



T.C

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TİP 2 DİYABET VE DİYABETİK NÖROPATİ HASTALARININ
mikroRNA VE mRNA EKSPRESYON SEVİYELERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Tezi Hazırlayan

Aleyna TOPALOĞLU

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Halime Hanım PENÇE

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN/2020

BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Hamidiye Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Aleyna TOPALOĞLU

17.06.2020

ÖZET

Tip 2 Diyabet ve Diyabetik Nöropati Hastalarının mikroRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması

Amaç: Tip 2 diyabet ve diyabetik periferik nöropati hastalarındaki miRNA ve mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin incelenmesi ile diyabetik periferik nöropati fizyopatolojisinin aydınlatılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 30-75 yaş arası tip 2 diyabeti olup diyabetik periferik nöropati gelişmeyen (T2DM) 30 hasta, diyabetik periferik nöropatili (DPN) 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. 1 adet mor kapaklı tüpe 5-10 cc periferik kan örnekleri alındı. Alınan örneklerde miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-375 gen ekspresyonları real-time polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle belirlendi.

Bulgular: Her bir grup birbirleriyle karşılaştırıldığında T2DM hasta grubu, DPN hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında miRNA-128a, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). DPN hasta grubu ile kontrol grubu arasındaki miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık saptanmıştır ($p<0,05$). Fakat T2DM hasta grubu ile kontrol grubu arasında miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$). T2DM hasta grubu ile DPN hasta grubu arasında miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0,05$).

Sonuç: Çalışmanın sonucunda miRNA-375'in diyabetik periferik nöropati ile ilişkili olabileceği bulunmuştur. Ancak daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar kelimeler: tip 2 diabetes mellitus, diyabetik periferik nöropati, miRNA

ABSTRACT

Comparison of microRNA and mRNA Expression Levels of Type 2 Diabetes and Diabetic Neuropathy Patients

Aim: The aim of this study was to investigate the relationship between miRNA and mRNA expression levels in patients with type 2 diabetes and diabetic peripheral neuropathy.

Materials and Methods: The study included 30 patients aged 30-75 years with type 2 diabetes who did not develop diabetic peripheral neuropathy (T2DM), 30 patients with diabetic peripheral neuropathy (DPN) and 30 healthy controls. 5-10 cc peripheral blood samples were taken into a purple capped tube. In the samples taken, gene expressions of miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155, miRNA-375 were determined by the real-time polymerase chain reaction (PZR) method.

Results: When each group was compared with each other, no significant difference was found in miRNA-128a, miRNA-146a and miRNA-155 expression levels between T2DM patient group, DPN patient group and healthy control group ($p>0,05$). There was a significant difference in miRNA-375 expression levels between the DPN patient group and the control group ($p<0,05$). However, there was no significant difference in miRNA-375 expression levels between the T2DM patient group and the control group ($p>0,05$). There was no significant difference in miRNA-375 expression levels between T2DM patient group and DPN patient group ($p>0,05$).

Conclusion: As a result of the study, it was found that miRNA-375 may be associated with diabetic peripheral neuropathy. However, more comprehensive studies are needed.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, diabetic neuropathy, miRNA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini hissettiğim, çalışmamın planlanması, yürütülmesi ve tamamlanmasında her türlü imkan ve kolaylığı sağlayan, tüm tecrübesini, bilgisini, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Halime Hanım PENÇE' ye,

Çalışmanın vaka grubununa ulaşılmasında yardımcı olan Dr. Öğr. Gör. Hanife Şerife AKTAŞ' a,

Çalışmanın her anında desteğini eksiltmeyen, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, deney aşamasında da yazım aşamasında da her zorlukta yanımda olan ve yardım eden Ar. Gör. Sibel KURAŞ' a ve Öğr. Gör. Bekir ERDOĞAN' a ve Öğr. Gör. Fatih HACIMUSTAFAOĞLU' ya,

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her anıma şahit olan, beni cesaretlendiren, desteklerini esirgemeyen ve her durumda yanımda olan çok sevgili sınıf arkadaşlarım Fzt. Fulya Senem KARAAHMETOĞLU ve Fzt. Zeynep Betül ÖZCAN' a,

Tez süreci boyunca elinden gelen her şekilde bana yardımcı olan sevgili ev arkadaşım Rahime ÖLMEZ' e, tüm fedakarlıklarıyla yanımda olan arkadaşım Uzm. Fzt. Ümran ZARARSIZ' a ve desteklerini esirgemeyen tüm arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde sonsuz emekleri ve fedakarlıkları olan, tüm hayatım boyunca daima özveriyle maddi ve manevi yanımda olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan canım aileme,

Teşekkür ediyorum.

Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2019/034

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. DİABETES MELLİTUS	3
2.1.1. Epidemiyoloji	3
2.1.2. Tanı	4
2.1.3. Sınıflandırılması	4
2.1.4. Tip 1 Diyabet	6
2.1.5. Tip 2 Diyabet	6
2.1.5.1. Tip 2 diyabet risk faktörleri:	8
2.1.6. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları	9
2.1.6.1. Akut komplikasyonlar:	10
2.1.6.2. Kronik komplikasyonlar:	10
2.1.6.3. Diğer Komplikasyonlar:	11
2.2. DİYABETİK PERİFERİK NÖROPATİ	11
2.2.1. Diyabetik Periferik Nöropati Patofizyolojisi	13
2.3. mikroRNA (miRNA)	15
2.3.1. mikroRNA Biyogenezi	16
2.3.2. mikroRNA ve Diabetes Mellitus	17
2.3.2.1. mikroRNA 128a:	20
2.3.2.2. mikroRNA 146a:	21
2.3.2.3. mikroRNA 155:	21
2.3.2.4. mikroRNA 375:	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1. ÇALIŞMAYA KATILAN KATILIMCILAR	23
3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU	23
3.2.1. Tam Kan Örneklerinin Lizis Aşaması	23

3.2.2. Nükleik Asitlerin Presipitasyonu	24
3.2.3. Total RNA' nın Presipitasyonu.....	24
3.3. mikroRNA-128a, mikroRNA-146a, mikroRNA-155 VE mikroRNA-375 EKSPRESYON SEVİYELERİNİN REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE BELİRLENMESİ.....	25
3.4. KULLANILAN CİHAZLAR	27
3.5. KULLANILAN MALZEMELER VE KİMYASALLAR	27
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇ	39
KAYNAKLAR	41
EKLER	48
EK 1 HASTA DEMOGRAFİK BİLGİ FORMU	48
EK 2 ETİK KURUL ONAYI.....	49
ÖZGEÇMİŞ	50

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1. DM tanı kriterleri- ADA' dan.....	4
Çizelge 2.2. DM etiyolojik sınıflaması- ADA' dan.....	5
Çizelge 2.3. Tip 1 diabetes mellitus evreleri- ADA' dan	6
Çizelge 2.4. Diyabetik periferik nöropati semptom ve belirtileri - ADA' dan (62)....	12
Çizelge 3.1. cDNA sentez aşaması-1	25
Çizelge 3.2. cDNA sentez aşaması-2.....	26
Çizelge 3.3. Real-Time PZR bileşenleri	26
Çizelge 3.4. Real-Time PZR çalışma protokolü.....	27
Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının özellikleri.....	29
Çizelge 4.2 Kontrol grubunun ve hasta gruplarının miRNA Δ Ct değerleri.....	30
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve hasta gruplarının miRNA ifade düzeyleri (kat değişimi)	31

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.Diyabetik nöropati patogenezi (66)	14
Şekil 2.3. mikroRNA biyogenezi- Vrijens ve ark.' dan (91).....	17
Şekil 4.1. miRNA amplifikasyon eğrileri	32

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADA	American Diabetes Association-Amerikan Diyabet Derneği
BKİ	Beden Kütle İndeksi
cDNA	Complementer DNA, Eşlenik DNA
DM	Diabetes Mellitus
DPN	Diyabetik periferik nöropati
HbA1c	Glike hemoglobin
IDDM	İnsüline bağımlı diyabet
IDF	Uluslararası Diyabet Federasyonu
IFG	Impaired fasting glucose, bozulmuş açlık glikozu
IGT	Impaired glucose tolerance, bozulmuş glikoz toleransı
miRNA	Mikroribonükleik asit, mikroRNA
mRNA	Mesajcı RNA
NIDDM	İnsüline bağımlı olmayan diyabet
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
T1DM	Tip 1 Diyabet
T2DM	Tip 2 Diyabet
OGTT	Oral glikoz tolerans testi
TURDEP-II	Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II
WHO	World Health Organisation- Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diabetes mellitus (DM), insülin eksikliği ya da etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi tedavi ve bakım gerektiren, komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (1). Tip 2 diyabet hastalığında, insülin direnci nedeniyle gelişen beta hücre fonksiyon bozukluğu görülmektedir.

Diyabetik periferik nöropati, diyabetin en sık görülen kronik komplikasyonudur. Sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyerek vücuttaki sinirlerin normal aktivitelerinde bir bozulma oluşturur. Otonom, motor ve duysal fonksiyonları değiştirerek sinir sistemi ile ilgili farklı klinik bulgular açığa çıkartır (2). DPN' nin patofizyolojisi hem iç içe geçmiş çok sayıda nedensel mekanizma hem de kesin bir teşhis koymanın zorluğu nedeniyle henüz net olarak ortaya konulamamıştır (3).

mikroRNA (miRNA) yaklaşık 20-24 nükleotit uzunluğunda, şifre taşımayan, tek zincirli, protein kodlamayan, kısa molekül türüdür. miRNA' lar post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu düzenleyerek patolojik ve normal durumlarda rol oynayan önemli düzenleyicilerdir (4). miRNA' ların bozulmuş ekspresyon seviyelerinin DM de dahil olmak üzere pek çok hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. miRNA' ların vücuttaki varlığı ile, diyabetin ilerlemesi ve tedavisinde önemli birer potansiyel belirteçler olabilecekleri gündeme gelmiştir (5).

Bazı araştırmalarla olası biyobelirteçlerin ve terapötik hedeflerin bolluğu mevcut olsa bile, DPN gelişimi için yatkınlığın tespit edilebileceği veya DPN' nin tedavi edilebileceği zaman aralığı henüz tanımlanmamıştır. miRNA' nın anormal ekspresyon paternlerinin DPN' nin klinik bulgularından önce oluşması beklenirken, bu değişikliklerin ne zaman gerçekleştiğini ve araştırma ortamında önceden tespit edilebileceğini tarif eden tam zaman çizelgesinin açıklanması komplikasyon önleme için etkili müdahale algoritmalarının tasarımında son derece önemlidir. miRNA manipülasyonu nöropati tedavisi kapsamında incelendiğinde, miRNA ekspresyon normalizasyonunun nöral dokuya zaten verilen hasarı tersine çevirebilmesi veya duysal ve motor bozulmasının ilerlemesini engelleyip engellemeyeceği

incelenmelidir (6).

Diyabet gelişimindeki mekanizmaların anlaşılmasında miRNA' ların önemli katkıları vardır. miRNA' ların pankreatik beta hücrelerinin farklılaşması, hayatta kalması ve çoğalmasında önemli rol oynayarak, insülin üretimi ve salınmasını etkilediğini gösteren çalışmalar vardır (7).

Toplam 26 yayın taranarak yapılan bir meta-analizde T2DM için teşhiste önemli olabilecek 10 adet miRNA belirlenmiş ve bu miRNA' ların altı tanesinin ekspresyon seviyelerinin artmış, dördünün ise azalmış olduğu bildirilmiştir (8). Yapılan başka bir meta-analizde T2DM' li hastalarda 40 miRNA' nın ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde değişiklik görülmüştür. Böylelikle dolaşımdaki bazı miRNA' ların biyobelirteç olarak kullanılabileceği gösterilmiştir (9). Aynı zamanda T2DM hastaları ve normal glikoz toleransına sahip hastaların serum miRNA seviyeleri karşılaştırıldığında yedi adet miRNA' nın ekspresyonlarının önemli ölçüde yüksek olduğu saptanmıştır (10).

Tip 2 diyabet hasta grubu için erken ve etkili tedavi, diyabetik komplikasyon riskinin azaltılması ve kontrol altına alınması için önemlidir. Tedavinin etkinliği ve hastalığın ilerleyişini belirlemede rol oynayan miRNA' lar ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Tüm bu örnek çalışmalara rağmen, literatürde DPN' nin miRNA ekspresyon seviyeleriyle ilgili çalışmalar çok azdır.

Bu nedenle bu çalışma; miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-375 mikroRNA' larının ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin kontrol grubu, tip 2 diyabeti olup diyabetik periferik nöropati gelişmeyen ve diyabetik periferik nöropatisi gelişmiş olan hasta grupları arasında analiz edilerek, miRNA ekspresyon farklılıklarını değerlendirmek ve anlamlı çıkan miRNA sonuçlarına göre mRNA analizi yapılarak, diyabetik periferik nöropati fizyopatolojisinin aydınlatılmasına katkıda bulunmak amacıyla planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. DİABETES MELLİTUS

Diabetes mellitus, insülin eksikliği ya da etkisindeki defektler nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, sürekli tıbbi tedavi ve bakım gerektiren, komplikasyonları nedeniyle hastanın yaşam kalitesini oldukça azaltan ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (1). İnsülin, vücuttaki pankreas bezinde üretilen temel bir hormondur ve kan akışından glikozu, glikozun enerjiye dönüştürüldüğü vücut hücrelerine taşır. DM oluşurken bilinen öncelikli nedenler; insülin yokluğu, yetersizliği ya da insülin reseptörlerinin insüline direncidir. İnsülin eksikliği veya hücrelerin insüline yanıt verememesi, yüksek düzeyde kan şekeri seviyesine veya hiperglisemiye yol açar (11).

Hiperglisemi, uzun vadede kontrol edilemezse, çeşitli vücut organlarına zarar veren mikrovasküler, makrovasküler ve nöropatik komplikasyonların gelişmesine yol açabilir. Bunlar kalp damar hastalıkları, retinopati, nöropati ve nefropati gibi hayati tehlike arz eden sağlık sorunlarıdır (12,13). Hipergliseminin genel semptomları; kilo kaybı, poliüri, polidipsi, bazen polifaji ve bulanık görmedir. Nadir semptomları ise; kaşıntı, inatçı enfeksiyonlar, bulanık görme, tekrarlayan mantar enfeksiyonları ve açıklanamayan kilo kaybıdır (14).

Diabetes mellitus etiyolojisi tam olarak aydınlatılamamasına rağmen viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, genetik ve çevresel etkiler sonucu geliştiği düşünülmektedir (15).

2.1.1. Epidemiyoloji

Diabetes mellitus 21. yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biridir. Prevalansı dünya çapında hızla artmaktadır. 1985' de 30 milyon insanda DM tanımlanmışken bu rakam 2017' de 425 milyona kadar ulaşmıştır (16). Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) verilerine göre diyabetli bireylerin sayısı 2045' e kadar 425 milyondan 629 milyona çıkacaktır. Diyabet dünya çapında 20-79 yaş arası ölümlerin %14.5' inden sorumludur (17). DM gittikçe artan insidansı, akut ve kronik komplikasyonları önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Ülkemizde 2010

senesinde Sağlık Bakanlığı ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi' nin birlikte yaptığı 'Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II' ye (TURDEP-II) göre DM sıklığı 1999 yılında yapılan TURDEP I' göre %90 artış göstermiştir. TURDEP-II' ye göre Türk erişkin toplumunda DM sıklığının %13.7' ye ulaştığı görülmüştür (18).

