

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

DİABETLİ HASTALARDA
Na⁺/K⁺ ATPaz ENZİMİ
GEN POLİMORFİZMİNİN ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

Cemile TOPCU

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜRBİLEK

KONYA 2006

I

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|-----------|
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.LİTERATÜR BİLGİ..... | 2 |
| 2.1. Diabetes Mellitus..... | 2 |
| 2.1.1. Tanım..... | 2 |
| 2.1.2. Sınıflandırma..... | 2 |
| 2.1.3. Tip I Diabetes Mellitus (IDDM)..... | 2 |
| 2.1.4. Tip 2 Diabetes Mellitus..... | 4 |
| 2.1.5. Diabetik nöropati..... | 6 |
| 2.2. C-peptid..... | 8 |
| 2.3. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Enzimi..... | 11 |
| 2.3.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz enziminin fonksiyonu..... | 11 |
| 2.3.2. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz izozimleri..... | 13 |
| 2.3.3. α ve β İzofomların yapısı | 16 |
| 2.3.4. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz izozimlerinin enzimatik özellikleri..... | 19 |
| 2.3.5. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz enziminin regülasyonu..... | 20 |
| 2.4. Genetik Polimorfizm..... | 25 |
| 2.5. Polimeraz zincir tepkimesi..... | 26 |
| 2.6. Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RLFP) | 28 |
| 3. MATERYAL ve METOT..... | 29 |
| 3.1 . Vaka seçimi..... | 29 |
| 3.2. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı..... | 29 |
| 3.3. Kullanılan Cihazlar..... | 30 |
| 3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Reaktifler..... | 30 |

| | |
|--|-----------|
| 3.5. Kullanılan Çözeltiler..... | 30 |
| 3.6. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Enzim Aktivitesinin Tayini..... | 31 |
| 3.7. C-peptid Tayini..... | 32 |
| 3.8. DNA İzolasyonu..... | 32 |
| 3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu..... | 33 |
| 3.10. Jel Elektroforezi..... | 34 |
| 3.11. Restriksiyon Enzim Kesimi | 34 |
| 3.12. İstatiksel Analiz | 32 |
| 4. BULGULAR..... | 36 |
| 5. TARTIŞMA ve SONUÇ..... | 38 |
| 5.1. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Aktivitesi ve Diabetes Mellitus..... | 38 |
| 5.2. C-Peptid ve Diabetes Mellitus..... | 42 |
| 5.3. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Aktivitesi ve C-Peptid..... | 43 |
| 5.4. Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Aktivitesi ve Gen Polimorfizmi..... | 44 |
| 6. ÖZET | 47 |
| 7. SUMMARY..... | 48 |
| 8. KAYNAKLAR..... | 49 |
| 9. ÖZGEÇMİŞ..... | 62 |
| 10. TEŞEKKÜR | 63 |

II

KISALTMALAR

MODY: Gençlerin erişkin tip diabeti. (Maturity onset diabetes of the young)

LADA: Erişkinin latent otoimmün diabeti. (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)

GAD: Glutamik asit dekarboksilaz

ICA: Adacık hücre antikoru

IAA: İnsülin otoantikorları

OGTT: Oral Glukoz Tolerans Testi

TPAI-1: Doku Plazminojen Aktivatör İnhibitör-1

PNP: Polinöropati

HDM: Hücre Dışı Matriks

MTAL: Medullar Thick Ascending Limb

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

Ala: Alanin

Glu: Glutamin

MAPK: Mitogen Associated Protein Kinase

NO: Nitrik Oksit

eNOS: Endotelyal Nitrik Oksit Sentaz

cDNAs: DNA kopyaları

dNTP: Deoksinükleozit 5' trifosfat

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi

GSH: İndirgenmiş Glutatyon

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

AGEs: Advanced glycation end products

NCV: Sinir iletim hızı. (Nerve Conduction Velocity)

III

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. Tip1 diabetin doğal öyküsü

Şekil 2.2. C-Peptidin hücresel etkilerinin şematik gösterilmesi

Şekil 2.3. Na^+/K^+ -ATPaz'ın mekanizması

Şekil 2.4. Na^+/K^+ -ATPaz'ın düzenli sıralı reaksiyon şeması

Şekil 2.5. Na^+/K^+ -ATPaz enzimi alt üniteleri

Şekil 2.6. İnsülinle Na-K-ATPaz regülasyonunun şematik mekanizması

Şekil 2.7. PZR ile DNA çoğaltılması

Şekil 2.8. Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizm belirlenmesi.

Şekil 4.1. ATP1A1 gen polimorfizmine ait genotip örnekleri

IV

TABLO LİSTESİ

Tablo 3.1. Kontrol ve hasta grubunda ortalama yaş \pm standart sapma değerleri

Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda C-peptid ve Na⁺/K⁺-ATPaz değerlerinin karşılaştırılması

V

GRAFİKLER

Grafik 4.1. Hasta ve kontrol grubunda C-peptid düzeyleri grafiği

Grafik 4.2. Hasta ve kontrol grubunda Na/K-ATPaz düzeyleri grafiği

1.GİRİŞ

Eritrosit membranı Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki düşüş, periferik nöropatinin oluşması ile ilişkili bulunmuştur. Na^+/K^+ -ATPaz'ın disfonksiyonu sonucu, intraaksonal Na^+ konsantrasyonu artmakta, sinir depolarizasyonu bozulmakta ve iletim hızı yavaşlamaktadır. Na^+/K^+ -ATPaz enziminin ATP1A1 izoformunun bulunması diabetik nöropati için bir risk faktörüdür.

Na^+/K^+ -ATPaz geninin allelik varyantını taşıyan Tip1 diabetli hastalarda eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesindeki azalma ile nöropati arasında kuvvetli bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. ATP1A1 varyantı bulunan Tip2 diabetli hastaların nöropatiden etkilenme sıklığının da daha yüksek olduğu bulunmuştur.

C-peptid, Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle nöropatinin patojenezinde rol oynar. Eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi ile serum C-peptid seviyeleri arasında korelasyon bulunmaktadır. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ATP1A1 allelik varyantını taşıyan hastalarda düşüktür. C-peptid eksikliği aktivite düşüklüğünü sekonder olarak etkilemektedir.

Bir grup veya popülasyondaki bireyler arasında DNA dizisindeki değişiklikler polimorfizm olarak adlandırılır. Bu değişikliklerin sıklığı % 1 den daha siktir ve genellikle hastalık ile direk ilişkili değildir. Ancak birçok polimorfik bölge ile bazı hastalıklar arasında bir bağlantının olabileceği son çalışmalar ile ortaya konmuştur. Na^+/K^+ -ATPaz enzimini kodlayan gendeki polimorfik değişikliklerin, PZR-RFLP tekniği kullanılarak hasta-kontrol karşılaştırmaları ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada, Konya bölgesinde yaşayan Diabetes Mellituslu hastalarda, düşük Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi ile gelişen polinöropatinin Na^+/K^+ -ATPaz-ATP1A1gen polimorfizmi ile ilişkisinin olup olmadığını araştırdık.

2. LİTERATÜR BİLGİ

2.1. Diabetes Mellitus

2.1.1. Tanım

Diabetes Mellitus (DM), kronik hiperglisemi, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasında bozukluklarla karakterize bir grup metabolik hastalıktan oluşmaktadır. Bu hastalıklar insülin salınımında, insülinin etkisinde veya her ikisinde bozulmalarla sonuçlanır. Tüm organ ve sistemleri etkileyen bu kronik hastalığın akut, kısa dönem ve uzun dönemli komplikasyonlarından, açlık ve kronik hiperglisemisi ve postprandiyal hiperglisemi sorumludur (Barnett ve Braunstein 2001).

2.1.2. Sınıflandırma

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen sınıflama aşağıdaki gibidir (Alberti ve Zimmet 1998);

A-Primer DM

1-İnsüline Bağımlı DM (Tip 1 DM)

2-İnsüline Bağımlı olmayan DM (Tip 2 DM)

- a) Metabolik Sendrom
- b) MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)
- c) LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults)
- d) Malnutrisyonla ilişkili DM

B-Sekonder DM

C-Gestasyonel DM

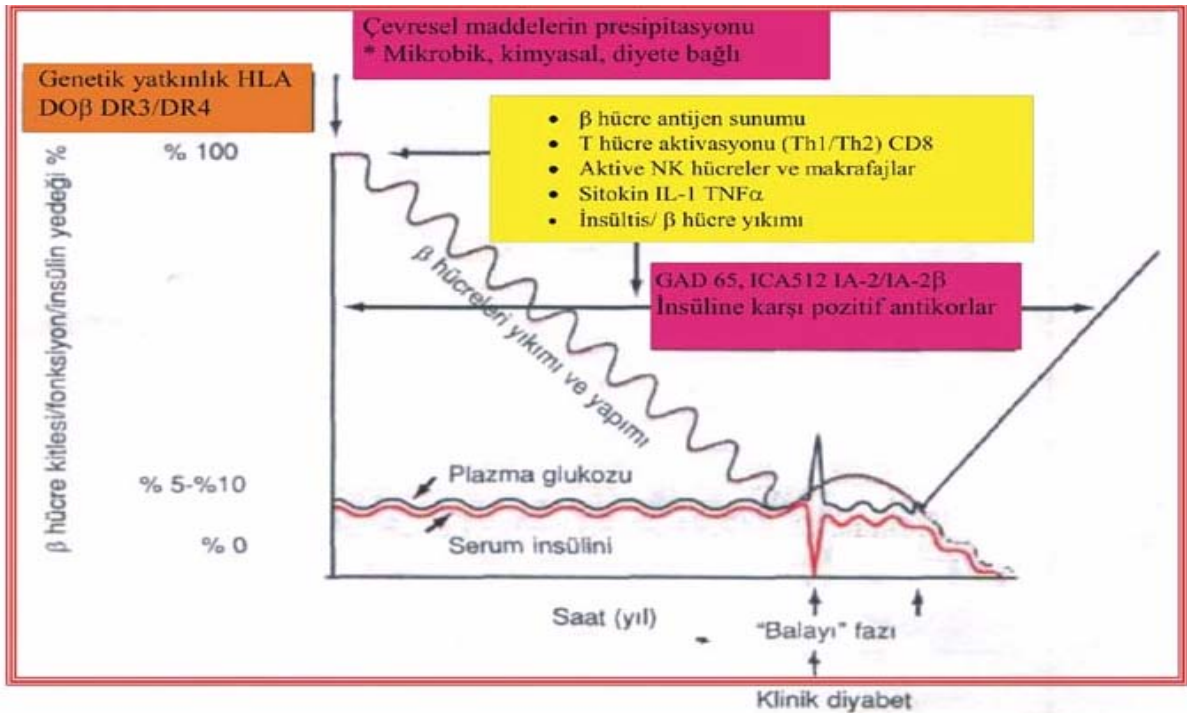
D-Bozulmuş Glukoz Toleransı

E-Sınıflandırılmayanlar

2.1.3. Tip I Diabetes Mellitus

Pankreas β hücrelerinin sellüler kaynaklı otoimmün yıkımı sonucunda gelişir (Atkinson ve Macleren 1994). İmmün hasarın belirleyicileri; adacık hücre otoantikorları

(ICA), insülin otoantikoru (IAA), glutamik asit dekarboksilaz (GAD) otoantikoru, tirozin fosfataz IA-2 ve IA-2 β otoantikoru. Bu otoantikorların bir veya birkaçı, açlık hiperglisemisi ilk olarak saptandığında % 85-90 hastada mevcuttur. Hastalığın HLA-DQA ve B genleri ile bağlantılı olarak kuvvetli HLA ilişkisi vardır (Cantor ve ark 1995, Huang ve ark 1996). Bu HLA-DR/DQ alelleri hastalığa predispozan veya koruyucu olabilir. İmmün kaynaklı diabet sıklıkla çocukluk ve adolesan dönemde ortaya çıksa da her yaşta başlayabilir. β hücre harabiyetinin hızı değişken olup özellikle yenidoğan ve çocuklarda hızlı, yetişkinlerde ise yavaştır (Zimmet ve ark 1994). Bazı hastalar ilk belirti olarak ketoasidozla başvururlar, diğerlerinde ise infeksiyon veya diğer stres durumlarında hızla ciddi hiperglisemi ve/veya ketoasidoza dönüşebilen orta derecede açlık hiperglisemisi vardır. Viral enfeksiyonlar, pankreas dokusunu ve adacık hücrelerini de enfekte eder ve insülinitis adı verilen bir tabloya yol açarlar. Erken devrede pankreas normal büyüklük ve ağırlıktadır.



Şekil 2.1. Tip1 diabetin doğal öyküsü.

Şekil 2.1’de klinik tanı konulmasından sonra insülin tedavisinin başlamasıyla beta hücre işlevlerinde geçici düzelmeye giden balayı dönemi şematik olarak ifade edilmiştir. ICA512 (adacık hücre otoantijeni 512), tirozin fosfatazlar (IA2/IA2 β), GAD (glutamik asit dekarboksilaz), ICA (adacık hücre antikoru), IAA (insülin otoantikorları), IL (interlökin), NK (doğal öldürücü) Th1 (Cd4 +T yardımcı hücrelerinin alt grubu), hücre sel immüniteden sorumlu, Th2 (CD4 + T yardımcı hücrelerinin alt grupları) ifade edilmektedir (Barnett ve Braunstein 2001).

2.1.4. Tip 2 Diabetes Mellitus

Önceleri insüline bağımlı olmayan diabet, yetişkin başlangıçlı diabet terimleri kullanılan bu tipte, insülin rezistansı ve rölatif bir insülin eksikliği vardır. Spesifik etyoloji bilinmese de bu tip diabette, β hücrelerinin otoimmün yıkımı yoktur. Tip 2 diabet hastalarında insülin salgısında eksiklik vardır ve bu insülin salgısı insülin rezistansını kompanse etmek için yetersizdir. Kilo kaybı ve /veya hipergliseminin farmakolojik tedavisi ile insülin rezistansında iyileşme olsa da normale dönmesi nadirdir (Scarlett ve ark 1982, Wing ve ark 1994). Tip 2 diabetik hastalarda yemeklerden sonraki plazma glukoz yükselmelerine ve OGTT’ne (Oral Glukoz Tolerans Testi) insülin cevapları incelendiğinde ilk 10 dakikada ortaya çıkan erken insülin cevabının (birinci faz insülin cevabı) düşük olduğu, geç dönemde ise yüksek düzeyde insülin salındığı gözlenmiştir. Birinci faz insülin cevabı yokluğu, postprandial erken dönemde plazma glukozunun regüle edilmesinde zorluk oluştururken, geç hiperinsülinemi ise hastalığın klinik olarak aşikar hale gelmesinden önce görülen reaktif hipoglisemiye neden olur. Tip 2 Diabetli hastalarda proinsülin ve ilişkili diğer peptidlerin dolaşımdaki miktarları 2-4 kat kadar artmıştır. Bu da hiperinsülinemiye rağmen yeterince periferik insülin etkisi elde edilememesinin nedenlerinden biridir. Sağlıklı kişilerde gün içi insülin salınımı pulsatif özellikteyken, Tip

2 diabetin erken dönemlerinde küçük amplitüdü salınımlar kaybolur ve yemeklerden sonraki ana salınımların da amplitüdüleri küçülmüştür (Weir ve Leahy 1994). Zaman içinde adacık beta hücrelerinin sayısındaki azalmada hastalığın gidişini etkileyen bir faktördür. Yerleşmiş bir Tip 2 Diabetes Mellitus'da beta hücre kitlesi %20-40 oranında azalmıştır. Bu azalmadan kronik hipergliseminin yanı sıra, pankreas adacıklarında biriken adacık amiloid polipeptidin (amilin) de sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (Clark ve ark 1996). Yine son zamanlarda serbest yağ asitlerinin ve özellikle de postprandial hipertrigliserideminin beta hücresi üzerine toksik etki ile insülin sekresyonunu bozduğu fark edilmiştir. İnsülin rezistansı Tip 2 Diabetin kardinal bir özelliğidir. Tip 2 diabetli hastaların çoğu obezdir, obez olmayanların da daha çok abdominal bölgede olmak üzere vücut yağ yüzdesi artmış olabilir (Kissebah ve ark 1982). İnsülin sensitivitesini etkileyen birçok faktörden biri obezitedir. Özellikle gövdesel yerleşimli obezitede beraberinde glukoz intoleransı, hipertansiyon, hiperlipidemi ve vasküler hastalık gibi majör komponentlerin ve hiperürisemi, TPAI-1 (doku plazminojen aktivatör inhibitör-1) artışı gibi minör komponentlerin bulunması halinde metabolik sendrom veya sendrom X adını alır. Obezite insülinin hedef dokulara bağlanmasını da azaltır. Ayrıca insülinin kas kan akımını artırıcı etkisi obezlerde azalmış olduğundan insülin rezistansına katkıda bulunabilir. Visseral adipoz dokuda eksprese olan ve kahverengi adipoz dokuda istirahat metabolik hızını ve beyaz adipoz dokuda da lipolizi regüle ettiği bilinen $\beta 3$ adrenerjik reseptörünün insülin rezistansı ve Tip2 Diabetes Mellitus'da rolü vardır (Sakane ve ark 1997).

