



**DIYABETİK AYAKLI HASTALARDA SERUM  
TRİMETİLAMİN N-OKSİT ve FLAVİN İÇEREN  
MONOOKSİDAZ (FMO3) SEVİYELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet Emin ÖZHAN**  
**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ**

**Doktora Tezi-2023**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYABETİK AYAKLI HASTALARDA SERUM  
TRİMETİLAMİN N-OKSİT ve FLAVİN İÇEREN  
MONOOKSİDAZ (FMO3) SEVİYELERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Mehmet Emin ÖZHAN**

**Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ**

**ERZURUM  
2023**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>III</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>VI</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. Diyabetes Mellitus .....	3
2.2. İnsülin Bağımlı Diyabetes Mellitus (Tip 1 DM) .....	4
2.2.1. İnsülin Bağımsız Diyabetes Mellitus (Tip 2 DM) .....	4
2.2.2. Tip 1 DM’ de Tedavi Amaçları .....	6
2.2.3. Tip 2 DM’ de Tedavi Amaçları .....	6
2.2.4. Diyabetin Komplikasyonları.....	7
2.2.5. Diyabetik Ketoasidoz.....	7
2.2.6. Hiperglisemik Dehidratasyon Sendromu.....	7
2.2.8. Kronik Komplikasyonları .....	8
2.2.8.1. Nefropati .....	8
2.2.8.2. Retinopati.....	9
2.2.8.3. Nöropati .....	9
2.2.8.5. Periferik Nöropatide .....	11
2.3. Glikolize Hemoglobin -HbA1c.....	14
2.4. Flavin İçeren Monooksidaz (FMO3) .....	16

2.5. Mikrobiyota .....	22
2.6. Trimetil Amin-n-Oksit (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> NO ( TMAO) .....	25
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>30</b>
3.1. İstatistiksel Analiz.....	31
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>33</b>
4.1. Sonuçlar .....	35
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>42</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>51</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>67</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>67</b>
<b>EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU.....</b>	<b>68</b>
<b>EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>69</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, yönlendiren tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, her türlü kolaylığı sağlayan hocam Sayın Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

LC MS/MS ve ELİSA çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Fikret AKYÜREK'e, her soruma içtenlikle cevap veren Doç. Dr. Zafer BAYRAKTUTAN'a, numune toplanmasında büyük desteği olan Doç. Dr. Handan Alay ve Dr. Öğr. Üyesi Muhammet ÇELİK'e,

Tıbbi Biyokimyayı sevdiren hocam Sayın Prof. Dr. Ebubekir BAKAN'a,

Değerli hocalarım Prof. Dr. Ahmet KIZILTUNÇ'a, Prof. Dr. Nuri BAKAN'a, Prof. Dr. Fatma Zühal UMUDUM'a, Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK'e,

Değerli ağabeylerim Muhammet ÖRNEK'e, M. Akif ve Özgür'e

Beni ısrarla motive eden Cengiz SARIGÜL'e teşekkürü borç bilirim.

Ve bana sabır gösteren Numan, Hafsa ve Şükran'a...

**Mehmet Emin ÖZHAN**

## ÖZET

### Diyabetik Ayaklı Hastalarda Serum Trimetilamin n-Oksit (TMAO) ve Flavın İçeren Monooksidaz (FMO3) Seviyelerinin Araştırılması

**Amaç:** Değişen beslenme alışkanlıklarının ve mikrobiyotanın, obezite ve diyabet gelişimindeki rolü artmaktadır. DM önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. DM'nin kronik komplikasyonlarından diyabetik ayak beklenen yaşam süresini kısaltmakta ve sosyal güvenlik sistemlerine büyük maddi yükler getirmektedir. Çalışmamız mikrobiyota FMO3 ve TMAO ekseninde varsa; diyabet ve diyabetik ayak ilişkisini açıklamayı amaçlamaktadır.

