SOD2 Ala-9Val polimorfizmi için; SOD2 Ala-9Ala, SOD2 Ala-9Val ve SOD2 Val-9Val olarak belirlenmiştir.

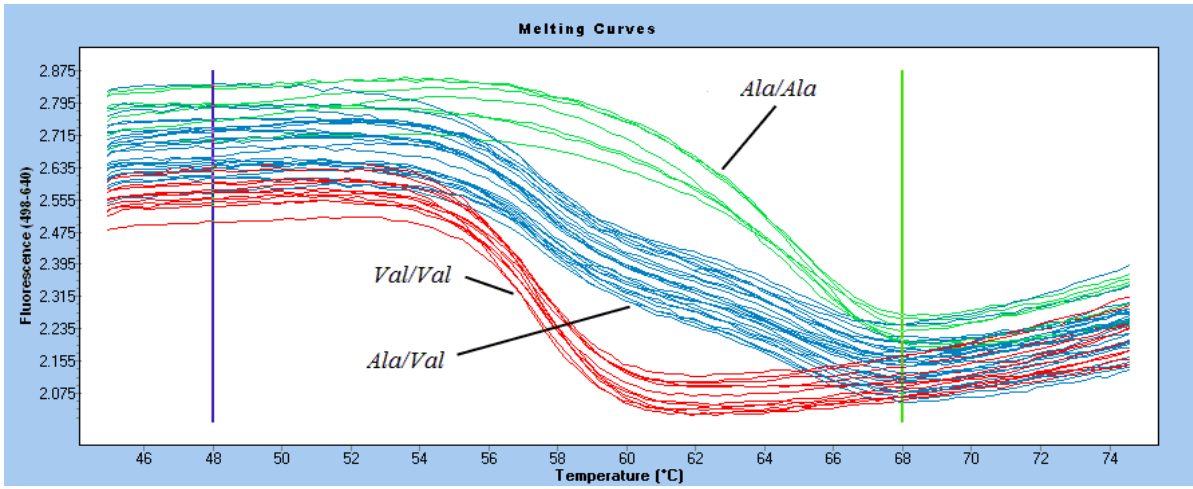
SOD2 Ala-9Val polimorfizmi için genotip belirlenmesi şu şekilde yapılmıştır;

- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 65 °C'de tek bir pik şeklinde ise iki allel de alanin (Ala) amino asidini kodlamaktadır (SOD2 Ala-9Ala).
- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 57 °C ve 65 °C'de iki pik şeklinde ise allellerden biri alanin (Ala), diğeri valin (Val) amino asidini kodlamaktadır (SOD2 Ala-9Val).

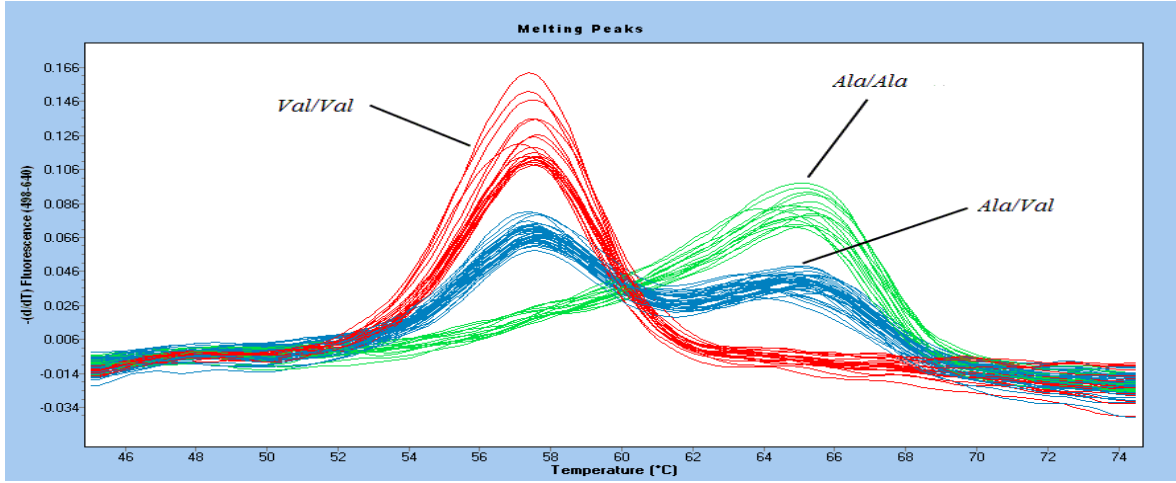
- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 57 °C’de tek bir pik şeklinde ise iki allel de valin (Val) aminoasidini kodlamaktadır (SOD2 Val-9Val).



Şekil 3.1. SOD2 Ala-9Val için amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.2. SOD2 Ala-9Val için erime eğrisi



Şekil 3.3. SOD2 Ala-9Val için erime pikleri

3.4.2. GPX1 Pro198Leu Gen Polimorfizminin Tespit Edilmesi

GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespiti için gerekli primer ve hibridizasyon prob seti (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, Germany) daha önce yapılan bir çalışmaya göre (Akbaş, 2009) sentezletirilmiştir. Primer ve probe dizileri Çizelge 3.4’de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.4. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan primer ve prob setinin dizileri

Primer/Prob	Oligonükleotit Dizisi
Forward Primer	5'-ACTTTGAGAAGTTCCTGGTG
Rewerse Primer	5'-TTCCTCCCTCGTAGGTTTAG
Prob1	5'-LC640-TGCTGTCTCAAGGGCCCAG—PH
Prob2	5'-CAGACCATTGACATCGAGCCTGACATCGAA—FL

GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespiti için PCR karışımı optimizasyonu Çizelge 3.5’de görüldüğü gibi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.5. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR koşulları

İçerik	Hacim	Başlangıç Konsantrasyonu	Son Konsantrasyon
İleri Primer	2,6 mL	5 pmol/mL	0,65 mM
Geri Primer	2,6 mL	5 pmol/mL	0,65 mM
Prob1	2 mL	1,5 pmol/mL	0,15 mM
Prob2	2 mL	1,5 pmol/mL	0,15 mM
MgCl₂	0,8 mL	25 mM	1 mM
FastStart Master Mix	2 mL	10X	1X
Kalıp DNA	4 mL	40 ng/mL	10 ng/mL
H₂O	4 mL	-	-
Toplam hacim	20 mL	-	-

Hazırlanan PCR karışımı polimorfizm tespiti yapmak üzere LightCycler 480 II cihazına yerleştirilmiş olup, Çizelge 3.6’da belirtilen PCR prosedürü izlenecek şekilde PCR işlemine geçilmiştir.

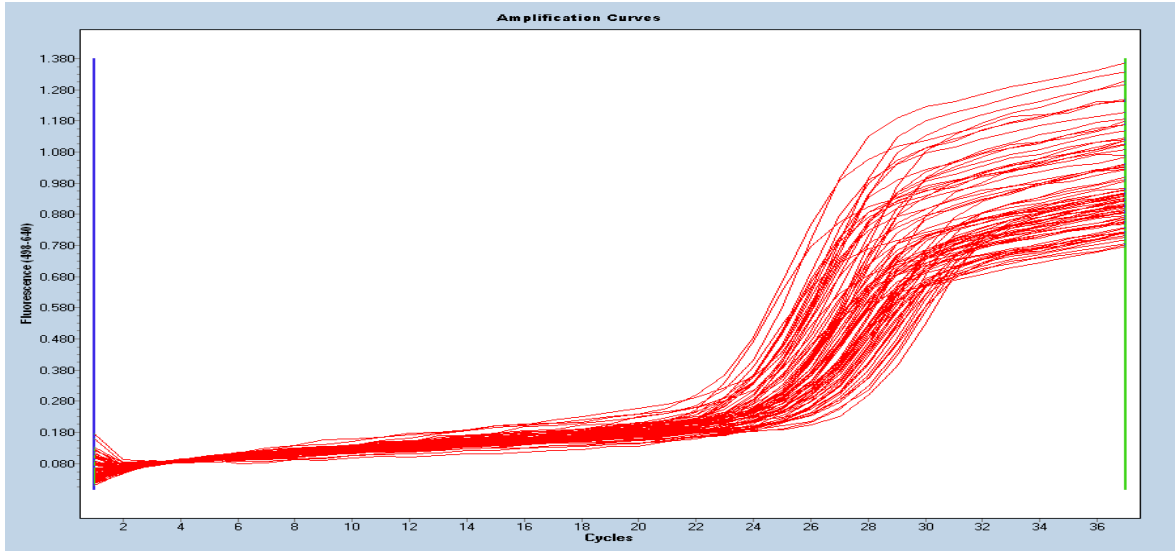
Çizelge 3.6. GPX1 Pro198Leu gen polimorfizminin tespitinde kullanılan PCR prosedürü

PCR Aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Denaturasyon	95°C	600 sn	1
	95°C	10 sn	
Amplifikasyon	60°C	20 sn (Tek Okuma)	37
	72°C	20 sn	
	95°C	30 sn	
Erime Eğrisi Analizi	40°C	30 sn	1
	75°C	0,1 °C/sn (Sürekli Okuma)	
Soğutma	40°C	30 sn	1

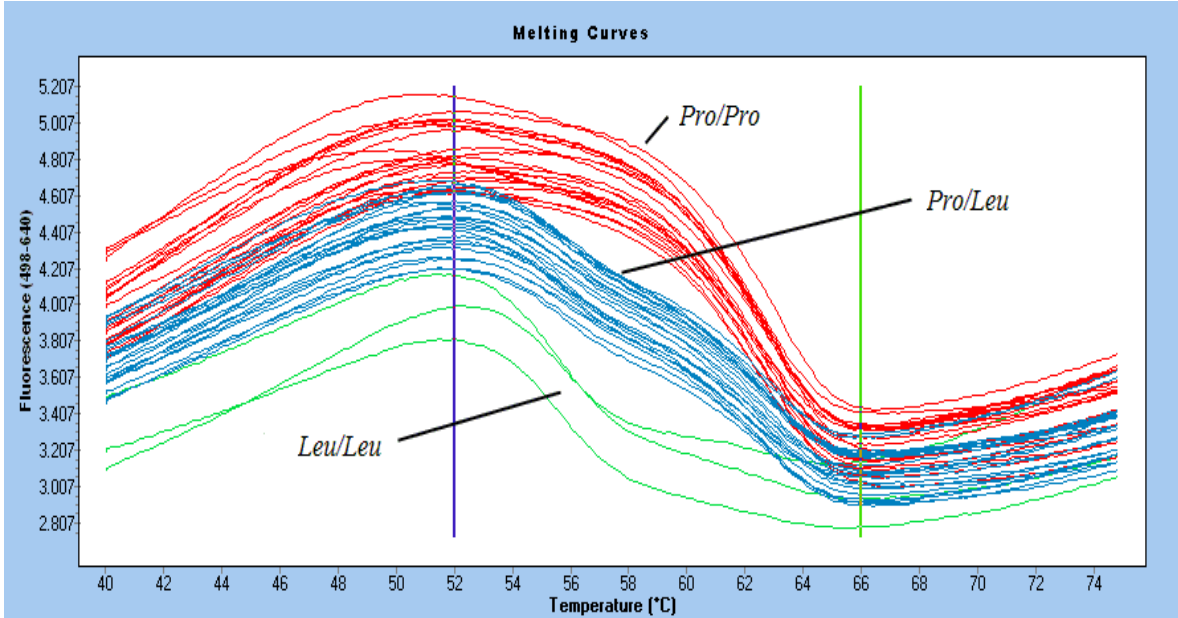
Çalışma sonunda elde edilen amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi ve erime piki grafikleri Şekil 3.4, Şekil 3.5 ve Şekil 3.6’da gösterilmiştir.