Tip 1 ve Tip 2 DM arasındaki ayırım, her iki grupta farklılık gösteren diabet nedenlerinin anlaşılması ve tedavi gereksiniminin değerlendirilmesi için klinik olarak önemlidir. Birçok hastanın diabet tiplerinden hangisine dahil oldukları açıkça ayrılabilmesine rağmen, insüline bağımlı olmayan bazı diabetli kişilerin daha iyi bir sağlık

durumuna sahip olabilmek için insüline ihtiyaç duyması, belirgin bir şekilde basit olan bu sınıflamanın sınırlarını bir dereceye kadar bulanıklaştırmaktadır.

2.1.5. Diabetik nöropati

Diabetik nöropati terimi periferik sinir sistemini etkileyen heterojen bir grup hastalığı tanımlar ve diabetin en sık komplikasyonlarından biridir. Küçük ve büyük çaplı duyu liflerinde kayıp nedeniyle duyu arazları daha belirgindir. Küçük çaplı lif kaybı ağrı ve ısı duyusunda azalmaya neden olarak ayak ülserlerine yol açabilir. Büyük lif kaybı ise, vibrasyon duyusu ve derin duyu azalmaları ve sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olur (Nacar ve Ömeroğlu 2004).

Bir sinir lifinin normal fonksiyonunu sürdürebilmesi şu faktörlere bağlıdır;

- 1) Hücre gövdesinin sağlam olup, sinir lifinin metabolik desteğini sağlaması,
- 2) Schwann hücrelerinin sağlam olması ve myelin kılıfının devamlılığının sağlanması,
- 3) Vasa-nervorum aracılığı ile sinirin düzenli bir şekilde beslenmesinin sağlanması.

Hücre gövdesinin metabolizması bozulursa sinir lifi canlılığını sürdüremez, aksonal nöropati gelişir.

Polinöropatiler dağılım biçimine göre ;

- a) Yaygın
- b) Lokalize

Klinik seyrine göre;

- a) Akut
- b) Subakut
- c) Kronik

Aksayan fonksiyona göre ;

- a) Motor

- b) Duyusal
- c) Karışık
- d) Otonom nöropatiler olarak isimlendirilebilir (Özekmekçi ve Apaydın 1995).

Diabetiklerde periferik nöropati oranı çok değişik yüzdelerde verilmekle birlikte genellikle % 20-30 dolayında kabul edilmektedir. Diabette periferik sinirlerin vasa nervorumlarında mikro-anjiyopatilere bağlı ya da periferik sinirlerin beslenmesi ile ilgili metabolik aksaklıklar sebebiyle periferik nöropatiler görülmektedir. En sık rastlanılan distal yerleşmeli, özellikle duyusal ve simetrik nöropatilerdir. Bunun yanı sıra diabete bağlı diğer nöropati tipleri bildirilmiştir. Spinal sinirlerin yaygın ve simetrik olarak tutulmasına ise polinöropati (PNP) denilmektedir.

Diabetin sinir sistemini tutma olasılığı hastalığın süresi ile artar ve glisemik kontrolün derecesinden etkilenir, periferik veya otonom sinir sisteminin herhangi bir bölümü etkilenebilir. (Barnett ve Braunstein 2001).

Hiperglisemi, nörovasküler kan akımını azaltarak sinir iskemisi oluşturur. Glukoz oto oksidasyonu sonucu açığa çıkan reaktif oksijen radikalleri endotel hasarı yapar. Damar geçirgenliği artar ve proteinler damar dışına çıkar. Endonöral ödem sonucu gelişen endonöral basınç artışı ile kapiller daralma ve sonucunda sinir iskemisi olur. İskemi de sinir lifi kaybına neden olur. Hücre dışı matriks, sinir sisteminin çok önemli bir bileşenidir ve hücre çoğalması, göçü ve hücre şeklinin korunmasında rolü vardır. Diabetik nöropatide, periferik sinir HDM'sinde (hücre dışı matriks) belirgin değişiklikler vardır. Bu değişiklikler nöropati patogenezinde önemli yer tutmaktadır (Nacar ve Ömeroğlu 2004).

2.2. C-PEPTİD

C-peptid seviyeleri Tip1 diabetli hastalarda endojen insülin sekresyonunun değerlendirilmesinde en güvenilir faktördür (Zmyslowska ve ark 2004).

C-peptidin ana rolü A ve B zincirlerinde disülfid bağlarının oluşumunu kolaylaştırmak suretiyle proinsülin molekülünün doğru katlanmasını sağlamaktır. C-peptid oldukça asidik bir peptiddir. İnsanlarda beş asidik rezidüsü vardır ve bazik rezidülerle nötürleşmez (Wahren ve ark 2004).

Salgılanan C-peptidin fizyolojik rolü hala tartışılmaktadır. Birçok araştırma C-peptidin kan glukoz konsantrasyonunu değiştirmedeğini, henüz tanımlanmamış reseptörlere spesifik bağlanma ile biyolojik etkileri olduğunu göstermektedir (Wahren ve ark 2000). Sağlıklı gönüllülerde C-peptid konsantrasyon ortamında reseptörler satüre olduğundan C-peptid infüzyonu ölçülebilir etkilere sahip değildir (Rigler ve ark 1999). Buna karşılık Tip 1 diabette insülin ve C-peptid yoksunluk durumunda kısa vadeli C-peptid infüzyonu renal fonksiyonları artırır, protein kaçağını azaltır ve hiperfiltrasyonu düzeltir (Sjoquist ve ark 1998). Hücresel düzeyde C-peptid etkileri Na^+/K^+ -ATPaz ve endotel nitrik oksit sentaz aktivasyonlarının sitümüstasyonlarını içerir (Ohtomoto ve ark1996, Ohtomoto ve ark 1998). C-peptid sinyal iletim yolu, proteinkinaz-C ve MAPK (Mitogen Associated Protein Kinase) aktivasyonuna öncülük eden hetero-multimerik-G protein aracılıklı intraselüler Ca^{2+} artışını içeren bir mekanizmayı düşündürür (Kitamura ve ark 2001). Şekil 2.2' de bu mekanizma şematize edilmiştir.

Na^+/K^+ -ATPaz, renal tübül epitelyum hücrelerinde aktif Na reabsorpsiyonu için bir kuvvet sağlar (Burg 1982). Bu enzimin aktivitesi multihormonal kontrol altındadır (Feraille ve Doucet 2001). Henle kulpunun yukarı çıkan kalın kolunda, aktif Na^+/K^+ -ATPaz bağımlı Na absorpsiyonu, filtre edilmiş Na iyonunun %15'ine yakını bu nefron segmentinden reabsorbe edildiğinden, Na dengesi için temel oluşturur. Buna ek olarak

aktif Na absorpsiyonu yukarı çıkan kalın medullar kolda (MTAL: Medullar Thick Ascendind Limb) osmotik gradient oluşumuna izin verir. MTAL'de Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi genellikle regülatör inhibisyon ve cAMP- PKA (Proteinkinaz A) bağımlı sinyal yolu aracılığı ile sürekli bir sitümülyasyondan kaynaklanır (Feraille ve Doucet 2001). Rat MTAL'inde insülin Na absorpsiyonu üzerinde muhtemelen insülin reseptörlerinin zayıf ekspresyonu nedeniyle küçük sitümlatör bir etki gösterir (Mandon ve ark 1993). Buna ilaveten yukarı çıkan kalın kolda, insülin Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini sitümüle etmez. Bu nefron segmentinde, C-peptid, Na transportunun, insülinde daha mühim bir fizyolojik regülatörü olabilir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın hormonlar tarafından kontrol mekanizması, yüksek derecede bir hücre spesifitesi gösterdiği için Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi üzerinde spesifik fizyolojik etkisi rat MTAL'inde incelenmiştir (Tsimaratos ve ark 2003).

C- peptidin pertussis toksini ile preinkübasyonu C-peptid' in hücre membranına bağlanmasını engellemektedir. Bu bulgu C-peptid sinyal transdüksiyonunun dahil olduğu allosterik mekanizmayla uyumludur. Pertussis toksinine maruz kalmadan önce C-peptid ve onun reseptörü arasında yüksek affiniteli bir etkileşim varken, pertussis toksininden sonra düşük affiniteli bir etkileşim gözlenmiştir (Hamm 1998).

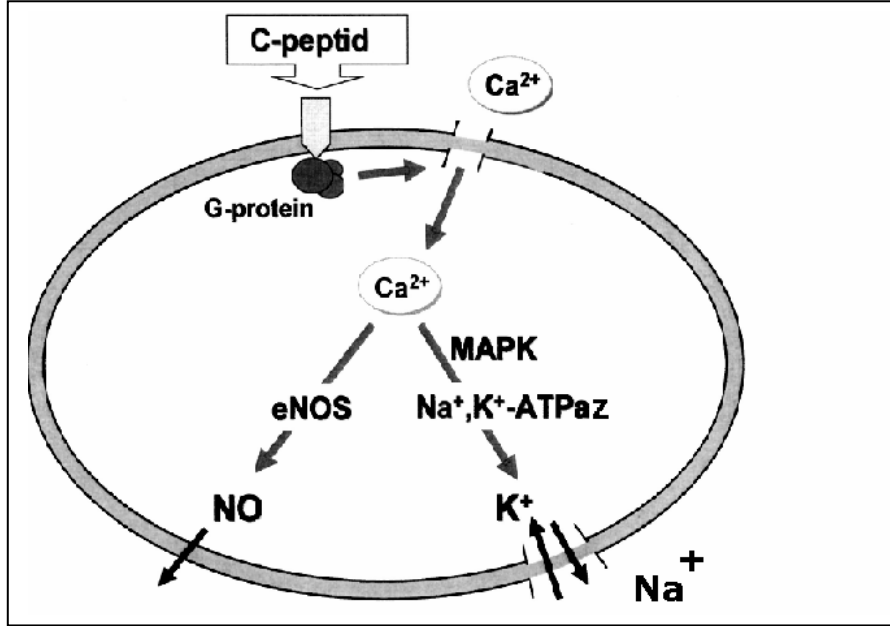
Çeşitli çalışmalarda intraselüler kalsiyumun C-peptid sinyal transdüksiyonunda ikinci mesajcı fonksiyonu olduğu ileri sürülmektedir. İnsanlarda C-peptidin tüm zinciri ve onun C- terminal pentapeptidinin renal hücrelerde intraselüler kalsiyum artışındaki etkinlikleri eşittir. Pentapeptidin Glu(1)'li (Glutamin) analogu, Ala(Alanin) ile yerdeğiştirdiğinde intraselüler kalsiyum artışının başarısız olduğu ve bağlanma prosesi için bu rezidünün önemli olduğu ileri sürülmüştür.

Ortama kalsiyum şelatörü eklenmesi C-peptid'in etkilerini ortadan kaldırır. Bu etkinin intraselüler depolardan salınan kalsiyumdan ziyade, ekstraselüler kalsiyum girişi yolu ile ortaya çıktığı ileri sürülür. Ortama pertussis toksininin ilave edilmesi, hem C-peptid'in,

hem de pentapeptid segmentinin kalsiyum konsantrasyonu üzerine olan etkilerini önler.

Burada tekrar G- proteininin C-peptid sinyal yoluna karıştığına işaret edilmektedir

(Wahren ve ark 2004).



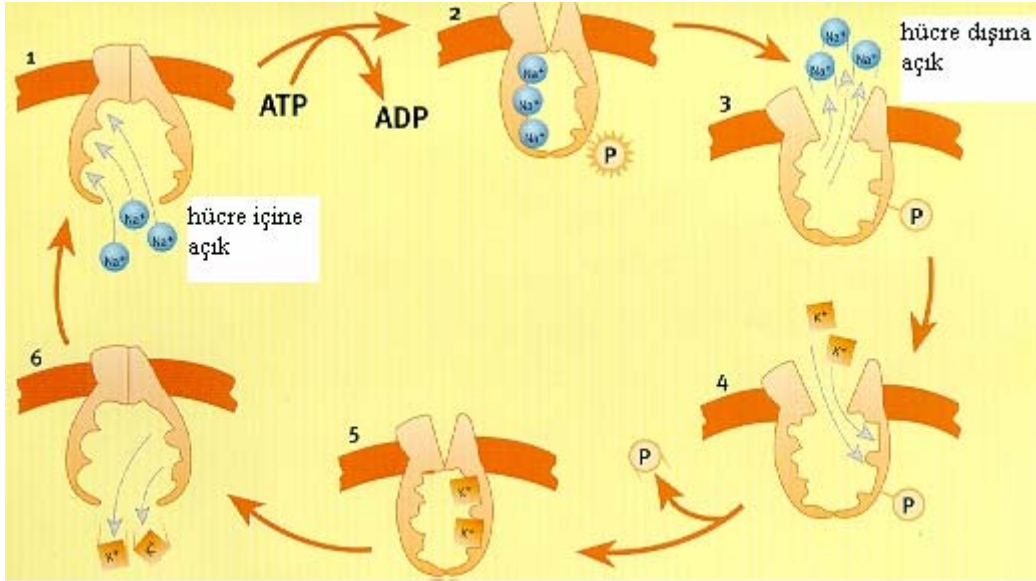
Şekil 2.2. C-Peptidin hüresel etkilerinin şematik gösterilmesi (Wahren ve ark 2004).

2.3. Na⁺ / K⁺- ATPaz ENZİMİ

2.3.1. Na⁺/K⁺-ATPaz enziminin fonksiyonu

1957 yılında Jens Skou ATP'yi hidroliz eden bu enzimi keşfetmiştir. Na⁺/K⁺-ATPaz yapısı ve enzimatik özellikleri iyi tanımlanmış bir aktif transport sistemidir. Bu sistemin hücre hacminin regülasyonu, hücreler arası pH'ın korunması gibi görevleri vardır. Plazma membranının her iki tarafında Na ve K iyonlarının elektrokimyasal gradientini kurmak ve korumaktan sorumlu integral membran proteindir. Bu gradientler ozmoregülasyon için, çeşitli organik ve inorganik moleküllerin Na eşleşmeli transportu için ve sinir ve kasın elektriksel uyarılabilirliği için esansiyeldir (Stryer 1998).

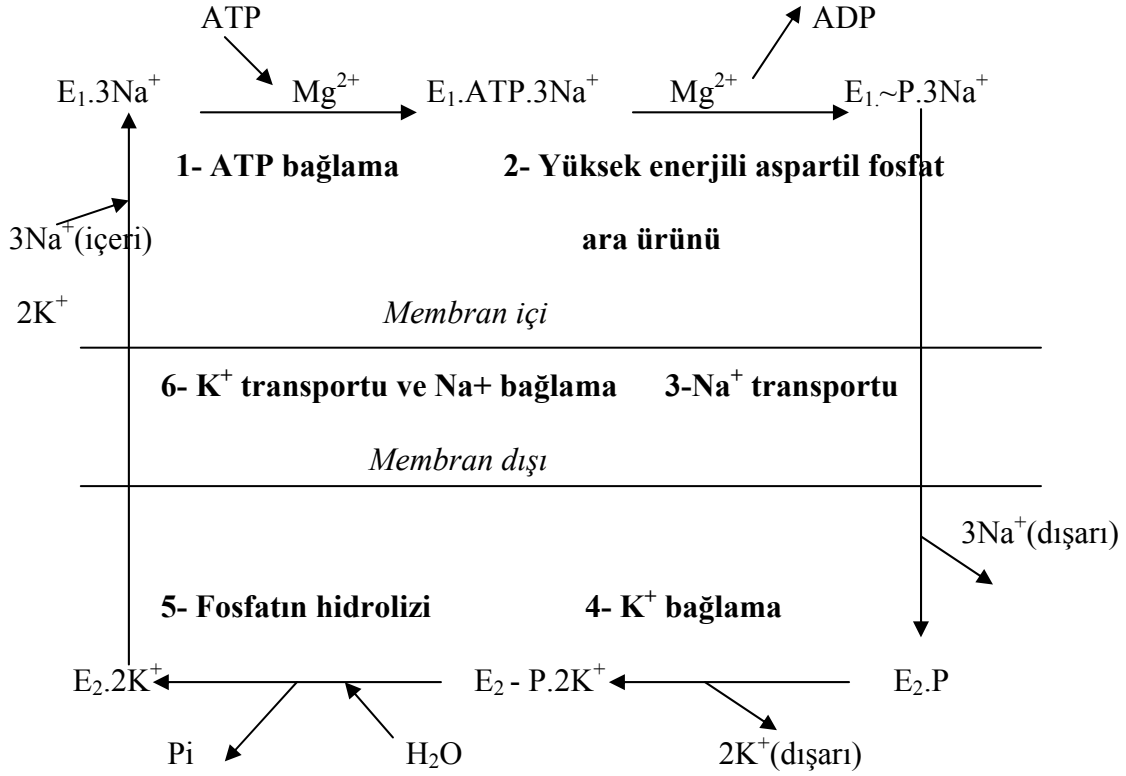
Bu enzim genellikle iyon pompası olarak nitelendirilir. ATP'nin hidrolizi ile sağlanan enerji sayesinde sodyum iyonu hücre dışına verilirken potasyum iyonu hücre içine alınır (Gözükara 1997). Şekil 2.3'te bu mekanizma şematize edilmiştir.