2.1.2. Tanı

Tanı kriterleri venöz plazmada glikoz oksidaz yöntemi ile yapılan ölçümleri baz almaktadır. Amerikan Diyabet Derneği (ADA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) 2003 ve 2010 revizyonlarına göre diyabet tanı kriterleri Çizelge 2.1'deki gibidir. Diyabet tanısı Çizelge 2.1' deki dört yöntemden birisi ile konulabilir. Ancak ağır semptomların olmaması durumlarında, tanının başka bir gün doğrulanması gerekir.

Çizelge 2.1. DM tanı kriterleri- ADA' dan

Açlık (≥ 8 saat açlık) plazma glikozu (APG) ≥ 126 mg/dL
Oral glikoz tolerans testi (OGTT) (75 g glikoz) 2. saat plazma glikozu ≥ 200 mg/dL
Standardize metotla (HPLC) ölçülen glikosile edilmiş hemoglobin (HbA1c) $\geq \%6,5$ (48 mmol/mol)
Diyabet semptomları varlığında random plazma glikozu ≥ 200 mg/dL

Kaynak: The American Diabetes Association, 2014 (19)

2.1.3. Sınıflandırılması

Diabetes mellitus, daha çok otozomal resesif kalıtsal yatkınlık mekanizmasına dayalı bir hastalıktır. DM' nin sınıflandırılması ve teşhisi karmaşıktır. Yıllarca süren birçok konsültasyon, tartışma ve revizyona konu olmuştur. DM sınıflandırması için herhangi bir yeni özellik tanımlanıyorsa bu sınıflandırmalarda amaç DM ile ilgili etiyolojik görüşlerin birleştirilmesidir. 1980 ve 1985' te WHO tarafından önerilen eski ve kafa karıştırıcı insüline bağımlı diyabet (IDDM) veya insüline bağımlı olmayan diyabet (NIDDM) terimleri ortadan kalkmıştır. Yeni sınıflandırma sistemi dört tip diyabet tipini tanımlamaktadır: tip 1, tip 2, gestasyonel diyabet ve diğer spesifik tipler (20). DM' nin etiyolojik sınıflaması Çizelge 2.2' de özetlenmektedir.

Çizelge 2.2. DM etiyolojik sınıflaması- ADA’ dan

1. Tip 1 diyabet	
a. İmmünolojik tip	
b. İdiyopatik tip	
2. Tip II DM	
3. Gestasyonel DM	
4. Diğer spesifik tipler:	
a) β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) • 20. Kromozom, HNF-4 α (MODY1) • 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) • 12. Kromozom, HNF-1 α (MODY3) • 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) • 17. Kromozom, HNF-1 β (MODY5) • 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) • 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) • 9. Kromozom, CEL (MODY8) • 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) • 11. Kromozom, INS (MODY10) • 8. Kromozom, BLK (MODY11) • Mitokondriyal DPNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kır6.2, ABCCB, KCNJ11 mutasyonu) • 11. Kromozom, KJN11 (MODY13) • 3. Kromozom, APLL1 (MODY14) • Diğerleri b) İnsülinin etkisindeki genetik defektler • Leprechaunism • Lipoatrofik diyabet • Rabson-Mendenhall sendromu • Tip A insülin direnci • Diğerleri c) Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları • Fibrokalkülöz pankreatopati • Hemokromatoz • Kistik fibroz • Neoplazi • Pankreatit • Travma/pankreatektomi • Diğerleri d) Endokrinopatiler • Akromegali • Aldosteronoma • Cushing sendromu • Feokromositoma • Glukagonoma • Hipertiroidi • Somatostatinoma • Diğerleri	e) İlaç ve kimyasal ajanlar • Atipik anti-psikotikler • Anti-viral ilaçlar • β-adrenerjik agonistler • Diazoksid • Fenitoin • Glukokortikoidler • α-İnterferon • Nikotinik asit • Pentamidin • Proteaz inhibitörleri • Tiyazid grubu diüretikler • Tiroid hormonu • Vacor • Statinler • Diğerleri (Transplant rejeksiyonunu önlemek için kullanılan ilaçlar) f) İmmun aracılıklı nadir diyabet formları • Anti insülin-reseptör antikorları • “Stiff-man” sendromu • Diğerleri g) Diyabetle ilişkili genetik sendromlar • Alström sendromu • Down sendromu • Friedreich tipi ataksi • Huntington korea • Klinefelter sendromu • Laurence-Moon-Biedl sendromu • Miyotonik distrofi • Porfiria • Prader-Willi sendromu • Turner sendromu • Wolfram (DIDMOAD) sendromu • Diğerleri h) Enfeksiyonlar • Konjenital rubella • Sitomegalovirus • Koksaki B • Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

Kaynak: The American Diabetes Association, 2014 (19)

2.1.4. Tip 1 Diyabet

Tip 1 Diyabet (T1DM); genetik, çevresel ve immünolojik faktörlerin etkileşimi sonucunda pankreas beta hücrelerinin zedelenmesi ya da total kaybına bağlı olarak gelişen insülin eksikliği ile ortaya çıkan ve insüline bağımlı olarak sürüp giden diyabet tipidir. Genetik yatkınlığı bulunan kişilerde çevresel tetikleyici faktörlerin etkisiyle otoimmünite tetiklenir ve ilerleyici beta hücre hasarı başlar. Beta hücre kaynakları %80-90 oranında azaldığında ise klinik diyabetik semptomlar ortaya çıkar. T1DM, çocuklarda teşhis edilen en yaygın (diyabetik çocukların% 80-90' ı) endokrin hastalıklardan biridir (21). Tüm T1DM hastaları eninde sonunda normglisemiyi sürdürmek için insülin tedavisine ihtiyaç duyacaklardır (20).

Çizelge 2.3. Tip 1 diabetes mellitus evreleri- ADA' dan

	Fenotipik özellikler	Tanı kriterleri
Evre 1	Otoimmünite	Çoklu otoantikorlar
	Normoglisemi Preseptomatik	Normal glikoz toleransı
Evre 2	Otoimmünite	Çoklu otoantikorlar
	Disglisemi Preseptomatik	Disglisemi: (BAG / BGT)
Evre 3	Yeni başlamış hiperglisemi	Klinik semptomlar
	Semptomatik	Standart kriterlerle tanı almış diyabet

Kaynak: Diabetes Care, 2019 (22)

2.1.5. Tip 2 Diyabet

Tip 2 Diyabet (T2DM); azalmış insülin sekresyonu, insülin direnci veya her ikisinin birlikteliği sonucu, karbonhidrat, lipid ve protein metabolizmasında bozukluklar ile seyreden bir hastalıktır. Önceleri “erişkin başlangıçlı diyabet” veya “insüline bağımlı olmayan diyabet” olarak adlandırılan T2DM, tüm diyabetlerin %90-95' ini oluşturur. Artan obezite, sedanter yaşam tarzı ve işlenmiş et, rafine tahıllar ve

şekerli içecekler içeren yüksek enerjili sağlıksız diyetlerin tüketimi T2DM hastalarının sayısının ciddi şekilde artmasına neden olmaktadır (23). Bu tip hastalarda hiperglisemi yavaş yavaş geliştiğinden ve genel diyabet semptomlarının ortaya çıkması için gereken ciddi düzeyde hiperglisemi gelişmediğinden yıllarca tanı konulmaz (22).

Tip 2 diyabetin çeşitli nedenleri vardır. Spesifik etiyolojiler bilinmemekle birlikte, beta hücrelerinin otoimmün yıkımı meydana gelmez ve hastalar bilinen diğer diyabet nedenlerine sahip değildir. Hastalarda pankreatik beta hücresinin işlevindeki bozukluk nedeniyle insülin salgılanmasında bozukluk ve insülin direnci mevcuttur (20).

Genel olarak insülin direnci, normal insülin konsantrasyonlarına yetersiz biyolojik yanıt verilmesi durumu olarak tanımlanabilir. T2DM gelişmesi olası kişilerde tespit edilebilen ilk anormalliktir (24). Fakat, pankreatik beta hücreleri insülin direncini yenebilecek seviyede insülin salgılayabildikleri sürece T2DM ortaya çıkmamaktadır (25). İnsülin direnci, dokuların insülin aracılı glikoz kullanımının azalması ve karaciğer glikozun yapımının artması ile meydana gelen metabolik bir bozukluktur. Lipid ve protein metabolizması, adipoz doku, kas-iskelet sistemi, bağışıklık sistemi ve santral sinir sistemi gibi birçok sistemi etkiler (26).

İnsülin direncinin altında yatan patofizyolojik sebepler yeterince aydınlatılamamıştır. Mekanizmaları henüz tam netleşmemiş olsa da insülin direnci çoğunlukla hücre içi post reseptör sinyal yollarının aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. Post reseptör insülin direnci, sinyal aktarım bozuklukları ve GLUT 4 mutasyonları gibi sebeplerle ortaya çıkmaktadır. Böylelikle insülin hormonu, reseptörüne bağlanmasına rağmen, reseptör sonrası mekanizmalardaki bozukluk sebebi ile etkili olamamaktadır (27). Enflamatuar sitokinler, adipokinler ve mitokondriyal disfonksiyonun insülin direnci mekanizmasına etkisi olduğu öne sürülmüştür. Beta hücresi disfonksiyonu için glukotoksisite, lipotoksisite ve amiloid formasyonu dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar önerilmiştir. Ayrıca, hastalık güçlü bir genetik bileşene sahiptir, ancak şimdiye kadar sadece birkaç gen tanımlanmıştır (28).

Diabetes mellitus patogenezi anlamaya yönelik yapılan çalışmalarda hipergliseminin ve artmış serbest yağ asitlerinin beta hücreleri üzerindeki olumsuz

etkilerinin de hastalık gelişimi ve ilerleyişi üzerinde önemli rol oynadığı ortaya koyulmuştur. Buna uzun dönemde insülin sekresyonunda ciddi azalma da eşlik eder (29,30).

Tip 2 diyabetli hastaların bir kısmında diyet, egzersiz ve ilaç tedavisi ile yeterli glisemik kontrol sağlanabilir. Ancak yeterli glisemik kontrolün sağlanamadığı veya beta hücre yıkımı olup insülinin salgılanmadığı kişilerde ise ekzojen insülin kullanılır (31).

2.1.5.1. Tip 2 diyabet risk faktörleri:

Tip 2 diyabet riski, genetik ve metabolik faktörlerin etkileşimi ile belirlenir.

Tip 2 diyabet gelişimi için risk faktörleri şu şekilde sıralanabilir (32).

- Yaşlılık
- Tip 2 diyabet aile öyküsü
- Kalıtsal faktörler
- Aşırı kilo veya obezite (Beden kitle indeksi (BKİ) ≥ 25 kg/m²)
- Aterosklerotik kardiyovasküler hastalık öyküsü
- Sağlıksız beslenme
- Dislipidemi
- Sigara kullanımı
- Polikistik over sendromu
- Bazı ilaçlar
- Psikososyal ve ekonomik faktörler
- Sedanter yaşam tarzı
- Gestasyonel diyabet veya bebek doğurma öyküsü (doğum tartısı >4 kg)
- Akantozis nigrikans varlığı
- Kısa veya uzun uyku süresi ve vardiyalı çalışma

Beslenme ve fiziksel inaktivitenin göstergesi olan aşırı vücut yağı T2DM için en güçlü risk faktörüdür. Aşırı kilo ve obezitenin, fiziksel hareketsizlikle birlikte, küresel diyabet yükünün büyük bir kısmına neden olduğu tahmin edilmektedir (33). Bel çevresindeki yağlanma ve yüksek beden kitle indeksi T2DM riskinde artışa neden olmakla birlikte, ilişki popülasyonlara göre farklılık gösterebilir (34). Yağ kitlesi

arttıkça serbest yağ asitleri, tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve leptin gibi moleküller insülin direncinin ortaya çıkmasında kuvvetli aday faktörler arasında yer almaktadır. Obezitede gelişen ilk değişiklik, adipozitlerde triaçilgliserol birikimi olarak kabul edilmektedir. Artmış adipoz doku kitlesi ile ilişkisi olan faktörün diğer dokularda insülin direnci gelişmesine yol açtığı düşünülmektedir. En belirgin aday, uygunsuz olarak artan serbest yağ asiti konsantrasyonlarıdır. Serbest yağ asitlerinin dolaşıma dağıtımının artmasının insülin direncini başlatabileceği gösterilmiştir (35).

Yüksek doymuş yağ asitleri alımı, yüksek toplam yağ alımı ve yetersiz diyet lifi tüketimi dahil olmak üzere çeşitli sağlıksız diyet paterninin de T2DM riskini arttırdığı düşüncesi üzerine çalışmalar yapılmıştır (36–38). Yapılan çalışmalar şekerli tatlandırılmış içeceklerin tüketimi ile T2DM riskinde artış arasında bir ilişki olduğunu kanıtlamıştır (39–41).

Yapılan prospektif çalışmalarda aktif sigara kullanımının T2DM riskini arttırdığı görülmüştür (42). Yirmi beş prospektif çalışma içeren bir meta-analizde mevcut sigara içiminin diyabet riskini %44 oranında arttığı saptanmıştır (43). Günde 20 adetten fazla sigara kullananlarda hafif içici veya sigara kullanımı bırakmış olanlara kıyasla daha yüksek T2DM riski saptanmıştır (44). Buna ek olarak, bazı araştırmalarda sigara bıraktıktan ilk 2-3 yıl sonra T2DM riskinin devam ettiği gösterilmiştir (45). Yapılan kohort çalışmasında sigarayı bırakanlarda 12 yıl sonra riskin azaldığı saptanmıştır (45).

Fiziksel inaktivite ve sedanter yaşamın T2DM gelişmesinde güçlü bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (46–48).

Farklı çalışmalarda, genetik bileşenlerin T2DM patogeneğinde önemli role sahip olduğunu göstermiştir (49–51). Birinci derece akrabalar arasında pozitif aile geçmişinin T2DM riskinde artışa neden olduğunu ve her iki ebeveyn etkilendiğinde riskin daha yüksek olduğunu bildiren çalışmalar da bulunur (51).

2.1.6. Diabetes Mellitus'un Komplikasyonları

Diyabet, neden olduğu komplikasyonlar ile önemli bir mortalite ve morbidite sebebidir. Kan glikoz düzeylerinde kısa süre içerisinde ortaya çıkan dalgalanmalar mortalitesi yüksek bu akut komplikasyonlara neden olurken glikoz düzeylerinin uzun soluklu olarak kontrol altına alınamaması kronik komplikasyonlara yol açmaktadır

(52). T2DM hastalarında tanı anında da diyabet komplikasyonları olabilir (17). Ayrıca diyabet artmış kanser, fiziksel ve bilişsel sakatlık, tüberküloz ve depresyon oranları ile ilişkilendirilmiştir (53–56).

2.1.6.1. Akut komplikasyonlar:

Akut komplikasyonlar dört başlık altında incelenebilir. Bunlardan üçü hiperglisemi ile ilişkili iken, hipoglisemi diyabet tedavisinin bir komplikasyonu olarak ortaya çıkmaktadır (14).