**Materyal ve Metot:** Bu çalışma, hepsi 50 yaş üstü diyabetik ayak tanısı olan 30 diyabetik ayak hastası (Diyabetik Ayak Servisinden), DM tanısı olup diyabetik ayak gelişmeyen 30 DM hastası ve bilinen hiçbir kronik hastalığı olmayan 30 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu ile gerçekleştirilmiştir. Hastaneye çeşitli nedenlerle başvuran kişilerin testlerinden artan serum ve plazmaları küçük porsiyonlara bölünerek çalışma gününe kadar -80°C de muhafaza edildi ve FMO3 ELISA yöntemi ile, TMAO ise LC MS/MS yöntemiyle çalışıldı.

**Bulgular:** DM' li ve diyabetik ayaklı gruplarda TMAO mean değerleri daha yüksekti ama istatistiksel olarak anlamlı değildi. FMO3 diyabetik ayaklı grupta daha düşük ve istatistiksel olarak anlamlı çıktı.

**Sonuç:** Çalışmamızda TMAO ile DM ve diyabetik ayak arasında ilişki tespit edilemedi. FMO3 düşüklüğü ile diyabetik ayak komplikasyonu arasında ilişki tespit edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Diyabetik ayak, diabetes mellitus, FMO3, HbA1c, mikrobiyota, TMAO

## ABSTRACT

### **Investigation of Serum Trimethylamine n-Oxide (TMAO) and Flavin-Containing Monooxidase (FMO3) Levels in Diabetic Foot Patients**

**Aim:** The role of changing eating habits and microbiota in the development of obesity and diabetes is increasing. DM has become an important public health problem. Diabetic foot ulcer one of the chronic complications of DM, shortens life expectancy and imposes great financial burdens on social security systems. If our study is based on microbiota FMO3 and TMAO axis; aims to explain the relationship between diabetes and diabetic foot ulcer.

**Material and method:** This study was carried out with a control group consisting of 30 diabetic foot patients (from diabetic foot service) over 50 years of age, 30 DM patients with DM diagnosis who did not develop diabetic foot and 30 healthy people with no known chronic disease. The remaining serum and plasma were divided into small portions and maintained at -80°C until the working day and FMO3 was studied by ELISA method and TMAO was studied by LC-MS/MS method.

**Results:** TMAO mean values were higher in the DM and diabetic foot groups, but it was not statistically significant. FMO3 was lower and statistically significant in the group with diabetic foot ulcer.

**Conclusion:** In our study, no relationship between TMAO and DM and diabetic foot ulcer could be determined. There was a correlation between low FMO3 and diabetic foot complication.

**Key Words:** Diabetic foot ulcer, diabetes mellitus, FMO3, HbA1c, microbiota, TMAO

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>ADA</b>	: American Diabetes Association
<b>AGE</b>	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
<b>Anti-VEGF</b>	: Anti-Vasküler endotelyal growth faktör
<b>CPS-1</b>	: Karbomoilfosfat Sentaz 1
<b>DM</b>	: Diabetes Mellitus
<b>ER</b>	: Endoplazmik Retikulum
<b>FMO3</b>	: Flavin İçeren Monooksidaz 3
<b>HbA1c</b>	: Hemoglobin A1 (glukolize)
<b>IDF</b>	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
<b>OGTT</b>	: Oral Glukoz Tolerans Testi
<b>TDV</b>	: Türk Diyabet Vakfı
<b>Tip 1 DM</b>	: Tip 1 Diabetes Mellitus
<b>Tip 2 DM</b>	: Tip 2 Diabetes Mellitus
<b>TMA</b>	: Trimetilamin
<b>TMAO</b>	: Trimetilamin N-Oksit

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 2.1.</b> Türk Diyabet Vakfı ve ADA Diyabet Mellitus Tanı Kriterleri .....	3
<b>Şekil 2.2.</b> Glikolize Hemoglobin HbA1c kristal yapısal şeması .....	14
<b>Şekil 2.3.</b> FMO3 Enzimi İçin Kristal Yapısal Şeması .....	17
<b>Şekil 2.4.</b> FMO3 döngüsü.....	19
<b>Şekil 2.5.</b> FMO' ların bazı hastalıkların fizyopatolojileri ile olan ilişkileri .....	20
<b>Şekil 2.6.</b> Flavın İçeren Monooksidazın Bazı Fonksiyonları .....	21
<b>Şekil 2.7.</b> Mikrobiyota Bazı Görevleri .....	24
<b>Şekil 2.8.</b> TMAO Sentez Yolakları .....	27
<b>Şekil 4.1.</b> Gruplar arası HbA1c ilişkisi.....	36
<b>Şekil 4.2.</b> TMAO parametresinin gruplara göre dağılımını gösteren Violin grafiği .....	39
<b>Şekil 4.3.</b> FMO3 parametresinin gruplara göre dağılımını gösteren Violin grafiği .....	39
<b>Şekil 4.4.</b> Çalışma gruplarına göre FMO3 ile yaş arasındaki saçılım grafiği.....	41