GPX1 Pro198Leu polimorfizmi için genotip belirlenmesi şu şekilde yapılmıştır;

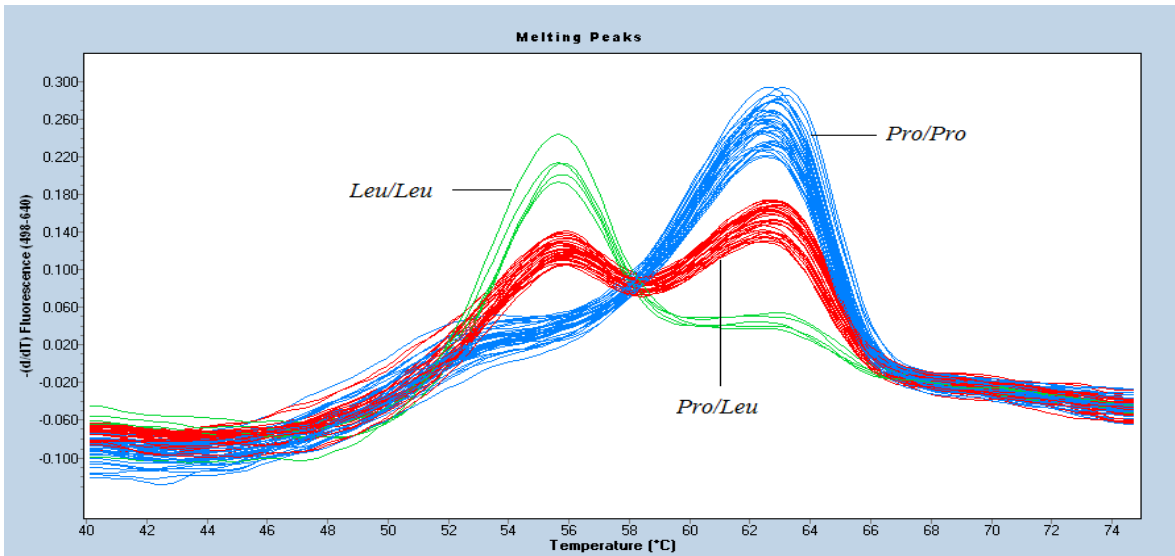
- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 63 °C’de tek bir pik şeklinde ise iki allel de prolin (Pro) aminoasidini kodlamaktadır (GPX1 Pro198Pro).
- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 63 °C ve 55 °C’de iki pik şeklinde ise allellerden biri prolin (Pro), diğeri lösin (Leu) aminoasidini kodlamaktadır (GPX1 Pro198Leu).
- Erime eğrisi analizi sonunda oluşan erime piki 55 °C’de tek bir pik şeklinde ise iki allel de lösin (Leu) aminoasidini kodlamaktadır (GPX1 Leu198Leu).



Şekil 3.4. GPX1 Pro198Leu için amplifikasyon eğrisi



Şekil 3.5. GPX1 Pro198Leu için erime eğrisi



Şekil 3.6. GPX1 Pro198Leu için erime pikleri

3.5. İstatistik Analizler

Tüm veriler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir. Tüm istatistik hesaplamaları SPSS 21.0 programı ile yapılmıştır (SPSS Inc. Chicago, IL). Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile analiz edilmiştir. Gruplar arasındaki verilerin karşılaştırılmasında Samples T Test ve Mann-Whitney U Test kullanılmıştır. Gruplar arası genotip frekanslarının ve kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi kullanılmıştır. Göreli oranlar lojistik regresyon analiziyle belirlenmiştir. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Demografik Özellikler

Kontrol grubunu oluşturan 100 bireyin %27'si erkek, %73'ü kadın olup yaş ortalaması $54,28 \pm 9,36$ olarak bulunmuştur. Diyabetik Nöropati hastası grubunu oluşturan 100 bireyin ise 30'u erkek, 70'i kadın olup yaş ortalamaları $55,87 \pm 9,18$ olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu ve Diyabetik Nöropati grubu arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Kontrol ve Diyabetik Nöropati hastalarının demografik özellikleri

Demografik	Kontrol $n = 100$	Nöropati $n = 100$	P
Erkek/Bayan (N)	27 (%27) / 73 (%73)	30 (%33) / 70 (%70)	0,638
Yaş (yıl)	$54,28 \pm 9,36$	$55,87 \pm 9,18$	0,227

(Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde verilmiştir.)

4.2. Genotip Frekansları

Kontrol ve hasta gruplarının genotip frekanslarına bakıldığında kontrol grubunda MnSOD Ala-9Val genotiplerin yüzde oranları; %13.1 Ala/Ala, %46.5 Ala/Val, %44.4 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Diyabetik Nöropati hastaları grubunda ise bu oranlar; %12.1 Ala/Ala, %52.5 Ala/Val, %35.4 Val/Val şeklindedir. MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından kontrol ve hasta grupları arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. MnSOD Ala9Val genotip frekansları

Genotip	Kontrol $n = 99$	DNP $n = 99$
Ala/Ala	13 (%13,1)	12 (%12,1)
Ala/Val	46 (%46,5)	52 (%52,5)
Val/Val	37,5 (%44,4)	35 (%35,4)

P= 0,690

GPX1 Pro198Leu genotiplerinin kontrol grubundaki yüzdeler oranları %51.5 Pro/Pro, %37.4 Pro/Leu, %11.1 Leu/Leu, hasta grubunda ise bu oranlar; %49 Pro/Pro, %43 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak bulunmuştur. Bu oranlar ele alınarak kontrol ve hasta grubu arasında genotip frekanslarına bakılarak yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. GPX1 Pro198Leu genotip frekansları

Genotip	Kontrol <i>n</i> = 99	DNP <i>n</i> = 100
Pro/Pro	51 (%51,5)	49 (%49)
Pro/Leu	37 (%37,4)	43 (%43)
Leu/Leu	11 (%11,1)	8 (%8)
P= 0,619		

4.2.1. Diyabetik nöropati hastalarında cinsiyete göre genotip frekansları

Hasta gruplarının genotip frekanslarına bakıldığında erkek genotip dağılımı MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %20 Ala/Ala, %56.7 Ala/Val, %23.3 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Diyabetik Nöropati hastası olan kadın grubunda ise bu oranlar; %8.7 Ala/Ala, %50.7 Ala/Val, %46.6 Val/Val şeklindedir. MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hasta cinsiyetleri arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. MnSOD Ala9Val hastalarda cinsiyetlerine göre genotip frekansları

Genotip	Erkek <i>n</i> =30	Kadın <i>n</i> = 69
Ala/Ala	6 (%20)	6 (%8,7)
Ala/Val	17 (%56,7)	35 (%50,7)
Val/Val	7 (%23,3)	28 (%46,6)
P= 0,128		

Hasta gruplarının genotip frekanslarına bakıldığında erkek genotip GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları; %40 Pro/Pro, %46.7 Pro/Leu, %13.3 Leu/Leu olarak tespit

edilmiştir. Diyabetik Nöropati hastası olan kadın grubunda ise bu oranlar; %52.9 Pro/Pro, %41.4 Pro/Leu, %5.7 Leu/Leu olarak bulunmuştur. GPX1 Pro198Leu genotipleri açısından hasta cinsiyetleri arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. GPX1 Pro198Leu hastalarda cinsiyetlerine göre genotip frekansları

Genotip	Erkek <i>n</i> =30	Kadın <i>n</i> = 70
Pro/Pro	12 (%40)	37 (%52,9)
Pro/Leu	14 (%46,7)	29 (%41,4)
Leu/Leu	4 (%13,3)	4 (%5,7)
P= 0,306		

4.2.1. Diyabetik nöropati hastalarının ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları

Diyabetik Nöropati hastası olanların ilaç kullanma durumlarına (insülin yada oral antidiyabetik kullanmalarına) göre genotip frekanslarına bakıldığında insülin kullananların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %12.5 Ala/Ala, %62.5 Ala/Val, %25 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Oral Antidiyabetik ilaç kullananların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %12 Ala/Ala, %50.7 Ala/Val, %37.3 Val/Val şeklindedir. İlaç kullanmayan Diyabetik Nöropati hastası olanların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %12.5 Ala/Ala, %50 Ala/Val, %37.5 Val/Val şeklindedir. MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hastaların ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. MnSOD Ala9Val hastalarda ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları

Genotip	İnsülin <i>n</i> = 16	Oral Antidiyabetik <i>n</i> = 75	İlaç Kullanmayan <i>n</i> = 8
Ala/Ala	2 (%12,5)	9 (%12)	1 (%12,5)
Ala/Val	10 (%62,5)	38 (%50,7)	4 (%50)
Val/Val	4 (%25)	28 (%37,3)	3 (%37,5)

P= 0,918

Diyabetik Nöropati hastası olanların ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında insülin kullananların genotip GPX1 Pro198Leu genotiplerin yüzde oranları; %75 Pro/Pro, %18.8 Pro/Leu, %6.3 Leu/Leu olarak tespit edilmiştir. Oral Antidiyabetik ilaç kullananların GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları;; %44.7 Pro/Pro, %47.4 Pro/Leu, %7.9 Leu/Leu olarak bulunmuştur. İlaç kullanmayan Diyabetik Nöropati hastası olanların GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları ise; %37.5 Pro/Pro, %50 Pro/Leu, %12.5 Leu/Leu olarak bulunmuştur. GPX1 Pro198Leu genotipleri açısından ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. GPX1 Pro198Leu hastalarda ilaç kullanma durumlarına göre genotip frekansları

Genotip	İnsülin <i>n</i> = 16	Oral Antidiyabetik <i>n</i> = 76	İlaç Kullanmayan <i>n</i> = 8
Pro/Pro	12 (%75)	34 (%44,7)	3 (%37,5)
Pro/Leu	3 (%18,8)	36 (%47,4)	4 (%50)
Leu/Leu	1 (%6,3)	6 (%7,9)	1 (%12,5)

P= 0,306

4.2.2. Diyabetik nöropati hastalarında Retinopati olup olmamasına göre genotip frekansları

Diyabetik Nöropati hastası olanların Retinopati varlığına göre genotip frekanslarına bakıldığında MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %9.7 Ala/Ala, %64.5 Ala/Val, %25.8 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Retinopati olmaması durumunda MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %13.2 Ala/Ala, %47.1 Ala/Val, %39.7 Val/Val olarak gerçekleşmiştir. Bu durum MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hastaların Retinopati varlığı/yokluğu açısından genotip frekansları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. MnSOD Ala9Val hastalarda Retinopati olup olmamasına göre genotip frekansları

Genotip	Var <i>n</i> =31	Yok <i>n</i> = 68
Ala/Ala	3 (%9,7)	9 (%13,2)
Ala/Val	20 (%64,5)	32 (%47,1)
Val/Val	8 (%25,8)	27 (%39,7)

P= 0,270

Diyabetik Nöropati hastalarının Retinopati varlığına göre genotip frekanslarına bakıldığında GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları; %56.3 Pro/Pro, %34.4 Pro/Leu, %9.4 Leu/Leu olarak tespit edilmiştir. Retinopati olmaması durumunda GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları ise; %45,6 Pro/Pro, %47.1 Pro/Leu, %7.4 Leu/Leu olarak bulunmuştur. GPX1 Pro198Leu genotipleri Retinopati varlığı/yokluğu açısından genotip frekansları arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. GPX1 Pro198Leu hastalarda Retinopati olup olmasına göre genotip frekansları

Genotip	Var <i>n</i> =32	Yok <i>n</i> = 68
Pro/Pro	18 (%56,3)	31 (%45,6)
Pro/Leu	11 (%34,4)	32 (%47,1)
Leu/Leu	3 (%9,4)	5 (%7,4)
P= 0,489		