- Diyabetik ketoasidoz
- Laktik asidoz
- Hiperozmolar hiperglisemik durum
- Hipoglisemi

2.1.6.2. Kronik komplikasyonlar:

Diyabetin kronik dönem komplikasyonları arasında küçük ve büyük damarları, kranial ve periferik sinirleri, deriyi ve göz lensini tutan bir dizi patolojik değişiklik sayılabilir. Bu lezyonlar hipertansiyona, son dönem böbrek hastalığına, körlüğe, otonom ve periferik nöropatiye, alt ekstremitte amputasyonlarına, miyokard infarktüsüne ve serebrovasküler olaylara yol açar (57).

Hipergliseminin hücre ve organ disfonksiyonuna hangi yollar üzerinden neden olduğu net değildir. Hipergliseminin epigenetik değişikliklere neden olduğu ve etkilediği hücrelerde gen ekspresyonunu değiştirdiği düşünülmektedir (16).

1. Makrovasküler komplikasyonlar (kardiyovasküler hastalıklar):

- Koroner arter hastalığı
- Serebrovasküler hastalık
- Periferik arter hastalığı

2. Mikrovasküler komplikasyonlar:

- Diyabetik retinopati
- Diyabetik periferik nöropati
- Diyabetik nefropati
- Diyabetik kardiyomiyopati (58)

2.1.6.3. Diğer Komplikasyonlar:

1. Büyüme ve gelişme geriliği
2. Otoimmün durumlar
 - Çölyak hastalığı
 - Hipotiroidi
 - Hipertiroidi
 - Vitiligo
 - Addison Hastalığı
3. Lipodistrofi (Lipoatrofi ve lipohipertrofi)
4. Non-alkolik karaciğer hastalığı
5. Nekrobiyozis lipoidika diabetikorum
6. Eklem hareket kısıtlılığı
7. Diyabette görülen enfeksiyonlar
8. Ödem (20)

2.2. DİYABETİK PERİFERİK NÖROPATİ

Diyabetik periferik nöropati, diyabetin en sık görülen kronik komplikasyonudur ve diyabetli hastaların üçte ikisinden fazlasında nöropati gelişir. Sinir sisteminin farklı bölümlerini etkileyerek vücuttaki sinirlerin normal aktivitelerinde bir bozulma oluşturur. Otonom, motor ve duysal fonksiyonları değiştirerek sinir sistemi ile ilgili farklı klinik bulgular açığa çıkartır (2).

Diyabetik olmayan nöropatiler, diyabetli hastalarda mevcut olabilir ve spesifik önlemlerle tedavi edilebilir. Ancak diyabetik periferik nöropati için şu anda etkili bir tedavi mevcut değildir (59). Mikrovasküler komplikasyonlara benzer şekilde hiperglisemi süresi DPN gelişme olasılığını etkiler (52). Nöropatiler uzun süreli diyabetin bir sonucu gibi görünse de, erken başlangıçlı polinöropati de bildirilmiştir (60). Elektrofizyolojik çalışmalar, 5-10 yıllık diyabet sonrası birçok hastada motor ve duyu siniri iletiminin yavaşladığını göstermiştir (61).

Nüfus ve klinik temelli çalışmalar, 20 yıllık hastalık süresinin ardından T1DM hastalarında %20 ve T2DM tanılı hastalarda ise %10-%15'e kadar artmakta olan DPN prevalansını göstermektedir (62). Semptomatik DPN için çeşitli tedavi seçenekleri mevcuttur. Hastaların %50 kadarı asemptomatiktir. Açık klinik belirtilerin ortaya

çıkmasından önce erken anormallikler için, asemptomatik hastalık seyri olan veya DPN gelişimi için aday olan hastalara mevcut yöntemler kullanılarak yapılan taramalarda tatmin edici bir veriye ulaşılamamıştır (63).

Çizelge 2.4. Diyabetik periferik nöropati semptom ve belirtileri - ADA' dan (62)

	Fonksiyon	Semptomlar	Klinik Muayene
Büyük miyelinli sinir lifleri	Basınç Denge	Uyuşma Karıncalanma Zayıf denge	Ayak bileği refleksleri: azaltılmış / yok Titreşim algısı: azaltılmış / yok Monofilament: azaltılmış / yok Propriyosepsiyon: azaltılmış / yok
Küçük miyelinli sinir lifleri	Nosisepsion Koruyucu his	Ağrı: yanma, elektrik çarpması, bıçaklama	Termal (soğuk / sıcak) ayrımı: azaltılmış / yok Pinprick hissi: azaltılmış / yok

Diyabetik periferik nöropati periferik sinir liflerinde yaygın hasar ile karakterizedir. Eğer hastalık erken tanısı konmaz ve ayak bakımına yönelik önlemler alınmazsa hastalarda ciddi enfeksiyonlara, ülserasyona ve bazı durumlarda amputasyonlara neden olabilir. Otonomik nöropatinin tanınması ve tedavisi ile semptomlarda iyileşme sağlanır ve sonuç olarak sekeller azaltılıp hastanın yaşam kalitesi artırılır (62). Prediyabetik hastalarda da diyabetik hastalarda olduğu gibi nöropati gelişebilir (64). DM hastalarında nöropatinin erken tanınması ve uygun şekilde yönetilmesi, bu nedenlerden dolayı önemlidir (62).

Diyabetik periferik nöropati için son derece güvenilir bir teşhis yönteminin bulunmamasına ilişkin olarak, halen kullanılmakta olan tedavi rejimleriyle ilgili benzer bir karmaşıklık derecesi vardır. DPN gelişimi için nedensel tedavinin yokluğunda, mevcut tedavi yaklaşımı genellikle glisemik kontrol ve ağrı yönetimi kombinasyonundan oluşur. Altta yatan sinir hasarına yönelik tedavilerin yetersizliği nedeni ile diyabetik periferik nöropatinin gelişmesinin önlenmesi esas unsurdur (62). Yoğun tedavinin nöropatinin başlangıcını %70 ve erken nöropatinin progresyonunu %57 yavaşlattığını gösteren çalışmalar mevcuttur (65).

Distal simetrik polinöropati ve özellikle kardiyovasküler otonomik nöropati diyabetik periferik nöropatinin en iyi bilinen formlarıdır (62). Periferik nöropati, ekstremitelerin distal sinirlerini, özellikle de ayakların sinirlerini etkileyen en yaygın diyabetik periferik nöropati şeklidir. Temel olarak, dış travma ve/veya iç kemik basıncının anormal dağılması nedeniyle ülserlerin (diyabetik ayak) gelişimini kolaylaştıran anormal hislere ve ilerleyici uyuşukluğa simetrik olarak duyusal işlevi değiştirir. Nöropati ayrıca erektil disfonksiyonun yanı sıra sindirim ve idrar problemlerine ve kardiyak otonomik disfonksiyon gibi diğer bazı problemlere de yol açabilir (17).

2.2.1. Diyabetik Periferik Nöropati Patofizyolojisi

Diyabetik periferik nöropatinin patofizyolojisi hem iç içe geçmiş çok sayıda nedensel mekanizma hem de kesin bir teşhis koymanın zorluğu nedeniyle henüz net olarak ortaya konulamamıştır (3). Spesifik olarak, DPN' nin tanısal yaklaşımı standardize olmaktan ziyade karmaşıktır, genellikle sonuçların duyarlılığını ve özgüllüğünü arttırmak için çeşitli kalitatif ve kantitatif yöntemlerin bir kombinasyonunu içerir.



Şekil 2.1.Diyabetik nöropati patogenezi (66)

Diyabetik periferik nöropatide farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. En önemlisi oksidatif stres ve endotel disfonksiyonudur; bu mekanizmalar metabolizma ve mikrosirkülasyonda bozukluklara yol açar (66). DPN, bozulmuş antioksidan mekanizmalarla birlikte artan serbest radikal üretimi sonucu oluşan oksidatif stres ile ilişkili olabileceği gibi periferik sinirleri besleyen vasküler yapılardaki değişiklikler ile de ilişkili olabileceği öngören çalışmalar vardır (67,68).

Hiperglisemi, lipotoksisite, poliyol (sorbitol) yolunun aktivasyonu, ileri glikolizasyon ürünlerinin artışı, heksozamin ve protein kinaz C yolağının aktivasyonu, oksidatif stres, nitrik oksit düzeylerinde azalma ve enflamasyonun etkili olduğu düşünülmektedir (69). Periferik vasküler hastalığın da periferik nöropati patofizyolojisinde önemli bir etken olduğu bilinmektedir. Ayrıca hipertansiyon, nöropati gelişimini hızlandırabilmektedir (70). Diyabet komplikasyonlarının oluşumunda rol alan faktörler nöropatinin oluşumunda da etkili olup artmış poliyol

yolağı aktivitesi, glikolizasyon ürünlerinin aktivitesi ile sinir lifleri tahrip olmaktadır. Poliyol yolağı aktivasyonu;

- NADPH / NADP + oranını ve nitrik oksit üretimini azaltabilir,
- sorbitol birikimini ve ozmotik stresi indükleyebilir,
- fruktoz içeriğini arttırmak,
- protein glikasyonunun artmasına ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığının gelişmesine yol açabilir, ROS üretimi ve oksidatif strese yol açan NADH / NAD + oranını arttırabilir (71).

2.3.mikroRNA (miRNA)

mikroRNA yaklaşık 22 nükleotit uzunluğunda, şifre taşımayan, protein kodlamayan, tek zincirli, kısa RNA molekülü türüdür. Tüm hücre tiplerinde gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel olarak düzenlerler. Genel olarak, miRNA' lar transkripsiyonel baskılamayı tetiklemek için hedef mRNA' sının 3'-UTR (çevrilmeyen bölge)' sine bağlanır ve protein sentezlenmesini engelleyerek işlev görürler (72).

Bu zamana kadar, insan genomunda yaklaşık 2300 miRNA tanımlanmıştır (73). miRNA' ların normal ve patolojik durumlarda önemli rol oynayan düzenleyiciler olduğu bilinmektedir. miRNA' larda anormal bir ifade olması durumunda ise hem fizyolojik hem de patofizyolojik süreçler etkilenir (74). Aynı UTR' ler sayısız miRNA tarafından hedeflenir, böylece düşük eksprese edilmiş miRNA' lar bile fonksiyonlarını epigenetik bir düzenleme ağının parçası olarak uygularlar. Bu miRNA' lar, patofizyolojik uyarıcılara cevap olarak gen ekspresyon paternlerinin ince ayarlayıcılarıdır ve bazal koşullar altında kısmen düşük seviyelerde eksprese edilmelerine rağmen patolojik stres sırasında kuvvetli bir şekilde düzenlenirler (75).

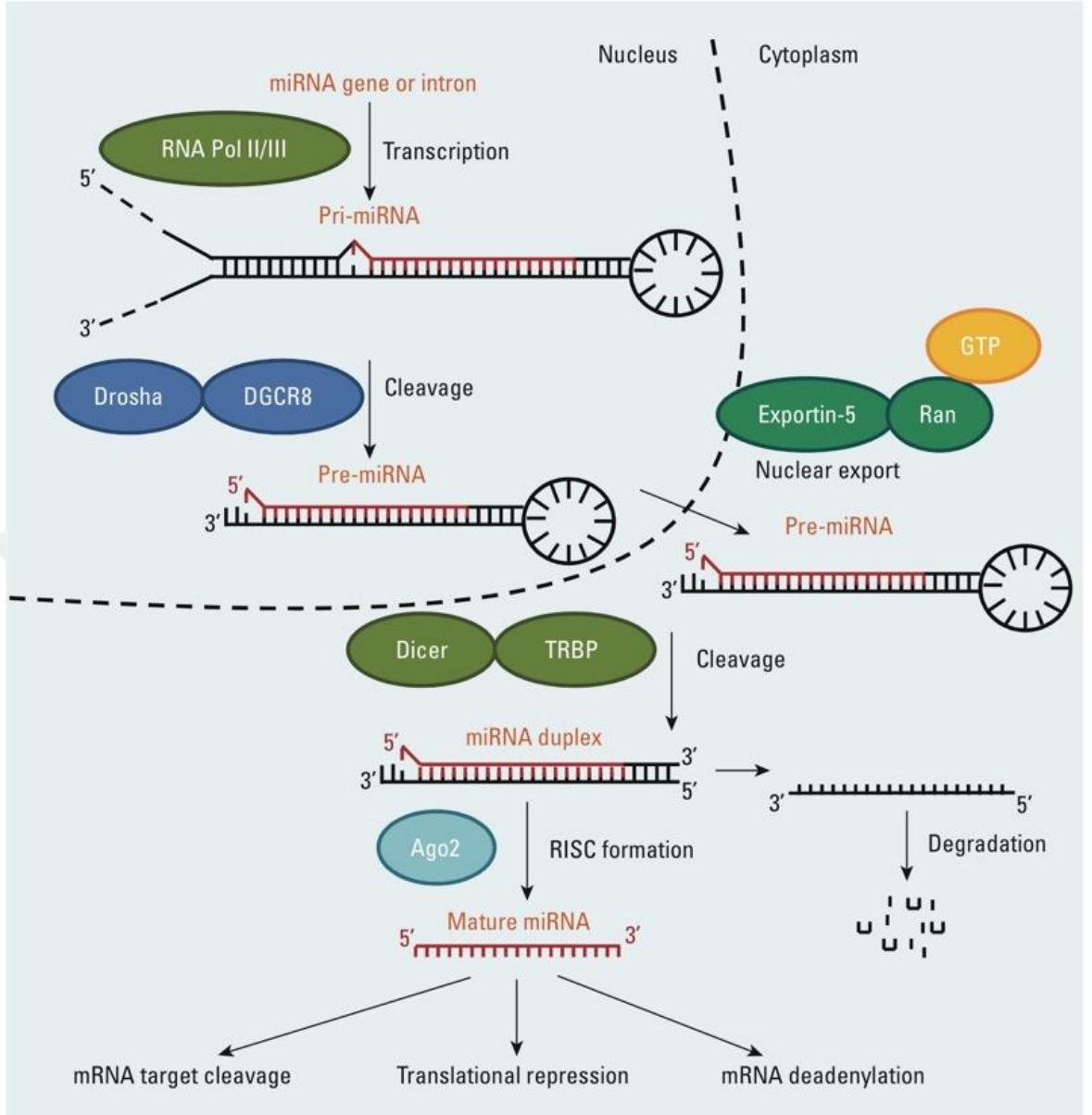
mikroRNA' lar proliferasyon, farklılaşma ve apoptoz gibi hücrel fonksiyonlarda ve biyolojik gelişim gibi çok çeşitli biyolojik işlemlerde önemli bir role sahiptir. miRNA' ların gelişimsel geçişler, nöronal şekillendirme adipogenez metabolizması ve farklı organizmalarda hematopoez de dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde anahtar rollere sahip olduğu göstermiştir (76). Birçok onkogen ve tümör baskılayıcı gen, miRNA' lar tarafından düzenlenir. Enflamasyon kanserojenez, glikoz homeostazı ve diğer biyolojik işlemlerde rol oynarlar (77). Yapılan bazı çalışmalarda

ise miRNA' lar ile bazı insan maligniteleri ve bulaşıcı hastalıklar arasındaki olası ilişki gösterilmiştir (78).