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 4.1.</b> Sağlıklı Kontrollere Ait Sonuçlar .....	33
<b>Tablo 4.2.</b> Diyabetik Kontrol Grubuna Ait Sonuçlar .....	34
<b>Tablo 4.3.</b> Diyabetik Ayaklı Kontrol Grubuna Ait Sonuçlar .....	35
<b>Tablo 4.4.</b> Çalışma Gruplarına Göre Parametrelerin Karşılaştırılması .....	38
<b>Tablo 4.5.</b> Çalışma Gruplarına Göre HbA1c ile TMAO ve FMO-3 Arasındaki İlişki ..	40



# 1. GİRİŞ

Özellikle son 200 yıl olmak üzere savaş sonrası yıllarda endüstriyel şekerin yaygınlaşması, gelişmiş ülkelerde gıdaya ulaşım, tüketim ve beslenme alışkanlıklarının değişmesiyle ve teknolojinin getirdiği hareketsiz yaşam tarzının artmasıyla obezite yaygınlaşmış, önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Tüm bunların sonucunda obezite, Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) bozukluğu ve akabinde gelişen Tip 2 Diyabet (Tip 2 DM) adeta küresel bir salgına dönüşmüştür.

Uluslararası Diyabet Federasyonunun (IDF) 2021 verilerine göre dünyada 537 milyon yetişkin (20-79 yaş) diyabetle yaşamaktadır. Yaklaşık her 10 kişiden 1'i, yine aynı verilere göre 541 milyon yetişkin, Tip 2 DM riskini artıran bozulmuş OGTT' ye sahiptir. 2021 yılında diyabet ve diyabet kaynaklı nedenlerden dünyada her 5 saniyede bir kişi hayatını kaybetmiştir. Diyabet için yapılan sağlık harcamalarının tutarının ise 966 milyar ABD dolara ulaştığı tahmin edilmektedir.<sup>1</sup>

IDF' nin 2021 Türkiye projeksiyonuna göre ülkemizde;

- Yaklaşık 9.020.000 diyabet tanılı erişkin (20-79),
- 1.024.600 bozulmuş OGTT'li erişkin,
- Yaklaşık 25.800 Tip 1 DM'li genç ve çocuk (0-19),
- Tahminen 4.323.000 tanı konmamış DM' li erişkin mevcuttur.

2021 yılında Türkiye'de 83.221 kişi diyabet ve bağlı nedenlerle vefat etmiştir. Ülkemizde diyabete bağlı sağlık harcamaları ise, yine aynı yıl için hasta başına 1.044 ABD dolarına ve toplamda 9.426.000 ABD dolarına ulaşmıştır.<sup>1</sup>

Dünyada travmatik olmayan alt ekstremitte amputasyonlarının %40-60'ı diyabete bağlıdır. Diyabetik ayak enfeksiyonu %20 oranında değişik seviyelerde amputasyona neden olmaktadır. Periferik arter hastalığı, ayak ülseri ve enfeksiyon amputasyon riskini arttıran faktörlerdir. Bir diyabet hastasının hayatı boyunca diyabetik ayak ülseri olma

ihtimali %34'lerdedir. Diyabete bağlı ampütasyonlardan sonra, 5 yıl içinde mortalite %70'i bulurken, tabloya böbrek nakli eklenmişse beklenen ölüm riski 2 yıl içinde dramatik olarak %75'lere çıkabilmektedir.