4.2.3. Diyabetik nöropati hastalarında hipertansiyon olup olmasına göre genotip frekansları

Diyabetik Nöropati hastası olanların hipertansiyon olup olmama durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında hipertansiyon olanların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %12.2 Ala/Ala, %51 Ala/Val, %36.7 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Diyabetik Nöropati hastalarında hipertansiyon bulunmaması durumunda MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %12 Ala/Ala, %54 Ala/Val, %34 Val/Val şeklindedir. Diyabetik Nöropati hastalarında hipertansiyon olup olmaması MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından genotip frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. MnSOD Ala9Val hastalarda hipertansiyon olup olmasına göre genotip frekansları

Genotip	Var <i>n</i> =49	Yok <i>n</i> = 50
Ala/Ala	6 (%12,2)	6 (%12)
Ala/Val	25 (%51)	27 (%54)
Val/Val	18 (%36,7)	17 (%34)
P= 0,953		

Diyabetik Nöropati hastası olanların hipertansiyon olup olmama durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında hipertansiyon olanların GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde

oranları; %48 Pro/Pro, %44 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak tespit edilmiştir. Diyabetik Nöropati hastalarında hipertansiyon bulunmaması durumunda GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları ise; %50 Pro/Pro, %42 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak bulunmuştur. Diyabetik Nöropati hastalarında hipertansiyon olup olmaması GPX1 Pro198Leu genotipleri açısından genotip frekansları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. GPX1 Pro198Leu hastalarda hipertansiyon olup olmamasına göre genotip frekansları

Genotip	Var	Yok
	<i>n</i> =50	<i>n</i> = 50
Pro/Pro	24 (%48)	25 (%50)
Pro/Leu	22 (%44)	21 (%42)
Leu/Leu	4 (%8)	4 (%8)
P= 0,978		

4.2.4. Diyabetik nöropati hastalarında sigara içip içmemeye göre genotip frekansları

Diyabetik Nöropati hastası olanların sigara kullanma durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında sigara kullananların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %15.8 Ala/Ala, %73.7 Ala/Val, %10.5 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Sigara kullanmayan Diyabetik Nöropati hastası olanların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %11.4 Ala/Ala, %46.8 Ala/Val, %41.8 Val/Val şeklindedir. MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hastaların sigara kullanma durumlarına göre genotip frekansları arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.12).

Çizelge 4.12. MnSOD Ala9Val hastalarda sigara içip içmemeye göre genotip frekansları

Genotip	Evet <i>n</i> =19	Hayır <i>n</i> = 79
Ala/Ala	3 (%15,8)	9 (%11,4)
Ala/Val	14 (%73,7)	37 (%46,8)
Val/Val	2 (%10,5)	33 (%41,8)

P= 0,038

Diyabetik Nöropati hastası olanların sigara kullanma durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında sigara kullananların GPX1 Pro198Leu genotiplerin yüzde oranları; %47.4 Pro/Pro, %42.1 Pro/Leu, %10.5 Leu/Leu olarak tespit edilmiştir. Sigara kullanmayan Diyabetik Nöropati hastası olanların GPX1 Pro198Leu genotiplerinin yüzde oranları ise; %48.8 Pro/Pro, %43.8 Pro/Leu, %7.5 Leu/Leu olarak bulunmuştur. GPX1 Pro198Leu genotipleri açısından sigara kullanma durumlarına göre genotip frekansları arasında anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.13. GPX1 Pro198Leu hastalarda sigara içip içmemeye göre genotip frekansları

Genotip	Evet <i>n</i> =19	Hayır <i>n</i> = 80
Pro/Pro	9 (%47,4)	39 (%48,8)
Pro/Leu	8 (%42,1)	35 (%43,8)
Leu/Leu	2 (%10,5)	6 (%7,5)

P= 0,910

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Diyabetik nöropati, yüksek hastalık ve ölüm oranı ile seyreden ve diyabetik hastaların yaşam kalitesini düşüren önemli bir komplikasyondur. Görülme sıklığı, yapılan nöropati çalışmalarının toplum veya hastane kaynaklı olması ve tespit için kullanılan yöntemlerdeki farklılığa dayalı olarak %10 ila 90 arasında değişmektedir.

5.1. Diyabetik Nöropati ve MnSOD Ala-9Val

Çalışmamızda kullandığımız Mn-SOD genindeki Ala(-9)Val değişiminin, hasta ve kontrollerden elde edilen verilere bakıldığında Diyabetik nöropati ile genel olarak ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Chistyakov ve ark., 2001; Zotova ve ark., 2003; Stokov ve ark., 2003; Nomiyama ve ark., 2003; El-Masry ve ark., 2005; Lee ve ark., 2006; Möllsten ve ark., 2007; Flekac ve ark., 2008; Nakanishi ve ark., 2008; Tiwari ve ark., 2009; Tian ve ark., 2011; Hong Chen ve ark., 2011; Ascencio-Montiel ve ark., 2013; Vats ve ark., 2015). Bu değerlendirmeler genel olmayıp herbir allel genotipinin kontrol grubu ile kıyaslanmasından elde edilmektedir. Buna göre çalışmamızda kullandığımız genotiplerin hasta ve kontrol arasındaki farklılıklar Çizelge 4.2 de ifade edilmiştir.

Allel frekansları dikkate alındığında; Silig ve ark. (2010) 440 sağlıklı birey ile gerçekleştirdikleri çalışmada, yaş ortalaması $56,3 \pm 11,1$ yıl (erkek, $57,4 \pm 6,6$; kadın, $55,5 \pm 4,1$) olan bir Türk popülasyonunda, SOD2 Ala16Val polimorfizmlerinin allel ve genotip frekans dağılımlarını, Ala16Ala için %17,5, Ala16Val için %50,5 ve Val16Val için %32,0 olarak tespit ettiler. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubunun %27'si erkek, %73'ü kadın olup yaş ortalaması $54,28 \pm 9,36$ olarak bulunmuştur. Hasta grubunda ise 30'u erkek, 70'i kadın olup yaş ortalamaları $55,87 \pm 9,18$ olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.1). Diğer yandan çalışmamızda SOD2 Ala9Val polimorfizmlerinin allel ve genotip frekans dağılımları hasta grubunda, Ala9Ala için %12,1, Ala9Val için %52,5 ve Val9Val için %35,4 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

Strokov ve ark. (2003), Tip 1 diyabetik hastası olan Ruslarla yaptıkları çalışmada, SOD2'nin Ala(-9)Val polimorfizmi ve SOD3'ün Arg213Gly polimorfizmi ile diyabetik polinöropati arasındaki ilişkiyi incelemişler ve Mn-SOD extrasellular superoxide dismutaz (EC-SOD) enzimlerini kodlayan genlerle diyabetik polinöropati patogenezi arasında bağlantı olduğunu tespit etmişlerdir. Ala alleli ve Ala/Ala genotipinin diyabetik polinöropatili (DP) Tip 1 DM hastalarında önemli oranda seyrek görüldüğünü ve düşük DP riski ile ilişkili olduğunu bildirdiler. Bu grupta Val alleli ve Val/Val genotipinin daha yüksek olduğunu, dolayısıyla yüksek DP riski ile ilişkili olduğunu rapor ettiler. Sonuç olarak, SOD2 Ala(-9)Val polimorfizminin Tip 1 DM hastalarında DP ile ilişkili olduğunu buldular. Bizim çalışmamızda ise durum kontrol ve hasta grubunda farklı gözlemlenmiş ve istatistik (kontrolde %44.4 Val/Val, Diyabetik Nöropati hastaları grubunda ise; %35.4 Val/Val şeklindedir.) olarak önemsizdir. Hasta grubunda ise; Ala/Val heterozigot durumu daha yüksek gözlenmiştir (Çizelge 4.2).

Diğer yandan Nomiya ve ark. (2003)'nin yapmış olduğu 478 Japon Tip 2 DM hastasını çalışmalarında, Mn-SOD Val(16)Ala polimorfizminin diyabet ve diyabetik nefropati ile ilişkisinde nefropatili DM hastalarında Val/Val genotipinin frekansının Ala/Ala veya Val/Ala genotipinden daha yüksek olduğunu, sonuçta Mn-SOD'un Val(16)Ala polimorfizminin Tip 2 diyabet etiolojisi ile ilişkisiz olduğunu fakat Japon Tip 2 diyabet hastalarında diyabetik nefropati ile ilişkili gibi görünmesi bizim çalışmamızla uygunluk (Ala9Ala için %12.1, Ala9Val için %52,5 ve Val9Val için %35.4) göstermektedir (Çizelge 4.2).

Çalışmamıza benzer bir diğer makalede El-Masry ve ark. (2005), 65 Mısırlı Tip 1 diyabetik çocukla yaptıkları çalışmada, Mn-SOD2 geni Ala(-9)Val polimorfizminin diyabetik nöropati ile ilişkili olduğunu, nefropati oluşumunda ise önemli bir faktör olmadığını belirlemişlerdir. Mn-SOD2 geni allel frekansları DN hasta grubunda, Ala için %48.80, Val için %51.20 şeklinde, genotip frekansları ise Val/Val için %17.50, Val/Ala için %56.90 ve Ala/Ala 15.00 şeklinde gerçekleşmiştir. Kontrol grubunda ise allel frekansları, Ala için %66.30, Val için %33.70 olarak, genotip frekansları ise Val/Val için %7.50, Val/Ala için

%52.50 ve Ala/Ala 40.00 olarak bulunmuştur. Ala allelinin ve Ala/Ala genotipinin diyabetik nöropatili hastalarda önemli ölçüde daha düşük olduğunu, bunun tersine Val alleli ve homozigot Val/Val genotipinin DN'li hastalarda kontrol grubuna göre önemli oranda daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bizim sonuçlarımız da ise anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir (Çizelge 4.2). Diğer yandan Lee ve Choi (2006), 304 Koreli Tip 2 DM hastası ile gerçekleştirdikleri araştırmada, Mn-SOD2 geni V16A polimorfizminin Tip 2 DM gelişimi ve diyabetik retinopati ve diyabetik maculer edema'nın (DME) ilerlemesi arasında bir ilişki olup olmadığını incelemelerinin sonucunda, V16A polimorfizminin diyabet gelişimi ve DR'nin ilerlemesi ile ilişkili olmadığını, ama DME ile alakalı olduğunu ifade etmişlerdir.

Diyabetik Nöropati hastası olanların Retinopati varlığına göre genotip frekanslarına bakıldığında MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %9.7 Ala/Ala, %64.5 Ala/Val, %25.8 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Retinopati olmaması durumunda MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %13.2 Ala/Ala, %47.1 Ala/Val, %39.7 Val/Val olarak gerçekleşmiştir. Bu durum MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hastaların Retinopati varlığı/yokluğu açısından genotip frekansları arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Çizelge 4.8). Petroviç ve ark. (2008), 426 Slokyalı hastayla gerçekleştirdikleri çalışmalarında Mn-SOD geninin V16A polimorfizminin VV genotipinin ise hasta grubunda önemli oranda yüksek olduğunu bulmuşlar. Bu genotipin Tip 2 diyabet hastalarındaki retinopati ile ilişkili olduğu ve diyabetik retinopatinin genetik markırı olarak kullanılabileceği sonucuna varmış olmalarına rağmen bizim sonuçlarımızla uyum sağlamamıştır.