Kümelenmiş miRNA' lar, aynı biyokimyasal yolda bulunan aynı gen veya farklı genlerin hedeflenmesi açısından işlevsel olarak ilişkili olabilir (79). miRNA' ların işlevsel önemlerinin tam olarak anlaşılabilmesi, tanı veya tedavi amaçlı kullanılabilmesi için hedeflerine nasıl bağlandıklarının ve gen ifadesini farklı seviyelerde nasıl düzenlediklerinin belirlenmesi gerekmektedir (80).

2.3.1. mikroRNA Biyogenezi

mikroRNA' ların biyolojik oluşumu, nükleusta başlayıp sitoplazmada son bulan bir dizi işlemler sonucunda meydana gelmektedir. miRNA' ların kodlandığı genler, genomik DNA' daki protein kodlamayan bölgelerde ve protein kodlayan genlerin intronlarında bulunur (81). miRNA genlerinin hücre çekirdeğinde çoğu RNA-polimeraz II, bazıları RNA-Polimeraz III ile birkaç yüz nükleotit uzunluğundaki pri-miRNA' yı meydana getirir. Pri-miRNA nükleer endoribonükleaz RNaz III Drosha ve onun kofaktörü DGCR8 (DiGeorge sendromu kritik bölge protein 8) aracılığıyla 70 nükleotit uzunluğundaki pre-miRNA' yı meydana getirir (82). Pre-miRNA, Ran-GTP (guanozin trifosfat) ve Exportin-5 transport kompleksi vasıtasıyla nükleus dışına çıkarılır (83,84). Sitoplazmada, endonükleaz RNaz III Dicer ve TRBP (TAR RNA bağlayıcı protein kompleksi) tarafından pre-miRNA' lar tekrar kesime uğrayarak ~22nt uzunluğundaki çift iplikli bir yapı olan miRNA haline gelir. Oluşan miRNA dupleksi argonaute' a yüklenerek RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi adı verilen efektör kompleksi oluşturur (85,86). miRNA' yı barındıran RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi, hedefi olan mRNA'nın 3'-UTR' sine yönelir. miRNA' lar hedef mRNA' ya tam ya da kısmi eşleniklik göstererek bağlanabilirler (87). Eğer tam bir eşleşme gerçekleşirse RNA ile indüklenmiş susturma kompleksi hedef mRNA' ların destabilizasyonu sağlanır. Fakat tam eşleşme gerçekleşmeyecek olursa miRNA hedef mRNA' nın translasyonun baskılanması gerçekleşir (88). Dolayısıyla miRNA, mRNA deadenilasyonu ve bozunması yoluyla hedef genleri ekspresyonunu durdurur (89,90).



Şekil 2.2. mikroRNA biyogenezi- Vrijens ve ark.' dan (91)

2.3.2. mikroRNA ve Diabetes Mellitus

mikroRNA' ların hastalıkların mekanizmalarında önemli bir role sahip olduğu düşünülmese de halen ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. T2DM alanında, patolojiyle ilgili miRNA' ları tarif eden çalışmalar vardır. T2DM hastalarında tanın konulabilmesi için dolaşımdaki miRNA' larının kullanılması ilk olarak 2008 yılında Chen tarafından yapıldı. Chen, Solexa dizilimini kullanarak, T2DM olan

hastaların serum miRNA' larının sağlıklı deneklere kıyasla, belirgin bir şekilde değişmiş ekspresyon profiline sahip olduğunu gösterdi (92).

Değişmiş miRNA ekspresyonlarının DM dahil pek çok hastalığın patogenezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. miRNA' ların vücuttaki varlığı, diyabetin ilerleme süreci ve tedavisinde önemli olabilecek potansiyel belirteçler olarak gündeme gelmesini sağlamıştır. miRNA' lar diyabet gelişiminden sorumlu mekanizmaların anlaşılmasına önemli katkı sağlamaktadır (93). miRNA' lar karbonhidrat ve lipid metabolizmaları, insülin sinyal yolu ve adipositokin sinyal yolu gibi T2DM ile ilişkili çekirdek işlemlerde yer alır (94).

Tip 2 diyabetin başlangıcını ve ilerlemesini tahmin edebilen belirli bir biyobelirteç mevcut değildir. Bugüne kadar mevcut olan geleneksel (örneğin açlık plazma glikozu, HbA1c) ve yeni biyobelirteçler (örneğin adipokinler, sitokinler ve C-reaktif protein), halihazırda metabolik değişiklikler sergileyen durumları gösterdikleri için T2DM geliştirme riski taşıyan kişileri verimli bir şekilde tanıyamazlar. Dolaşımdaki mikroRNA' ların, T2DM hastalarında ve farklı ekspresyon profilleri gösterdiği ve hastalığa yakalanma riski taşıyan bireylerde de teşhis için ümit verici biyobelirteçler olduğu ileri sürülmüştür (95).

Açlık plazma glikozu ve HbA1c gibi klasik biyobelirteçler sınırlamaları nedeniyle duyarlı bir popülasyonda diyabet komplikasyonlarının gelişme riskini öngörmeye yetersizdir. miRNA' lar diyabetle ilişkili komplikasyonlar için ideal biyobelirteçler olarak hareket edebilir. Diyabeti tespit etmek ve hassas popülasyonda diyabetle ilişkili komplikasyonların gelişme riskini bulmak için ideal olarak spesifik miRNA paternlerinin belirlenmesi, diyabetin dünya çapında kontrol edilmesi için mevcut klinik stratejilerin temel şartı olduğu düşünülmektedir (96).

Spesifik miRNA seviyelerinin değişmesi sadece diyabetik hastalarda gözlenen kronik enflamasyonun gelişmesine değil aynı zamanda beta hücre kaybı ya da işlev bozukluğuna bağlı insülin sekresyonunun düzensizleşmesi, insülin direnci ve onun kronik komplikasyonları ile ilgili işaretler verebilir (97).

Tip 2 diyabet teşhisi için önemli olabilecek ve kanda yapılmış iki çalışmada benzer 10 adet miRNA, toplam 26 yayın taranarak meta-analiz ile saptanmıştır. Bu miRNA' ların ekspresyonlarının altı tanesinin arttığı ve dördünün azaldığı bildirilmiştir. miRNA' lar aynı zamanda pankreatik beta hücrelerinin farklılaşması,

çoğalması ve hayatta kalmasında önemli rol oynarlar. Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile bir biyobelirteç olarak serum miRNA-126 düzeyleri T2DM hastalarında kontrol bireylere göre düşük bulunmuştur. T2DM hastalarının serumunda yedi adet miRNA düzeyleri normal glikoz toleransına sahip hastalar ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde yüksek saptanmıştır. T2DM' li hastaların meta-analiz sonuçları 40 miRNA'nın önemli ölçüde değiştiğini, dolaşımdaki bazı miRNA' ların biyobelirteç olarak kullanılabileceğini göstermiştir (96).

Zampetaki, Bruneck kohortundan rastgele seçilen 800' den fazla kişiyi içeren prospektif bir çalışmada spesifik bir miRNA paterni tanımlayan ilk kişidir. T2DM hastaların ve diyabetik olmayan deneklerin plazmalarındaki çeşitli miRNA' lar karşılaştırdığında 10 miRNA seviyesinde azalma görülürken, miRNA-28-3p'ün arttığı bulunmuştur (98).

Kesitsel bir çalışmada, T2DM hastalarında ve normal glikoz toleransı olan bireylerde dolaşımdaki miRNA' ların ekspresyon profili incelendiğinde, T2DM hastalarında bazı miRNA plazma seviyelerinin azalırken bazılarının arttığı gösterilmiştir (99).

Yeni bir pilot kesitsel çalışmada, plazma miRNA-126 ve miRNA-146a seviyelerinin prediyabetik bireylerin ile normal glikoz toleransı olan bireyler arasında karşılaştırıldığında önemli ölçüde downregüle edildiği görüldü (100).

mikroRNA' lar, beta hücre kütlesi ve işlevinin yanı sıra immün sistem homeostazının düzenlenmesi ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir, bu nedenle diyabet patogenezinde önemli bir rol oynarlar (101).

Kong, bozulmuş açlık glikozu (IFG) ve/veya bozulmuş glikoz toleransı (IGT) olan, yeni teşhis edilmiş T2DM hastalarında ve normal glikoz toleransı olan bireylerin serumlarında T2DM patogenezinde rol aldığı bilinen 7 mikroRNA' nın ekspresyon seviyelerini analiz etti. T2DM olan hastalarda normal glikoz toleransı olan bireylere göre yedi miRNA' nın tümü artmış iken ve IFG ve/veya IGT olan bireylere göre beşinin artmış olduğunu belirtmiştir (102). Balasubramanyam, T2DM hastalarında ve diyabetik olmayan bireylerde periferik kan mononükleer hücrelerinde miRNA-146a ifadesininin, glisemik kontrol ve insülin direnci ile ilişkisini incelemiştir. Bu mikroRNA'nın ekspresyon seviyelerinin T2DM hastalarındaki periferik kan

mononükleer hücrelerinde diyabetik olmayan bireylere göre anlamlı derecede azaldığını göstermiştir (103).

Diyabet veya komplikasyonları ile ilişkili dolaşımdaki bir miRNA' lar alt grubunu tanımlamayı amaçlayan çok sayıda yayınlanmış çalışmaya rağmen, bunlardan sadece birkaçının doğruluğu tekrarlanabildi. Bu da hem numune toplama hem de analizi standartlaştırma çabasını koordine etme ihtiyacının altını çizdi. Dolaşımdaki miRNA' ların rolü kronik diyabetik komplikasyonlarında da araştırılmıştır. Nitekim, diyabetik komplikasyonların ortaya çıkmasını öngörebilecek ve kesin bir şekilde kötüleşen izlemelerine veya durumlarının iyileştirilmesine ilişkin spesifik biyobelirteçlerin bulunamaması, bazı araştırma gruplarının yeni biyobelirteçler kaynağı olarak dolaşımdaki miRNA' lara odaklanmasına neden olmuştur (95).

Nöropatik ağrı, yaşam kalitesini etkileyen DM ile ilişkili en yaygın komplikasyonlardan birini temsil eder. Yapılan çalışmalar miRNA' ların DPN gelişiminde de rol aldığını vurgulamaktadır (104). Spekülatif olarak, retinopati ve nefropati enflamasyonuna katılan miRNA' lar ayrıca nöropatik enflamasyonu da etkiler (105). 2018 yılında yapılmış olan bir çalışmada miRNA tabanlı tanı, evreleme ve tedavi gelişiminde bir sonraki adımın, DPN görüntüsü ve ciddiyeti ile ilişkili olarak zaman içinde biriken miRNA epigenetik değişikliklerini değerlendirmek amacıyla, komplikasyon içermeyen diyabetik bireyler içeren prospektif bir kohort çalışmasında nöropati ve diyabet ile ilişkili miRNA' ları incelemek olması gerektiği belirtilmiştir (6).

2.3.2.1. mikroRNA 128a:

mikroRNA-128a' nın tek nükleotid polimorfizmleri olan diyabetli hastalarda, DPN dahil olmak üzere diyabetik mikrovasküler komplikasyonlara karşı duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (106,107). miRNA-128a insülin sinyallemede yer alan, hem mRNA hem de protein seviyesinde IR (insülin reseptörü), IRS 1 (insülin reseptörü substratı 1) ve PIK3R1 (fosfatidilinositol 3-kinaz regülatörü 1) içeren hedef genleri düzenleyerek insülin sinyalizasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (108).

2.3.2.2. mikroRNA 146a:

mikroRNA-146a, doğal ve adaptif bağışıklık ve enflamatuvar hastalıkların düzenlenmesinde en iyi karakterize edilmiş miRNA'lardan biridir (109). Yapılan bir çalışmada NF- κ B (nükleer faktör kappa B) sinyallemede ince ayar yapma yeteneği nedeniyle inflamma-miRNA olarak adlandırılmıştır (110). miRNA-146a, T2DM patofizyolojisinde, diyabetik retinopati ve diyabetik yara iyileşmesi geliştirmede rol oynar (105,111,112). Dolaşımdaki mononükleer hücrelerde bulunan miRNA-146a, DPN' de enflamatuvar yanıtı modüle edebilir (113,114). DPN patogenezinde rol oynadığı ve ekspresyon seviyesinin siyatik sinir yaralanmalarını şiddetlendiren enflamatuvar yanıtlarla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir (115).

2.3.2.3. mikroRNA 155:

mikroRNA-155 enflamatuvar süreçlerde rol oynar ve diyabet ve komplikasyonları sırasında farklı ekspresyon kalıpları gösterir (115). miRNA-155, immünolojik ve metabolik hastalıklarda yoğun olarak çalışılmıştır. miRNA-155' in immün hücrelerde ve adipoz doku dahil diğer dokularda eksprese edildiği ve diyabet dahil olmak üzere çeşitli hastalıklarda yer aldığı düşünülmektedir (116). miRNA-155' in birçok bilgisi bilinmemekle birlikte, muhtemelen glikoz homeostazını koruyarak DM ve insülin direncinin tedavisi için umut verici bir strateji haline gelebileceği savunulmaktadır (117). Yağsız ve obez adipoz doku makrofaj (ATM) kaynaklı eksozomlarda farklı şekilde eksprese edilen 20 miRNA' dan biri olan miRNA-155' in aşırı ekspresyonu sonucu hedefi olan peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör gama (PPAR γ) mRNA' sını baskılayarak glikoz üretimi üzerindeki insülin etkisini azalttığı bulunmuştur (118). miRNA-155 sessizliğinin DPN' deki siyatik sinir hasarını hafiflettiği ve DPN için terapötik bir hedef olarak potansiyel aday olabileceğini vurgulanmıştır (104).

2.3.2.4. mikroRNA 375:

Pankreatik adacıklarda fazla miktarda bulunan miRNA' lardan biri olan miRNA-375' in, 2004 yılında insülin sekresyonunu doğrudan düzenleyen ilk miRNA olduğu ve pankreas adacıkları için ilk spesifik miRNA olduğu rapor edilmiştir.

miRNA-375 ve diğer miRNA' lar arasındaki fark, miRNA-375' in adacık hücrelerinin büyümesi, farklılaşması ve insülin üretimine katılması; diğer miRNA' ların ise çeşitli hedef dokuların ve hücrelerin insülin sinyal yollarının düzenlenmesinde yer almasıdır (119). miRNA-375' in up regülasyonu veya down regülasyonu, insülin sekresyonunu baskılar veya arttırır (120,121).

İnsan kaynaklı pluripotent kök hücrelerde yapılan çalışma, miRNA-375' in insülin salgılayan pankreatik adacıkların oluşumu için gerekli olduğunu ortaya koymuştur (122,123). Bununla birlikte miRNA-375' in sadece glikoz homeostazını (örneğin insülin gen ekspresyonu) ve insülin sekresyonunu (ekzositoz üzerindeki etkisi yoluyla) değil, aynı zamanda pankreatik hücrenin gelişimini, korunmasını ve hayatta kalmasını da düzenlediği gösterilmiştir (117). miRNA-375 ekspresyonunun, endokrin pankreas hücrelerinin insan embriyonik kök hücrelerine farklılaştığı süreci etkileyebildiği görülmüştür (124). miRNA-375' in bu özel rolü göz önüne alındığında, olgun insan embriyonik kök hücrelerin DM tedavisinde pankreatik β -hücrelerine farklılaşmasına yardımcı olabildiği düşünülmektedir (117).