Şekil 2.3. Na⁺/K⁺-ATPaz'ın mekanizması (Bauer ve ark 2005)

Tüm hücreler ürettikleri ATP' nin büyük bir yüzdesini (sinir hücrelerinde % 70' inden fazlası) hücre içi Na⁺ ve K⁺ konsantrasyonlarını sağlamak için kullanırlar. ATP hidrolizinden sağlanan serbest enerji, Na⁺ ve K⁺ 'un elektrokimyasal bir gradientle endergonik transportunu sağlar. Bu olayın nasıl gerçekleştiği konusunda ortaya atılan bir

görüŖe göre; Na^+/K^+ -ATPaz enzimi transport olayı esnasında sodyumun varlığında ATP tarafından fosforile edilir. Na^+/K^+ ATPaz iki önemli komponentten oluşur. Çalışmalara göre ATP, Na^+/K^+ -ATPaz'ı sadece Na varlığında fosforile eder. Aynı zamanda Aspartil Fosfat deposu da yalnızca K^+ varlığında hidroliz için substrat olur. Bu da enzimin iki tane konformasyonel bölgeden oluştuğunu ispatlar. Bu iki bölge E_1 ve E_2 ' dir. Bu iki bölgenin, değişik görevlere sahip farklı alt bölümleri vardır. Değişik katalitik aktivite ve değişik bağlanma spesifiteleri göstermeleri örnek olarak verilebilir (Montgomery ve ark 1993, Blank 1995).



Şekil 2.4. Na^+/K^+ -ATPaz' ın düzenli sıralı reaksiyon şeması.

E_1 kapalı, içe bakan ve yüksek afiniteli Na bağlayıcı bölüme sahiptir ($\text{K}_m=0,2$ mM, bu da intraselüler sodyumunkinden küçük) ve Na^+ ile bağlandığı zaman aktive ürün $\text{E}_1\text{-P}$ ' nin oluşması için ATP ile reaksiyona girer. $\text{E}_2\text{-P}$ dışa bakan yüzde ve yüksek K bağlayıcı afiniteli bir bölümdür ($\text{K}_m=0,05$ M, ekstraselüler potasyumunkinden düşük) ve K

bağlandığı zaman $P_i + E_2'$ yi oluşturmak için hidrolize olur. Na^+/K^+ -ATPaz aşağıdaki düzenli sıralı reaksiyon şemasını kontrol etmek için çalışır ;

1. $E_1.3Na$, yapısındaki Na^+ 'u hücre içinde kazanır. ATP' ye enerjili bileşiği olan $E_1.ATP.3Na$ 'u oluşturmak için bağlanır.
2. Bu enerjili kompleks, yüksek enerjili Aspartil Fosfat ara ürünü $E_1\sim P.3Na^+$ 'u oluşturmak için reaksiyona girer.
3. Bu yüksek enerjili ara ürün düşük enerjili konformasyona dönüşür. $E_2-P.3Na^+$ ve bağlı sodyumu hücre dışına atar, bu sodyumun membrandan transfer edilmesidir.
4. E_2-P , iki tane potasyuma hücre dışında bağlanır ve $E_2-P.2K^+$ 'u oluşturur.
5. $E_2.2K$ 'yı oluşturmak için fosfat grubu hidrolize edilir.
6. $E_2.2K$ konformasyon değiştirir. İki molekül potasyumunu hücre içine aktarır. Onu 3 Na ile değiştirir ve transport siklusunu tamamlar.

2.3.2. Na^+/K^+ -ATPaz izozimleri

Hücrede çeşitli moleküler formlarda sentezlenen çoğu enzimin keşfi biyolojide oldukça ilginç bir olgu olmuştur. 1959 da Markert ve Moller, benzer biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen ayrı proteinleri tanımlamak için ilk defa izozim ifadesini kullandılar. Daha sonraları araştırmacılar enzimlerin fizyolojik fonksiyonlarının anlaşılması için bu enzimlerin yapısal varyantlarını araştırdılar. Na^+/K^+ -ATP az, P tipi ATPaz lar sınıfına aittir. P tipi ATP az'lar çeşitli katyonların hücre membranlarından aktif transportundan sorumludur. Prokaryotik ve ökaryotik hücrelerin her ikisinde de bulunurlar ve H^+ , Na^+ , Mg^{++} , K^+ , Ca^{++} , Cu^{++} ve Cd^{++} katyonlarının transportundan sorumludurlar. Bu enzimlerin hepsi elektrokimyasal potansiyele karşı katyon transportunu yürütmek için ATP nin hidrolizini kullanırlar. P tipi ATPaz'lar müşterek reaksiyon mekanizmalarına sahip

olmalarına ek olarak, ekivalan membran uzaysal organizasyon ve son derece korunmuş protein bölgeleri gibi benzer tersiyer yapılar sergilerler (Blanco ve Mercer 1998).

Na^+/K^+ -ATPaz iki ana polipeptid, α , β ve γ ' nın sitokimetric bileşiminden meydana gelen bir oligomerdir. Enzimin α ve β subünitelerinin primer yapısı ve membran organizasyonu şekil 2.5 te gösterilmiştir. α subünitesi 112.000 dalton moleköl ağırlığı ile oldukça geniş bir membran proteindir. Enzimin katalitik ve transport özelliklerinden sorumludur. α subünitesinin katyonlar, ATP ve inhibitör (oubain) bağlanma bölgeleri vardır (Lingrel ve Kuntzweiller 1994, Mercer 1993). β subünitesi, membranı bir defa karşıdan karşıya geçen bir polipeptittir. Glikozilasyonunun derecesine bağılı olarak farklı dokularda 40.000 ila 60.000 dalton arasında moleköl ağırlığına sahiptir. β subünitesi enzimin normal aktivitesi için esansiyeldir ve enzimin Na ve K afinitesinin modülasyonu ile ilgili olduğu görölmektedir. Buna ek olarak omurgalı hücrelerde β subünitesi α polipeptitin doğru katlanmasını stabilizasyonda rol oynar (Blanco ve ark 1994, Chow ve Forte 1995, McDonough ve ark1990).

γ subünitesi olarak adlandırılan üçüncü protein, enzim preparasyonlarının saflaştırılmasında tanımlanmıştır. γ subünitesinin, küçük 8-14 kDA hidrofobik bir polipeptit olduğu ifade edilmektedir. γ subünitesi $\alpha\beta$ kompleksleri ile birlikte immünopresipat oluşturan ve nefron segmentlerinde α subünitesi ile birlikte lokalize olan Na-K-ATP az enziminin bir komponentidir. γ subüniteleri arasındaki homolojinin yüksek olması nedeniyle bu γ subünitesinin Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi için gerekli olabileceği ileri sürölmüştür. Ek olarak γ subünitesinin enzimin E1 konformasyonunu stabilize edebileceği gösterilmiştir. γ subünitesinin Na^+/K^+ -ATPaz fonksiyonunu modifiye edebildiğine dair deliller vardır. γ subünitesinin Na^+/K^+ -ATPaz fonksiyonundaki kesin rolü daha ileri çalışmalara gereksinim duyar (Reaves ve ark 1980).

Na^+/K^+ -ATPaz hücrede birçok esansiyel proteinlerle birlikte birkaç izozimi olan proteinlerden biri olarak vurgulanmaktadır. Gerçekten her iki α , β polipeptitlerin farklı moleküller formları farklı genlerle kodlanmıştır. Memelilerde Na^+/K^+ -ATPaz'ın ilk olarak doğrudan gösterilmesi Sweadner tarafından başarılmıştır (Sweadner 1979, Urayama ve Sweadner 1988). Sweadner α -subünitenin iki formunu bulmuştur. Renal α formu ve beyin formu $\alpha +$ olarak tanımlanmıştır. Enzimin bu alışılmamış katalitik subünitesinin SDS (sodyum dodesil sülfat)-poliakrilamid jelde göçü daha yavaş ve Ouabain duyarlılığı daha yüksektir. Bu öncü çalışma her iki izoformun biyokimyasal özelliklerine odaklanmış çalışmalar tarafından takip edilmiştir. Böylece $\alpha +$; N etilmalemi de karşılık daha yüksek bir reaktivite göstermektedir; vitamin B türevi pyriithiamine daha yüksek bir duyarlılık ve α 'ya kıyasla tripsine karşı artmış direnç göstermektedir. Bu özellikler izoformlar arasında farklılıklar olduğunu göstermektedir. Daha sonra α ve $\alpha +$ 'nın NH_2 terminalinde farklılıklarının gösterilmesi izoform farklılığı için genetik temeli ortaya atmaktadır. Ratlarda Na^+/K^+ -ATPaz'lar, santral sinir sistemiyle sınırlandırılmış beyin tipi ve çoğu organda bulunan böbrek tipi Na^+/K^+ -ATPaz olarak iki gruba ayrılmıştır (Urayama ve Nakao 1979). Moleküler biyolojik tekniklerin ulaştığı nokta vertebralılarda en azından 3 α polipeptidin tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır. Şimdilerde $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ olarak bilinmektedir. Son zamanlarda Shamraj ve Lingrel (1994) rat testislerinde 4 α izoformunu tanımlamışlardır. Na^+/K^+ -ATPaz'ın izoformları birkaç memeli türden klonlanmıştır. Bu izoformların bütün memelilerde var olduğu ortaya konmuştur (Hem plasental hemde keseli türlerde). Tavuklarda ve teleost balıklarında Na^+/K^+ -ATPaz izoformlarının tanımlanması, vertebralılar arasında sınırsız mevcudiyetin olduğunu anlatmaktadır. İleri çalışmalar göstermektedir ki Na pompasının moleküler farklılığı beta alt ünite'ye kadar uzar. Şimdilerde 3 farklı Na^+/K^+ -ATPaz beta izoformunu tanımlanmıştır. İzoformlardan ikisi (beta 1 ve beta 2) kuşlarda ve memelerin farklı dokularında bulunmuştur. Halbuki beta 3,

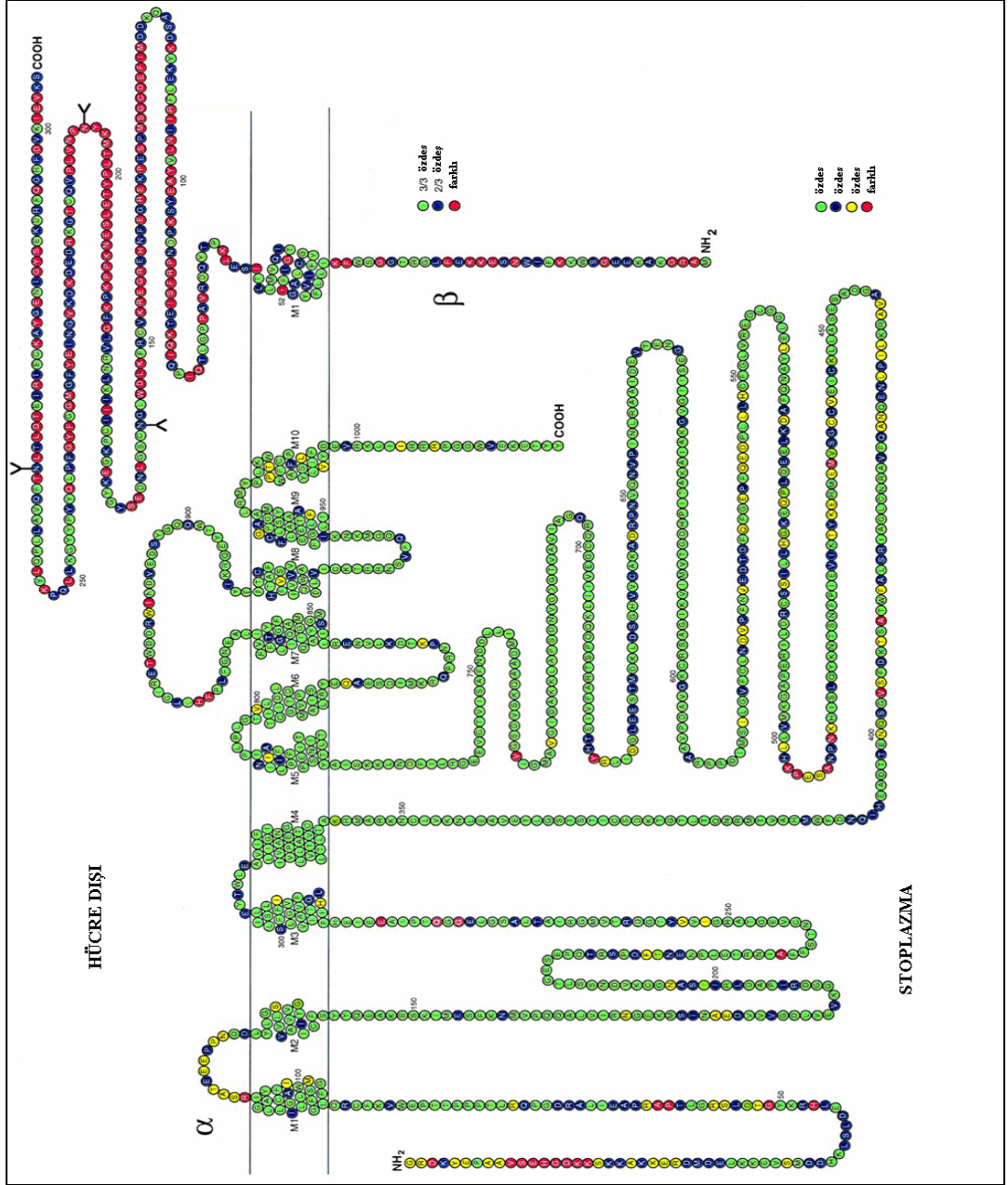
farelerde, ratlarda ve insanlarda belirlenmiştir. Na pompasının hem α hem β izoformları, ifade olarak doku-spesifik model sergilemektedir. $\beta 1$ alt üniteleri ile birleşmiş alfa 1 izoformları yaklaşık olarak her dokuda bulunur. İlâveten $\alpha 1 \beta 1$ böbreklerin başlıca izozimidir. (Klasik olarak Na^+/K^+ -ATPaz'ın kaynağı olarak kullanılmıştır)(Presley 1992, Takeyasu ve ark 1990).

Böbreklerde diğer Na^+/K^+ -ATPaz izoformlarının mevcudiyeti tartışma konusudur. $\alpha 2$ ve $\alpha 3$ izoformları hem RT-PZR (real time-PCR) ile hem de ouabain titrasyon analizi ile renal korteks, medulla ve papillada tesbit edilmiştir. $\alpha 1$ ve $\beta 1$ in geniş doku dağılımının aksine, diğer α ve β polipeptitlerin ekspresyonu sınırlanmıştır. Na^+/K^+ -ATPaz izoformlarının ekspresyon örnekleri hem mRNA hemde protein seviyesinde en çok ratlarda ayrıntılı olarak çalışılmıştır. $\alpha 4$ izoformu testise özgü bir izoformdur. $\alpha 2$ izoformları baskın olarak adipositlerde, kaslarda, kalpte ve beyinde $\alpha 3$ izoformları sinir dokusunda bol olarak bulunur. Sinir sisteminde Na^+/K^+ -ATPaz izoformların ifadesi en karışık duruma ulaşır. Nöron hücreleri tek izozim veya farklı $\alpha \beta$ heterodimer kombinasyonlarından oluşan çoklu izozimleri göstermektedir. Halbuki nöronlar $\alpha 3$ polipeptidin başlıca kaynağıdır. Glial hücreler tercihen $\alpha 2$ yi eksprese eder. β izoformları doku-bağlı tarzda dağılmıştır. $\beta 2$ izoformu; iskelet kaslarında, pineal bezde ve sinir dokusunda bulunur. Halbuki $\beta 3$ testislerde, retina, karaciğer ve akciğerde mevcuttur. Buna ilâveten Na^+/K^+ -ATPaz izoformların ekspresyon örnekleri, gelişimin yanı sıra hormonal regülasyona bağlıdır ve hastalık sürecinde değişebilir (Blanco ve Mercer 1998).

2.3.3. α ve β İzoformların yapısı

α -izoformların tamamlanmış aminoasit sekansı; insan ve ratlardan polipeptidler için cDNAs kodlanmasıyla ortaya çıkarılmıştır (Schneider ve ark 1985, Lingrel ve ark1990). Ratlarda

α alt uniteler uzunlukta azıcık değişir. α -3 izoform 1,014 aminoasit ile en küçüğüdür. α 1 -1,024, α 2-1,021 ve α 4-1,028 kalıntı ile en büyüğüdür. Aminoasit sekuansı, bölge spesifik sınıflandırma, immünolojik ve proteolitik çalışmalar α -alt unitelerinin muhtemel transmembran oryantasyonunun anlaşılmasını sağlamaktadır. Bu çalışmalarda dört trans membran mesafe alan ile bir NH₂ terminal segmenti, kabaca polipeptidin 1/3'ün büyük stoplazmik alan ve 6 membran mesafe alan bir karboksi terminal bölge ihtiva ettiği ileri sürülmektedir. Bu membran topografisi Ca-, H- ve H-K-ATPaz'lar için önerilen modellere benzemektedir (Arystarkhova ve ark 1995).



Şekil 2.5. Na⁺/K⁺-ATPaz enzimi alt üniteleri. Farklı α ve β alt üniteleri arasındaki aminoasit homolojisini göstermek için rezidüler renklendirilmiştir. (Blanco ve Mercer 1998).