Yine son yıllarda beslenme alışkanlıkları, gıda güvenliği, hijyeni, niceliği kadar bu gıdalardan çeşitli şekillerde faydalanım göz önünde alındığında, sindirim, sentez, emilim son ürün gibi direkt ve dolaylı etkileriyle mikrobiyota ve mikrobiyotaya ilgi hızla artmıştır. Sağlık, hastalık ve yaşlanmada mikrobiyom çeşitliği, içeriği ve fonksiyonelliği sağlık profesyonelleri, bilim insanları, ve toplumsal alanda popülerlik kazanmıştır.

Bu süreçte mikrobiyota tarafından sentezlenen çok sayıda bileşikten TMA, okside hali TMAO ve bu işlemi karaciğerde gerçekleştiren FMO3 ilgi çekmeye başlamıştır.

Daha önce diyabet ve obeziteden, ateroskleroz ve kansere kadar zararlı etkileri, ya da ozmoregülasyondan protein stabilizasyonuna kadar koruyucu etkileri olduğu ile ilgili çok sayıda yayına konu olan TMAO ve detoksifikasyon, çeşitli ilaç ve ksenobiyotik metabolizmaları ile ön plana çıkan FMO3 ve bunların varsa diyabetik ayak patogenezine katılımı ve yine varsa birbirleriyle ve bu hastalık süreçleri ile ilgili katılım mekanizmalarını açıklamak amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Diyabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM), insülin salınımının ve/veya insülin etkinliğinin bozukluğu nedeniyle ortaya çıkan, hiperglisemi ile karakterize, kronik metabolik bir hastalıktır. Diabetes Mellitus, Türkçe’ de Şeker Hastalığı olarak ifade edilmektedir. Eski Yunanca’ da şekerli idrar, ballı idrar gibi anlamlara gelir.

Ağız kuruluğu, polidipsi, poliüri, polifaji, kilo kaybı, noktüri, iştahsızlık, bulanık görme, ayaklarda uyuşma-karıncalanma-yanma, idrar yolu enfeksiyonları, vulvovajinit, mantar enfeksiyonları, kaşıntı, ciltte kuruma, yorgunluk gibi belirti ve bulgularla ortaya çıkar ve hayat boyu devam eder.

Günümüzde DM’ nin tanısı yüksek kan şekeri tespiti temeline oturtulmuştur. Semptomatik olmayan şeker hastalığında, tanısal değerler, hastalığın spesifik komplikasyonu retinopati prevalans riski esas alınarak belirlenmiştir.<sup>2</sup> Türk Diyabet Vakfının 2021 Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi’nde yer alan tanı kriterleri ve American Diabetes Association’ ın (ADA) 2023 yılı tanı kriterleri Tablo’de gösterilmiştir.<sup>3-5</sup>

**Tablo 2.1.** Türk Diyabet Vakfı ve ADA Diyabet Mellitus Tanı Kriterleri

Tanı kriteri	Değer
Açlık Plazma Glukozu	≥ 126 mg/dl
Rastlantısal Plazma Glukozu	≥ 200 mg/dl
Oral Glukoz Tolerans Testi	≥ 200 mg/dl
HbA1c	≥ % 6.5

ADA ve Türkiye Diyabet Vakfı 45 yaş üstü ek diyabet riski olmayan bireyleri için 3 yılda bir, ek riski olanları ise daha sık taramayı tavsiye etmektedir.

Tanı kriterleri kandaki yüksek glukoz durumuyla direkt ilişkilidir. Ancak acil klinik durumlar hariç, belirti, bulgu ve sekeller ise neredeyse tamamen, dokulardaki süregelen yüksek glukoz ile düşük veya yüksek insülin düzeyleri ilişkilendirilmiştir.