Bununla birlikte, son zamanlarda, miRNA-375' in, salgı granüllerinin aktin depolimerizasyonu yoluyla plazma membranı ile kaynaşmasına katılan miyotropin mRNA' sını hedefleyerek glikoza bağlı insülin sekresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (120). Aynı zamanda, miRNA-375, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3-kinaz) yolunun anahtar molekülü olan 3'-fosfoinositit bağımlı kinaz 1 (PDK1) mRNA'sını doğrudan hedefleyerek glukoz ile indüklenen insülin sekresyonunu da azaltır (125).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMAYA KATILAN KATILIMCILAR

Çalışmaya, Temmuz 2019 ve Aralık 2019 ayları arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dahiliye polikliniğine rutin kontroller amaçlı başvuran, 30-75 yaş arası tip 2 diyabeti olup diyabetik periferik nöropati gelişmeyen (T2DM) 30 hasta, diyabetik periferik nöropatili (DPN) 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise herhangi bir kanser teşhisi olmayan, gebelik bulundurmayan 30-75 yaş aralığında olan 30 sağlıklı birey dahil edilmiştir. 150 kişiyle yapılması planlanan çalışmamız yeterli sayıda uygun hasta bulunamaması sebebiyle 90 kişiyle yapılmıştır. Yapılan power analizi sonucunda da 90 kişinin yeterli olduğu görülmüştür.

Çalışmaya katılan her bir katılımcıya araştırma hakkında bilgilendirme yapılmış ve Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalatılmıştır. Her iki gruptaki örnekler cinsiyet ve yaş açısından eşlenik olarak tutulmuştur. Çalışmanın etik açıdan uygunluğu Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ümraniye Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 17.10.2018 tarihli ve 148 sayılı kararı ile teyit edilmiştir.

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden rutin kan tetkikleri esnasında EDTA' lı tüplere 5-10 cc periferik kan örnekleri alındı. Alınan periferik kan örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı.

3.2. TOTAL RNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerden alınan periferik kan örneklerinden üretici firma (Lucigen MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit, ABD) protokolü uygulanarak total RNA izole edildi.

3.2.1. Tam Kan Örneklerinin Lizis Aşaması

200 µL tam kan örnekleri 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine eritrositleri lizis etmek amacıyla 600 µL Red Cell Lysis Solution eklendi. Örnekler 3 kez ters düz edilerek karıştırıldı, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilip ardından

vortekslendi (2 kez). Mikrosantrifüjde 25 saniye santifüj edilerek beyaz kan hücreleri çöktürüldü. Süpernatantın çoğunluğu (dipte yaklaşık 25 µL kalacak şekilde) alınıp pellet iyice çözündürüldü ve üzerine 300 µL Tissue and Cell Lysis Solution eklendi. Pipetaj ile iyice karışım sağlandıktan sonra buzda 5 dakika kadar bekletildi.

3.2.2. Nükleik Asitlerin Presipitasyonu

Karışım üzerine 150 µL MPC Protein Precipitation Reagent' ı eklendi ve şiddetli bir şekilde 10 saniye kadar vortekslendi ve ardından soğutmalı santrifüjde 4°C' de 10 dakika 12 000 g' de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve pellet içeren tüp atıldı. Süpernatant üzerine 500 µL izopropanol eklendi, 40 kez ters düz edildi ve tekrar soğutmalı santrifüjde 4°C' de 10 dakika 12 000 g' de santrifüjlendi. Oluşan pellette total nükleik asitler bulunduğundan pellet yapısı bozulmadan, karışmasına izin verilmeden çok dikkatli bir şekilde süpernatant pipet yardımıyla çekilip atıldı. RNA' nın çöktürülmesi için bir sonraki aşama ile devam edildi.

3.2.3. Total RNA' nın Presipitasyonu

Her bir örnek için 5 µL DNaz I enzimi ve 195 µL 1X DNase I Buffer içeren 200 µL' lik DNaz I çözeltisi hazırlandı. Total nükleik asit pelleti yeni hazırlanmış olan 200 µL DNaz I çözeltisi ile çözündürülüp 37°C' de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler 200 µL 2X T and C Lysis Solution eklenip 5 saniye vortekslendi. Ardından 200 µL MPC Protein Precipitation Reagent eklenip 10 saniye kadar vortekslendi ve 5 dakika buzda bekletildi. Soğutmalı santrifüjde 4°C' de 10 dakika 12 000 g' de santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant dikkatli bir şekilde alınarak yeni bir 1,5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve pellet içeren tüp atıldı. Süpernatant üzerine 500 µL izopropanol eklendi, 40 kez ters-düz edildi ve tekrar soğutmalı santrifüjde 4°C' de 10 dakika 12 000 g' de santrifüjlendi. RNA içeren pellet yapısı bozulmadan çok dikkatli bir şekilde %70' lik etanol ile iki kez yıkandı. Etanol kalıntılarının tamamı bir pipet yardımıyla kaldırıldıktan sonra 30 µL TE Buffer eklendi

ve pellet çözdürüldü. En son aşama olarak her bir örneğe 1 µL RiboGuard™ RNase Inhibitor eklendi ve izolasyon tamamlandı.

İzole edilen total RNA örneklerinin saflık ve konsantrasyonu NanoDrop 2000 (Thermo Ficsher) cihazı ile ölçüldü. Bir sonraki aşamaya kadar -80°C’ de muhafaza edildi.

3.3. mikroRNA-128a, mikroRNA-146a, mikroRNA-155 VE mikroRNA-375 EKSPRESYON SEVİYELERİNİN REAL-TİME POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PZR) İLE BELİRLENMESİ

mikroRNA ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için öncelikle total RNA örneklerinden aşağıdaki üretici firma protokolüne göre eşlenik DNA (cDNA) sentezlendi. RNA örneklerinin miktarı son konsantrasyonu 50 ng olacak şekilde eşitlendi.

Çizelge 3.1. cDNA sentez aşaması-1

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
RNA örneği	değişken	50 ng
5X Poli(A) Polimeraz Reaksiyon Tamponu	2 µl	1X
ATP (10 mM)	1,5 µl	1,5 mM
25 mM MnCl ₂	1 µl	2,5 mM
Poli (A) Polimeraz (1U/µl)	0,5 µl	0,5 U/reak.
RNaz içermeyen H ₂ O	değişken	-
Toplam	10 µl	

Her bir örneğe yukarıdaki miktarlarda (örnek başına 10 µl) solüsyonlar eklendi ve 37°C’ de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler spin edildi ve her bir örnek üzerine 2 µl miRNA oligo adaptör (10 µM) eklendi. Örnekler tekrardan 65°C’de 5 dakika inkübe edildi ve her bir örnek için aşağıdaki karışım hazırlandı.

Çizelge 3.2. cDNA sentez aşaması-2

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
dNTP (10 mM)	1 µl	500 µM
5X Revers Transkriptaz Tamponu	4 µl	1X
Revers Transkriptaz	1 µl	200 U/reak.
RNaz içermeyen H ₂ O	2 µl	-
Toplam	20 µl	-

Her bir örneğe 8' er µl yukarıdaki karışım eklendikten sonra kısa bir karıştırılıp 42 °C' de 15 dakika, ardından 70°C' de 10 dakika inkübe edildi ve cDNA bu reaksiyonlar sonucu elde edilmiş oldu.

Elde edilen cDNA' lardan her bir miRNA (miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-375) ve kontrol geni olarak RNU6' nın ekspresyon seviyelerinin incelenmesi, her miRNA' ya uygun primer olacak şekilde aşağıdaki miktarlarda karışım hazırlandı.

Çizelge 3.3. Real-Time PZR bileşenleri

Bileşen	Hacim (µl)	Son Konsantrasyon
miRNA qPZR MasterMix	10 µl	1X
miRNA Spesifik Primer	0,6 µl	300 nM
Universal miRNA Primer	0,6 µl	300 nM
cDNA	1 µl	≤500 ng/reak.
Nükleaz içermeyen H ₂ O	7,8 µl	-
Toplam	20 µl	-

Hazırlanan karışım platelerin her kuyucuğunda 19 µl olacak şekilde dağıtıldı ve cDNA örnekleri eklendi. Real-Time PZR reaksiyonunun gerçekleşmesi ve ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için aşağıdaki protokol uygulandı. Reaksiyonda istenilen bölgenin çoğalıp çoğalmadığı ve primer dimerlerinin olup olmadığı melting curve aşaması eklenerek kontrol edildi.

Çizelge 3.4. Real-Time PZR çalışma protokolü

Aşama	Sıcaklık	Süre	Siklus Sayısı
Enzim Aktivasyonu	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	40
Primer Bağlanması	63 °C	15 saniye	
Uzama	72 °C	5 saniye	

3.4. KULLANILAN CİHAZLAR

- Buz makinesi
- +4°C Buzdolabı (KW)
- -20°C Derin Dondurucu (Panasonic)
- 80°C Derin Dondurucu (Panasonic)
- Çeker ocak
- Otomatik Mikropipet Seti (1000, 100, 10 µl) (Eppendorf Research Plus)
- PZR cihazı (BioRad C1000)
- Real-time PZR (qRT-PZR) (BioRad CFX96 Touch)
- Spektrofotometre (Nanodrop™ Thermo Fisher Scientific)
- Soğutmasız mikrosantrifüj (Beckman Coulter 16R)
- Mini Spin Santrifüj (Thermo MySpin)
- Vorteks (Daihan Scientific)
- Kuru Isıtıcı Blok (Daihan Scientific)

3.5. KULLANILAN MALZEMELER VE KİMYASALLAR

- Absolüt etil alkol (99.9% ACS ayar) (Sigma Merck)
- Total RNA izolasyon kiti (Lucigen MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit)
- mikroRNA cDNA sentez kiti (miRNA cDNA Synthesis Kit, with Poly(A) Polymerase Tailing, ABMgood)
- miRNA RT-PZR Kiti (BrightGreen miRNA qPZR MasterMix-No Dye, ABMgood)

- miRNA-128a primer (ABMgood)
- miRNA-146a primer (ABMgood)
- miRNA-155 primer (ABMgood)
- miRNA-375 primer (ABMgood)
- Housekeeping miRNA-U6 (ABMgood)
- Nükleaz free su
- Distile su (dH₂O)
- EDTA' lı tüp (10 ml)
- Eldiven (Non-steril)
- Mikropipet ucu (1000, 100, 10µl)
- Parafilm
- Polipropilen kapaklı tüp (0,2 ve 1,5 ml)
- 96'lık well plate ve sealer

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 23 versiyonu kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel değerlendirmede, normalite testleri, student t testi, Mann Whitney U testi kullanıldı. Sonuçlar ortalama ve standart sapma olarak belirtildi.

Tüm testlerde istatistiksel olarak; $p < 0,05$ düzeyi anlamlı, $p < 0,01$ düzeyi çok anlamlı, $p < 0,001$ düzeyi ise ileri düzeyde anlamlı şeklinde kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya, 30-75 yaş arası diyabetik periferik nöropati gelişmeyen tip 2 diyabeti (T2DM) olan 30 hasta, diyabetik periferik nöropatili (DPN) 30 hasta ve 30 sağlıklı kontrol dahil edilmiştir. Kontrol grubuna ise herhangi bir kanser teşhisi olmayan, gebelik bulundurmayan ve 30-75 yaş aralığında olan 30 sağlıklı birey dahil edilmiştir. T2DM hasta grubundaki bireylerden 20' si kadın, 10' u erkek olup yaş ortalamaları $59,5 \pm 3,3$ tı. DPN hasta grubundaki bireylerden 20' si kadın, 10' u erkek olup yaş ortalamaları $56,2 \pm 5,4$ di. Kontrol grubundaki bireylerden 23' ü kadın, 7' si erkek olup yaş ortalamaları $57,8 \pm 4,1$ di. Çalışma gruplarının demografik özellikleri çizelge 4.1' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Çalışma gruplarının özellikleri

Demografik Özellik		T2DM Hasta Grubu (n=30)	DPN Hasta Grubu (n=30)	Kontrol Grubu (n=30)
Yaş (yıl)*		59,5±3,3	56,2±5,4	57,8±4,1
Cinsiyet	Kadın	n=20 (%66,6)	n=23 (%76,6)	n=20 (%66,6)
	Erkek	n=10 (%33,4)	n=7 (%23,4)	n=10 (%33,4)
Sigara	Kullanan	6 (%20)	4 (%13,4)	13 (%43,4)
	Kullanmayan	24 (%80)	26 (%86,6)	17 (%56,6)
Alkol	Kullanan	1 (%3,4)	0 (%0)	0 (%0)
	Kullanmayan	29 (%96,6)	30 (%100)	30 (%100)
İlaç Kullanımı	Var	29 (%96,6)	22 (%73,4)	30 (%100)
	Yok	1 (%3,4)	8 (%26,6)	0 (%0)
Cerrahi Geçmişi	Var	19 (%63,4)	25 (%83,4)	27 (%90)
	Yok	11 (%36,6)	5 (%16,6)	3 (%10)
Bki*		29,5±2,4	29,2±2,3	30,9±1,5
Diyabet Süresi (yıl)*		6,7±4,2	11,7±5,6	0

*Sonn lar ortalama olarak gösterilmiştir.

Kontrol grubu ve hasta gruplarının miRNA göreceli ekspresyon değerleri (Δ ct)  izelge 4.2' de ve göreceli ekspresyon oranları (kat değişimi)  izelge 4.3' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 Hasta gruplarının ve kontrol grubunun miRNA ΔCt değerleri

Grup		Ortalama	Standart Sapma
ΔCt (128a)	T2DM	4,14	5,47
	DPN	5,24	6,34
	Kontrol	4,66	2,85
ΔCt (146a)	T2DM	,04	4,43
	DPN	-,71	8,44
	Kontrol	6,64	5,09
ΔCt (155)	T2DM	5,10	5,63
	DPN	4,42	7,95
	Kontrol	,52	3,83
ΔCt (375)	T2DM	4,59	5,07
	DPN	6,78	4,76
	Kontrol	4,14	4,91

Kontrol ve hasta gruplarındaki miRNA' lara bakılarak ortalama değerler çıkartıldı. Bu verilere göre miRNA-128a T2DM hasta grubunda ΔCt ortalaması $4,14 \pm 5,47$, DPN hasta grubunda ΔCt ortalaması $5,24 \pm 6,34$, kontrol grubu ΔCt ortalaması $4,66 \pm 2,85$ bulundu. miRNA-146a, T2DM hasta grubunda ΔCt ortalaması $0,04 \pm 4,43$, DPN hasta grubunda ΔCt ortalaması $-0,71 \pm 8,44$, kontrol grubu ΔCt ortalaması $0,52 \pm 3,83$ bulundu. miRNA-155, T2DM hasta grubunda ΔCt ortalaması $6,64 \pm 5,09$, DPN hasta grubunda ΔCt ortalaması $4,42 \pm 7,95$, kontrol grubu ΔCt ortalaması $5,10 \pm 5,63$ bulundu. miRNA-375, T2DM hasta grubunda ΔCt ortalaması $4,59 \pm 5,07$, DPN hasta grubunda ΔCt ortalaması $6,78 \pm 4,91$, kontrol grubu ΔCt ortalaması $4,14 \pm 4,91$ bulundu.

Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve hasta gruplarının miRNA ekspresyon seviyeleri (kat değişimi)

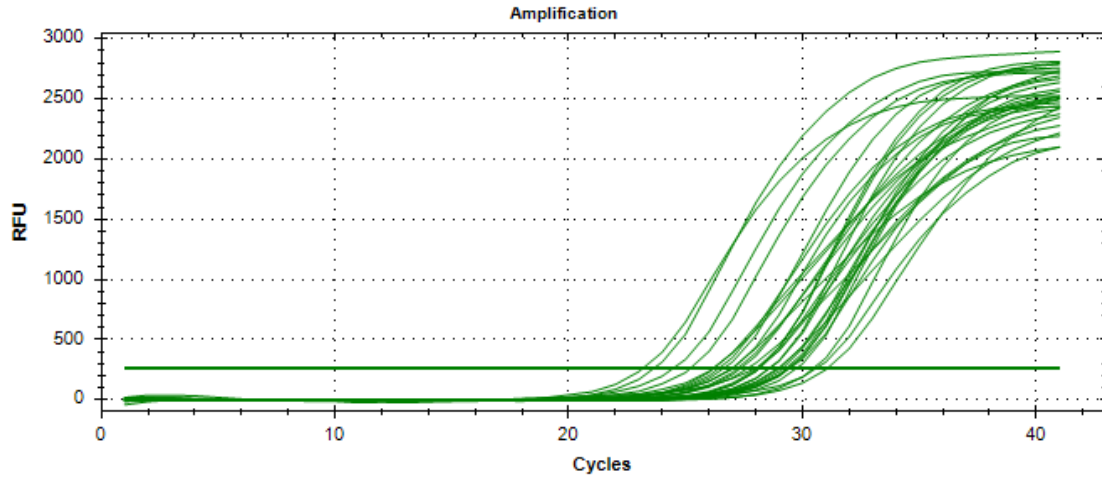
Kat değişimi	DPN-T2DM	T2DM-Kontrol	DPN-Kontrol
miRNA-128a	0,46	1,42	0,66
p değeri	0,47	0,64	0,64
miRNA-146a	1,69	1,39	2,36
p değeri	0,79	0,78	0,63
miRNA-155	4,65	0,34	1,60
p değeri	0,35	0,39	0,86
miRNA-375	0,21	0,73	0,16
p değeri	0,08	0,72	0,03

Katlanma farkları üzerine yapılan istatistiksel değerlendirmede (kat değişimi) kontrol grubu ve hasta gruplarında miRNA ekspresyon seviye farklılıkları saptandı (Çizelge 4.3). Buna göre sadece miRNA-375' in DPN hasta grubunda ekspresyon seviyesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,03$). DPN hasta grubu ve kontrol grubu arasında miRNA-128a, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyon seviyelerinde farklılık gözlenirken bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Kontrol grubu ve T2DM hasta grubu arasında miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel bir anlamlılık saptanmadı ($p>0,05$).

Diyabetik periferik nöropatili ve T2DM hasta grubu arasında miRNA-128a ve miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde de farklılık gözlenirken bu farklılık istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). DPN hasta grubunda T2DM hasta grubuna göre miRNA-146a yaklaşık 2 kat artış ve miRNA-155 yaklaşık 5 kat artış değişiklik gösterirken bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

mikroRNA ekspresyon seviyeleri arasında hasta grupları ile kontrol grubu ve hasta gruplarının kendi arasında da istatistiksel anlam farklılığı bulunmadığı için hedef mRNA ekspresyon seviyeleri incelenmemiştir.



Şekil 3.1. miRNA amplifikasyon eğrileri

5. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet, pankretik beta hücrelerinin insülin sekresyonunun göreceli veya mutlak azalmasından kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize kompleks ve kronik metabolik bir hastalıktır (95). Diyabetik periferik nöropati, diyabetin neden olduğu metabolik bozukluğa bağlı olarak difüz veya fokal periferik somatik veya otonomik sinir hasarına dayanan karmaşık klinik sendrom grubu için sıklıkla kullanılan bir terimdir (126).

Diabetes mellitus için birçok tanısal belirteç tanımlanmasına ve yeni ilaçlar geliştirilmesine rağmen, diyabetli hasta sayısı ve bununla birlikte de diyabetik komplikasyonlar dünya çapında artmaktadır. Mevcut tedavilere yeterince cevap vermeyenler için etkili terapötik maddelere ihtiyaç duyulmaktadır. Son zamanlarda, dolaşımda mikroRNA denilen biyobelirteçler sınıfı keşfedilmiştir (95). Biyobelirteç olmalarının yanı sıra miRNA'ların diyabet tedavisi için kullanılması istenirse buradaki temel yaklaşım, anormal miRNA ekspresyonunu normalleştirmektir (77). Anormal miRNA ekspresyonlarının bilinmesi bunun için önemlidir. Çalışmamızda literatür taraması sonucunda diyabetik periferik nöropati ile ilişkisi olabileceğini düşündüğümüz miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-375'in ekspresyon miktarlarını hasta ve kontrol grupları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirmeyi amaçladık. Çalışmamız sonucunda; kontrol grubu ile T2DM ve DPN hasta grupları arasında miRNA-128a, miRNA-146a ve miRNA-155 ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark bulamadık. Ancak DPN hasta grubu ile kontrol grubu arasında miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel anlamlılık gözlemlendi. Literatüre baktığımızda, miRNA-128a, miRNA-146a ve miRNA-155 ile ilgili çelişkili çalışmaların mevcut olduğunu gördük.

mikroRNA-128a tek nükleotid polimorfizmleri olan diyabetli hastaların, diyabetik periferik nöropati dahil olmak üzere diyabetik mikrovasküler komplikasyonlara karşı duyarlılığı artırdığı bilinirken T2DM ve DPN hastalarındaki ekspresyon seviyeleriyle ilgili bir bilgi belirtilmemiştir (106,107). Asya Hint fenotipinde dolaşımdaki miRNA'ları araştırmak için yapılan bir çalışmada normal glikoz toleransı bulunan kontrol grubuna göre T2DM'li hastalar ile bozulmuş glikoz

toleransı bulunan pre-diyabetik kişilerde miRNA-128 dolaşım ekspresyon seviyelerinin up regüle olduğu gösterilmiş ve miRNA-128 ekspresyon seviyesinin artmasının T2DM ile ilişkili dislipidemi gelişimi ile bağlantılı olabileceğini belirtilmiştir (127). 2020 yılında yapılmış başka bir çalışmada depresyonu olan ve olmayan T2DM'li hastalarda dolaşımdaki miRNA-128 ekspresyon seviyeleri up regüle olarak bulunmuştur (128). Çalışmamızda miRNA-128a ekspresyon seviyelerinde, T2DM hastalarında kontrol grubuna göre yaklaşık 1,5 kat değişiklik gözlenirken, bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). miRNA-128a ekspresyon seviyelerinde, DPN hasta grubu ile kontrol grubu ve DPN hasta grubu ile T2DM hasta grubu arasında da bir farklılık bulunmamıştır.

Birçok çalışma, dolaşımdaki miRNA-146a ekspresyon seviyeleri ile T2DM arasındaki ilişkiyi araştırmış olsa da, T2DM' deki rolleri hala tartışmalıdır. miRNA-146a' nın ekspresyon düzeyleri, T2DM hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde diyabetik olmayan kontrol bireylerine göre daha düşük olmasına rağmen, bazı çalışmalar plazma veya serumda çelişkili sonuçlar göstermiştir (129–131). Alipoor ve arkadaşları 2017 yılında yaptıkları, 12 çalışmanın analiz edildiği bir meta-analizde miRNA-146a' nın down regülasyonunun T2DM duyarlılığı ile ilişkili olabileceği belirtilmişken, 2018 yılında yaptıkları T2DM hastaları ile sağlıklı bireylerin karşılaştırdıkları çalışmada ise miRNA-146a dolaşım düzeylerinin anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (132,133). Başka bir çalışmada, yeni tanı almış T2DM hastalarında normal glikoz toleranslı bireylere kıyasla dolaşımdaki miRNA-146a seviyelerinde anlamlı derecede artış tespit edilmiştir (111). Rong ve ark. yeni teşhis edilen T2DM hastalarında plazma miRNA-146a ekspresyon seviyelerinin artmış olduğunu bildirmiştir (129). Buna karşılık, Baldeón tarafından yapılan bir çalışmada, T2DM hastalarında, obez ve dislipidemik diyabetik olmayan bireylere kıyasla, serum miRNA-146a seviyelerinde anlamlı azalma olduğu görülmüştür (131). miRNA-146a' nın hem tip 1 hem de tip 2 diyabette kalp, böbrekler ve retinalardaki hücre dışı matriks protein transkriptlerinin up regülasyonu ile ilişkili olarak down regüle olduğu gösterilmiştir (134). Ayrıca sağlıklı bireyler ve T2DM hastaları karşılaştırıldığında, erkek hastalar kontrollere göre önemli ölçüde daha düşük miRNA-146a seviyeleri gösterirken, kadınlarda anlamlı farklılık olmadığı gösterilmiştir (135). T2DM komplikasyonları olan veya olmayan hastalar arasında plazma miRNA-146a

seviyelerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir (135). Başka bir çalışmada ise miRNA-146a' nın, enflamatuvar reaksiyonun down regülasyonu yoluyla DPN oluşumunu etkilediği gösterilmiştir (114). Bizim çalışmamızda ise miRNA-146a ekspresyon seviyeleri, T2DM hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 1,5 kat değişiklik gösterirken, DPN hasta grubunda T2DM hasta grubuna göre yaklaşık 2 kat değişiklik göstermiştir. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

mikroRNA-155 enflamatuvar süreçlerde rol oynar ve diyabet ve komplikasyonları sırasında farklı ekspresyon kalıpları gösterir. 2013 yılında yapılan bir çalışmada down regüle olmuş miRNA-155 seviyelerinin, T2DM' nin patogenezinde metabolik kontrol ile ilişkilerinden dolayı önemli bir rolü olduğu belirtilmiştir (130). Fichtlscherer ve ark. stabil koroner arter hastalığı olan hastalarda endotel ve iltihaplanma ile ilişkili olduğu bilinen bazı miRNA'ların sağlıklı gönüllülerle sonuçları karşılaştırarak plazma miRNA' larının ekspresyon seviyelerini araştırmış ve diyabetli hastalarda miRNA-155' in down regüle olduğunu bulmuşlardır (136). Kan miRNA profilini analiz ederken, alkolik diyabetik fare grubunda miRNA-155 seviyelerinin önemli derecede down regüle olduğunu ve kontrol grubuna kıyasla diyabetik deney grubunda anlamlı olmayan bir down regülasyon gözlemlendiği belirtilmiştir (137). Yapılan bu çalışmalar miRNA-155' in ekspresyonundaki azalma ile DM arasında bir ilişkiyi göstermektedir. Ancak DM' de miRNA-155 ekspresyonunun arttığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. 2015 yılında yapılan bir çalışmada T2DM grubundaki pankreatik adacık dokularındaki ve serum örneklerindeki miRNA-155 seviyesinin, kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (138). Huang ve ark , hipergliseminin *in vitro* olarak miRNA-155 ekspresyonunu indüklediğini göstermiştir (115). DPN olan sıçanlarda spinal miRNA-155 ekspresyonu arttığı gösterilmiştir (139). Çalışmamızda miRNA-155 ekspresyon seviyeleri, DPN hasta grubunda kontrol grubuna göre yaklaşık 2 kat değişim gösterirken, T2DM hasta grubuna göre yaklaşık 5 kat değişim göstermiştir. Ancak bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). T2DM hasta grubu ile kontrol grubu arasında miRNA-155 ifade düzeylerinde de anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tip 2 diyabet miRNA ekspresyon profillemesi çalışması olarak yapılan bir meta-analizde miRNA-375' in potansiyel kan biyobelirteç adayı olduğu ve yapılan analizde

miRNA-375 ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre up regüle olduğu belirtilmiştir (9). miRNA-375 pankreas adacıklarında ve β hücrelerinde bol miktarda bulunur. miRNA-375' in aşırı ekspresyonu veya inhibisyonu, insülin sekresyonunu baskılar veya arttırır (120,121). García-Jacobo' nun 2019 yılında yaptığı bir çalışmada glisemik kontrolü zayıf olan T2DM hastalarında miRNA-375' in nispi ekspresyonu artmış, nefropatisi ve diyabetik ayağı olan T2DM hastalarında ise azalmış görülmüştür (140). Başka bir çalışmada yeni tanı almış T2DM hastalarında miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde artış gözlemlenmiştir (102). Bizim çalışmamızda ise T2DM hasta grubu ile kontrol grubu arasında bir farklılık görülmedi ($p>0,05$). Ancak miRNA-375 ifade düzeyleri DPN hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde up regüle bulunmuştur ($p=0,03$). 2019 yılında 30 prediyabet hastası ve 30 T2DM hastasının periferik kanındaki miRNA ekspresyonunu inceleyen bir çalışmada çıkan değerler kontrollerle karşılaştırıldığında, miRNA-375 prediyabet hastalarında daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği ve T2DM hastalarında artışın giderek daha anlamlandırıldığı bulunmuştur (141). Bu çalışmaya bakıldığında DPN hastalarındaki miRNA-375' in ekspresyon düzeyi artışı ile DPN hastalığını diyabetin daha ileri seviyesi olarak düşünebilmemizin mümkün olduğunu göstermektedir.

Bu sonuçlar, bu miRNA' ların diyabetik periferik nöropati ile olan ilişkisini tanımlayacak birden fazla mekanizmanın bulunması ile açıklanabilir. Bu yüzden daha fazla örneklem ile daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Yapılan çalışmalar dolaşımdaki miRNA tespitinde tam kan, plazma veya serumun birbirine üstünlüğünü kanıtlayamamıştır. Çalışma sonuçlarındaki farklılıklar çalışılan örnek türü ve olası interferanslar gözönünde bulundurularak karşılaştırılmalıdır (142,143).

Diyabetik periferik nöropati progresyonu açısından miRNA düzeylerine tekrar bakılması bu miRNA' ların diyabetik periferik nöropatiyle olan ilişkisini daha kapsamlı açıklayabilir. Fakat unutulmamalıdır ki bir miRNA birden çok hastalığın patogenezinde rol oynadığı gibi, bir hastalığın patogenezinde de birden çok miRNA rol oynayabilir (144). Bu açıdan bakıldığında belirli bir hastalığa etkisi netleşmiş olan miRNA' ların birlikte değerlendirilmesi o hastalıkla ilgili daha doğru bir fikir oluşturacaktır. Hastalıklar ya da bir bozuklukla ilişkili miRNA' ların incelenmesi için yapılan çalışmalar, her miRNA' nın kaynak aldığı spesifik hücreler, etkiledikleri yapılar ve metabolik yollar netleştikçe daha faydalı olacaktır. Dolaşımdaki miRNA'

ların kaynakları oldukça karmaşık olduğundan yapılan çalışmalar da daha özelleşirse miRNA faydaları hakkında daha çok bilgi elde edilebilecektir. Ayrıca ileride yapılacak araştırmalarda hastaların mevcut komorbid durumları ve sürekli kullanmak zorunda oldukları ilaçlar da mutlaka göz önünde tutularak hastaların buna uygun olarak değerlendirilmesinin daha doğru olacağını düşünmekteyiz.