Diyabetik Nöropati hastası olanların sigara kullanma durumlarına göre genotip frekanslarına bakıldığında sigara kullananların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları; %15.8 Ala/Ala, %73.7 Ala/Val, %10.5 Val/Val olarak tespit edilmiştir. Sigara kullanmayan Diyabetik Nöropati hastası olanların MnSOD Ala-9Val genotiplerinin yüzde oranları ise; %11.4 Ala/Ala, %46.8 Ala/Val, %41.8 Val/Val şeklindedir. MnSOD Ala-9Val genotipleri açısından hastaların sigara kullanma durumlarına göre genotip frekansları

arasında (Ala/Val grubunda 1.57 kat) anlamlı bir fark bulunmuştur (Çizelge 4.12). Möllsten ve ark. (2007), 1,510 Finli ve İsveçli hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmada ise; MnSOD (V16A, rs4880) polimorfizminin tek başına veya sigara içme ile birlikte diyabetik nefropati gelişimine katkıda bulunup bulunmayacağını araştırmışlar. Buna göre; sigara içen ve Val/Val genotipli yüksek riskli grubun, hiç sigara içmemiş olan ve Val/Ala veya Ala/Ala genotipine sahip olan düşük risk grubuna göre 2.52 kat daha fazla diyabetik nefropati riskine sahip olduğunu ortaya koydular. Sonuç olarak, sigara içme ve MnSOD Val allel homozigotlu olmanın artan diyabetik nefropati riski ile ilişkili olduğunu belirtmişler. Bu durum sonuç olarak çalışmamızla ilişkili iken alleller açısından farklılık göstermektedir.

Chen ve ark. (2011), 168 Çinli hastada MnSOD Val16Ala (T→C), GPX1 Pro198Leu (C→T), ve CAT -262C/T (C→T) fonksiyonel polimorfizmlerinin Tip 2 diyabet hastalığı veya diyabet CVD üzerine etkisini araştırdılar. Çalışmalarının sonunda, yaygın MnSOD, GPX1, ve CAT TT+CC+CC genotiplerinin Tip 2 diyabet veya diyabetik CVD'li olan Çinli hastalarda hipertrigliseridemi'ye katkıda bulunabileceğini bildirdiler. Ascencio-Montiel ve ark. (2013), Meksikalı Tip 2 diyabet hastaları ile yaptıkları çalışmalarında, SOD2 geni Val16Ala polimorfizmi (rs4880) ile albuminuria arasında önemli bir ilişki olduğunu belirttiler. Ancak bizim çalışmamızda bu durumu ifade edebilmek pek mümkün görünmemektedir. Bunun gerekçesi tüm verilerimize bakıldığında heterozigot gen allellerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bunun sebebi de muhtemelen inceleme yaptığımız bölgenin gen kaynakları yönünden heterojen bir yapı sergilemesinden dolayı olabileceği şeklinde yorumlanabilmektedir.

5.2. Diyabetik Nöropati ve GPX1

Çalışmamızda kullandığımız GPX1 genindeki Pro198Leu genotiplerinin kontrol grubundaki yüzdeler oranları %51.5 Pro/Pro, %37.4 Pro/Leu, %11.1 Leu/Leu, hasta grubunda ise bu oranlar; %49 Pro/Pro, %43 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak bulunmuştur. Bu oranlar ele alınarak kontrol ve hasta grubu arasında genotip frekanslarına bakılarak yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Çizelge 4.3). Çalışmaları bizim çalışmalarımızla ilişkili olan makalelerde de benzer durumlar söz konusudur (Hamanishi ve

ark., 2004; Süzen ve ark., 2010; Dutkiewicz ve ark., 2010; Panduru ve ark., 2011; Matsuno ve ark., 2011; Tang ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2014; Vats ve ark., 2015).

Süzen ve arkadaşlarının (2010) yapmış oldukları çalışma sonuçları, özellikle Leu/Leu (TT), grubu çalışmamızla (%8) uygunluk göstermektedir. Araştırmacılar Türk popülasyonunda CAT C-262T ve GPX1 Pro198Leu genotipik varyantların dağılımını incelediklerinde, GPX1 Pro198Leu için genotip frekanslarını 0.416 (CC), 0.44 (CT), ve 0.144 (TT) olarak tespit etmişlerdir. Buldukları sonuçların rapor edilen diğer popülasyonlarla karşılaştırıldığında önemli etnik farklılık sergilediğini bildirmişlerdir.

Panduru ve ark. (2011), 238 hasta ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında, GPX1 geninin Pro198Leu olarak da bilinen Pro200Leu polimorfizminin Tip 1 diyabet hastalarında diyabetik nefropati gelişimi riski ile ilişkisini araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçların, Pro200Leu polimorfizminin 200Pro allelinin ileri diyabetik nefropati geliştirme riskini artırdığını rapor etmişlerdir. İlişki testinde, Pro/Pro polimorfizminin risk genotip olduğu, Leu/Leu genotipinin ise koruyucu tip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, Nöropati hasta grubunda GPX1 ile retinopati arasındaki ilişki bağlamında, Panduru ve arkadaşlarının sonuçlarına benzer şekilde Pro/Pro, %56.3, Leu/Leu ise %9.4 olarak bulunmuştur. Bu durum hasta grubu içersinde retinopati olmayanlar ile kıyaslandığında (%7.4) farklılık olduğu görülmektedir. Panduru ve arkadaşlarının çalışmalarında, Pro/Pro polimorfizminin nefropati açısından risk genotipi, Leu/Leu genotipinin ise koruyucu tip olmasına benzer şekilde, bizim çalışmamızda aynı genotipler (Pro/Pro, Leu/Leu) retinopati için sırasıyla risk ve koruyucu genotipler olarak ortaya çıkmaktadır.

Tang ve ark. (2012), birbirinden bağımsız iki farklı hasta grubu ile yaptıkları çalışmada rs1050450 glutathione peroxidase-1 (C > T) gene varyantı Pro198Leu ile periferel nöropati arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bu çalışmada, birinci grupta yer alan nöropatili hastalarda (558); genotip değerleri CC (Pro/Pro) %47.5, CT (Pro/Leu) %40.1, TT (Leu/Leu) %12.4 olarak, kontrol grubunda ise aynı değerler sırasıyla %37.4, %51.2 ve %11.4 (p=0.01) olarak tespit edilmiştir. İkinci gruptaki nöropatili hastalarda (319); genotip

değerleri CC (Pro/Pro) %51.1, CT (Pro/Leu) %43.0, TT (Leu/Leu) %6.0 şeklinde, kontrol grubunda ise sırasıyla %34.9, %60.3 ve %4.8 (p=0.02) şeklinde belirlenmiştir. Çalışmamızda ise, hem kontrolde hemde hasta grubunda benzer yüzdelerle görülmesine rağmen istatistik olarak farklı ifade edilmiştir. Bunun sebebi ise bizce hasta ve kontrol grubunda yer alan birey sayısındaki farklılıklardır. GPX1 Pro198Leu genotiplerinin kontrol grubundaki yüzdeler oranları %51.5 Pro/Pro, %37.4 Pro/Leu, %11.1 Leu/Leu, hasta grubunda ise bu oranlar; %49 Pro/Pro, %43 Pro/Leu, %8 Leu/Leu olarak bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Zhang ve ark. (2014), GPX1'in rs1050450 Pro198Leu ve Pro197Leu polimorfizmlerini ele aldıkları meta-analizde, bu polimorfizmlerin özellikle Uzakdoğu Asya popülasyonlarında kardiyovasküler hastalık (CVD) riski açısından, istatistiksel anlamda önemli olmakla birlikte az miktarda ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır. Etnik farklılıkların genetik çalışmalarda heterojenlik üreten bir faktör olduğuna dikkat çekmişlerdir. Önceki çalışmalarda T allelinin dağılım sıklığının beyazlarda %36, Afrikalılarda %33 ve Japonlarda %5 olarak rapor edildiğini, kendi çalışmalarında ise Doğu Asyalılarda %8.57 ve Doğu Asyalı olmayanlarda %29.56 oranları ile benzerlik bulunduğunu belirtmişlerdir. Gerçekleştirdikleri bu meta-analizin sonucunda, GPX1 geninin Pro198Leu ve Pro197Leu varyantlarının Doğu Asyalı popülasyonlarda CVD riskini önemli oranda artırdığını ve bu sonuçların diğer etnik gruplardaki çalışmalarla doğrulanması gerektiğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda, T allelini ifade eden Leu kontrolde %11.1, hastalarda %8 olarak bulunmuştur. Diğer yandan hasta grubu içerisinde cinsiyete bakıldığında erkekler %13.3, kadınlar %5.7 olarak tespit edilmiştir. Hasta grubu içerisinde retinopati varlığı (%9.4) ve yokluğuna (%7.4) göre bu allelin incelenmesinde de değişimler belirlenmiştir. Sonuç olarak incelediğimiz kontrol ve hasta, cinsiyet, hastalar arasında ki incelenen diğer alt hastalık gruplarının tamamında Leu/Leu allelleri daha çok Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki Japonlar ve Doğu Asyalı olmayan gruplar arasında yerini almaktadır.

KAYNAKLAR

- Ahmed N., Thornalley PJ., 2007. Advanced glycation endproducts: what is their relevance to diabetic complications? *Diabetes Obes Metab.* 9(3):233-45
- Akbaş, A., 2009. FMF hastalarında GSH-Px (Glutasyon Peroksidaz) ve SOD (Süperoksid Dismutaz) enzim polimorfizmi. Uzmanlık Tezi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Tokat.
- Akkuş İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Baskı, Konya, Mimoza Yayınları. 3-15
- Akyol Ö., 2004. Şizofrenide oksidatif stres. *Kocatepe Tıp Dergisi*; 5 (ek sayı 1): 15-25.
- Alemzadeh R, Wyatt D.T., 2004. Diabetes Mellitus. In: Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB, eds. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 17th ed. Pennsylvania: Elsevier Saunders; 1947-72
- Alsahli M. and Gerich J.E., 2012. Pathogenesis of Type 2 Diabetes, J.S. Skyler (ed.), *Atlas of Diabetes: Fourth Edition*, p.156, Springer Science+Business Media, LLC., 422 p., USA.
- Altan N., Ongun C.Ö., Hasanoğlu E., Engin A., Tuncer C., Sindel P., 1994. Effects of the Sulfonylurea Glyburide on Superoxide Dismutase Activity In Alloxan-Induced Diabetic Rat Hepatocytes. *Diabetes Research and Clinical Practice*; 22(2-3): 95-98.
- American Diabetes Association, 2011. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 34:62-69
- American Diabetes Association, 2011. Standarts of medical cares in diabetes. *Diabetes Care* 34:11-61
- Anderson E. J., Lustig M. E., Boyle K. E., Woodlief T. L., Kane D. A., Lin C. T., Price J. W., 3rd, Kang L., Rabinovitch P. S., Szeto H. H., Houmard J. A., Cortright R. N., Wasserman D. H. & Neuffer P. D., 2009. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *J Clin Invest*, Vol. 119, No. 3, pp. 573-581.
- Antmen E., 2005. Beta talasemide oksidatif stres. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Adana.
- Archer A.G, Roberts V.C., 1984. Blood flow patterns in painful diabetic neuropathy. *Diabetologia*. 27:563-7.
- Ascencio-Montiel I.D.J., Parra E.J., Valladares-Salgado A., Gómez-Zamudio J.H., Kumate-Rodriguez J., Escobedo-de-la-Peña J., Cruz M., 2013. SOD2 gene Val16Ala polymorphism is associated with macroalbuminuria in Mexican Type 2 Diabetes patients: A comparative study and meta-analysis. *BMC Medical Genetics*, 14 (1).
- Atkinson M.A, Eisenbarth GS., 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet*. 358:221-9.
- Bag A. and Bag N., 2008. Target sequence polymorphism oh human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: A review. *Cancer Epidemiol. Biom.* 17: 3298–3305.
- Banerji M, Chaiken R, Gordon D, et al., 1995. Does intra-abdominal adipose tissue in black men determine whether NIDDM is insulinresistant or insulin-sensitive? *Diabetes*, 44:141–146.