DM için birçok etiyolojik alt tip tanımlanmıştır. Şeker hastalığının sınıflandırılması önceleri;

-Tip 1 DM olarak bilinen erken yaşta başlayan,

-Tip 2 DM olarak bilinen erişkinlerde sık görülen ve daha geç yaşlarda başlayan olarak, iki temel tip ile sınırlı iken sonradan bu sınıflamaya gebelikte görülen Gestasyonel Diyabet eklenmiş, devamında da bu sınıflama çok çeşitli patojenik mekanizmaların, hastalık ve sendromların sebep olduğu 50 kadar alt tipin tanımlanması ile sayıca hızla artmıştır.<sup>2,6</sup>

## **2.2. İnsülin Bağımlı Diyabetes Mellitus (Tip 1 DM)**

Tip1 DM, otoimmün veya diğer nedenlerle pankreatik beta hücre harabiyetine bağlı olarak gelişen, mutlak insülin yetmezliği sonucu ortaya çıkan klinik tablodur. Genellikle çocukluk yaşlarında başlar ve insülin eksikliğine yol açan otoimmün beta hücre yıkımı vardır.<sup>2</sup> Hastalarda insülin hormonu düşük, yetersiz ya da hiç yoktur. Tip 1 DM erişkinlerde görülen Latent Otoimmün Diyabeti de ( LADA) içerir. Tip 1 DM' un iki alt tipi tanımlanmıştır. Bunlardan immün aracılı tip: olguların %95' ini teşkil eder. % 90' ın üzerinde pankreatik otoantikor pozitifliği vardır. İdiyopatik tip ise olguların % 5' ini teşkil eder. Pankreatik kalsifikasyon görülür. Pankreatik oto antikor yoktur.

### **2.2.1. İnsülin Bağımsız Diyabetes Mellitus (Tip 2 DM)**

İnsülin direnci, rölatif insülin yetmezliği ve insülin direnci zemininde ilerleyici insülin salınım defekti mevcuttur. Tip 2 DM tüm diyabet hastalarının yaklaşık %90'ını oluşturur. Hastalık hareketsiz yaşam tarzı, obezite ve ileri yaşa eşlik eder. Son yıllarda değişen beslenme alışkanlıkları ve hareketsiz hayat tarzı gibi nedenlerden ötürü, erken

yaşlarda çocuklara da Tip 2 DM tanısı konulmaya başlanmıştır.<sup>2,7</sup> Tip 2 DM' de hastalık öncesi 10-15 yıl kadar, uzun asemptomatik prediyabet dönemi vardır. Bu dönemde özellikle de retinopati ve nöropati olmak üzere farklı mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar gelişir.<sup>8</sup> Türk Diyabet Vakfı'nın son kılavuzuna göre diyabet tiplerinin sınıflaması aşağıdaki gibidir.

### **Gestasyonel Diyabetes Mellitus:**

Gebelik sırasında tanımlanan karbonhidrat intoleransıdır.<sup>2</sup> Hamilelerin yaklaşık % 3 ile % 9' unda görülür.<sup>2,8</sup>

### **Diğer Spesifik Tipler:**

- **Beta Hücre Fonksiyonunun Genetik Defektleri:** Mody (1-2-3-4-5-6)
- **İnsülin Etkisinde Genetik Defektler:** Tip A insülin direnci
- **Ekzokrin Pankreas Hastalıkları:** Pankreatit, Travma, Pankreatektomi,
- **Endokrinopatiler:** Akromegali, Cushing Sendromu, Glukagonoma, Feokromasitoma,
- **İlaç ve Kimyasal Maddelerle Oluşan Diyabet:** Pentamidin, Nikotinic Asit, Glukokortikoidler, Tiroid Hormonları,
- **İnfeksiyonlar:** Konjenital Kızamıkçık, Sitomegalovirus, Koksaki B, Kabakulak
- **İmmün İlişkili Diyabetin Sık Olmayan Formları:** Stiff-man Sendromu, Antiinsülin Reseptör Antikoru
- **Berberinde Diyabet Görülebilen Diğer Genetik Sendromlar:** Down Sendromu, Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu, Wolfram Sendromu, Friedreich Ataksisi<sup>9,10</sup>

Diyabet alt tipleri sadece hastalık patogenezini, klinik ve laboratuvar tanı şeklini belirlemekle kalmaz, aynı zamanda tedavi şeklini de tamamen etkiler.