6. SONUÇ

Çalışmamızda T2DM, DPN ve sağlıklı kontrol grubundan alınan periferik kanlar kullanılarak miRNA-128a, miRNA-146a, miRNA-155 ve miRNA-375 ekspresyon seviyeleri değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Yapılan Real-Time PZR analizi ile elde edilen sonuçlarda miRNA-128a, miRNA-146a ve miRNA-155 seviyelerinde anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Ancak miRNA-375' in DPN grubu ile kontrol grubu arasındaki ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı.

mikroRNA-128a ekspresyon seviyeleri çalışma grupları arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Fakat litaretür taraması yapıldığında miRNA-128a ekspresyon seviyeleri ile DPN arasında anlamlı bir ilişki de görülmemektedir. Bu miRNA' nın DPN mekanizması ile olası ilişkisinin açıklanabilmesi için de daha çok örneklem ile daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

mikroRNA-146a ekspresyon seviyeleri çalışma grupları arası karşılaştırmalarda DPN grubu ile T2DM grubu arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmasa da yaklaşık 2 kat artış saptandı. T2DM grubu ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlılık bulunmasa da yaklaşık 1,5 kat artış saptandı. miRNA-146a ile ilgili DPN tanı ve tedavisinde biyobelirteç olarak kullanımı ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

mikroRNA-155 ekspresyon seviyeleri çalışma grupları arası karşılaştırmalarda DPN grubu ile kontrol grubu arasında yaklaşık 2 kat istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan artışlar saptandı. DPN grubu ile T2DM grubu arasında yaklaşık 5 kat istatistiksel olarak anlamlı bulunmayan artışlar saptandı. miRNA-155 ile ilgili DPN tanısında yararlılığı ile ilgili daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

mikroRNA-375 ekspresyon seviyeleri T2DM grubu ile kontrol grubu arası ve DPN grubu ile kontrol grubu arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ancak deneylerimiz sonucunda miRNA-375 ekspresyon seviyelerinde DPN grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Bulgularımız, miRNA-375' in DPN ile ilişkili miRNA' lardan olduğunu desteklemektedir. miRNA-375 DPN tanısı açısından yararlı olabilir, ancak daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.



KAYNAKLAR

1. ADA. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Am Diabetes care*. 2015;27(1):5–10.
2. Türkiye Diyabet Vakfı. Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi 2019. 9th ed. Balcı MK, editor. Türkiye; 2019.
3. Schreiber AK. Diabetic neuropathic pain: Physiopathology and treatment. *World J Diabetes*. 2015;6(3):432–44.
4. DP B. MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004;116(2):281–97.
5. Hammond SM. An overview of microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015;87:3–14.
6. Xourgia E, Papazafiropoulou A, Melidonis A. Circulating microRNAs as biomarkers for diabetic neuropathy: A novel approach. *World J Exp Med*. 2018;8(3):18–23.
7. Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, et al. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. In: *Diabetes Care*. 2010.
8. Singh R, Kishore L, Kaur N. Diabetic peripheral neuropathy: Current perspective and future directions. *Pharmacol Res*. 2014;80:21–35.
9. Zhu H, Leung SW. Identification of microRNA biomarkers in type 2 diabetes: a meta-analysis of controlled profiling studies. *Diabetologia*. 2015;58(5):900–11.
10. Zenker J, Ziegler D, Chrast R. Novel pathogenic pathways in diabetic neuropathy. *Trends Neurosci*. 2013;36(8):439–49.
11. Petersmann A, Nauck M, Müller-Wieland D, Kerner W, Müller UA, Landgraf R, et al. Definition, classification and diagnostics of diabetes mellitus. *J Lab Med*. 2018;126(7):406–10.
12. Bennett PH, Knowler WC. Definition, diagnosis, and classification of diabetes mellitus and glucose homeostasis. *Joslin's Diabetes Mellitus: Fourteenth Edition*. 2011.
13. the American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2003;1:4–19.
14. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. TEMD Diabetes Mellitus ve komplikasyonlarının tanı, tedavi ve izlem kılavuzu. 10th ed. Türkiye: Bayt Bilimsel Araştırmalar Basın Yayın ve Tanıtım Ltd. Şti.; 2018. 21 p.
15. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review. *J Biochem Mol Toxicol*. 2003;17(1):24–38.
16. J. Larry Jameson, Anthony S. Fauci, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2018.
17. Federation ID. IDF Diabetes Atlas Eighth edition 2017. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 8th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2017. <http://www.diabetesatlas.org>. 2017.
18. Satman I, Omer B, Tutuncu Y, Kalaca S, Gedik S, Dinccag N, et al. Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *Eur J Epidemiol*. 2013;28(2):169–80.
19. the American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*. 2014;37:81–90.
20. Baynest HW. Classification, Pathophysiology, Diagnosis and Management of Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab*. 2015;6(5).
21. Craig Prof. ME, Jefferies C, Dabelea D, Balde N, Seth A, Donaghue KC. Definition, epidemiology, and classification of diabetes in children and adolescents. *Pediatr Diabetes*. 2014;10(12):3–12.
22. 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetesd-2019. *Diabetes Care*. 2019;42(1):13–28.
23. Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2).
24. DeFronzo RA. From the triumvirate to the ominous octet: A new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. In: *Diabetes. USA*; 2009. p. 773–95.
25. Ferrannini E, Mari A. β -Cell function in type 2 diabetes. *Metabolism*. 2014;63(10):1217–27.

26. Türk Diyabet Vakfı. İnsülin Direnci Çalıştayı sonuç raporu 2017. Türkiye; 2017.
27. SAVAŞ HB, GÜLTEKİN F. İnsülin Direnci ve Klinik Önemi. *SDÜ Tıp Fakültesi Derg.* 2017;
28. Stumvoll M, Goldstein BJ, Van Haeften TW. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet.* 2005;365(9467):1333–46.
29. Kashyap S, Belfort R, Gastaldelli A, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, et al. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. *Diabetes.* 2003;52(10):2461–74.
30. Robertson RP, Harmon J, Tran POT, Poitout V. β -Cell Glucose Toxicity, Lipotoxicity, and Chronic Oxidative Stress in Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2004;53(1):119–24.
31. Standards of medical care in diabetes-2014. *Diabetes Care.* 2014;37(1):14–80.
32. DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, Henry RR, Herman WH, Holst JJ, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Prim.* 2015;1:1019.
33. Forouzanfar MH, Alexander L, Bachman VF, Biryukov S, Brauer M, Casey D, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2015;386(10010):2287–323.
34. Vazquez G, Duval S, Jacobs DR, Silventoinen K. Comparison of body mass index, waist circumference, and waist/hip ratio in predicting incident diabetes: A meta-analysis. *Epidemiol Rev.* 2007;29:115–28.
35. Frayn KN, Williams CM, Arner P. Are increased plasma non-esterified fatty acid concentrations a risk marker for coronary heart disease and other chronic diseases? *Clin Sci.* 1996;90(4):243–53.
36. Ley SH, Hamdy O, Mohan V, Hu FB. Prevention and management of type 2 diabetes: Dietary components and nutritional strategies. *Lancet.* 2014;383(9933):1999–2007.
37. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. *FAO Food Nutr Pap.* 2010;91:1–166.
38. Amine EK, Baba NH, Belhadj M, Deurenberg-Yap M, Djazayeri A, Forrestre T, et al. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. World Health Organization - Technical Report Series. Geneva; 2003.
39. Imamura F, O'Connor L, Ye Z, Mursu J, Hayashino Y, Bhupathiraju SN, et al. Consumption of sugar sweetened beverages, artificially sweetened beverages, and fruit juice and incidence of type 2 diabetes: Systematic review, meta-analysis, and estimation of population attributable fraction. *Br J Sports Med.* 2016;351(8):3576.
40. Consumption of sweet beverages and type 2 diabetes incidence in European adults: Results from EPIC-InterAct. *Diabetologia.* 2013;56(7):1520–30.
41. Malik VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: A meta-analysis. *Diabetes Care.* 2010;33(11):2477–83.
42. Willi C, Bodenmann P, Ghali WA, Faris PD, Cornuz J. Active smoking and the risk of type 2 diabetes. *J Am Med Assoc.* 2007;298(22):2654–64.
43. Manson JAE, Ajani UA, Liu S, Nathan DM, Hennekens CH. A prospective study of cigarette smoking and the incidence of diabetes mellitus among US male physicians. *Am J Med.* 2000;109(7):538–42.
44. Nagaya T, Yoshida H, Takahashi H, Kawai M. Heavy Smoking Raises Risk for Type 2 Diabetes Mellitus in Obese Men; But, Light Smoking Reduces the Risk in Lean Men: A Follow-up Study in Japan. *Ann Epidemiol.* 2008;18(2):113–8.
45. Yeh HC, Duncan BB, Schmidt MI, Wang NY, Brancati FL. Smoking, smoking cessation, and risk for type 2 diabetes mellitus: A cohort study. *Ann Intern Med.* 2010;152(1):10–7.
46. Fretts AM, Howard B V., Kriska AM, Smith NL, Lumley T, Lee ET, et al. Physical activity and incident diabetes in American Indians. *Am J Epidemiol.* 2009;170(5):632–9.
47. Gimeno D, Elovainio M, Jokela M, De Vogli R, Marmot MG, Kivimäki M. Association between passive jobs and low levels of leisure-time physical activity: The Whitehall II cohort study. *Occup Environ Med.* 2009;66(11):772–6.
48. Jeon CY, Lokken RP, Hu FB, Van Dam RM. Physical activity of moderate intensity and risk of type 2 diabetes: A systematic review. *Diabetes Care.* 2007;30(3):744–52.
49. Bener A, Zirie M, Al-Rikabi A. Genetics, obesity, and environmental risk factors associated with type 2 diabetes. *Croat Med J.* 2005;46(2):302–7.

50. Yaturu S, Bridges JF, Dhanireddy RR. Preliminary evidence of genetic anticipation in type 2 diabetes mellitus. *Med Sci Monit*. 2005;11(6):262–5.
51. Rich SS, Norris JM, Rotter JI. Genes associated with risk of type 2 diabetes identified by a candidate-wide association scan; As a trickle becomes a flood. *Diabetes*. 2008;57(11):2915–7.
52. Fowler MJ. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clin Diabetes*. 2011;26(2):77–82.
53. Lu FP, Lin KP, Kuo HK. Diabetes and the risk of multi-system aging phenotypes: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2009;4(1):e4144.
54. Wong E, Backholer K, Gearon E, Harding J, Freak-Poli R, Stevenson C, et al. Diabetes and risk of physical disability in adults: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2013;1(2):106–14.
55. Jeon CY, Murray MB. Diabetes mellitus increases the risk of active tuberculosis: A systematic review of 13 observational studies. *PLoS Med*. 2008;5(7):e154.
56. Roy T, Lloyd CE. Epidemiology of depression and diabetes: A systematic review. *J Affect Disord*. 2012;142:8–21.
57. Mcphee SJ, Papadakis MA. *Current Medical Diagnosis & Treatment 2012*. Current Medical Diagnosis & Treatment 2012. 2012.
58. Fuentes-Antras J, Picatoste B, Gomez-Hernandez A, Egido J, Tunon J, Lorenzo O. Updating experimental models of diabetic cardiomyopathy. *J Diabetes Res*. 2015;2015:656795.
59. Boucek P. Advanced Diabetic Neuropathy: A Point of no Return? *Rev Diabet Stud*. 2006;3(3):143–50.
60. Said G, Goulon-Goeau C, Slama G, Tchobroutsky G. Severe early-onset polyneuropathy in insulin-dependent diabetes mellitus: A clinical and pathological study. *N Engl J Med*. 1992;326(19):1257–63.
61. Yagihashi S, Yamagishi SI, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(1):184–9.
62. Pop-Busui R, Boulton AJM, Feldman EL, Bril V, Freeman R, Malik RA, et al. Diabetic neuropathy: A position statement by the American diabetes association. *Diabetes Care*. 2017;40(1):136–54.
63. Petropoulos IN, Ponirakis G, Khan A, Almuhammad H, Gad H, Malik RA. Diagnosing diabetic neuropathy: Something old, something new. *Diabetes Metab J*. 2018;42(4):255–69.
64. Bongaerts BWC, Rathmann W, Heier M, Kowall B, Herder C, STöCKL D, et al. Older subjects with diabetes and prediabetes are frequently unaware of having distal sensorimotor polyneuropathy: The KORA F4 study. *Diabetes Care*. 2013;36(5).
65. Wassay SAM, Dar FJ, Saleh AK, Mansoor I. Role of therapeutic plasma exchange in the treatment of severe hypertriglyceridemia: an experience. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2017;8(12):169–72.
66. Aguilar F, Teran Soto JM, la Pen JE de. The Pathogenesis of the Diabetic Foot Ulcer: Prevention and Management. In: *Global Perspective on Diabetic Foot Ulcerations*. 1st ed. Mexico; 2011. p. 158.
67. Callaghan BC, Cheng HT, Stables CL, Smith AL, Feldman EL. Diabetic neuropathy: Clinical manifestations and current treatments. *The Lancet Neurology*. 2012.
68. Javed S, Petropoulos IN, Alam U, Malik RA. Treatment of painful diabetic neuropathy. *Therapeutic Advances in Chronic Disease*. 2015.
69. Hosseini A, Abdollahi M. Diabetic neuropathy and oxidative stress: Therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:168039.
70. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):456–80.
71. Yan L. Redox imbalance stress in diabetes mellitus: Role of the polyol pathway. *Anim Model Exp Med*. 2018;1(1):7–13.
72. Liu J, M. Albrecht A, Ni X, Yang J, Li M. Glioblastoma Tumor Initiating Cells: Therapeutic Strategies Targeting Apoptosis and MicroRNA Pathways. *Curr Mol Med*. 2013;13(3).
73. Alles J, Fehlmann T, Fischer U, Backes C, Galata V, Minet M, et al. An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2019;47(7):3353–64.
74. Sekar D, Venugopal B, Sekar P, Ramalingam K. Role of microRNA 21 in diabetes and associated/related diseases. *Gene*. 2016;582(1):14–8.
75. Thum T, Condorelli G. Long noncoding RNAs and microRNAs in cardiovascular

- pathophysiology. *Circ Res*. 2015;116(4):751–62.
76. Wang Y, Russell I, Chen C. MicroRNA and stem cell regulation. *Curr Opin Mol Ther*. 2009;11(3):292–8.
 77. Hashimoto N, Tanaka T. Role of miRNAs in the pathogenesis and susceptibility of diabetes mellitus. *J Hum Genet*. 2017;62(2):141–50.
 78. Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs - Micro in size but macro in function. *FEBS J*. 2008;275(20):4929–44.
 79. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*. 2004;14(10A):1902–10.
 80. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011;12(2):99–110.
 81. Khan S, Ayub H, Khan T, Wahid F. MicroRNA biogenesis, gene silencing mechanisms and role in breast, ovarian and prostate cancer. *Biochimie*. 2019;167:12–24.
 82. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75(5):855–62.
 83. Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004;18(24):3016–27.
 84. Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*. 2008;15(4):354–63.
 85. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*. 2002;16(6):720–8.
 86. Hauptmann J, Meister G. Argonaute regulation: Two roads to the same destination. *Dev Cell*. 2013;25(6):553–4.
 87. Çınar İ, Dursun HG. miRNA Biyogenezi ve Kanseri Patogenezindeki Fonksiyonu. *Sak Tıp Derg*. 2016;
 88. HİTİT M, KURAR E, GÜZELOĞLU A. MikroRNA Biyogenezi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bilim Derg*. 2015;10(3).
 89. Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJC. The long and short of microRNA. *Cell*. 2013;153(3):516–9.
 90. Beermann J, Piccoli MT, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in development and disease: Background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev*. 2016;96(4):1297–325.
 91. Vrijens K, Bollati V, Nawrot TS. MicroRNAs as potential signatures of environmental exposure or effect: A systematic review. *Environmental Health Perspectives*. 2015.
 92. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*. 2008;18(10):997–1006.
 93. Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SLT, Wong MTK, et al. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(12).
 94. He Y, Ding Y, Liang B, Lin J, Kim TK, Yu H, et al. A systematic study of dysregulated MicroRNA in type 2 diabetes mellitus. *Int J Mol Sci*. 2017;18(3):456.
 95. Sebastiani G, Nigi L, Grieco GE, Mancarella F, Ventriglia G, Dotta F. Circulating microRNAs and diabetes mellitus: a novel tool for disease prediction, diagnosis, and staging? *J Endocrinol Invest*. 2017;40(6).
 96. Banerjee J, Nema V, Dhas Y, Mishra N. Role of MicroRNAs in Type 2 Diabetes and Associated Vascular Complications. *Biochimie*. 2017;139:9–19.
 97. McClelland AD, Kantharidis P. MicroRNA in the development of diabetic complications. *Clin Sci*. 2014;126(2):95–110.
 98. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010;107(6):810–7.
 99. Ortega FJ, Mercader JM, Moreno-Navarrete JM, Rovira O, Guerra E, Esteve E, et al. Profiling of circulating microRNAs reveals common microRNAs linked to type 2 diabetes that change with insulin sensitization. *Diabetes Care*. 2014;37(5):1375–83.
 100. Seyhan AA, Nunez Lopez YO, Xie H, Yi F, Mathews C, Pasarica M, et al. Pancreas-enriched miRNAs are altered in the circulation of subjects with diabetes: A pilot cross-sectional study. *Sci Rep*. 2016;6:31479.