Şekil 2.5' de gösterildiği gibi izoformlar arasında en yüksek yapısal farklılık NH₂ terminalinde meydana gelir. Ekstraselüler Oubain bağlanma yeri transmembran segment 1 ve 2 arasında ve aminoasit 403–503 arasında stoplazmik bölgedir. Aksine en büyük benzerlikler ATP bağlama ve fosforilasyon yerlerinin lokalize olduğu sitoplazmik orta bölge içinde meydana gelir (transmembran hidrofobik bölgeler ve COOH terminal bölge) (Blanco ve Mercer 1998).

α alt ünitesi translasyonel veya posttranslasyonel modifikasyona uğrar, bunlardan bazıları izoforma spesifiktir. Matür $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ polipeptidlerinde ilk 5 aminoasit bölünür. $\alpha 3$ izoformun benzer bir işlemde geçip geçmediği bilinmemektedir. $\alpha 3$ izoformu için doku-spesifik post translasyonel bir modifikasyon önerilmektedir. İzoform-spesifik antikor beyinde $\alpha 3$ olarak tanımlanmış ATP bağlanma yerinin yakınında bir bölgede aktivite gösterir, fakat kalpte benzer izoforma aktivite göstermez. Bu reaktifliğin eksikliği sentez esnasında proteinin modifikasyonu tarafından epitop antikorun blokajı olarak yorumlanır (Arystarkhova ve Sweadner 1996, Lingrel ve Kuntzweiller 1994).

Bu β izoformların aminoasit sekuansı; fare, insan ve ratların cDNA larından ortaya çıkarılmıştır. Ratlarda $\beta 1$ -izoformunun 304, $\beta 2$ -izoformunun 290 ve $\beta 3$ -izoformunun 279 aminoasiti vardır. Bütün izoformlar genel temel yapıyı paylaşırlar. β izoformlar kısa NH₂ terminal sitoplazmik bölge, bir transmembran mesafe segment ve bir geniş ekstraselüler alandan ibarettir. Bütün memeli türleri boyunca $\beta 1$ ve $\beta 2$ izoformların homolojisi yaklaşık %95'tir. Bu değer memeli olmayan türlerde %60'a düşer. Farklı β izoformları arasında homoloji, katalitik altünite için daha düşük bulunmuştur. β altünitenin transmembran alanı hem izoformlar hemde türler arasında en çok korunmuş bölgedir. Bütün β -izoformlar ağırlıkta glikozilattır. Memelilerde $\beta 1$ izoformları 3 N -bağlı glikozilasyon bölgesine sahiptir. $\beta 2$ izoformlar için farz edilen N-bağlı glikozilasyon

bölgeleri türlere bağlı olarak değişir. Ratlar 7, insanlar 8, fareler 9 potansiyel glikozilasyon bölgesine sahiptir. Bütün alanların kullanılıp kullanılmadığı bilinmemektedir. Tunikamisin ile Na^+/K^+ -ATPaz alt ünitesinin glikozilasyonunun inhibisyonu, Oubain için normal affiniteyle, katalitik olarak yeterli Na pompaları ile sonuçlanır (Blanco ve Mercer 1998).

β 1-alt ünitenin yapısında bir diğer önemli özellik 3 disülfid köprüsünün olmasıdır ki, bunlar rat polipeptidlerinde, Cys^{125} - Cys^{148} ,- Cys^{158} - Cys^{174} ,- Cys^{212} - Cys^{215} arasında meydana gelir. Bütün sisteinler sekans içinde bağlantılı pozisyonlar değil- β 2 ve β 3 izoformları içinde muhafaza edilmiştir. İndirgeyici ajanlarla Na^+/K^+ -ATPaz'ın muamelesi ve Na^+/K^+ -ATPaz'ın inaktivasyonunun sonuçları, disülfid bağlarının enzim fonksiyonu için gerekli olduğunu ortaya koymaktadır. Diğer Na pompa β -izoformlarında sülfhidril köprülerinin rolü ve yeri bilinmemektedir (Beggah ve ark 1997).

2.3. 4. Na^+/K^+ -ATPaz izozimlerinin enzimatik özellikleri

Bireysel izozimlerin enzimatik özelliklerinin anlaşılması, Na^+/K^+ -ATPaz'ı karakterize eden kompleks moleküler farklılıklar için temelin belirlenmesinde yardımcı olabilir. Böbrekte bütün Na pompalarının α 1 β 1 izozimlerinin fonksiyonel özellikleri kapsamlı olarak analiz edilmiştir. Na pompası izozimlerinin katalitik özelliklerinin değerlendirilmesindeki ilk girişim, böbrek ve beyinde enzimlerinin substrat affinitelerinin kıyaslanmasıyla olmuştur. Bu ilk çalışmalar Na^+ , K^+ ve ATP için onların affinitelerinde bariz farklılıklara sahip olduğunu ortaya koymuştur. Daha sonra Sweadner Na^+/K^+ -ATPaz'ın, rat axolemma ve rat böbreklerinde özelliklerini kıyaslamıştır (Sweadner 1985).

Böbrek α 1 β 1 izozimi α 2 α 3 alt ünitelerinden oluşmuş, nöral enzime göre daha düşük ATP, benzer K^+ ve daha yüksek Na affinitesi göstermiştir. Böylece Na^+ ve K^+ affinitelerinde, ratların farklı dokularında, kısmi olarak saflaştırılmış Na^+/K^+ -ATPaz

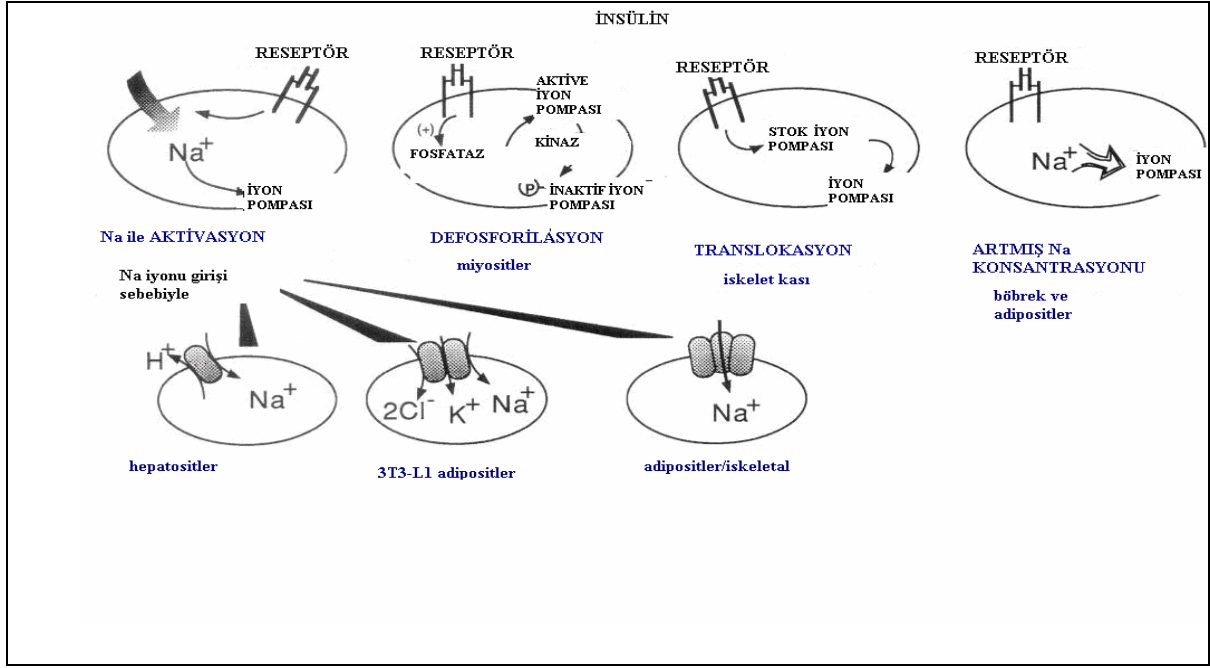
arasında farklılıklar bulunmuştur. Ratların bütün adipositlerinde $\alpha 1$ izozimin Na^+ için Km değeri, $\alpha 2$ izozimden 3 kat daha düşük bulunmuştur. İzofomların enzimatik özelliklerinde diğer bir farklılık, pineal bezde $\alpha 3 \beta 2$ Na^+/K^+ -ATPaz formunda bulunmuştur (pineal $\alpha 1 \beta 1$ 'e göre daha yüksek Na^+ affinitesi göstermektedir)(Blanco ve Mercer 1998).

Gelişim boyunca Na pompası izofomlarının ilişkili miktarının değişimi birkaç dokuda meydana gelir. Na^+/K^+ -ATPaz izoform ekspresyonunun düzenlenmesinde dikkate değer örneği gelişen rat kalbinde bulunmuştur. Bu dokuda hayatın ikinci ve üçüncü hafta arasında $\alpha 3$ izoformdan $\alpha 2$ izoformda değişiklik vardır ve daha sonra yetişkin miyokardiyumun baskın izoformu haline gelir. İlginç bir şekilde bu bulgu miyokardiyumun elektrofizyolojik özelliklerinde önemli değişiklikler ile çakışmaktadır (Orlowski ve Lingrel 1988, Lucchesi ve Sweadner 1991). Na pompası izozimleri hormonlar tarafından farklı olarak düzenlenebilir. Hormonlar özel bir izoformun ekspresyonunun düzenlenmesiyle aksiyonları ortaya çıkabilir veya bir birey Na^+/K^+ -ATPaz'ın aktivitesini direkt olarak etkileyebilir (Ewart ve Klip 1995). Örneğin rat iskelet kasında insülin, plazma membranına intrasellüler depolanma öncesi $\alpha 2$ Na^+/K^+ -ATPaz'ın hızlı translokasyonuna yolaçabilir Bunun sonucunda, hücre yüzeyine ilave fonksiyonel Na pompalarının gereksinimi ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi artar. İlaveten Na^+/K^+ -ATPaz izofomlarının normal ekspresyonu patolojik durumlar tarafından değiştirilebilir. Örneğin birkaç kardiyak hastalıkta kalbin Na^+/K^+ -ATPaz izoform kompozisyonu değişmiştir. Bu değişiklikler, hastalık esnasında değişmiş homeostazisin yeniden şekillenmesinde hücresel girişimi yansıtabilir (Hundal ve ark1992).

2.3.5. Na⁺/K⁺-ATPaz enziminin regülasyonu

Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin regülasyonu farklı hücresel mekanizmalar tarafından gerçekleştirilir. Plazma membranında mevcut enzim moleküllerinin sayısının modülasyonu tarafından veya hücre yüzeyinde hazır Na⁺/K⁺-ATPaz'ın aktivitesinin etkilenmesiyle başarılabılır. Örneğin plazma membranındaki enzimin miktarı sentez oranının değişmesiyle modifiye edilebilir. Alternatif olarak hücre yüzeyinde Na pompasının aktivitesi Na pompası fonksiyonunda hızlı düzenlenme sağlanmasıyla hücre yüzeyinde direkt olarak regüle edilebilir. Bu hızlı yanıtı karışan birkaç etken vardır. İntrasellüler Na⁺ konsantrasyonu, intrasellüler Ca⁺² ve endojen Ouabain, Na pompası aktivitesinin potansiyel kısa dönem düzenleyicileridir (Ewart ve Klip1995).

α1- Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin kısa süreli regülasyonu için, Na iyonu girişine sekonder, Na iyonu konsantrasyonunun artması, fosforilasyon, defosforilasyon, subünitelerin plazma membranına translokasyonu ya da Na'a ilginin artması ile sonuçlanan bir mekanizma ileri sürülmektedir. Bu subünitenin uzun süreli regülasyonuna gen transkripsiyonu, translasyonu ve protein degradasyonundaki değişikliklerin neden olduğu ileri sürülmektedir. .Bu değişiklikler kompleks intrasellüler sinyal ağı üzerinde gerçekleşir ve proteinkinaz ve fosfatazin inhibisyon veya aktivasyonunu içermektedir (Sweeney ve Klip 1998).



Şekil 2.6. İnsülinle Na^+/K^+ -ATPaz regülasyonunun şematik mekanizması (Ewart ve Klip1995).

Na^+/K^+ -ATPaz subünitelerinin hücre içi depolanma sitelerinden, plazma membranına translokasyonunun, iskelet kasında insüline cevapta Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi için ana regülatör mekanizma olduğu ileri sürülmüştür. Sweeney and Klip(1998), rat kasında $\alpha 2$ subünitesinin tercihli olarak insülinle yer değiştirtirdiğini rapor etmişlerdir. 30 dk üzerinde insülinde sonra iskelet kası preparasyonları izole edildiğinde $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformları plazma membranında artmış olarak bulunmuştur. Hücre içi membranda ise bu izoformlar azalmış olarak bulunmuştur. $\alpha 2$ ve $\beta 2$ dağılımında ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Kas hücreleri içinde Na^+/K^+ -ATPaz subünitelerinin dağılımını insülinin regüle edebileceği ileri sürülmüştür.

İnsülinle regüle edilmiş Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve insülinle regüle edilmiş glukoz transportu arasında ilginç korelasyonlar vardır. İnsülin; subünitelerin hücre içi depo kompartımanlarından, plazma membranına translokasyonunu gerçekleştirir. Bu sistemler hücre içinde sırasıyla K^+ ve glukoz alınmasına aracılık eder. Glut 1 gibi $\alpha 1$ subünitesi de her yerde bulunur. Glut 4 gibi $\alpha 2$ subünitesi de dokuya spesifiktir (kas, kalp, yağ dokusu).

Na⁺/K⁺-ATPaz'ın α 2 subünitesinin ve glut 4'ün, insüline cevapta, hücre içi membrandan hücre yüzeyine yer değiştirdiği gösterilmiştir. İnsülin subünite dağılımını yağ hücrelerinde değiştirmedeği, kaslarda değiştirdiği ileri sürülmüştür (Weidmann ve Ferrari 1991, Mueckler 1993).

Protein kinaz A'nın cAMP aktivasyonu, protein kinaz C'nin diaçil gliserol aktivasyonu ve kalmodulin kinaz'ın serbest intraselüler Ca iyon konsantrasyonu. Bu kaskadlar enzim aktivitesinin hormonal regülasyonuna aracılık eden sinyal kaskadları olarak önerilir ve genellikle enzimin fosforilasyonu ile sona erer. Na⁺/K⁺-ATPaz pompasının yukarıda bahsedilen kinazlar tarafından fosforilasyona tabi olabileceği ileri sürülmüştür. Proteinkinaz A ve proteinkinaz C'nin, Na⁺/K⁺-ATPaz'ın katalitik aktivitesini modifiye edebileceği ileri sürülmüştür (Ewart ve ark 1995).

İnsülin tedavisi gören diabetik hayvanların kas hücre membranlarında, ısrarcı hiperglisemiye rağmen Na-K-ATPaz aktivitesinin kısmi restorasyonu kaydedilmiştir. İnsülinin, Na pompası üzerinde direkt olarak onun Na affinitesini artırmak suretiyle hareket ettiği, fakat membranda mevcut olan pompa sayısını değiştirmedeği ileri sürülmüştür (Vague ve ark 1997).

İskelet kası Na⁺/K⁺-ATPaz havuzlarından en genişlerinden birini içerir ve burada enzim α ve β subüniteleri olarak ifade edilir. Rat iskelet kası membran fraksiyonları aralıklı sükroz gradientleri ve diferansiyel santrifügasyonlarla izole edilmiş, insülinin; α 2 ve β 1 subünitelerinin plazma membranına translokasyonunu sağladığı, fakat α 1 ve β 2 dağılımında bir değişiklik meydana getirmedeği ifade edilmiştir. α 1 izoformunun idari fonksiyonunun bulunduğu, α 2 izoformunun ise hormon sensitif ve primer olarak aktivite üzerinde insülin etkisinden sorumlu olduğu ileri sürülmüştür. İskelet kasında Na⁺/K⁺-ATPaz α subüniteleri, insüline cevapta serin/treonin ve tirozin rezidüleri üzerinde fosforile edilir. Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin insülin tarafından sitümüle edilmesi proteinkinaz-C

bağımlı yollar aracılığı ile meydana gelir. Hücre yüzeyinde aktif Na^+/K^+ -ATPaz molekülerinin sayısı artar (Al-Khalili ve ark 2003)

2.4. Genetik Polimorfizm

Bir kromozomun aynı bölgesi veya lokusu, aynı türün farklı bireylerinde veya kromozomlarında iki (veya daha fazla) farklı DNA dizilişine sahiptir ve bunlar polimorflar olarak tanımlanır, ve lokusların (genetik) polimorfizm gösterdiği söylenebilir. Genetik polimorfizme mutasyonlar neden olur. Diploid bireyler içersinde, örneğin, belirli tek kopya genin iki aleli sadece bir nükleotid yönünden bile farklılık gösterebilir ve dolayısıyla gen polimorfik olarak tanımlanabilir. Benzer şekilde popülasyondaki bireylerde, eğer aynı gen için diğer alternatif DNA sekansları varsa bu geni kodlayan birçok aleller bulunabilir. Yukarıda tarif edildiği gibi, mutasyon olaylarının genetik polimorfizme neden olması tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) meydana getirir, fakat bunlar aynı zamanda tekrarlayan sekansların demetlerinde uzunluk varyasyonları da meydana getirir. Her farklı tekrarın uzunluğu, farklı bir formdadır ve her birisi basit sekanslı uzunluk polimorfizmin bir örneğidir. SNP'ler, restriksiyon enzimlerince teşhis edilebilen kısa diziler içinde oluşur ve böylelikle, bir restriksiyon enzimi tarafından DNA molekülünün kesilmesi ile elde edilen bir fragmentin uzunluğu her iki alel için farklı olur. Bu restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RLFP) olarak bilinir. Genetik bir hastalığa neden olan aleli belirleyen özel bir RLFP, klinik teşhiste bir markır olarak kullanılabilir. RLFP'ler ayrıca genetik haritaların oluşturulmasında da kullanılabilir ve böylece genom sekanslama projelerindeki DNA dizilerinin düzenlerinin belirlenmesi çalışmalarına yardımcı olmaktadır. Restriksiyon fragmentleri veya PCR ürünleri gibi aynı uzunluktaki DNA fragmentlerinde bulunan SNP'lerin belirlenmesinde jel elektroforezi kullanmak mümkündür (Turner ve ark 2004).