- Bansal V, Kalita J, Misra U.K., 2006. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J.* 82:95-100.
- Barnett A.H, Eff C, Leslie R.D, Pyke D.A., 1981. Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia.* 20(2):87-93.
- Battist W.P., Palmisano J., Keane W.F., 2003. Dyslipitemia in patients with type 2 diabetes. Relationships between lipids, kidney disease and cardiovascular disease. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine;* 41 : 1174-1181.
- Baynes J.W, Thorpe S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48(1), 1-9.
- Bennett P.H, Knowler W.C., 2005. Definition, diagnosis, and Classification of Diabetes mellitus and glucose homeostasis. In: Kahn CR, Weir GC, King GL, et al., eds. *Joslin's Diabetes Mellitus.* 14th ed. USA; Joslin Diabetes Center, 14th ed. USA; Joslin Diabetec Center; 331-9.
- Bierhaus A, Haslbeck K.M, Humpert P.M, Liliensiek B, Dehmer T, Morcos M, et al., 2004. Loss of pain perception in diabetes is dependent on a receptor of the immunoglobulin superfamily. *J Clin Invest;*114:1741–51.
- Bikopoulos G., da Silva Pimenta A., Lee S. C., et al., 2008. “Ex vivo transcriptional profiling of human pancreatic islets following chronic exposure to monounsaturated fatty acids,” *Journal of Endocrinology,* vol. 196, no. 3, pp. 455–464.
- Bilazer C.A., 2006. Mekonyum Boyalı Yenidoğanlarda Kordon Kanı, MDA Konsantrasyonları ve Perinatal Döneme Ait Faktörlerle İlişkisi. Uzmanlık Tezi. İstanbul: T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Arastırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği.
- Bonora E, Bonadonna R, DelPrato S, et al., 1993. In vivo glucose metabolism in obese and type II diabetic subjects with or without hypertension. *Diabetes,* 42:764–772.
- Boulton A.J., 2007. Diabetic neuropathy: classification, measurement and treatment. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes;*14:141–5.
- Brownlee M., 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature.*414:813-20
- Brownlee M., 2005. The pathobiology of diabetic complications. An unifying mechanism. *Diabetes;*54:1615–25.
- Bruning J.C, Michael M.D, Winnay J.N, et al., 1998. A muscle-specific insulin receptor knockout exhibits features of the metabolic syndrome of NIDDM without altering glucose tolerance. *Mol Cell,* 2:559–569.
- Buchanan T.A, Xiang A.H, Peters R.K, et al., 2002. Preservation of pancreatic beta-cell function and prevention of type 2 diabetes by pharmacological treatment of insulin resistance in high-risk hispanic women. *Diabetes,* 51:2796–2803.
- Burghes A.H, Vaessin H.E, de La Chapelle A, 2001. Genetics. The land between Mendelian and multifactorial inheritance. *Science,* 293:2213–2214.
- Byrne M, Sturgis J, Sobel R, Polonsky K, 1996. Elevated plasma glucose 2h postchallenge predicts defects in B-cell function. *Am J Physiol,* 270:E572–E579.
- Cameron N.E, Cotter M.A., 1997. Metabolic and vascular factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetes.* 46(2):31-7
- Cameron N.E, Cotter M.A., 2008. Pro-inflammatory mechanisms in diabetic neuropathy: focus on the nuclear factor kappa B pathway. *Curr Drug Targets;*9:60–7.

- Campbell P, Mandarino L, Gerich J, 1988. Quantification of the relative impairment in actions of insulin on hepatic glucose production and peripheral glucose uptake in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism*, 37:15–21.
- Carey D, Jenkins A, Campbell L, et al., 1996. Abdominal fat and insulin resistance in normal and overweight women: direct measurements reveal a strong relationship in subjects at both low and high risk of NIDDM. *Diabetes*, 45:633–638.
- Carlsson C., Borg L. A. H., and Welsh N., 1999. “Sodium palmitate induces partial mitochondrial uncoupling and reactive oxygen species in rat pancreatic islets in vitro,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 8, pp. 3422–3428.
- Ceriello, A., Bortolotti, N., Motz, E., Crescentini, A., Lizzio, S., Russo, A., Tonutti, L. & Taboga, C., 1998. Meal-generated oxidative stress in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*, Vol. 21, No. 9, pp. 1529-1533.
- Chen, H., Yu, M., Li, M., Zhao, R., Zhu, Q., Zhou, W., Lu, M., (...), Liu, L., 2012. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 363 (1-2), pp. 85-91.
- Chistyakov D.A, Savost'anov K.V, Zotova E.V, Nosikov V.V (2001) Polymorphisms in the Mn-SOD and EC-SOD genes and their relationship to diabetic neuropathy in type 1 diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 2:4
- Choi B, Shi F, 2001. Risk factors for diabetes mellitus by age and sex: results of the national population health survey. *Diabetologia*, 44:1221–1231.
- Cline G.W, Rothman D.L, Magnusson I, et al., 1994. ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of hepatic glucose metabolism in normal subjects and subjects with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 94:2369–2376.
- Cochrane C.G., 1991. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med.*;12:137 47.
- Consensus Panel, 1988. Report and Recommendations of the San Antonio Conference on Diabetic Neuropathy. *Diabetes* 37:1000-4.
- Cowell R.M, Russell J.W., 2004. Nitrosative injury and antioxidant therapy in the management of diabetic neuropathy. *J Investig Med*. 52(1):3-44
- Dandona, P., Thusu, K., Snyder, B., Makowski, J., Armstrong, D., and Nicotera, T., 1996. Oxidative damage to DNA in diabetes mellitus. *Lancet* 347, 444–445.
- Das Evcimen N, King G.L., 2007. The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes. *Pharmacol Res*. 55(6):498-10.
- Das K., Chainy G.B.N., 2001. Modulation of rat liver mitochondrial antioxidant defense system by thyroid hormone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*; 1537(1) : 1-13.
- DCCT Research Group, 1993. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. *N Engl J Med*;329:977–86.
- DeFronzo R.A, 1997. Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev*, 5:177–269.

- Diekman M.J., Romijn J.A., Endert E., Sauerwein H., Wiersinga W.M., 1998. Thyroid hormones modulate serum leptin levels: observations in thyrotoxic and hypothyroid women. *Thyroid*; 8(12) : 108-6.
- Dohm G.L, Tapscott E, Pories W, et al., 1988. An in vitro human muscle preparation suitable for metabolic studies. Decreased insulin stimulation of glucose transport in muscle from morbidly obese and diabetic subjects. *J Clin Invest*, 82:486–494.
- Dokken, B. B., Saengsirisuwan, V., Kim, J. S., Teachey, M. K. & Henriksen, E. J., 2008. Oxidative stress-induced insulin resistance in rat skeletal muscle: role of glycogen synthase kinase-3. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 294, No. 3, pp. E615-621.
- Donal M.Y., Gross D.J., Cesari E., Kaiser N., 1999. Hyperglycemia-induced P cell apoptosis in pancreatic islets of Psammoys obesus during development of diabetes. *Diabetes*; 48(4) : 738-744.
- Drews, G., Krippeit-Drews, P. & Dufer, M., 2010. Oxidative stress and beta-cell dysfunction. *Pflugers Arch*, Vol. 460, No. 4, pp. 703-718.
- Dündar Y., Aslan R., 1999. Oksidan-Antioksidan Denge ve Korunmasında Vitaminlerin Rolü, *Hayvancılık Araştırma Dergisi*; 9(1-2): 32-39.
- Duthie, G.G., Wahle, K.W.J. and James, W.P.T., 1989. Oxidants, antioxidants and cardiovascular disease. *Nutr. Res. Rev.* 2; 51-62.
- Dutkiewicz G, Domanski L, Pawlik A, et al., 2010. Polymorphisms of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase genes in patients with post-transplant diabetes mellitus. *Arch Med Res*; 41:350–355.
- Dyck P.J, Thomas P.K., 1993. *Pathology-Symmetrik Polyneuropathy, Peripheral Neuropathy*, third edition , W.B. Saunders Company, USA:1230.
- Edwards J.L, Vincent A.M, Cheng H.T, Feldman E.L., 2008. Diabetic neuropathy: mechanisms to management. *Pharmacol Ther.* 120:1-34.
- Eidland A, Sebekova K, Schinzel R., 2001. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases.* 38:100-6.
- el-Masry T.M, Zahra M.A, el-Tawil M.M, Khalifa R.A., 2005. Manganese superoxide dismutase alanine to valine polymorphism and risk of neuropathy and nephropathy in Egyptian type 1 diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2:70–74.
- Erejuwa, O. O., Gurtu, S., Sulaiman, S. A., Ab Wahab, M. S., Sirajudeen, K. N. & Salleh, M. S., 2010. Hypoglycemic and antioxidant effects of honey supplementation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Vitam Nutr Res*, Vol. 80, No. 1, pp. 74-82.
- Eriksson J, Lindstrom J, Tuomilehto J, 2001. Potential for prevention of type 2 diabetes. *Br Med Bull*, 60:183–199.
- Eriksson K, Lindgarde F, 1991. Prevention of type 2 (noninsulin dependent) diabetes mellitus by diet and exercise. *Diabetologia*, 34:891–898.
- Ertekin C., 2006. *Diyabetik Nöropatiler, Santral ve Periferik EMG Anatomi-Fizyoloji-Klinik*, Türkiye 211-28.
- Evans J. L., Goldfine I. D., Maddux B. A., and Grodsky G.M., 2002. “Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes,” *Endocrine Reviews*, vol. 23, no. 5, pp. 599–622.

- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. & Grodsky, G. M., 2003. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? *Diabetes*, Vol. 52, No. 1, pp. 1-8.
- Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus., 1997. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 20(7):1183-97.
- Feldman E.L, Stevens M.J, Thomas P.K, Brown M.B, Canal N, Greene D.A., 1994. A practical two-step quantitative clinical and electrophysiological assessment for the diagnosis and staging of diabetic neuropathy. *Diabetes Care*. 17:1281-91.
- Feldman EL., 2003. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. *J Clin Invest*.111:431–433.
- Finaud J., Lac G., Filaire E., 2006. Oxidative stress relationship with exercise and training. pp: 335-336.
- Flekac M, Skrha J, Hilgertova J, Lacinova Z, Jarolimkova M, 2008. Gene polymorphisms of superoxide dismutases and catalase in diabetes mellitus. *BMC Med Genet* 9:30
- Florez J.C, Jablonski K.A, Bayley N, et al., 2006. TCF7L2 polymorphisms and progression to diabetes in the Diabetes Prevention Program. *N Engl J Med*, 355:241–250.
- Florez J.C, Jablonski K.A, Kahn S.E, et al., 2007. Type 2 diabetes-associated missense polymorphisms KCNJ11 E23K and ABCC8 A1369S influence progression to diabetes and response to interventions in the Diabetes Prevention Program. *Diabetes*, 56:531–536.
- Foote, C.S. 1985. Chemistry of reactive oxygen species. In “ Chemical Changes in Food During Processing”, T. Richardson and J.W. Finley (Eds), pp:17-32. Van Nostrand Reinhold Company, New York.
- Fridovich I., 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem.*; 264:7761-4.
- Friedman J.E, Dohm G.L, Leggett-Frazier N, Elton C.W, Tapscott E.B, Pories W.P, Caro JF., 1992. Restoration of insulin responsiveness in skeletal muscle of morbidly obese patients after weight loss. Effect on muscle glucose transport and glucose transporter GLUT4. *J Clin Invest*. 89(2):701-5.
- Genuth S., 2006. Insights from the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications study on the use of intensive glycemic treatment to reduce the risk of complications of type 1 diabetes. *Endocr Pract*. 1:34-41.
- Gerich J, 1998. The genetic basis of type 2 diabetes mellitus: Impaired insulin secretion versus impaired insulin sensitivity. *Endocr Rev*, 19:491–503.
- Gerich J, Van Haefen T, 1998. Insulin resistance versus impaired insulin secretion as the genetic basis for type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes*, 5:144–148.
- Giacco F. and Brownlee M., 2012. Mechanisms of Hyperglycemic Damage in Diabetes, J.S. Skyler (ed.), *Atlas of Diabetes: Fourth Edition*, p.226, Springer Science+Business Media, LLC., 422 p., USA.
- Gillery P, Monboisse J.C, Maquart F.X, Borel J.P., 1998. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes*. 14(1):1114-20.
- Giugliano I, Ceriello A, Paolisso G., 1996. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 19(3):257-67.