101. Ventriglia G, Nigi L, Sebastiani G, Dotta F. MicroRNAs: Novel players in the dialogue between pancreatic islets and immune system in autoimmune diabetes. *Biomed Res Int*. 2015;61:1–11.
102. L. K, J. Z, W. H, X. J, M. X, Y. Z, et al. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetol*. 2011;48(1):61–9.
103. Balasubramanyam M, Aravind S, Gokulakrishnan K, Prabu P, Sathishkumar C, Ranjani H, et al. Impaired miR-146a expression links subclinical inflammation and insulin resistance in Type 2 diabetes. *Mol Cell Biochem*. 2011;351(1–2):197–205.
104. Chen J, Li C, Liu W, Yan B, Hu X, Yang F. miRNA-155 silencing reduces sciatic nerve injury in diabetic peripheral neuropathy. *J Mol Endocrinol*. 2019;63(3):227–38.
105. Kovacs B, Lumayag S, Cowan C, Xu S. microRNAs in early diabetic retinopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(7):4402–9.
106. Kaidonis G, Gillies MC, Abhary S, Liu E, Essex RW, Chang JH, et al. A single-nucleotide polymorphism in the MicroRNA-146a gene is associated with diabetic nephropathy and sight-threatening diabetic retinopathy in Caucasian patients. *Acta Diabetol*. 2016;53(4):643–50.
107. Ciccacci C, Morganti R, Di Fusco D, D'Amato C, Cacciotti L, Greco C, et al. Common polymorphisms in MIR146a, MIR128a and MIR27a genes contribute to neuropathy susceptibility in type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2014;51(4):663–71.
108. Chakraborty C, Doss CGP, Bandyopadhyay S, Agoramoorthy G. Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: Micro-molecules with a major role in type-2 diabetes. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;
109. Li L, Chen XP, Li YJ. MicroRNA-146a and human disease. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2010.
110. Olivieri F, Rippo MR, Procopio AD, Fazioli F. Circulating inflamma-miRs in aging and age-related diseases. *Frontiers in Genetics*. 2013.
111. Kong X, Ma M zhe, Huang K, Qin L, Zhang H mei, Yang Z, et al. Increased plasma levels of the methylglyoxal in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *J Diabetes*. 2014;6(6):535–40.
112. Xu J, Wu W, Zhang L, Dorset-Martin W, Morris MW, Mitchell ME, et al. The role of MicroRNA-146a in the pathogenesis of the diabetic wound-healing impairment: Correction with mesenchymal stem cell treatment. *Diabetes*. 2012;
113. Expression and clinical significance of microRNA 146a in peripheral blood mononuclear cells from type 2 diabetic neuropathy patients. *Int J Clin Exp Med*. 2018;11(7):7165–73.
114. Feng Y, Chen L, Luo Q, Wu M, Chen Y, Shi X. Involvement of microRNA-146a in diabetic peripheral neuropathy through the regulation of inflammation. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:171–7.
115. Huang Y, Liu Y, Li L, Su B, Yang L, Fan W, et al. Involvement of inflammation-related miR-155 and miR-146a in diabetic nephropathy: Implications for glomerular endothelial injury. *BMC Nephrol*. 2014;15:142.
116. Lee M-W, Lee M, Oh K-J. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. *J Clin Med*. 2019;8(6).
117. Zhang B han, Shen C an, Zhu B wei, An H ying, Zheng B, Xu S bo, et al. Insight into miRNAs related with glucometabolic disorder. *Biomed Pharmacother*. 2019;(111):657–65.
118. Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, Dong Y, Birmingham A, Seo JB, et al. Adipose Tissue Macrophage-Derived Exosomal miRNAs Can Modulate in Vivo and in Vitro Insulin Sensitivity. *Cell*. 2017;171(2):372–84.
119. Eliasson L. The small RNA miR-375 – a pancreatic islet abundant miRNA with multiple roles in endocrine beta cell function. *Mol Cell Endocrinol*. 2017;465:95–101.
120. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226–30.
121. Yan JW, Lin JS, He XX. The emerging role of miR-375 in cancer. *Int J Cancer*. 2014;135(5):1011–8.
122. Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RHA. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol*. 2007;5(8):e203.
123. Lahmy R, Soleimani M, Sanati MH, Behmanesh M, Kouhkan F, Mobarra N. MiRNA-375 promotes beta pancreatic differentiation in human induced pluripotent stem (hiPS) cells. *Mol Biol Rep*. 2014;41(4):2055–66.

124. Kim N, Kim H, Jung I, Kim Y, Kim D, Han YM. Expression Profiles of miRNAs in Human Embryonic Stem Cells During Hepatocyte Differentiation. *Hepatol Res.* 2011;41(2):170–83.
125. Ouaamari A El, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, Van Obberghen E. MiR-375 targets 3'-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1 and regulates Glucose-Induced biological responses in pancreatic β -Cells. *Diabetes.* 2008;57(10):2708–17.
126. Mojto V, Chládeková A, Komlósi M, Timárová G. Diabetic neuropathy. *Lek Obz.* 2019;1:1–10.
127. Prabu P, Rome S, Sathishkumar C, Aravind S, Mahalingam B, Shanthirani CS, et al. Circulating miRNAs of “Asian Indian phenotype” identified in subjects with impaired glucose tolerance and patients with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2015;
128. Prabu P, Poongothai S, Shanthirani CS, Anjana RM, Mohan V, Balasubramanyam M. Altered circulatory levels of miR-128, BDNF, cortisol and shortened telomeres in patients with type 2 diabetes and depression. *Acta Diabetol.* 2020;
129. Rong Y, Bao W, Shan Z, Liu J, Yu X, Xia S, et al. Increased microRNA-146a levels in plasma of patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *PLoS One.* 2013;
130. Corral-Fernández NE, Salgado-Bustamante M, Martínez-Leija ME, Cortez-Espinosa N, García-Hernández MH, Reynaga-Hernández E, et al. Dysregulated miR-155 expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2013;121(6):347–53.
131. Baldeón LR, Weigelt K, De Wit H, Ozcan B, Van Oudenaren A, Sempértegui F, et al. Decreased serum level of miR-146a as sign of chronic inflammation in type 2 diabetic patients. *PLoS One.* 2014;9(12):e115209.
132. Alipoor B, Ghaedi H, Meshkani R, Torkamandi S, Saffari S, Iranpour M, et al. Association of MiR-146a expression and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. *Int J Mol Cell Med.* 2017;6(3):156–63.
133. Alipoor B, Ghaedi H, Meshkani R, Omrani MD, Sharifi Z, Golmohammadi T. The rs2910164 variant is associated with reduced miR-146a expression but not cytokine levels in patients with type 2 diabetes. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(5):557–66.
134. Feng B, Chen S, Gordon AD, Chakrabarti S. miR-146a mediates inflammatory changes and fibrosis in the heart in diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;
135. Mensà E, Giuliani A, Matakchione G, Guráu F, Bonfigli AR, Romagnoli F, et al. Circulating miR-146a in healthy aging and type 2 diabetes: Age- and gender-specific trajectories. *Mech Ageing Dev.* 2019;
136. Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res.* 2010;
137. Gonçalves FZ, Lizarte Neto FS, Novais PC, Gattas D, Lourenço LG, de Carvalho CAM, et al. Expression profile of endothelin receptors (ETA and ETB) and microRNAs-155 and -199 in the corpus cavernosum of rats submitted to chronic alcoholism and diabetes mellitus. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol.* 2018;
138. Song C, Ji Y, Zou G, Wan C. Tetrandrine down-regulates expression of miRNA-155 to inhibit signal-induced NF- κ B activation in a rat model of diabetes mellitus. *Int J Clin Exp Med.* 2015;
139. El-Lithy GM, El-Bakly WM, Matboli M, Abd-Alkhalek HA, Masoud SI, Hamza M. Prophylactic L-arginine and ibuprofen delay the development of tactile allodynia and suppress spinal miR-155 in a rat model of diabetic neuropathy. *Transl Res.* 2016;
140. García-Jacobo RE, Uresti-Rivera EE, Portales-Pérez DP, González-Amaro R, Lara-Ramírez EE, Enciso-Moreno JA, et al. Circulating miR-146a, miR-34a and miR-375 in type 2 diabetes patients, pre-diabetic and normal-glycaemic individuals in relation to β -cell function, insulin resistance and metabolic parameters. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2019;46(12):1092–100.
141. Haifa Abdullah Al-Muhtareh GA-K. Evaluation of Two-Diabetes Related microRNAs Suitability as Earlier Blood Biomarkers for Detecting Prediabetes and type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Med.* 2018;7(2).
142. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, et al. Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS One.* 2013;8(6):e64795.
143. Cheng L, Sharples RA, Scicluna BJ, Hill AF. Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *J Extracell Vesicles.* 2014;3(1):23743.

144. Kappel A, Keller A. MiRNA assays in the clinical laboratory: Workflow, detection technologies and automation aspects. Clin Chem Lab Med. 2017;55(5):636–47.



EKLER

EK 1 HASTA DEMOGRAFİK BİLGİ FORMU

HASTA DEMOGRAFİK BİLGİ FORMU

ADI-SOYADI :

CİNSİYETİ : KADIN ☐ ERKEK ☐

DOĞUM TARİHİ :

BKİ(Kg/m²) :

BOY :

KİLO :

T2DM TANISI ALDIĞI TARİH :

DPN TANISI ALDIĞI TARİH :

SİGARA : KULLANIYOR ☐ KULLANMIYOR ☐

ALKOL : KULLANIYOR ☐ KULLANMIYOR ☐

MEDİKAL TEDAVİ ALIYOR MUSUNUZ? EVET ☐ HAYIR ☐

Evet ise;

DAHA ÖNCE OPERASYON GEÇİRDİNİZ Mİ? EVET ☐ HAYIR ☐

Evet ise;

GENETİK BAŞKA BİR HASTALIĞINIZ VAR MI? EVET ☐ HAYIR ☐

Evet ise;

EK 2 ETİK KURUL ONAYI

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	"Tip 2 Diyabet ve Diyabetik Nöropati Hastalarının mikroRNA ve mRNA Ekspresyon Seviyelerinin Karşılaştırılması"
VARSA, ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	09/10/18		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DEĞERLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLUR RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	SİGORTA	☐		
	ARAŞTIRMA RUTİNESİ	☐		
	RİVAYETLİK MATERYAL TRANSFER FORMU	☐		
	ELAN	☐		
	YERLİLE HÜDÜDÜ	☐		
	SONUÇ RAPORU	☐		
	ÖZÜMLÜLÜK BELGİLERİ	☐		
	Diğer:	☐		
KARAR BELGELERİ	Karar No:148	Tarih: 05/09/2018		
	Yukarıda belirtilen belgelerin bapına dayalı olarak ilgili belgelerin araştırmanın yapılmasını gerektiren, ahlak, yalıtım ve yetersizlik riskleri önlemek amacıyla ve uygun bulurken olup araştırmanın yapılmasını bapına dayalı olarak belirlenen standartlarda gerçekleştirileceğini bilgileri kararlaştırılmış olup bu kararın etki ve etkileri önlenmesi için gerekli olan önlemlerin alınması için karar verilmiştir. İlgili ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte Olan Yönetmelik kapsamında yer alan araştırma/teşhis için Türkiye İlgili ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.			

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yürürlükte Olan Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
BASKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	PROF. DR. SAİT NADERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Unvanlı Adı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilgili	Karar *	İmza
PROF. DR. SAİT NADERİ	DEYİN ÜNİVERSİTESİ	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
PROF. DR. NURİYE BAKAN	AMERİKAN ÜNİVERSİTESİ	SANCAKTEPE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
DOÇ. DR. BETÜL OKUYAN	FARMASİYER	MARMARA ÜNİVERSİTESİ FARMASİYERİ	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	
ÖZGE. DR. PINAR FİDAN	BEYKENT ÜNİVERSİTESİ	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
AYRINTI ÜNİVERSİTESİ	AYRINTI	AYRINTI HÜKME HASTAHANASI	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
HÜSREV KURBAN	YATIRIMCI	İST	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
DOÇ. DR. A. NURİYE ÖZAYDIN	HALK SAĞLIĞI	MARMARA ÜNİVERSİTESİ	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
UDM. DR. AYDIN ÖZAYDIN	BEYKENT ÜNİVERSİTESİ	BEYKENT ÜNİVERSİTESİ	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
PROF. DR. BİLAL BASAT	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
PROF. DR. BİLAL BASAT	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
DOÇ. DR. A. BİLAL BASAT	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	ÖMRANİYE EĞİTİM HASTAHANASI	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

Etik Kurul Başkanı

Unvanı/Adı/Soyadı: PROF. DR. SAİT NADERİ

İmza:



Not: Etik Kurul Başkanı, imzalaması için atandığı her sayfaya imza atmalıdır.

ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Aleyna TOPALOĞLU

Doğum yeri ve tarihi: Yenimahalle – 22.08.1994

Uyruğu: T.C

İletişim adresi ve telefonu: aleyna1154@gmail.com / 0507 278 39 77

Yabancı dili: İngilizce

Eğitim Durumu

Yüksek lisans: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya

Lisans: Marmara Üniversitesi, Fizyoterapi ve Rehabilitasyon

Lise: Dr.Binnaz Ege-Dr.Rıdvan Ege Anadolu Lisesi

İlköğretim: Milli Eğitim Vakfı Batıkent İlköğretim Okulu

Yayınları

Projeleri

Katıldığı Seminerler