2.5. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu 1985 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilmiş ve Saiki, Falovna ve diğerleri tarafından geliştirilmiştir (Kubista ve ark 2006). PZR tekniği moleküler biyoloji araştırma laboratuvarlarında anahtar bir prosedür olmuştur (Williams 1989). İki oligonükleotid dizisi tarafından tespit edilen spesifik DNA segmentleri, polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak enzimatik olarak milyonlarca kat çoğaltılabilir (Gyllensten 1989).

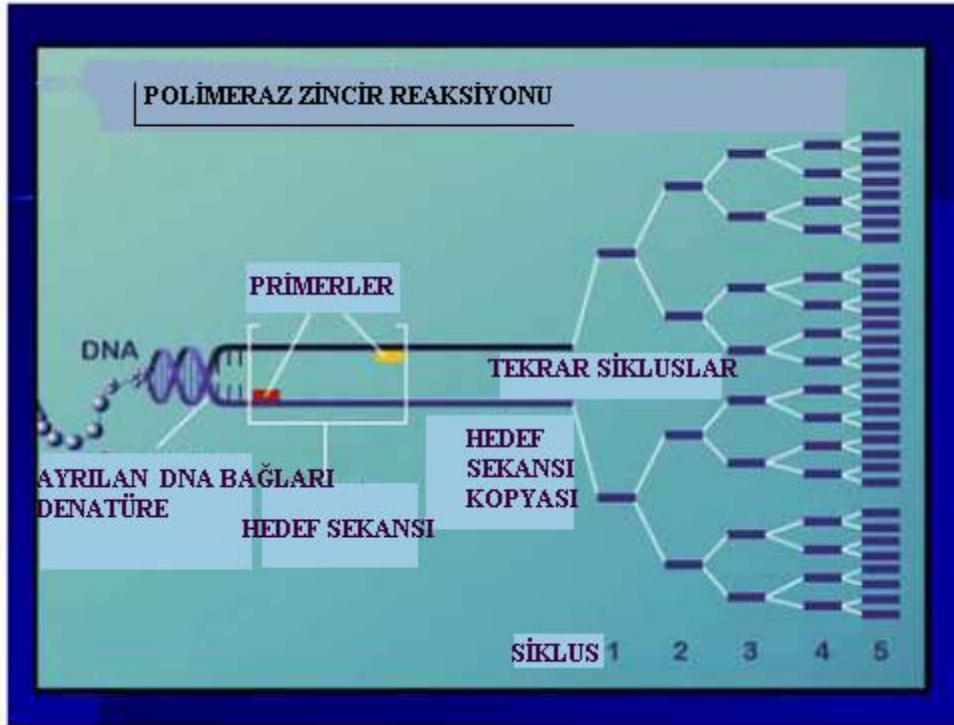
PZR, DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile (90-95 °C) birbirinden ayrılmasını (denatürasyon); daha sonra sentetik oligonükleotidlerin (primer) hedef DNA'ya bağlanmasının (hibridizasyonu); sonra zincirin uzamasını (polimerizasyonu) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması ile sağlanır.

Bu üç adım (denatürasyon / hibridizasyon / polimerizasyon) bir PZR siklusunu oluşturur. Her adım farklı ısılarda gerçekleştirilir. Yani çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer (18-24 baz uzunluğunda) kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır. Bu işlem DNA polimeraz enziminin varlığında birçok kez tekrarlanır. Amplifikasyon döngüsünün ürünleri bir sonraki için kalıp görevi görerek bol miktarda DNA ürünü elde edilir.

Isıya dayanıklı DNA polimerazlar PZR'da kullanılmak üzere bazı termofilik bakterilerden izole edilmiş ve klonlanmıştır. En yaygın olanı *Thermus aquaticus*'dan elde edilen Taq polimerazdır.

Bir çift PZR primerinin herbiri yaklaşık 18-24 nükleotid uzunluğa ve benzer G+C içeriğine sahip olması gereklidir. Böylece primerler benzer sıcaklıklarda tamamlayıcı sekanslara tutunabilir. Kısa oligonükleotidler (<25 nükleotid) için annealing sıcaklığı (°C), $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü kullanılarak hesaplanabilir. Primerler hedef sekansın zıt

zincirlere tutunması amacıyla tasarlanır, dolayısıyla 3' uçlarına nükleotidlerin eklenmesiyle birbirlerine doğru uzatılırlar. Genelde 500 bp(baz pair)'den kısa olan hedef sekanslar kolayca çoğaltılabilir; fakat optimizasyon yapılarak 10 kb'den daha uzun fragmentler PZR'da çoğaltılabilir. Eğer çoğaltılacak olan DNA sekansı biliniyorsa, primer tasarımı nispeten kolaydır (Turner ve ark 2004).

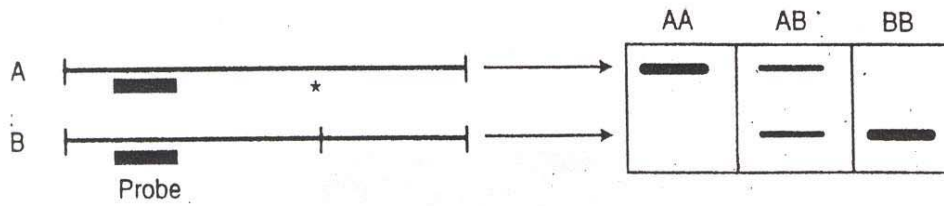


Şekil 2.7. PZR ile DNA çoğaltılması(http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/tez_uroloji.asp)

PZR ürününün zincir ayrışma ısıları, ürün özgüllüğü, primer yapışması, primer-dimer kalıntılarının oluşumu ile enzim etkinliği ve doğruluğu magnezyum iyonu derişiminden etkilenebilmektedir. Bu nedenle PZR'ler toplam dNTP derişiminin üzerinde 0.5 ile 2.5mM magnezyum içermelidir. Primer stoklarında ve kalıp DNA'da EDTA ya da diğer bağlayıcıların varlığı, uygun magnezyum derişimini bozabileceği dikkate alınmalıdır (Kayrın ve ark 2003).

2.6. Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi (RLFP)

Restriksiyon enzimleri spesifik bir DNA çift sarmal sekansını tanır ve DNA'yı belirli bir bölgeden keser. Genomik DNA'da oluşan sekans değişiklikleri restriksiyon enzimlerinin kesim yerlerini değiştirir ve kesim sonucu oluşan parçaların boyutları değişir. Enzim kesim yöntemi ile kesim sonucu oluşan parçalar agaroz jel üzerinde elektroforez edilir ve moleküler boyutlarına göre bandlara ayrılır (Şekil 2.8). Southern Blot ile belirlenen DNA'ya dayalı restriksiyon bölgelerindeki varyasyonlar "Restriction Length Fragment Polymorphism" olarak adlandırılır ve DNA genotiplerinin belirlenmesinde kullanılır. İnsan genetik araştırmalarında polimorfizm çalışmalarının sayısı hızla artmaktadır. (http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/tez_uroloji.asp)



Şekil 2.8. Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizm belirlenmesi. A alelinde *(yıldız) ile belirtilen bölgedeki varyasyon nedeni ile kesim yapılamamakta ve B alelinden daha geniş bir DNA parçası oluşmakta. Gösterilen lokus için olası varyasyonların üçü de gösterilmiştir.

3.MATERYAL VE METOD

3.1.Vaka seçimi

S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Endokrinoloji polikliniklerinde diabetik polinöropati tanısı almış, Konya ili ve çevresinde yaşayan Tip 2 Diabetes Mellituslu hastalardan seçildi. Hastaların seçimi endokrinoloji kliniğinde yapılan muayene sonuçlarına göre yapıldı. 60 hasta (30E/30K) ve 28 kontrol (18E,10K) çalışmaya dahil edildi. Kontrol grubunda diabetik nöropati tanısı almayan sağlıklı bireylerinin kan örnekleri kullanıldı.

Tablo 3.1. Kontrol ve hasta grubunda ortalama yaş \pm standart sapma değerleri

| | | $\bar{X} \pm SD$ | |
|----------------------|----------------|------------------|------------------|
| Yaş | Kontrol | 36,00 \pm 5,89 | 34,13 \pm 4,09 |
| | Hasta | 60,97 \pm 9,00 | 59,77 \pm 8,46 |
| Diabet süresi | | 11,54 \pm 7,40 | 12,67 \pm 7,08 |

DNA izolasyonu, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve restriksiyon enzim kesimi çalışmaları Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi araştırma laboratuvarında yapıldı.

3.2. Numunelerin Alınışı ve Hazırlanışı

Uygulama için heparinli, EDTA'lı kan ve serum örnekleri alındı. Heparinli kan santrifüj edilerek plazması ayrıldı Alttaki şekilli elemanlar yıkanarak santrifüj edildi. Süpernatant atılarak yıkama ve santrifüj işlemi üç kez tekrarlandı. Sonuçta elde edilen

eritrosit membranında Na^+ / K^+ -ATPaz enzim aktivitesi ölçüldü. EDTA'lı kandan DNA'lar izole edildi. Serumda C-peptid düzeyleri ölçüldü.

3.3. Kullanılan Cihazlar

1. Soğutmalı Santrifüj : Hettich Universal 30 RF
2. Soğutmalı Ultra Santrifüj : Hettich Rotina 46 R
3. Hassas Terazisi: Precisa 125 A
4. Vorteks: Nüve – NM 110
5. Benmari: Nüve 400
6. Manyetik Karıştırıcı: Elektro-Mag

3.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Reaktifler

Tris : Cat No: Sigma 8168

HCl : Cat No: Sigma 920-1

NaCl : Cat No: Sigma 9625

KCl : Cat No : Sigma P4504

MgCl_2 : Cat No : Merck 8266

Na_2ATP : Cat No : Sigma A7699

SDS: Sigma L4509

EDTA: Sigma E-1644

Heparin : Nevparin 5000 IU/ml

3.5. Kullanılan Çözeltiler

0,1 N HCl çözeltisi : 8,3 ml HCl alındı ve bir miktar distile su üzerine ilave edildi ve son hacim 1 litreye tamamlandı.

0,08 M Tris çözeltisi : 10,114 gr. Tris tartıldı, bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı.

Yıkama çözeltisi : Bir miktar distile su üzerine 26,56 ml 0,1 N HCl ilave edildi, üzerine 31,25 ml 0.08M tris çözeltisi ilave edildi. 9,125 gr. NaCl tartılıp çözeltiye ilave edildi. Toplam hacim 1000 ml ye tamamlandı.

10 mM pH=7,4 tris tamponu: Bir miktar distile su üzerine 0.1N HCl'den 42,5 ml ilave edildi, üzerine 0,08 M tris çözeltisinden 50 ml eklendi. Son hacim distile su ile 800 ml'ye tamamlandı.

Medium: 5,85 gr. NaCl, 0,3728 gr. KCl, 1,2198 gr. MgCl₂.6H₂O, 0,0372 gr. EDTA tartılıp bir miktar distile suda çözüldü. Üzerine 159,41 ml HCl ve 187,54 ml 0.08M tris ilave edilip karıştırıldı ve son hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlandı.

%10'luk SDS çözeltisi: 10 gr. SDS tartıldı, bir miktar distile suda çözüldü ve son hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.6. Na⁺-K⁺ ATP az Enzim Aktivitesinin Tayini

Eritrosit membran Na⁺/K⁺-ATP az aktivitesi ölçümü, modifiye edilmiş Kitao – Hattori metodu ile yapıldı (Kitao ve Hattori 1983). Alınan antikoagülanlı 10 ml kan, 1000g de 4 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen eritrosit pelleti aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Hafifçe alt üst edildikten sonra süpernatant atıldı. Alttaki eritrosit pelleti tekrar aynı miktarda yıkama çözeltisi ile muamele edildi. Bu yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Yıkama işlemi bittikten sonra eritrosit pelleti 10 mM, pH = 7,4 tris tamponuyla %40 hemotokrite getirildi. 0 – 4 °C de 15 dk. bekletildi. Hemolize numune 11.000 rpm'de 45 dk. santrifüj edildi. Süpernatant atılarak eşit hacimde tris tamponu ile karıştırılarak 11000 rpm'de 45 dk. santrifüj edildi. Bu işlem üç kez tekrar edildi. Elde edilen eritrosit ghostu, 10 mM Tris – HCl pH 7,4 tamponu içine alındı. Numuneden 200 µl. temiz bir deney tüpüne alınarak üzerine 800 µl. medium ilave edilerek iyice karıştırıldı. Su banyosunda 37°C de 10 dk. inkübe edildi. Daha sonra su banyosundan

çıkartılarak hiç bekletilmeden reaksiyonu durdurmak için 50 µl. %10' luk SDS ilave edildi. Alt üst edildi ve bulanıklık varsa 5500 g'de +4°C de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan Boehringer-Mainkeimin photometer 5010 marka spektrofotometrede, Diasis Diagnostic Systems marka inorganik fosfor ve Spinreact marka mikroprotein ticari kiti kullanılarak inorganik fosfor ve mikroprotein tayini yapıldı. Sonuç $\mu\text{molP}_i\cdot\text{mg.prt}^{-1}\cdot 10\text{dk}^{-1}$ olarak hesaplandı.

3.7. C-peptid Tayini:

İmmuno Assay metodu ile serumda ölçüm yapıldı. C-peptid ölçümleri, Immülite 1000 cihazı kullanılarak C-peptid için kompetitif kemiluminesan enzim immunaassay yöntem ile yapıldı (DPC Diagnostic Products Corporation USA)

3.8. DNA İzolasyonu: Kan örnekleri 2ml'lik EDTA'lı tüplerde toplandı çalışılincaya kadar -20°C de bekletildi. Invisorb marka Spin Blood kiti kullanılarak DNA lar izole edildi.

Çalışmaya başlamadan önce örnek sayısına yetecek kadar Eluotion Buffer hazırlandı ve 56°C ye ısıtıldı.

1. 200 µl kan örneği, 200 µl lizis buffer A ve 20µl Proteinkinaz K, 1.5 ml'lik ependorf tüpüne konuldu. Kapağı kapatılarak tüp kısaca vortekslendi. 10 dakika 56°C de inkübasyona bırakıldı.
2. 400 µl Binding Buffer tüpe eklendi. 10 sn. vortekslenerek veya 3 defa pipetaj yapıldı. Kısa bir spin yapıldıktan sonra sıvının tamamı RTA Spin filtreli tüpe aktarıldı, 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi ve 12 000 rpm/2 dk. santrifüj edildi.
3. Toplama tüpü değiştirilerek, filtre üzerine 500 µl Wash Buffer R1 eklendi ve 12 000 rpm/1 dk. satrifüj edildi.
4. Toplama tüpü boşaltıldı, tekrar aynı toplama tüpü kullanılarak filtre üzerine 800 µl Wash Buffer R2 eklendi ve 12 000 rpm/1 dk. satrifüj edildi.

5. Filtre boş toplama tüpüne aktarıldı, maksimum 13 200 rpm/ 4 dk. santrifüj edilerek alkolden arındırıldı.
6. Filtre temiz 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı ve alkolün tamamen uzaklaşması için 3 dk. kapak açık biçimde oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. Filtre membranın tam ortasına ısıtılmış 56°C'deki 200 µl Eluotion Buffer-D eklenerek, 5 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi
8. 10 000 rpm/1 dk. satrifüj edilir ve filtre atılarak, ependorf içindeki ekstrakt alınarak -20 °C de saklandı

3.9. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): Na/K-ATPaz-ATP1A1 geni kromozom1'in kısa kolu üzerinde lokalize olmuş ve 23 ekson ve 22 introndan meydana gelmiştir. İlk intronda BglII enzim kesimi ile bir restriksiyon polimorfizmi tanımlanmıştır. PCR işlemi için ATP1A1 geninin intron 1'i

F: 5'-CAG TCC CTG GCT AGA CAA TTC CTT-3'' (Tm=58.3)

R: 5'-CCA AAT GCA GCC CAT TTC GGA GTT-3' (Tm=60.2)

primerleri kullanılarak çoğaltıldı (Vague ve ark 1997).