- Gloyn A, 2001. The genetics of diabetes: a progress report. *Practical Diabetes Int*, 18:246–250.
- Gloyn A.L, Weedon M.N, Owen K.R, et al., 2003. Large-scale association studies of variants in genes encoding the pancreatic beta-cell KATP channel subunits Kir6.2 (KCNJ11) and SUR1 (ABCC8) confirm that the KCNJ11 E23K variant is associated with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52:568–572.
- Goh S.Y, Cooper M.E., 2008. Clinical review: The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 93:1143–52.
- Gorogawa S.-I., Kajimoto Y., Umayahara Y., et al., 2002. “Probucol preserves pancreatic β -cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes,” *Diabetes Research and Clinical Practice*, vol. 57, no. 1, pp. 1–10.
- Grant S.F, Thorleifsson G, Reynisdottir I, et al., 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*, 38:320–323.
- Green K, Brand M.D, Murphy M.P., 2004. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. 53:110-18.
- Groop L, Ekstrand A, Forsblom C, et al., 1993. Insulin resistance, hypertension and microalbuminuria in patients with type 2 (non-insulindependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 36:642–647.
- Guariguata L., 2012. By the numbers: New estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 98:524-5.
- Günöz H., 2010. Çocuklarda Diabetes Mellitus. Hasanoğlu H, Düşünsel R, Bideci A. Editörler. *Temel pediatri*. 1. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri. 1172-80.
- Haber C. A., Lam T. K. T., Yu Z., et al., 2003. “N-acetylcysteine and taurine prevent hyperglycemia-induced insulin resistance in vivo: possible role of oxidative stress,” *American Journal of Physiology*, vol. 285, no. 4, pp. E744–E753.
- Halban P.A, Kahn S.E, Lernmark A, Rhodes C.J, 2001. Gene and cellreplacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes*, 50:2181–2191.
- Halliwell B, Aruoma O.I., 1991. DNA damage by oxygen derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.*;28:9 19.
- Halliwell B, Gutteridge J.M, Cross C.E., 1992. Free Radicals, antioxidants and human disease: Where are we now? *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 119(6): 598-620.
- Halliwell B, Gutteridge J.M., 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*;186:1 85.
- Halliwell B. & Gutteridge, J. M. C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine* 4th. Edn, Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B., 2011. Free radicals and antioxidants - quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*, Vol. 32, No. 3, pp. 125-130.
- Hamanishi T., Furuta H., Kato H., 2004. Functional variants in the glutathione peroxidase-1 (GPX1) gene are associated with increased intima-media thickness of carotid arteries and risk of macrovascular diseases in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes*. ;53:2455–2460.
- Hamman R., 1992. Genetic and environmental determinants of noninsulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Metab Rev*, 8:287–338.

- Harmon J. S., Stein R., and Robertson R. P., 2005. "Oxidative stress-mediated, post-translational loss of MafA protein as a contributing mechanism to loss of insulin gene expression in glucotoxic beta cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 12, pp. 11107–11113.
- Harrison D, Griendling K.K, Landmesser U, Hornig B, Drexler H, 2003.. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol*; 91(3A):7A–11.
- Henriksen, E. J., 2010. Dysregulation of glycogen synthase kinase-3 in skeletal muscle and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Curr Diabetes Rev*, Vol. 6, No. 5, pp. 285-293.
- Hernández-Reséndiz S., Buelna-Chontal M., Correa F. and Zazueta C., 2012. Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Cardiovascular Diseases, p.163, *OXIDATIVE STRESS AND DISEASES*, Ed. by Lushchak V. and Gospodaryovp D.V., 634 p, Croatia.
- Hirosumi J., Tuncman G., Chang L., et al., 2002. "A central role for JNK in obesity and insulin resistance," *Nature*, vol. 420, no. 6913, pp. 333–336.
- Hoehn, K. L., Salmon, A. B., Hohnen-Behrens, C., Turner, N., Hoy, A. J., Maghzal, G. J., Stocker, R., Van Remmen, H., Kraegen, E. W., Cooney, G. J., Richardson, A. R. & James, D. E., 2009. Insulin resistance is a cellular antioxidant defense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 106, No. 42, pp. 17787-17792.
- Holland A. M., Hale M. A., Kagami H., Hammer R. E., and MacDonald R. J., 2002. "Experimental control of pancreatic development and maintenance," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 19, pp. 12236–12241.
- Horikawa Y, Oda N, Cox N, et al., 2000. Genetic variation in the gene encoding calpain-10 is associated with type 2 diabetes mellitus. *Nat Genet*, 26:163–175.
- Hotamisligil G.S, 2006. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, 444:860–867.
- Hotamisligil G.S., 2005. "Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes," *Diabetes*, vol. 54, supplement 2, pp. S73–S78.
- Hounsom L, Corder R, Patel J, Tomlinson D.R., 2001. Oxidative stress participates in the breakdown of neuronal phenotype in experimental diabetic neuropathy. *Diabetologia*;44:424–8.
- Hu F, Manson J, Stampfer M, et al., 2001. Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. *N Engl J Med*, 345:790–797.
- Ihara Y., Toyokuni S., Uchida K., et al., 1999. "Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β -cells of GK rats, a model of type 2 diabetes," *Diabetes*, vol. 48, no. 4, pp. 927– 932.
- Imlay J.A, Chin S.M, Linn S., 1988. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science*.;240:1302 9.
- Inal M, Akyüz F, Turgut A, Getsfrid W.M, 2001. Effect of aerobic and anaerobic metabolism on free radical generation swimmers. *Med Sci Sports Exerc*; 33 (4): 564-567.
- In't Veld P, 2011. Insulinitis in human type 1 diabetes: The quest for an elusive lesion. *Islets*. 3(4):131-8.

- International Expert Committee., 2009. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*. 32:1327-34.
- Jacob S., Ruus P., Hermann R., et al., 1999. "Oral administration of rac- α -lipoic acid modulates insulin sensitivity in patients with type-2 diabetes mellitus: a placebo-controlled pilot trial," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, no. 3-4, pp. 309–314.
- Jain A, Martensson J, Stole E, et al., 1991. Glutathione deficiency leads to mitochondrial damage in brain. *Proc Natl Acad Sci USA*.;88:1913 7.
- Johansen, J. S., Harris, A. K., Rychly, D. J. & Ergul, A., 2005. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovasc Diabetol*, Vol. 4, No. 1, pp. 5.
- Kahn B.B. and Flier J. S., 2000. "Obesity and insulin resistance," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 4, pp. 473–481.
- Kahn S, 2001. The importance of β -cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*, 86:4047–4058.
- Kalant N, Leibovici D, Fukushima N, et al., 1982. Insulin responsiveness of superficial forearm tissues in type 2 (noninsulin-dependent) diabetes. *Diabetologia*, 22:239–244.
- Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., et al., 1999. "Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity," *Diabetes*, vol. 48, no. 12, pp. 2398–2406.
- Kaneto H., Kajimoto Y., Miyagawa J., et al., 1999. "Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic β -cells against glucose toxicity," *Diabetes*, vol. 48, no. 12, pp. 2398–2406.
- Kaneto H., Xu G., Fujii N., Kim S., Bonner-Weir S., and Weir G. C., 2002. "Involvement of c-Jun N-terminal kinase in oxidative stress-mediated suppression of insulin gene expression," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 33, pp. 30010–30018.
- Kim, J.S., Saengsirisuwan, V., Sloniger, J.A., Teachey, M.K. & Henriksen, E.J., 2006. Oxidant stress and skeletal muscle glucose transport: roles of insulin signaling and p38 MAPK. *Free Radic Biol Med*, Vol. 41, No. 5, pp. 818-824.
- Klein B.E, Klein R, Moss S.E, Cruickshanks K.J., 1996. Parental history of diabetes in a population-based study. *Diabetes Care*. 19(8):827-30.
- Knowler W, Barrett-Connor E, Fowler S, et al., 2002. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *N Engl J Med*, 346:393–403.
- Konrad T., Vicini P., Kusterer K., et al., 1999. " α -lipoic acid treatment decreases serum lactate and pyruvate concentrations and improves glucose effectiveness in lean and obese patients with type 2 diabetes," *Diabetes Care*, vol. 22, no. 2, pp. 280–287.
- Koya D, King G.L., 1998. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes*. 47:859–66.
- Lavelli, V., Peri, C. and Rizzola, A., 2000. Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using Xanthine oxidase, Myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J. Agric. Food Chem*. 48(5); 1442-1448.

- Lee S.J, Choi M.G, 2006. Association of manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) with diabetic macular edema in Korean type 2 diabetic patients. *Metabolism* 55:1681–1688.
- Lee S.J, Choi M.G, Kim D.S, Kim T.W, 2006. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with stages of albuminuria in Korean type 2 diabetic patients. *Metabolism* 55:1–7.
- Lenzen S., Drinkgern J., and Tiedge M., 1996. “Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 20, no. 3, pp. 463–466.
- Lindsay, R.C., 1996. Food Additives. In “Food Chemistry”, O.R. Fennema (Ed), pp: 767-823. Marcel Dekker, New York.
- Lubos, E., Loscalzo, J. & Handy, D. E., 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, Vol. 15, No. pp. 1957-1997.
- Mak, J.C.W., Ho S.P., Yu W.C. et al. 2007. Polymorphism and functional activity in superoxide dismutase and catalase genes in smokers with COPD. *Eur. Respir. J.* 30: 684–690.
- Malik R.A, Tesfaye S, Thompson S.D, Veves A, Sharma A.K, Boulton A.J, Ward J.D, 1993. Endoneurial localization of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia.*;36:454.
- Mani S., 2015. Production of Reactive Oxygen Species and Its Implication in Human Diseases, p.6, *Free Radicals in Human Health and Disease*, Ed. by Rani V and Yadav U.C.S.,427 p, India.
- Marchetti, P., Dotta, F., Lauro, D. & Purrello, F., 2008. An overview of pancreatic beta-cell defects in human type 2 diabetes: implications for treatment. *Regul Pept*, Vol. 146, No. 1-3, pp. 4-11.
- Maritim A.C, Sanders R.A, Watkins III J.B., 2003. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology.* 17(1): 24-38
- Marshall J, Hoag S, Shetterly S, Hammon R, 1994. Dietary fat predicts conversion of impaired glucose tolerance to NIDDM. *Diabetes Care*, 17:50–56.
- Matsuno S., Sasaki H., Yamasaki H., Yamaoka H., Ogawa K., 2011. Pro198Leu missense polymorphism of the glutathione peroxidase 1 gene might be a common genetic predisposition of distal symmetric polyneuropathy and macrovascular disease in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Diabetes Investigation*; Vol. 2 Issue 6, p474-482, 9p.
- Matsuoka T.-A., Kajimoto Y., Watada H., et al., 1997. “Glycation-dependent, reactive oxygen species-mediated suppression of the insulin gene promoter activity in HIT cells,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 1, pp. 144–150.
- Matsuoka T.-A., Kaneto H., Stein R., et al., 2007. “MafA regulates expression of genes important to islet β -cell function,” *Molecular Endocrinology*, vol. 21, no. 11, pp. 2764–2774.
- Memişoğulları R., 2005. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*; 3: 30-39.