### **2.2.2. Tip 1 DM' de Tedavi Amaçları**

- Kan glukoz seviyesini düzenlemek.
- Akut ve kronik komplikasyonları önlemek, varsa kronik komplikasyonların ilerlemesini yavaşlatmak ve durdurmak.
- Büyüme ve gelişmeyi fizyolojik sınırlarda tutmak.
- Gebelik durumu varsa, anne ve fetustaki komplikasyonları önlemek.
- Olası enfeksiyonları ve şiddetini azaltmak, engellemek.
- Yaşam kalitesini artırmaktır.

Temel tedavisi eksikliği yerine koymaktır. Hastaya eksik olan insülini ihtiyacı miktarında vermektir.

### **2.2.3. Tip 2 DM' de Tedavi Amaçları**

- Öncelikle diyabet gelişimini engellemek veya geciktirilmesini sağlamak,
- Tanı esnasında ve ileride ortaya çıkabilecek kronik komplikasyonları engellemek ve hafifletmektir.<sup>11</sup>

Tip 2 DM'nin temel tedavisi; tamamen kişiye özel olup, kalori alımının azaltılması, yağ alımının azaltılması, fiziksel aktivitenin artırılması gibi yaşam tarzı değişiklikleri ile tartı kontrolünün sağlanmasıdır.<sup>12</sup> Hasta kilo kaybeder, hayat tarzını değiştirir ve devamlılık sağlayabilirse tam iyileşme de bazen mümkün olabilmektedir. Glisemik kontrol için metformin, akarboz, dapagliflozin, linagliptin gibi oral antidiyabetik ilaçlardan insüline kadar medikal tedavi alternatifleri mevcuttur.<sup>13</sup>

#### **2.2.4. Diyabetin Komplikasyonları**

Akut ve kronik olarak temelde ikiye ayrılır.

Akut Komplikasyonlar

#### **2.2.5. Diyabetik Ketoasidoz**

Daha çok Tip 1 DM' nin başlangıç döneminde görülür. İnsülin dozu veya diyetle uyum sıkıntıları, insülin ihtiyacını artıran hastalıklar, gebelik, ameliyat benzeri durumlar ve bazı ilaçlar (tiyazid vb.) bu duruma neden olabilir.<sup>6</sup>

Diyabetik ketoasidoz tablosu poliüri, polidipsi, bulantı, kusma, karın ağrısı, dehidratasyon, hiperpne, nefeste aseton kokusu, halsizlik, iştahsızlık, sıcak-kuru cilt, taşikardi, somnolans ve komaya kadar giden belirti ve semptomlarla ortaya çıkar.<sup>14</sup>

Acil bir durumdur. Hasta yatırılarak yoğun bakım şartlarında tedavi edilir. İnsülin tedavisinin yanında, genel destek tedavisi uygulanır ve iyileşme sonrası hastaya eğitim verilerek taburcu edilir.<sup>6</sup>

#### **2.2.6. Hiperglisemik Dehidratasyon Sendromu**

Genelde Tip 2 DM' de, özellikle yaşlı hastalarda, araya giren akut miyokard enfarktüsü, serebrovasküler olay, ameliyat, enfeksiyon gibi insülin ihtiyacının ani arttığı durumlarda gelişir. Ketoasidoza göre daha ciddi bir durumdur. Poliüri, polidipsi, taşikardi, fokal- jeneralize motor nöbet, hipotansiyon, konfüzyon, koma, kısmi felç gibi nörolojik belirtiler görülür. Ölüm riski daha yüksek ve dehidratasyon bulguları daha ön plandadır.

Hasta yatırılarak tedavi edilir.

#### **2.2.7. Hipoglisemi**

İnsülin kullanan hastalarda tedavi başlangıcında, ayrıca yaşlı ve düşkün hastalarda sıkça gözlenir. Fazla insülin alımı ve öğün atlama, dozu yanlış hesaplama, aşırı egzersiz gibi görece insülin fazlalığı durumlarında ortaya çıkar.

Adrenerjik semptomları: soğuk ve nemli cilt, terleme, halsizlik, solukluk, tremor ve çarpıntıdır.

Nöroglikopenik semptomları: baş ağrısı, uyku hali, dikkatte azalma, davranış değişiklikleri, halsizlik, ruhsal değişiklikler, huzursuzluk, stupor ve komadır.