- 1,6 µl dATP, dGTP, dTTP ve dCTP (10 pmol)
- 2 µl 10xPZR tamponu
- 1 µl MgCl₂
- 1,2 µl 10 pmol primer (LIG1; DNA ligaz 1)
- 11,8 µl dH₂O
- 0,4 µl DNA Taq polimeraz enzimi
- 2 µl genomik DNA

içeren karışım ile gerçekleştirildi. PZR reaksiyonu Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700 model termal cycler'da

- 94°C’de 3 dakika bir döngü
 - 94°C’de 0,15 dakika,
 - 60°C’de 0,15 dakika,
 - 72°C’de 0,15 dakika,
- } 10 döngü
- 94°C’de 0,15 dakika,
 - 58°C’de 0,15 dakika,
 - 72°C’de 0,15 dakika,
- } 25 döngü
- 72°C’de 3 dakika ve
 - 4°C’de bir döngü

şeklinde termal cycler’da programlandı.

3.10. Jel Elektroforezi

%2’lik agaroz jel hazırlandı ve EtBr ilave edildi. Meydana gelen PZR ürününden 5 µl alınıp yükleme boyası (6 x loading dye) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu. Jel, 1000 bp’lik ladder kullanılarak UV illüminator altında değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda 505 bp büyüklüğünde bantlar görüldü.

3.11. Restriksiyon Enzim Kesimi

Restriksiyon enzim kesimi için 2 µL buffer, 1 µL BglIII enzim ve 3 µL dH₂O karışımı hazırlandı ve 15 µL PCR ürününe eklendi ve 37°C de overnight işlemi yapıldı. Enzim kesimi ürünü yine %1’lük agaroz jele yüklendi. Jel 30 dakika 190 voltluk elektrik akımına tabi tutuldu Tüm değerlendirmelerde 1kb’lık marker kullanıldı. UV ışık kullanılarak jel görüntüleme sistemiyle genotipler değerlendirilerek fotoğrafları çekildi.

3.12. İstatiksel Analiz

Veriler bilgisayar ortamına aktarılarak, istatistiki analiz SPSS for Windows 10.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma olarak verildi. Parametrik koşulların sağlandığı ikili karşılaştırma için Student's t testi, bunun sağlanamadığı durumlar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arası ilişki Pearson korelasyon testi ile yapıldı. $P < 0,05$ olması anlamlı kabul edildi.

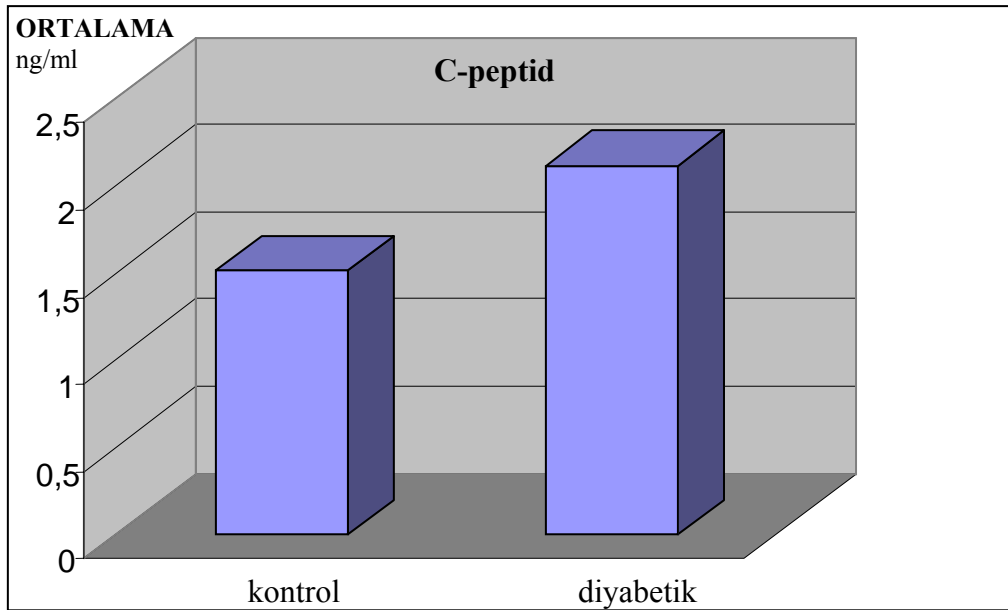
4.BULGULAR

4.1.Na-K-ATPaz Aktivitesi C-peptid Düzeyleri:

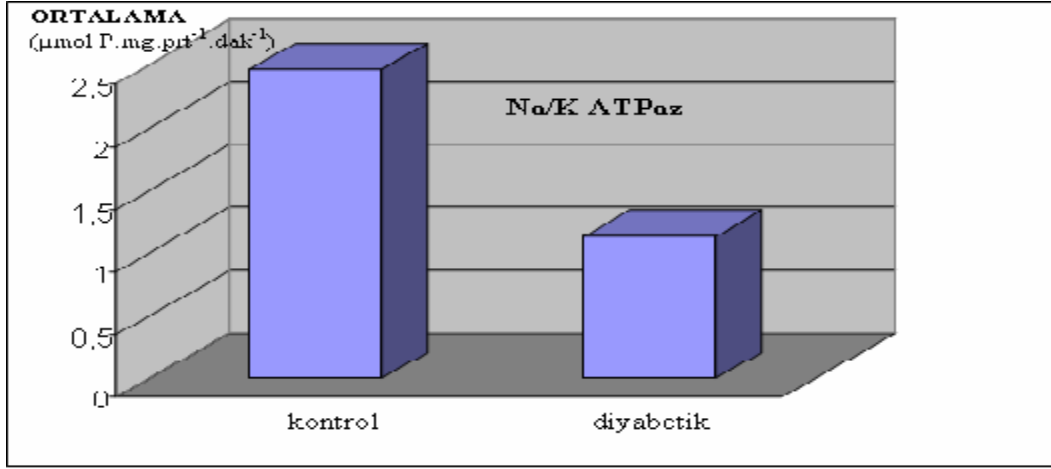
Tablo 4.1. Hasta ve kontrol grubunda C-peptid ve Na-K-ATPaz değerlerinin karşılaştırılması.

| | <i>kontrol</i> | <i>hasta</i> | <i>t</i> | <i>P</i> |
|-------------------|-----------------|-----------------|----------|----------|
| <i>C-peptid</i> | $1,51 \pm 0,44$ | $2,11 \pm 1,19$ | 3,24 | 0,002 |
| <i>Na-K-ATPaz</i> | $2,47 \pm 1.30$ | $1,13 \pm 0,45$ | 3,62 | 0,000 |

Grafik 4.1. Hasta ve kontrol grubunda C-peptid düzeyleri grafiği.

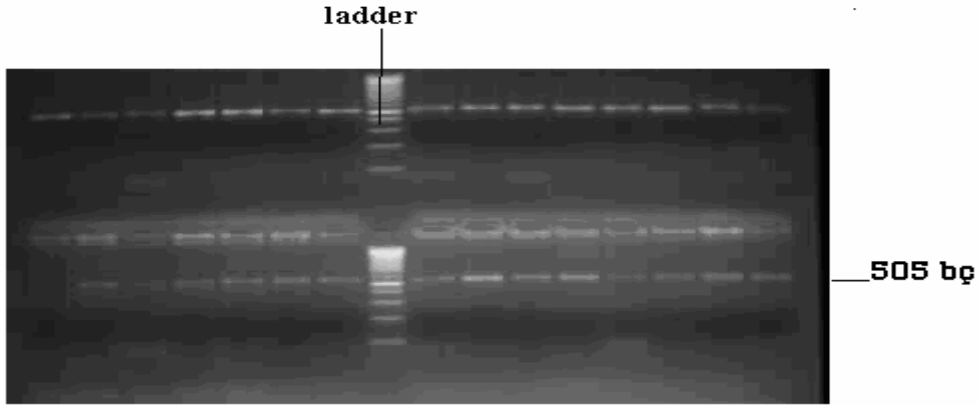


Grafik 4.2. Hasta ve kontrol grubunda Na/K-ATPaz düzeyleri grafiği.



Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi ile cinsiyet, yaş ve diabet süresi arasındaki korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05). C-peptid düzeyleri ile Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi arasında bir korelasyon yoktu (p>0.05).

4.2.Polimorfizm Bulguları.



Şekil 4.1. ATP1A1 gen polimorfizmine ait genotip örnekleri. Restriksiyon enzim kesimi her iki allel için de yoktu (genotip AA). 1000 bç marker (DNA Ladder MBI, Fermentas)

Değerlendirme sonucunda 505bç büyüklüğünde bant görüldü. Kesim sonucunda 310 ve 195bç' lik bantları göremediğimiz için ATP1A1 geni için genotipler; AA homozigot, şeklinde değerlendirildi (Şekil 4.1)

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Na⁺/K⁺-ATPaz Aktivitesi ve Diabetes Mellitus

Oksidatif stres, diabetin ve daha sonraki komplikasyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Nonenzimatik glikozilasyon, otooksidatif glikozilasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yolu aktivitesi, inflamatuvar mediatörlerin düzeyleri ile antioksidan savunma sistemindeki değişiklikler, hipoksi ve iskemik reperfüzyon hasarı sonucu oluşan lokalize doku hasarı, diabette oksidatif stresi arttıran mekanizmalardır. Diabetik kişilerde plazma ve doku lipid peroksidasyon ürünlerinin aynı yaştaki sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu bulunmuştur (Dedov ve ark 1992).

Diabette oksidatif stresin eritrosit membranında lipid peroksidasyonuna sebep olduğu ve zar lipid içeriğinde değişimlere yol açtığı, eritrosit membranında ortaya çıkan tüm bu değişiklikler sonucunda da eritrositlerde Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde ve membran akışkanlığında azalma olduğu ileri sürülmüştür (Rabini ve ark 1997).

Rabini ve ark (1993) yaptıkları çalışmada, diabetli vakalarda Na⁺/K⁺-ATPaz enziminin eritrosit membranında yarışmasız inhibisyona uğradığını ve membran lipid içeriğinin değişmesinin enzim aktivitesini etkilediğini ileri sürmüşlerdir.

Tip2 diabetli hastalarda Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinin inhibisyonunun serbest radikal aracılıklı mekanizmalarla ilişkili olduğu ileri sürülmektedir. (Konukoğlu ve ark. 2003)

Mazzanti ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada, Na⁺/K⁺-ATPaz enzim aktivitesinin yaşlanma ile azaldığını göstermişlerdir ve yine kontrol grubunda diabetlilere oranla enzim aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır.

2004 yılında Diabetes mellituslu hastalarda, hastalık süresinin eritrosit membranı Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla yaptığımız çalışmamızda da, literatürlerle uyumlu olarak diabet süresi uzadıkça Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesinin azaldığı bulunmuştu (Gürbilek ve ark.2004).

Na^+/K^+ -ATPaz aktivite azalışının, artmış oksidatif/nitrozatif stres mekanizmaları ile ilişkili olabileceği ileri sürölmüştür (Sampathkumar ve ark 2005). Transport proteinlerinin ROS (Reaktif Oksijen Türleri) değişimlerine karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Diabetik hastalarda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalma ve glutatyon tükenişi arasında gözlenen birliktelik, hücrenel GSH (indirgenmiş glutatyon) azalmasının, Na^+/K^+ -ATPaz fonksiyonunu bozabileceği gösterilmiştir ki bu birkaç yolla açıklanmıştır. Hipokloröz asitin şekillenmesinin, glutatyon azalmasını indükleyen oksidatif stres aracılığıyla, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini baskıladığı ve GSH'ın galaktozemik ratlarda Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonunu engellemek suretiyle koruyucu bir rol oynadığı da gösterilmiştir (Tsakiris ve ark 2004).

Post-translasyonal bir bozulma olarak, Na^+/K^+ -ATPaz'ın glutatyonilasyonun mümkün olabileceği ileri sürölmüştür. Redoks spesifik glutatyonilasyon gibi hücrenel proteinlerin modifikasyonu son çalışmalarda gösterilmiştir. Diabetik hastalarda lipid peroksidasyonu ve hipoglutatyonemi arasındaki birliktelik glutatyonun aşırı kullanımı dışında, glutatyon sistemindeki çeşitli enzimlerin kendileri oksidasyona hedef olabilmektedir. Hakim olan glukoz konsantrasyonu ve dolayısıyla glikasyon aracılığıyla enzimatik inaktivasyonun meydana gelebileceği gösterilmiştir. Diabetik kişilerde ileri glikasyonun arttığı gözlenmiştir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın glikasyonu, eksperimental diabetik retinopatide katarakt şekillenmesiyle ve aynı zamanda eksperimental diabetik nöropatide sinir disfonksiyonuyla ilişkilidir. Diabetik subjelerde mikroanjyopati varlığında azalmış Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve artmış AGEs (Advanced glycation end products) arasında korelasyon olduğu ileri sürölmüştür. (Sampathkumar ve ark 2005).

Ruitz-Guttierez ve ark (1993) Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalmayı, enzimdeki yapısal anormalliğe bağlamışlardır. Membran fosfolipidlerinin organizasyonundaki kalitatif anormalliğin, lipit katmanındaki Na^+/K^+ -ATPaz lokasyonunda anomaliye ve Oubain bağlanmasının engellenmesine yol açtığı rapor edilmiştir. Bu azalmadan kantitatif defekt ve maksimum enzimatik ünite sayısındaki azalma sorumlu tutulmuştur

Raccach ve ark(1996) tarafından Kuzey Afrikalı kontrol, beyaz ırk kontrol ve insüline bağımlı diabet hastalarının eritrositlerinde, Na^+/K^+ -ATPaz Oubain bağlanma sitelerinde azalmanın diyabetik nöropati ile ilişkisi araştırılmıştır. Sağlıklı beyaz ırk kontrolleri ile karşılaştırıldığında, insüline bağımlı diabet hastalarının ve sağlıklı Kuzey Afrikalı kontrollerin eritrositlerinde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde yaklaşık olarak %30 azalma gözlenmiştir. Aynı zamanda eritrositlerde maksimum enzimatik ünite sayısında da (B max) %30 azalma tespit edilmiştir. Her üç grupta da Oubain için disasyon sabitinde önemli düzeyde fark gözlenmemiş ve böylece üç grupta Oubain için enzim afinitesi karşılaştırılabilmıştır. Beyaz ırk vakalarına göre Kuzey Afrikalı vakaların eritrosit membranlarının daha az pompa ünitesi içerdiği ileri sürülmüştür. Sağlıklı beyaz ırk kontrollerde ve Kuzey Afrikalı kontrollerde eritrositlerde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve maksimum enzimatik ünite sayısı arasında korelasyon bulunmuş, fakat insüline bağımlı diabet hastalarından oluşan grupta böyle bir korelasyon gözlenmemiştir. Kuzey Afrikalı kontrollerde enzim aktivitesinde bir azalma olduğu ve bu insanlarda diabet gelişirse nöropatiye eğilim meydana gelebileceği ileri sürülmüştür (Vague ve ark 1988).

Eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi intra ve ekstraselüler katyon homeostazisinde santral bir rol oynar. Bu enzimdeki değişikliklerin diabetes mellitus komplikasyonları ile ilişkili olduğu düşünülür. Tip2 diabetli hastalarda bu ilişkiyi araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada nöropati ve retinopati mevcut olan diabet hastalarında, kontrol grubuna ve nöropati veya retinopati mevcut olmayan diabet hastalarına göre Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi daha düşük bulunmuştur (Koç ve ark, 2003).

Diabetik nöropati gelişiminde sinir dokusunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalmaya işaret eden çalışmalar vardır. Enzimatik aktivitedeki bir azalma intraaksonal Na^+ konsantrasyonunu artırır ve sinir membran depolarizasyonunu bloklar. Siyatik sinirin Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki bir azalma; aksiyon potansiyeli ile indüklenen depolarizasyondan sonra, normal membran akson repolarizasyonunu değiştirebilir, böylece NCV'de (Nevre Conduction Velocity) bir azalma beklenebilir (Vague ve ark 2004).

Wright ve Nukada yaptıkları araştırmada (1994) diabetin 16 haftalık indüksiyonundan sonra, 4. haftada ani bir duraklama ile NCV de önemli bir azalma tesbit etmişlerdir. Bu çalışmada ergin ratlarda diabet indüklenmiştir. NCV deki azalma; siyatik sinirlerde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalmadan kısmen sorumlu tutulmuştur. Çünkü bazı çalışmalarda, motor NCV nin azalması, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalmadan daha önce gözükmektedir. Diabetik ratların siyatik sinirlerinde çeşitli teropatik müdahalelerden (gamma linoleik asit veya balık yağı desteği vb.) sonra kondüsyon hızının hem kısmi, hemde total restorasyonunun daima Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki kısmi restorasyonla birlikte olduğu gözlemlenmiştir. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalmanın, Na kanallarının inaktivasyonunun artması ile birlikte olduğu ileri sürülmüştür (Sima ve Sugimoto 1999).