- Meydani M., 2001. Antioxidants and cognitive function. *ILSI. Nutrition Reviews.*, 59(8); S75-S82.
- Michiels, C., Raes, M., Toussaint, O. & Remacle, J., 1994. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, Vol. 17, No. 3, pp. 235-248.
- Miller D.D., 1996. Minerals. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 617-649. Marcel Dekker, New York.
- Mohazzab H. K. M., Kaminski P. M., and Wolin M. S., 1994. "NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium," *American Journal of Physiology*, vol. 266, no. 6, pp. H2568–H2572.
- Möllsten A, Jorsal A, Lajer M, Vionnet N, Tarnow L, 2009. The V16A polymorphism in SOD2 is associated with increased risk of diabetic nephropathy and cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Diabetologia* 52:2590–2593.
- Möllsten A, Marklund S.L, Wessman M et al., 2007. A functional polymorphism in the manganese superoxide dismutase gene and diabetic nephropathy. *Diabetes* 56:265–269.
- Moran A., Zhang H.-J., Olson L. K., Harmon J. S., Poitout V., and Robertson R. P., 1997. "Differentiation of glucose toxicity from beta cell exhaustion during the evolution of defective insulin gene expression in the pancreatic islet cell line, HIT-T15," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 99, no. 3, pp. 534–539.
- Nakanishi, S., Yamane, K., Ohishi, W., Nakashima, R., Yoneda, M., Nojima, H., Watanabe, H., (...), Kohno, N., 2008. Manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism is associated with the development of type 2 diabetes in Japanese-Americans. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 81 (3), pp. 381-385.
- Nawar W.W., 1996. Lipids. In "Food Chemistry", O.R. Fennema (Ed), pp: 225-319. Marcel Dekker, New York.
- Nesher R, Casa Della L, Litvin Y, et al., 1987. Insulin deficiency and insulin resistance in type II (noninsulin dependent) diabetes: quantitative contributions of pancreatic and peripheral responses to glucose homeostasis. *Eur J Clin Invest*, 17:266–274.
- Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, et al., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*;404:787–90.
- Nohl H, Hegner D., 1978. Do mitochondria produce oxygen free radicals in vivo? *Eur J Biochem.*;82:563 7.
- Nomiyama T, Tanaka Y, Piao L et al., 2003. The polymorphism of manganese superoxide dismutase is associated with diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Hum Genet* 48:138–141.
- Nosadini R, Solini A, Velussi M, et al., 1994. Impaired insulin-induced glucose uptake by extrahepatic tissue is hallmark of NIDDM patients who have or will develop hypertension and microalbuminuria. *Diabetes*, 43:491–499.
- Oates P.J., 2008. Aldose reductase, still a compelling target for diabetic neuropathy. *Curr Drug Targets*. 9(1):14-36.
- Öğüt S., Atay E., 2012. Yaşlılık ve Oksidatif Stres. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.*; 19(2): 68-74.
- Olbrot M., Rud J., Moss L. G., Sharma and A., 2002 . "Identification of β -cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA," *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 99, no. 10, pp. 6737–6742.
- Pacher P, Obrosova I.G, Mabley J.G, Szabó C., 2005. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. *Curr Med Chem*. 12(3):267-75.
- Pan X-R, Li G-W, Hu Y-H, et al., 1997. Effects of diet and exercise in preventing NIDDM in people with impaired glucose tolerance: the Da Qing IGT and Diabetes Study. *Diabetes Care*, 20:537–544.
- Panduru N.M, Ion D.A, Mota M, Cimponeriu D, Stavarachi M, Radu S, Anghel M, Mota E., 2011. Glutathione Peroxidase-1 (GPX1) Pro200Leu polymorphism and diabetic nephropathy in type 1 diabetes – A preliminary study. *Romanian Biotechnological Letters*. 16 5, p6655-p6667, 13p.
- Petersen K.F, Dufour S, Savage D.B, et al ., 2007. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104:12587–12594.
- Petrovic M.G, Cilensek I, Petrovic D., 2008. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with diabetic retinopathy in Slovene (Caucasians) type 2 diabetes patients. *Dis Markers* 24:59–64.
- Piwowara A. and Żurawska-Plaksejb E., 2014. Diabetes Mellitus, p.166, Role of Oxidative Stress in Chronic Diseases, Ed. by Dichi I., Breganó J.W., Simão A.N.C. and Cecchini R., Taylor & Francis Group, LLC, 708 p., Boca Raton, USA.
- Poitout V , Robertson R ., 2002 . Minireview: Secondary beta - cell failure in type 2 diabetes: a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology*; 143 : 339 – 342 .
- Poli G., Leonarduzzi G., Brasi F., Chiarotto E., 2004. Oxidative stress and cell signalling. *Curr Med Chem*; 11 (9): 1163-82.
- Porte D Jr, Kahn S, 2001. Beta-cell dysfunction and failure in type 2 diabetes: potential mechanisms. *Diabetes*, 50(Suppl 1):S160–S163.
- Porter N.A., 1985. Mechanism of fatty acid and phospholipid autoxidation. In “Chemical Changes in Food During Processing”, T. Richardson and J.W. Finley (Eds), pp:73-105. VanNostrand Reinhold Company, New York.
- Pratley R, Weyer C, 2001. The role of impaired early insulin secretion in the pathogenesis of type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 44:929–945.
- Rahimi R., Nikfar S., Larijani B., Abdollahi M., 2005. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; 59: 365-373.
- Redondo M.J, Yu L, Hawa M, Mackenzie T, Pyke D.A, Eisenbarth GS, Leslie R.D., 2001. Heterogeneity of type I diabetes: analysis of monozygotic twins in Great Britain and the United States. *Diabetologia*. 44(3):354-62.
- Revan S., 2007. Farklı dayanıklılık antrenmanlarının oksidatif stress oluşumu ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisi. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Beden Eğitimi ve Spor Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara.
- Rich-Edwards J, Colditz G, Stampfer M, et al., 1999. Birthweight and the risk for type 2 diabetes mellitus in adult women. *Ann Intern Med*, 130:278–284.

- Robertson R.P, Harmon J, Tran PO, Poynter V, 2004. P-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes* 53(Supplement 1), 119-124.
- Rösen P, Du X, Tschöpe D., 1998. Role of oxygen derived radicals for vascular dysfunction in the diabetic heart: prevention by α -tocopherol?. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 188:103.
- Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., Khamaisi M. & Bashan N., 1999. Lipoic acid protects against oxidative stress induced impairment in insulin stimulation of protein kinase B and glucose transport in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia*, Vol. 42, No. 8, pp. 949-957.
- Rudich A., Tirosh A., Potashnik R., Hemi R., Kanety H., and Bashan N., 1998. "Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes," *Diabetes*, vol. 47, no. 10, pp. 1562–1569.
- Sachdev, S. & Davies, K. J., 2008. Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*, Vol. 44, No. 2, pp. 215-223.
- Said G., 2007. Diabetic neuropathy – a review. *Nat Clin Pract Neurol*;3:331–40.
- Sakurai T, Tsuchiya S, 1998. Superoxide production from non-enzymatically glycated protein. *FEBS Lett* 236:406–410.
- Saltiel A, Kahn C, 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414:799–806.
- Satman İ, Gürol AO., 2003. Otoimmün diyabet patogenezi ve Tip 1 diyabetli hastada tedavi yaklaşımı. *Endokrinoloji Dergisi*. 1(3):169-79.
- Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dincçag N, Karsıdag K, Genc S, Telci A, Canbaz B, Turker F, Yilmaz T, Cakir B, Tuomilehto J., 2013. TURDEP-II Study Group. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 28(2):169-80.
- Savkur R.S, Philips A.V, Cooper T.A, 2001. Aberrant regulation of insulin receptor alternative splicing is associated with insulin resistance in myotonic dystrophy. *Nat Genet*, 29:40–47.
- Saxena A.K, Srivastava P, Kale R.K, Baquer N.Z., 1993. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochemical Pharmacology*. 45(3):539-42.
- Selvin E, Steffes M.W, Zhu H, Matsushita K, Wagenknecht L, Pankow J, Coresh J, Brancati FL., 2010. Glycated hemoglobin, diabetes, and cardiovascular risk in nondiabetic adults. *N Engl J Med*. 362:800-11.
- Shatten B, Smith G, Kuller L, Neaton J, 1993. Risk factors for the development of type 2 diabetes among men enrolled in the usual care group of the multiple risk factor intervention trial. *Diabetes*, 16:1331–1338.
- Shaw J, Purdie D, Neil H, et al., 1999. The relative risks of hyperglycemia, obesity and dyslipidemia in relatives of patients with type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, 42:24–27.
- Shaw JE, Zimmet PZ., 1999. The epidemiology of diabetic neuropathy. *Diabetes Rev*. 7:245-52.
- Shulman G. I., 2000. "Cellular mechanisms of insulin resistance," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 2, pp. 171–176.

- Sies, H., 1991. Oxidative stress: introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press London.
- Siliğ Yavuz, Ayça Taş, Hatice Pınarbaşı, 2010. “Türk Popülasyonunda Manganez-Süperoksit Dismutaz (SOD2) Polimorfizmi” 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, Türk Biyokimya Dergisi Özel Sayı (35), Eskişehir, 27-30 Ekim.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L., 2001. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia*. 44(2):129-46.
- Sohal R.S., 1997. Mitochondria generate superoxide anion radicals and hydrogen peroxide. *FASEB J.*;11:1269-70.
- Stefan N, Fritsche A, Haring H, Stumvoll M, 2001. Effect of experimental elevation of free fatty acids on insulin secretion and insulin sensitivity in healthy carriers of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene. *Diabetes*, 50:1143–1148.
- Strokov I.A, Bursa T.R, Drepa O.I, Zotova E.V, Nosikov V.V, Ametov A.S, 2003. Predisposing genetic factors for diabetic polyneuropathy in patients with type 1 diabetes: a populationbased case–control study. *Acta Diabetol* 40(Suppl 2):S375–S379.
- Sugimoto K, Yasujima M, Yagihashi S., 2008. Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr Pharm Des*. 14(10):953-61.
- Süzen H. S., E. Gucyener, O. Sakalli et al., 2010. “CAT C-262T and GPX1 Pro198Leu polymorphisms in a Turkish population,” *Molecular Biology Reports*, vol. 37, no. 1, pp. 87–92.
- Talior, I., Yarkoni, M., Bashan, N. & Eldar-Finkelman, H., 2003. Increased glucose uptake promotes oxidative stress and PKC-delta activation in adipocytes of obese, insulinresistant mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, Vol. 285, No. 2, pp. E295-302.
- Tan S.M., Sharma A. and de Haan J.B., 2012. *Oxidative Stress and Novel Antioxidant Approaches to Reduce Diabetic Complications*, p.255, *OXIDATIVE STRESS AND DISEASES*, Ed. by Lushchak V. and Gospodaryovp D.V., 634 p, Croatia.
- Tanaka Y., Gleason C. E., Tran P. O. T., Harmon J. S., and Robertson R. P., 1999. “Prevention of glucose toxicity in HIT-T15 cells and Zucker diabetic fatty rats by antioxidants,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , vol. 96, pp. 10857–10862.
- Tanaka Y., Tran P. O. T., Harmon J., and Robertson R. P., 2002. “A role of glutathione peroxidase in protecting pancreatic β cells against oxidative stress in a model of glucose toxicity,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 12363–12368.
- Tang T.S, Prior S.L, Li K.W, et al., 2012. Association between the rs1050450 glutathione peroxidase-1 (C > T) gene variant and peripheral neuropathy in two independent samples of subjects with diabetes mellitus. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*; 22: 417–425.
- Tesfaye S, Chaturvedi N, Eaton S.E, Ward J.D, Manes C, Ionescu-Tirgoviste Cand, 2005. EURODIAB Prospective Complications Study Group, et al. Vascular risk factors and diabetic neuropathy. *N Engl J Med*;352:341–50.

- Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, et al., 1996. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications study. *Diabetologia*;39:1377–84.
- Tian C, Fang S, Du X, Jia C., 2011. Association of the C47T polymorphism in SOD2 with diabetes mellitus and diabetic microvascular complications: a meta-analysis *Diabetologia*, 54, pp. 803–811.
- Tiedge M., Lortz S., Drinkgern J., and Lenzen S., 1997. “Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells,” *Diabetes*, vol. 46, no. 11, pp. 1733–1742.
- Tirosh A., Potashnik R., Bashan N. & Rudich, A., 1999. Oxidative stress disrupts insulin-induced cellular redistribution of insulin receptor substrate-1 and phosphatidylinositol 3-kinase in 3T3-L1 adipocytes. A putative cellular mechanism for impaired protein kinase B activation and GLUT4 translocation. *J Biol Chem*, Vol. 274, No. 15, pp. 10595-10602.
- Tiwari A.K, Prasad P, Thelma B.K et al., 2009. Oxidative stress pathway genes and chronic renal insufficiency in Asian Indians with type 2 diabetes. *J Diabetes Complications* 23:102–111.
- Todd J.A., 2010. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity*. 32(4):457-67.
- Torgerson J.S, Hauptman J, Boldrin M.N, Sjostrom L, 2004. XENical in the prevention of diabetes in obese subjects (XENDOS) study: a randomized study of orlistat as an adjunct to lifestyle changes for the prevention of type 2 diabetes in obese patients. *Diabetes Care*, 27:155–161.
- Touati D., 1989. The molecular genetics of superoxide dismutase in *E. coli*. An approach to understanding the biological role and regulation of SOD in relation to other elements of the defense system against oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med.*;8:1–9.
- Tuomilehto J, Lindström J, Eriksson J, et al., 2001. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*, 344:1343–1350.
- UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group, 1998. Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 352, 837-853.
- Vats P.a, Sagar N.a, Singh T.P.b, Banerjee M., 2015. Association of Superoxide dismutases (SOD1 and SOD2) and Glutathione peroxidase 1 (GPX1) gene polymorphisms with Type 2 diabetes mellitus *Free Radical Research*. 49:1 , 17-24.
- Vincent A.M, Callaghan B.C, Smith A.L, Feldman E.L., 2011. Diabetic neuropathy: cellular mechanisms as therapeutic targets. *Nat Rev Neurol*;7:573–83.
- Vincent A.M, Russell J.W, Low P, Feldman E.L., 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev*;25:612–28.
- Vinik A.I, Erbas T. Neuropathy. In: Ruderman N, editors., 2002. *Handbook of Exercise in Diabetes*. 2nd ed., Alexandria; American Diabetes Association. 463-96.
- Vinik A.I., Park T.S, Stansberry K, Pittenger G.L., 2000. Diabetic neuropathies. *Diabetologia*;43:957–73.
- Wannamethee S, Shaper A, Perry I, 2001. Smoking as a modifiable risk factor for type 2 diabetes in middle aged men. *Diabetes Care*, 24:1590–1595.

- Wei M, Schweitner H, Blair S, 2000. The association between physical activity, physical fitness and type 2 diabetes mellitus. *Compr Ther*, 26:176–182.
- Weir G.C., Laybutt D. R., Kaneto H., Bonner-Weir S., and Sharma A., 2001. “ β -cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes,” *Diabetes*, vol. 50, supplement 1, pp. S154–S159.
- Wellen K. E. and Hotamisligil G. S., 2005. “Inflammation, stress, and diabetes,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 115, no. 5, pp. 1111–1119.
- Wenying Y, Lixiang L, Jinwu Q, et al., 2001. The preventive effect of acarbose and metformin on the progression to diabetes mellitus in the IGT population: a 3-year multicenter prospective study. *Chin J Endocrinol Metab*, 17:131–136.
- Weyer C, Bogardus C, Mott D, Pratley R, 1999. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 104:787–794.
- Weyer C, Tataranni PA, Bogardus C, Pratley R, 2000. Insulin resistance and insulin secretory dysfunction are independent predictors of worsening of glucose tolerance during each stage of type 2 diabetes development. *Diabetes Care*, 24:89–94.
- Wickens A.P., 2001. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol*; 128: 379–91.
- Yalçın A.S., 1998. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim*; 11 (1-2): 342-6.
- Yamazaki I, Piette L.H., 1991. EPR spin trapping study on the oxidizing species formed in the reaction of the ferrous ion with hydrogen peroxide. *J Am Chem Soc.*;113:7588-93.
- Yi F, Brubaker P.L, Jin T, 2005. TCF-4 mediates cell type-specific regulation of proglucagon gene expression by beta-catenin and glycogen synthase kinase-3 β . *J Biol Chem*, 280:1457–1464.
- Yildirim Z., F. Yildirim, N.C. Ucgum et al. 2009. The evaluation of the oxidative stress parameters in nondiabetic and diabetic senile cataract patients. *Biol. Trace Elem. Res.* 128: 135–143.
- Young M.J, Boulton A.J, MacLeod A.F, Williams D.R, Sonksen P.H., 1993. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia*. 36(2):150-4.
- Younger D.S, Bronfin L., 1996. Overview of Diabetic Neuropathy. *Seminers in Neurology* 16:107.
- Zhang C, Qi L, Hunter D.J, et al., 2006. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene and the risk of type 2 diabetes in large cohorts of U.S. women and men. *Diabetes*, 55:2645–2648.
- Zhang J., X. Zhang, I.B. Dhakal et al. 2011a. Sequence variants in antioxidant defense and DNA repair genes, dietary antioxidants, and pancreatic cancer risk. *Int. J. Mol. Epidemiol. Genet.* 2(3): 236–244.
- Zhang Y., L. Zhang, D. Sun et al. 2011b. Genetic polymorphism of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in age-related cataract. *Molec. Vision.* 17: 2325–2332.
- Zotova E.V, Chistiakov D.A, Savost'ianov K.V et al., 2003. Association of the SOD2 Ala(-9)Val and SOD3 Arg213Gly polymorphisms with diabetic polyneuropathy in patients with diabetes mellitus type 1. *Mol Biol (Mosk)* 37:404–408.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mesut KOYUNCU

Doğum Tarihi: 04.02.1968

Öğrenim Durumu: Yüksek Lisans

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Öğretmenliği	Uludağ Üniv. Balıkesir Necatibey Eğitim Fak.	1989
Y. Lisans	Fen Bilimleri Enstitüsü	Ege Üniv.	2010
Doktora/S.Yeterlik/ Tıpta Uzmanlık	Biyoloji Bölümü	Gaziosmanpaşa Üniv.	2015

Yüksek Lisans Tez Başlığı (özeti ekte) ve Tez Danışman(lar)ı : *Papaver* cinsi *oxytona* seksiyonuna ait türlerde sıcaklık stresinin antioksidant enzimler üzerindeki etkisi.

Bu çalışmada, *Papaver* cinsi *Oxytona* seksiyonuna ait üç türün, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* ve *Papaver bracteatum*, üç aylık fidelerinde 10 dk ve 30 dk süreyle 40C sıcaklıkta ısı şoku uygulamasının, katalaz (CAT), peroksidaz (POD), askorbat peroksidaz (APX) gibi antioksidant enzimlerin aktiviteleri ile sekonder metabolitlerden fenol grubu bileşiklerin anahtar enzimlerinden polifenol oksidaz (PFO) aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Çalışılan üç türe ait 10 dk sıcaklık uygulamaları, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz enzimi aktivitesini kontrole göre önemli ölçüde artırırken, 30 dk uygulaması kontrolden fazla olmakla birlikte 10 dk uygulamasından daha düşük düzeyde kalmıştır. 10 dk sıcaklık uygulaması *Papaver orientale*'de PFO aktivitesini artırırken, 30 dk sıcaklık uygulamasının çalışılan bitkilerin hepsinde PFO aktivitesini azalttığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Papaver*, ısı şoku, antioksidant enzimler, katalaz, peroksidaz, askorbat peroksidaz, polifenol oksidaz, *Papaver pseudo-orientale*, *Papaver orientale* and *Papaver bracteatum*, *Oxytona* seksiyonu

Danışman: Doç. Dr. Lale YILDIZ AKTAŞ

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- A1.** M. Gemici, A. Guvensen and **M. Koyuncu**. Some ecophysiological changes in wheat plant (*Triticum durum* cv. gonen) grown in gypsum soils. *Pak. J. Bot.*, 41(3): 1179-1187, 2009.
- A2.** Muavviz Ayvaz, **Mesut Koyuncu**, Avni Guven, Kurt V. Fagerstedt. Does boron affect hormone levels of barley? *EurAsian Journal of BioSciences, Eurasia J Biosci* 6, 113-120 (2012)
- A3.** GÜRKÖK, Tuğba; KAYMAK, Elif; BOZTEPE, Gülşen; **KOYUNCU, Mesut**; PARMAKSIZ, İskender. Molecular characterisation of the genus *Papaver* section *Oxytona* using ISSR markers. *Turkish Journal of Botany*; Jul2013, Vol. 37 Issue 4, p 644.

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler :

- B1.** Aktaş T., **Koyuncu M.**, Türkecul İ., 2014. Hypersensitivity Pneumonitis Caused By Spores Of The Oyster Mushroom. The 5th International Symposium on Sustainable Development [ISSD 2014], 'Biotechnology for Sustainable Development'. May 15-18, 2014 - Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.

C. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

- C1.** Gürkök T., Boztepe G., **Koyuncu M** ve Parmaksız İ. 2013. P Cisimcikleri ve mRNA Döngüsü. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*. 5, 54-60.
- C2.** Boztepe G., Gürkök T., **Koyuncu M.**, Arslan N ve Parmaksız İ., 2014. Genetic Characterization of Turkish Commercial Opium Poppy (*Papaver Somniferum* L.) Cultivars Using ISSR and SSR Markers. *Journal of New Result in Science*. 7, 48-57.

D. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

- D1.** **Koyuncu, M.** Kaymak, E. Aktaş LY. Parmaksız, İ., 2012. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Türlerde Sıcaklık Stresinin Antioksidant Enzimler Üzerindeki Etkisi. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi.15–18 Kasım. Antalya
- D2.** Boztepe, G., Gürkök, T., Kaymak E., **Koyuncu M.**, Parmaksız, İ.,2012. Türkiye’de Ticari Değeri Olan *Papaver somniferum* L. Çeşitlerinin Moleküler Karakterizasyonu. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji Ve Biyoteknoloji Kongresi.15–18 Kasım 2012. Antalya.
- D3.** Parmaksız, İ. Karaer, F. **Koyuncu M.** 2012., Tokat’ın Bitki Biyoçeşitliliği ve Gen Kaynaklarının Korunması. Tokat Sempozyumu. 1-3 Kasım. Tokat.
- D4.** Boztepe, G., Gürkök, T., Kaymak E., **Koyuncu M.**, Parmaksız, İ., 2012. *Papaver* Cinsi *Oxytona* Seksiyonuna Ait Türlerin ITS Markörleri ile Moleküler Karakterizasyonu. 21.Ulusal Biyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı).03–07 Eylül 2012.İzmir
- D5.** Gürkök, T., Boztepe, G., Altu E., **Koyuncu M.**, Türkekul İ., Parmaksız, İ., 2012. *Lactarius* ve *Russula* Genuslarına Ait Bazı Türlerin ITS Yöntemi İle Moleküler Karakterizasyonu. IX. Türkiye Yemeklik Mantar Kongresi (Uluslararası Katılımlı).18-20 Ekim 2012. Denizli