Greene ve ark(1987), Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki azalmanın periferel sinirlerde hipergliseminin direkt bir sonucu olabileceğini ileri sürmüşler. Bu hipotezde, periferel sinirlere fazla glukoz girişinin, aldoz redüktaz yoluyla sorbitole dönüştüğünü, sorbitolde bir artmanın miyoinozitolde bir azalmaya ve dolayısıyla sebebi açıklanamayan bir mekanizma ile PKC (Protein kinaz C) aktivitesinde azalmaya yol açabileceği ileri sürülmüştür. PKC 'ın, Na^+/K^+ -ATPaz üzerinde sitümülatör bir etkisi olduğu ve diabette bu etkinin azalabileceği rapor edilmiştir.

Görüldüğü gibi Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin bozulma mekanizması oldukça komplekstir. Serbest radikallerin artması ile glutatyon azalmakta radikaller temizlenememektedir. Kan şekerini regüle edilememesi, enzim protein yapısının glikozilasyonuna ve glutatyonilasyonuna neden

olmaktadır. Biz de çalışmamızda nöropati tanısı almış tip 2 diabetik hastalarda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini kantitatif olarak değerlendirdik. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde ettik. Çalışmamızda yukarıdaki bilgilerle uyumlu olarak Na-K-ATPaz aktivitesini düşük olarak saptadık. Bu bulgu diabetin iyi regüle edilemediğinin bir göstergesi olmaktadır. Diabetle indüklenen Na^+/K^+ -ATPaz disfonksiyonu diabetli insanların periferik sinirlerinde motor iletim hızını azaltarak nöropati ve elektrofizyolojik anomalilerin patogenezeine etki edebilir. Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesini daha önceki çalışmamızda da düşük bulmuştuk. Bu çalışmamızda Konya bölgesinde yaşayan Diabetes Mellituslu hastalarda düşük Na^+/K^+ -ATPaz enzim aktivitesi ile gelişen polinöropatinin gen polimorfizmi ile ilişkisinin olup olmadığı araştırdık. Çalışma sonucunda ATP1A1 gen polimorfizminin bulunmadığını tespit ettik. Bu hastalarda ATP1A1 gen polimorfizminin bulunmaması nöropatiye yatkınlığın olmadığını düşündürmektedir. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ile cinsiyet, yaş ve diabet süresi arasındaki korelasyon ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

5.2. C-Peptid ve Diabetes Mellitus

Ekberg ve ark (2003); tip 1 diabetli hastalarda C-peptid replesmanının sinir fonksiyonları üzerindeki etkilerini incelemişler ve üç aylık replesman sonunda sinir fonksiyonlarında iyileşme kaydetmişlerdir.

Chan ve arkadaşları (2004); tip2 diabetli hastalarda yaptıkları çalışmada, bodymass indeksi, C-peptid ve metabolik statüler arasındaki ilişkiyi incelemişler BMI (Body Mass Index) düşük olan hastalarda C-peptid düzeylerinin düşük, glisemik kontrolün de iyi olmadığı bulunmuştur.

Wahren ve ark.(1996), yaptıkları çalışmada C-peptid replesmanının insüline bağımlı hastalarda, kısa süre bazında (1-3 saat), glomerüler hiperfiltrasyonun azalması, glukoz kullanımının artışı otonom sinir fonksiyonlarının iyileşmesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir. 1-3 aya kadar olan replesman otonom sinir fonksiyonları ile birlikte renal fonksiyonları da iyileştirmiştir.

Proinsülin C-peptidin rat renal tübüllerinde Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini sitümüle ettiği gösterilmiştir (Ohtomo ve ark 1998).

Çalışmamızda C-peptid düzeyleri hasta grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olmasına rağmen değerler referans aralıklarının içersinde idi. Cinsiyet, diyabet süresi ve yaş ile C-peptid değerleri arasında ise bir ilişki bulunmadı.

5.3.Na /K-ATP az Aktivitesi ve C-Peptid

İnsülinin periferel sinirlerde Na^+/K^+ -ATPaz'ın doğal aktivatörü olması dolayısıyla, insülinin Na^+/K^+ -ATPaz'ı sitümüle etmesindeki muhtemel bir problemin, nöropati sendromunun gelişmesine yol açabileceği ileri sürülmüştür. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde azalmayla beraber insülin direnci meydana gelebileceği ve bu defektin polyol yolu aracılığıyla hiperglisemi ile de ilişkili olabileceği ifade edilmiştir (Sweeney and Klip 1998).

İnsülinopenik diabetik ratlara C-peptid verilmesi Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesini düzeltmiş, nodal ve paranodal değişiklikleri onarmış ve önlemiştir (Sima ve ark 2001).

Forst ve ark (2000) tarafından Tip1 diabetes mellituslu hastalarda proinsülin C-peptidin nitrik oksit, mikrovasküler kan akışı ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve C-peptid infüzyonu süresince eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ve plazma C-peptid düzeyleri arasında önemli, lineer bir ilişki tesbit edilmiştir. Salin infüzyonu yapılan hastalarda cGMP ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi arasında önemli olmayan değişiklikler gözlenmiştir. C-peptidin mikrovasküler kan akışı üzerindeki etkileri, nitrik oksit üretiminde ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi üzerinde artışı aracılığıyla meydana geldiği gösterilmiştir.

Çalışmamızda C-peptid düzeyleri ile Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi arasında bir korelasyon yoktu. Diabetli hastalarda dokulara göre enzim aktivitesi değişmektedir. Örneğin barsak dokusunda enzim aktivitesi artışı ile $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlarının mRNA seviyelerindeki artış ile ilişkilidir. Böbreklerde $\alpha 1$ ve $\beta 1$ izoformlarının mRNA seviyeleri medullada artar, kortekste artmaz bununla

birlikte tüm nefron segmentlerinde enzim aktivitesi ile $\alpha 1$ izoformunun mRNA seviyelerindeki artış önemli korelasyon gösterir.

5.4. Na^+/K^+ -ATPaz Aktivitesi ve Polimorfizm

İnsan genomunun, herbiri 20-25 kb uzunluğunda en az beş farklı α subünitesi ve ilgili genleri içerdiği gösterilmiştir. $\alpha 1$, $\alpha 2$ ve $\alpha 4$; sırasıyla, ATP1A1, ATP1A2 ve ATP1A2 genleri tarafından kodlanır kromozom 1 üzerinde lokalize olmuşlardır. Bununla birlikte $\alpha 3$, ATP1A3 geni tarafından kodlanır ve kromozom 19 üzerinde lokalize olmuştur. α genleri üzerinde özellikle ATP1A1 üzerinde bazı polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizm restriksiyon enzimi BglII ile gösterilmiştir (Shull ve ark 1990).

Çeşitli çalışmalarda eritrosit membranında Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ile peroneal ve tibial sinirlerde kondüsyon hızı arasında korelasyon gözlenmiştir. Cinsiyet ve etnik orjine göre de enzim aktivitesinde varyasyonlar tespit edilmiştir. Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi; erkeklerde kadınlardan, siyahlarda beyazlardan, Asyalılarda İskandinavyalılardan, Yahudi toplumunda beyaz ırktan daha düşük bulunmuştur. Yahudi toplumu şiddetli ve erken nöropatiye eğilimlidir. Na^+/K^+ -ATPaz'ın kontrol edilme mekanizmaları aracılığıyla diabetik nöropatiye genetik bir yatkınlık söz konusudur (Racah ve ark 1996).

Diabetik nöropatinin patojenezi tamamen anlaşılmamış olsa bile Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde bir azalma görülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda eritrosit Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi üzerinde, genetik etkiler ve çevresel faktörler araştırılmaktadır.

Çeşitli çalışmalarda diabetik nöropatide de Na^+/K^+ -ATPaz fonksiyonunda bir defekt tanımlanmıştır. Streptozotocin-diabetik rat deneylerinde motor NCV'de bir azalmanın, Na^+/K^+ -ATPaz'ın $\alpha 1$ izoformunun ekspresyonu sonucu Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinde bir azalma görülmüştür (Vague ve ark 2004).

Tip1 diabetli hastaların eritrositlerinde düşük Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi ile birlikte Na^+/K^+ -ATPaz'ın $\alpha 1$ izoformunu kodlayan ATP1-A1 geninin restriksiyon enzimi uzunluk polimorfizminin araştırıldığı bir çalışmada, ATP1A1 geninin varyantının varlığının %6.5 lik relatif riskle diabetik nöropatiye yatkınlık faktörü olduğu ileri sürülmüştür (Jannot ve ark 2002).

Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin eritrositlerde (ki eritrositlerde $\alpha 1$ izoformdur) düşük bulunması ve $\alpha 1$ izoformunun sinir dokusunda da baskın izoform olması dolayısıyla, ATP1A1 olarak adlandırılan bu genin nöropatiye yatkınlıkla ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür Bu gen kromozom 1'in kısa kolu üzerinde kodlanmaktadır. . Genin primer yapısı cDNA sekanslaması ile ortaya çıkarılmıştır. Promotor bölgesi tanımlanmış ve Bgl-II kullanarak intron1'in PCR amplifikasyonundan sonra 11 kb'lık bir fragment elde edilmiş. Bazı örneklerde Bgl-II ile kesim sonucunda 3 ve 8 kb'lık iki fragment elde edilmiştir. Restriksiyon sitesi polimorfizmi ile cinsiyet, diabet süresi ve HbA1c düzeyleri arasında korelasyon gözlenmemiştir. Nöropati ve restriksiyon sitesi bulunması arasında yakın bir ilişki bulunmuş ve restriksiyon sitesini taşıyan hastaların hemen hemen hepsinde nöropatinin mevcut olduğu rapor edilmiştir

Restriksiyon sitesi olmayan homozigot diabetik hastalarda, restriksiyon sitesi olan heterozigot diabetik hastalara göre Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi daha yüksek bulunmuş fakat buna rağmen sağlıklı kişiler arasında, ATP1A1 gen polimorfizmi ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi arasında ilişki gözlenmemiştir. Polimorfizme bağlı genomik mutasyonun, intraselüler insülin mesajcısının bağlanma sitesini etkileyebileceği ileri sürülmüştür (Vague ve ark 1997).

Jannot ve ark(2002) yaptıkları çalışmada Kuzey Afrikalı kişilerde olduğu gibi, Avrupalı kontrollerde de enzim aktivitesinin ATP1A1 polimorfizminin varlığından etkilenmediği rapor edilmiştir. Avrupalı Tip1 ve Tip2 diabetlilerde bu varyant alelini taşıyan hastalarda, taşımayanlara göre enzim aktivitesi düşük bulunmuştur. İnsülin sekresyonu düşük olan Avrupalı ya da Kuzey Afrikalı Tip1 ya da Tip2 li hastalarda, bu varyant alelinin varlığının, düşük enzim aktivitesi ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir.

Çalışmamızda 60 hasta ve 28 kontrol vakasında ATP1A1 geni BgI-II ile kesilerek polimorfizm açısından incelendi ve gen bölgesindeki her iki allel için de restriksiyon enzim kesimi gözlenmedi. Bölgesel değerlendirmemizde ATP1A1 polimorfizmi ve polinöropatiye yatkınlık görülmedi. Bu hastalarda ATP1A1 gen polimorfizminin bulunmaması nöropatiye yatkınlığın olmadığını düşündürmektedir .

Diabette oksidatif stres membranda lipid peroksidasyonuna sebep olmakta ve bunun sonucunda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi düşmektedir. Düşük enzimatik aktivite sinir iletim hızının azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, diabetin iyi regüle edilmesi komplikasyonları ortadan kaldıracağından nöropati gelişimine engel olunacağı kanaatindeyiz.

6. ÖZET

S.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü
BİYOKİMYA (TIP) Anabilim Dalı
Doktora Tezi / KONYA – 2006

Cemile TOPCU

Tip 2 diabetik hastalarda ATP1A1 polimorfizminin Na⁺/K⁺-ATPaz aktivite değişimleri ile ilişkili olup olmadığını araştırdık. Aynı zamanda C-peptid seviyelerinin ATP1A1 polimorfizmi ve Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi arasındaki ilişkiyi etkileyip etkilemediğini araştırdık. Tip 2 diabetik hastalarda, Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi kontrol grubuna göre daha düşük, C-peptid seviyeleri daha yüksek bulundu. Enzim aktivitesi ve C-peptid seviyeleri arasında korelasyon bulunmadı. Parametrelere ait ortalama ± standart sapma değerleri; C-peptide seviyeleri kontrol grubu için; 1,51 ± 0,44 ve hasta grubu için 2,11 ± 1,19 , (p< 0,002), Na-K-ATPaz aktiviteleri; kontrol grubu için 2,47 ± 1.30 hasta grubu için; 1,13 ± 0,45 (p< 0,000). Tüm diabetik hastalar ve sağlıklı kontrol grubu kesilmemiş allel için homozigot olarak bulundu.

7. SUMMARY

Investigation of Na⁺/K⁺ATPase gene polymorphism in diabetic patients.

We investigated whether the ATP1A1 polymorphism is associated with Na⁺/K⁺-ATPase activity modifications and C-peptide levels in healthy subjects and in type 2 diabetic patients. We also tested whether C-peptide level could influence the relationship between ATP1A1 polymorphism and Na⁺/K⁺-ATPase activity. In type 2 diabetic patients, Na⁺/K⁺-ATPase activity was lower than in healthy controls and C-peptide levels were higher in healthy controls. There was no correlation between enzymatic activity and C-peptide levels. The mean ± standard deviation of the parameters; C-peptide levels of control; $1,51 \pm 0,44$ and patients; $2,11 \pm 1,19$, ($p < 0,002$), Na-K-ATPase activity of control; $2,47 \pm 1,30$ and patients; $1,13 \pm 0,45$ ($p < 0,000$). All diabetic patients and healthy controls were homozygous for the unrestricted allele.

KAYNAKLAR

- Alberti KGM, Zimmet PZ (1998)** *For the World Health Organization Consultation, Definition, Diagnosis and Classification of DM provisional report of WHO Consultation, Diabetic Med*,15,539-553.
- Al-Khalili L, Yu M, Chibalin AV (2003)** *Na⁺/K⁺-ATPase trafficking in skeletal muscle:insulin stimulates translocation of both α_1 - and α_2 - subunit isoforms*, FEBS Letters, 536,198-202.
- Arystarkhova E, Gibbons DL and Sweadner KJ (1995)** *Topology of the Na,K-ATPase, Evidence for externalization of a labile transmembrane structure during heating*, J Biol Chem, 270, 8785-8796.
- Arystarkhova E and Sweadner KJ(1996)** *Isoform-specific monoclonal antibodies to Na,K-ATPase α subunits. Evidence for a tissue-specific post-translational modification of the α subunit*, J Biol Chem, 271, 23407-23417.
- Atkinson MA, Maclaren NK (1994)** *The pathogenesis of insulin dependent diabetes* , N Engl J Med,331,1428-1436.
- Barnett P, Braunstein GD (2001)** *Diabetes Mellitus "Cecil Essentials of Medicine Türkçesi "* ed.Hayrünisa Çavuşoğlu, 583-597,Tavaslı Matbacılık.
- Bauer N, Müller J, Krämer U, Hambarchian N, Zobel C, Schwinger RHG, Neu N, Kirch U, Grünbaum EG, Schoner RHG (2005)** *Ouabain-Like Compound Changes Rapidly on*

Physical Exercise in Humans and Dogs, Effects of β -Blockade and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition. Hypertension, 45,1024-1028.

Beggah AT, Jaunin P, Geering K (1997) *Role of Glycosylation and Disulfide Bond Formation in the beta Subunit in the Folding and Functional Expression of Na,K-ATPase*, The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. 272(5), 10318-10326.

Blank M (1995) *Electric and magnetic field signal transduction in the membrane Na^+/K^+ -adenosine-tri-phosphatase*, American Chemical Society, 1995, 339-348.

Blanco G, Mercer RW (1998) *Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function*, Am J Physiol Renal Physiol, 275(5), 633-650,

Blanco G, DeTomaso AW, Koster J, Xie ZJ, Mercer RW (1994) *The α -subunit of the Na,K-ATPase has catalytic activity independent of the β -subunit*, J Biol Chem 269, 23420-23425.

Burg MB (1982) *Thick ascending limb of Henle's loop*, Kidney Int, 22,454-64.

Cantor AB, Krischer JP, Cuthbertson DD, Schatz DA, Riley WJ, Malone J, Schwartz S, Quattrin T, Maclaren NK(1995) *Age and family relationship accentuate the risk of IDDM in relatives of patients with insulin dependent diabetes*, J Clin Endocrinol Metab 80,3739-3740.

Chan WB, Tong PCY, Chow CC, So WY, Ng MCY, Ma RCW (2004) *The associations of body mass index, C-Peptide and metabolic status in Chinese Type 2 diabetic patients*, Diabetic Medicine, 21,4, 349.

Chow DC, Forte JG (1995) *Functional significance of the β subunit for heterodimeric P-type ATPases*, J Exp Biol, 198, 1-17.

Clark A, Charge SB, Badman MK (1996) *Islet amyloid polypeptide: actions and role in the pathogenesis of diabetes*, Biochem Soc Trans, 24(2), 594-9.

Çömez Yİ *Prostat adeno kanserli hastalarda tümör ve nekrozis faktör alfa C-4 polimorfizmi sıklığı*, http://www.istanbulsaglik.gov.tr/w/tez/tez_uroloji.asp

Dedov II, Gorelsheva VA, Romanovskaia GA, Smirnova OM, Filippov IK, Sanfirova VM (1992) *Lipid peroxidation and antioxidant enzymic defense in patients with newly detected insulin-dependent diabetes mellitus*, Probl Endokrinol, 38 32-33.

Ekberg K, Brismar T, Johansson BL, Jonsson BJ, Lindstrom P, Wahren J (2003) *Amelioration of Sensory Nerve Dysfunction by C-Peptide in Patients With Type 1 Diabetes*, Diabetes, 52, 537-541.

Ewart HS, Klip A (1995) *Hormonal regulation of the Na^+K^+ -ATPase: mechanisms underlying rapid and sustained changes in pump activity*, Am J Physiol, 269, 295, 311.

Feraille E, Doucet A (2001) *Sodium-potassium-adenosinetriphosphatase-dependent sodium transport in the kidney: hormonal control*, Physiol Rev, 81, 345-418.

Forst T, Dufayet D, Kunt T, Pfützner A, Goitom K, Pohlmann T, Schneider S, Johansson BL, Wahren J, Löbig M, Engelbach M, Beyer J, Vague P (2000) *Effects of proinsulin C-*

peptide on nitric oxide, microvascular blood flow and erythrocyte Na⁺,K⁺-ATPase activity in diabetes mellitus type I, Clinical Science 98,3,283-90.

Gözükara ME (1997) "Biyokimya" 3, 1997, 45, Nobel Tip Kitabevi. Istanbul.

Greene DA, Chakrabarti S, Lattimer SA, and Sima AA (1987) *Role of sorbitol accumulation and myo-inositol depletion in paranodal swelling of large myelinated nerve fibers in the insulin-deficient spontaneously diabetic bio-breeding rat. Reversal by insulin replacement, an aldose reductase inhibitor, and myo-inositol, Clin Invest, 79,5, 1479–1485.*

Gürbilek M, Dağlar C, Aköz M, Topçu C (2004) *Diabetes Mellituslu Hastalarda Hastalık Süresinin Eritrosit Membranı Na⁺/K⁺-ATPaz Enzim Aktivitesi, Lipid Peroksidasyonu ve DHEA(S), Glukoz, Lipid Düzeyleri Üzerine Etkisi, Turk J Biochem, 237-242.*

Gyllensten UB(1989) *PCR and DNA sequencing, Biotechnology 7,700-8.*

Hamm HE (1998) *The many faces of G protein signaling J Biol Chem, 273: 669–672.*

Huang W, Connor E, Dela Rosa T, Muir A, Schatz D, Silverstein J, Crockett S, She JX,

Maclaren NK(1996) *Although DR3-DQB1 may be associated with multiple component disease of the autoimmune polyglandular syndromes, the human leukocyte antigen DR4-DQB110302 haplotype is implicated only in beta cell autoimmunity, J Clin Endocrinol Metab, 81:1-5.*

Hundal HS, Marette A, Mitsumoto Y, Ramlal T, Blostein R, Klip A (1992) *Insulin induces translocation of the alpha 2 and beta 1 subunits of the Na,K-ATPase from intracellular*

compartments to the plasma membrane in mammalian skeletal muscle, J Biol Chem, 267, 5040-5043.

Jannot MF, Raccah D, De La Tour DD, Coste T, Vague P (2002) *Genetic and environmental regulation of Na/K adenosine triphosphatase activity in diabetic patients*, Metabolism, 51,3,284-91.

Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G (2003) *Tanıda DNA Teknikleri VI*. Biyokimya Yaz Okulu, Adana.

Kissebah AH, Vydellingum N, Murray R, Evans DF, Hartz AJ, Kalkhoff RK, AdamsPW (1982) *Relationship of body fat distribution to metabolic complications of obesity*. J Clin Endocrinol Metab 54:254-2.

Kitamura T, Kimura K, Jung BD, Makondo K, Okamoto S, Canas X, Sakane N, Yoshida T, Saito M (2001) Proinsulin C-peptide rapidly stimulates mitogen-activated protein kinases in Swiss 3T3 fibroblasts: requirement of protein kinase C, phosphoinositide 3-kinase and pertussis toxin-sensitive G-protein, Biochem J, 355,123–129.

Kitao T, Hattori K (1983) *Inhibition of erythrocyte ATPase activity by aclacynomycin and reverse effect of ascorbate on ATPase activity*, Experientia. 39,1362-1364.

Koç B, Erten V, Yılmaz MI, Sönmez A, Koçar IH (2003) *The relationship between red blood cell Na/K-ATPase activities and diabetic complications in patients with type 2 diabetes mellitus*, Endocrine, 21,3,273-8.

- Konukoglu D, Kemerli GD, Sabuncu T, Hatemi H.(2003)** *Relation of erythrocyte Na⁺-K⁺ ATPase activity and cholesterol and oxidative stress in patients with type 2 diabetes mellitus,* Clin Invest Med, 26,279-84.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N.(2006)** *The real-time polymerase chain reaction, Mol Aspects Med, 27,95-125.*
- Lingrel JB, Orlowsky J, Shull MM, Price EM (1990)** *Molecular genetics of Na,K-ATPase, Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 38, 37-89.*
- Lingrel JB, Kuntzweiler T (1994)** *Na⁺,K⁺-ATPase, J Biol Chem, 269, 19659-19662.*
- Lucchesi PA, Sweadner KJ (1991)** *Postnatal changes in Na,K-ATPase isoform expression in rat cardiac ventricle. Conservation of biphasic ouabain affinity, J Biol Chem 266, 9327-9331.*
- Mandon B, Siga E, Chabardes D, Firsov D, Roinel N, De Rouffignac C (1993)** *Insulin stimulates Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺, and Mg²⁺ transports in MTAL of mouse nephron: cross-potentialiation with AVP, Am J Physiol 265,361-9.*
- Mazzanti L, Faloia E, Rabini RA, Staffolani R, Kantar A, Fiorini R, Swoboda B, De Pirro R, Bertoli E (1992)** *Diabetes mellitus induces red blood cell plasma membrane alterations possibly affecting the aging process, Clin Biochem, 25 , 41-46.*

McDonough AA, Geering K, Farley RA (1990) *The sodium pump needs its beta subunit*, *Faseb J*, 4, 1598-1605.

Mercer RW (1993) *Structure of the Na,K-ATPase*, *Int Rev Cytol* 137, 139-168.

Montgomery R, Dryer RL, Conway TW, Spector AA (1993) "Biochemistry" 4.1993, 246-247, Iowa.

Mueckler M (1993) *The molecular biology of glucose transport: relevance to insulin resistance and non-insulin-dependent diabetes mellitus*, *J Diabetes Complications*,7,130-41.

Nacar A, Ömeroğlu S (2004) *Diabetik Nöropatide Periferik Sinir Hücre Dışı Matriks Yapısı*, *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 1, 42-47.

Ohtomo Y, Aperia A, Sahlgren B, Johansson BL, Wahren J (1996) *C-peptide stimulates rat renal tubular Na⁺, K(+)-ATPase activity in synergism with neuropeptide Y*, *Diabetologia*, 39,199-205

Ohtomo T, Bergman T, Johansson BL, Jornvall H, Wahren J (1998) *Differential effects of proinsulin C-peptide fragments on Na,K⁺-ATPase activity of renal tubule segments Y*, *Diabetologia* ,41, 287-291.

Orlowski J, Lingrel JB (1988) *Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic α isoform and β subunit mRNAs*, *J Biol Chem*, 263, 10436-10442.

Özekmekçi S, Apaydın H (1995) Polinöropatiler "Nöroloji" 268-269, İstanbul Üniversitesi Basım evi, İstanbul 1995.

Pressley TA (1992) *Phylogenetic conservation of isoform-specific regions within α -subunit of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$* , Am J Physiol, 262 ,743-751.

Rabini RA, Fumelli P, Staffolani R, Mazzanti L, Pagnaloni A, Biagini G, Faloia E, De Pirro R (1993) Effect of diabetes mellitus on structural and functional properties of erythrocyte membranes. Membr Biochem, 10,71-79.

Rabini RA, Petruzzi E, Staffolani R, Tesei M, Fumelli P, Pazzagli M (1997) Diabetes mellitus and subjects' ageing: a study on the ATP content and ATP-related enzyme activity in human erythrocyte, Eur J Clin Invest, 27,327-332.

Raccach D, Dadaun F, Coste C, Vague P (1996) *Decreased Na/K ATPase ouabain binding sites in red blood cells of patients with insulin-dependent diabetes and healthy north African control subjects: relationship with diabetic neuropathy*, Horm Metab Res, 28,3,128-32.

Raccach D, Fabreguetts C, Azulay JP, Vague P (1996) *Erythrocyte $\text{Na}(+) - \text{K}(+) - \text{ATPase}$ activity, metabolic control, and neuropathy in IDDM patients*, Diabetes Care, 19(6),564-8.

Reaves, A. S., J. H. Collins, and A. Schwartz.(1980) *Isolation and characterization of (Na,K)-ATPase proteolipid*, Biochem Biophys Res Commun, 95,1591-1598.

- Rigler R, Pramanik A, Jonasson P, Kratz G, Jansson OT, Nygren PA, Ståhl S, Ekberg K, Johansson BL, Uhlén S, Uhlén M, Jörnvall H, and Wahren J (1999)** *Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes*, Medical Sciences 96, 23, 13318-13323.
- Ruiz-Gutierrez V, Stiefel P, Villar J, Garcia-Donas MA, Acosta D (1993)** *Cell membrane fatty acid composition in type 1 (insulin-dependent) diabetic patients: relationship with sodium transport abnormalities and metabolic control*, Diabetologia, 36,9,850-6.
- Sakane N, Yoshida T, Umekawa T (1997)** *Effects of Trp64Arg mutation in the beta 3-adrenergic receptor gene on weight loss, body fat distribution, glycemic control and insulin resistance in obese type 2 diabetic patients*, Diabetes Care 20(12),1887.
- Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Tara C, Rema M, Mohan V (2005)** *Association of hypoglutathionemia with reduced Na⁺/K⁺-ATPase activity in type 2 diabetes and microangiopathy*, Molecular and Cellular Biochemistry 282,169-176.
- Sampathkumar R, Balasubramanyam M, Sudarslal S, Rema M, Mohan V, Balaram P (2005)** *Increased glutathionylated hemoglobin (HbSSG) in type 2 diabetes subjects with microangiopathy*, Clin Biochem, 38(10),892-9.
- Scarlett JA, Gray RS, Griffin J, Olefsky JM, Kolterman OG (1982)** *Insulin treatment reverses the insulin resistance of type II diabetes mellitus*, Diabetes Care, 5,353-363.
- Schneider JW, Mercer RW, Caplan M, Emanuel JR, Sweadner KJ, Benz EJ, Levenson R (1985)** *Molecular cloning of rat brain Na,K-ATPase α subunit cDNA*, Proc Natl Acad Sci USA 82, 6357-6361.

Shamraj OI, Lingrel JB (1994) *A putative fourth Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene is expressed in testis*, Proc Natl Acad Sci USA 91,12952-12956.

Shull MM, Pugh DG, Lingrel JB (1990) *The human Na,K-ATPase alpha I gene: characterization of the 5'-flanking region and identification of a restriction fragment length polymorphism*, Genomic ,6,451-460.

Sima AA, Sugimoto K (1999) *Experimental diabetic neuropathy: an update*, Diabetologia ,42,7,773-88.

Sima AA Grunberger G, Jornvall H, Wahren (2001) *Proinsulin C-peptide--a consensus statement* Int J Exp Diabetes Res, 2,2,145-51.

Sjoquist M, Huang W, Johansson BL (1998) *Effects of C-peptide on renal function at the early stage of experimental diabetes*, Kidney Int. 54,758-64.

Stryer L (1998) "Biochemistry" 3th, 1998, 579, Wh Freeman and company Newyork.

Sweadner KJ (1979) *Two molecular forms of (Na⁺ + K⁺)-stimulated ATPase in brain. Separation, and difference in affinity for strophanthidin*, J Biol Chem, 254, 6060-6067.

Sweadner KJ (1985) *Enzymatic properties of separated isozymes of the Na,K-ATPase. Substrate affinities, kinetic cooperativity, and ion transport stoichiometry*, J Biol Chem, 260(21),11508-13.

Sweeney G, Klip A (1998) *Regulation of the Na⁺/K⁺-ATPase by insulin: why and how*, Mol Cell Biochem, 82,121-33.

Takeyasu, K., V. Lemas, and D. M. Fambrough.(1990) *Stability of Na⁺-K⁺-ATPase α subunit isoforms in evolution*, Am J Physiol, 259 , 619-630.

Tsakiris S, Schulpis KH, Marinou K, Behrakis P (2004) *Protective effect of L-cysteine and glutathione on the modulated suckling rat brain Na⁺,K⁺,ATPase and Mg²⁺-ATPase activities induced by the in vitro galactosaemia*, Pharmacol Res, 49(5),475-9.

Tsimaratos M, Roger F, Chabardes D, Mordasini D, Hasler U, Doucet A, Martin PY, Feraille E (2003) *C-peptide stimulates Na⁺,K⁺-ATPase activity via PKC alpha in rat medullary thick ascending limb*, Diabetologia, 46,124-31.

Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH (2004) *Moleküler Biyoloji 2.ed.* Muhsin Konuk, Nobel yayın , Ankara.

Urayama, O and M. Nakao.(1979) *Organ specificity of rat sodium- and potassium-activated adenosine triphosphatase*, J. Biochem. (Tokyo) 86,1371-1381

Urayama O, Sweadner KJ (1988) *Ouabain sensitivity of the α 3 isozyme of rat Na,K-ATPase*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 156, 796-800

Vague P, Dufayet D, Coste T, Moriscot C, Jannot MF, Raccach D(1997) *Association of diabetic neuropathy with Na/K ATPase gene polymorphism*Diabetologia.40(5)506-11.

Vague P, Brunetti O, Valet AM, Attali I, Lassmann-Vague V, Vialettes B (1988)

Increased prevalence of neurologic complications among insulin dependent diabetic patients of Algerian origin, Diabete Metab, 14,6, 706-11.

Vague P, Coste TC, Jannot MF, Raccach D, Tsimaratos M. (2004) *C-peptide, Na⁺,K⁽⁺⁾-*

ATPase and Diabetes, Experimental Diab Res, 5,37,20.

Wahren J, Johansson BL, Wallberg-Henriksson H, Linde B, Fernqvist-Forbes E, Zierath JR

(1996) *C-peptide revisited--new physiological effects and therapeutic implication, J Intern Med, 240:115-24.*

Wahren J, Ekberg K, Johansson J, Henriksson M, Pramanik A, Johansson BL, Rigler R,

Jörnval H(2000) *Role of C-peptide in human physiology, Am J Physiol Endocrinol Metab, 278(5), 759-768.*

Wahren J, Shafqat J, Johansson J, Chibalin A, Ekberg K, Jörnval H (2004) *Molecular and*

Cellular Effects of C-peptide—New Perspectives on an Old Peptide Experimental Diab Res 5,15–23.

Weidmann P, Ferrari P (1991) *Central role of sodium in hypertension in diabetic subjects,*

Diabetes Care, 14,220-32.

Weir GC, Leahy JL (1994) *Pathogenesis of non insulin dependent diabetes mellitus. Joslin's*

Diabetes Mellitus, C Ronald Kahn, Gordon C Weir (Editors)13thEd.1994,Lea and Febiger ,USA,240-264.

Williams JF (1989) *Optimization strategies for the polymerase chain reaction*, Biotechniques,7,762-9.

Wing RR,Blair EH,Bononi P,Marcus MD,Watanabe R,Bergman RN(1994) Caloric restriction per se is a significant factor in improvements in glycemic control and insulinsensitivity during weight loss in obese NIDDM patients.Diabetes Care, 17,30-36.

Wright RA, Nukada H (1994) *Vascular and metabolic factors in the pathogenesis of experimental diabetic neuropathy in mature rats*, Brain,117,395-407.

Zimmet PZ, Tuomi T, Mackay R, Rowley MJ, Knowles W, Cohen M, LangDA (1994)
Latent autoimmune diabetes mellitus in adults (LADA):the role of antibodies to glutamic asid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependency, Diabet Med 11,299-303.

Zmyslowska A, Szadkowska A, Andrzejewski W, Wegner O, Wyka K, Mlynarski W, Bodalski J.(2004) *Factors affecting C-peptide level during the first year of type 1 diabetes in children*, Endokrynol Diabetol Chor Przemiany Materii Wieku Rozw. 10,103-11.

9.ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Konya'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 1997 yılında Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünden mezun oldu. 2001 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesinde Yüksek lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl doktora programına başladı. 2003 yılında S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarında uzman olarak göreve başladı. Halen aynı laboratuvarında çalışmaya devam etmektedir.

10.TEŞEKKÜR

Tezimi hazırlamamda emeği geçen, bilimsel yardımlarını esirgemeyen ve genetik laboratuvarlarını çalışmamıza aan Genetik A.B.D. Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr.Hasan Acar ve Doç.Dr. Tülin ora'ya, yine Genetik A.B.D. dan, deney süresince kendilerinden metot ve işleyiş için yardım aldığım arkadaşlarım Muradiye Acar ve Ziya İnan'a, ayrıca tez hazırlama süresince desteğini eksik etmeyen aileme teşekkür ederim.