Hipoglisemide, hafif veya ciddi olmasına göre oral şeker alımından, yatırılarak intravenöz glukoz veya im/sc glukagon uygulamasına kadar geniş yelpazede tedavi uygulanır.

## **2.2.8. Kronik Komplikasyonları**

### **2.2.8.1. Nefropati**

DM 'de böbrek tutulumu oldukça yaygındır. Hastaların yaklaşık %30-40' ını etkiler. Tip 1 DM ve Tip 2 DM' lilerde ciddi morbidite ve mortaliteden sorumludur.

Diyabetik Böbrek Hastalığı, glomerüler arteriollerin hasarına bağlı olarak böbrek fonksiyonlarının artarak bozulmasına neden olan, diyabetin mikrovasküler bir komplikasyonudur. Diyabetik nefropati son dönem kronik böbrek yetersizliğinin dünyadaki en sık nedenidir. Böbrek fonksiyonlarında progresif azalmayla, proteinüri ve hipertansiyonla karakterizedir.

Diyabetin her iki tipinde de görülür. Nefropati evresi, tanı süresi ve glisemik kontrolle ilişkili olarak mikroalbuminüriden son dönem böbrek yetmezliğine kadar değişir. Hastalarda mikroalbuminüri ve makroalbuminüri prevalansı yaklaşık %30-35 kadardır.

Optimal glisemik kontrol her iki diyabet tipinde de, hastalarda kronik böbrek hastalığı riskini azaltır ve mevcut durumun ilerlemesini geciktirir. Ayrıca kan basıncı kontrolü de kronik böbrek hastalığı riskini azaltır. Hipertansiyon varlığında tedavi seçeneği olarak anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörlerinin tercih edilmesi böbrek için koruyucu kabul edilmektedir.

### **2.2.8.2. Retinopati**

Diyabetik retinopati, dünyada başlıca körlük nedenleri arasındadır. Ciddi iş gücü kaybına sebep olmaktadır. Retinopati, sistemik hastalığa bağlı gelişir. Retinada ilerleyici yapısal ve fonksiyonel değişikliklere yol açar. Hem Tip 1 DM hem de Tip 2 DM’de sık görülen spesifik bir nörovasküler komplikasyondur.<sup>15</sup> Prevalansı diyabet süresi ve de glisemik kontrol ile güçlü şekilde ilişkilidir.<sup>16</sup> Retinopati, nöronların, ganglion hücreleri ve aksonlarının hasarlanmasından kaynaklanır. Bu nedenle, diyabetik retinopati diyabetik nöropatlere benzer. Diyabetik duyuşal nöropatinin farklı bir formu olarak da değerlendirilebilir.<sup>17</sup> Diyabetes Mellitus için tanı kriterleri, presemptomatik hastalarda retinopati prevalansı ve riski gözetilerek belirlenmiştir.<sup>2, 18</sup> Diyabet süresi, glisemik kontrol eksikliği, hipertansiyon ve hiperlipidemi (hiperkolesterolemi) retinopati için önemli sistemik risk faktörleridir.<sup>19</sup> Uygun glisemik kontrol ve rutin göz dibi incelemesi ile takip edilmesi önerilir. Gerekirse laser fotokoagulasyon, anti-VEGF gibi semptomatik tedavi seçenekleri mevcuttur. FDA aflibercept ve ranibizumabın diyabetik retinopatide kullanımına onay vermiştir.<sup>20,21</sup>

### **2.2.8.3. Nöropati**

DM’ nin en yaygın görülen kronik komplikasyonudur. Diyabete % 40-50 kadar eşlik eder. Mikroanjiopati zemininde gelişir. Yeni sentezlenmiş proteinlerin defektif katlanmasından kaynaklı endoplazmik retikulum stresinin diyabetik nöropati gelişiminde kilit rolü olduğu kabul edilmektedir.<sup>22</sup> ER stresi, metabolizmayı, gen ekspresyonunu ve transkripsiyonel düzenlemeyi etkiler. Sonuçta anormal hücresel fonksiyonuna, sinyal iletimine ve hasara neden olur.<sup>22</sup> Hücreler ER stresine karşın, katlanmamış protein cevabı oluşturur (unfolded protein response UPR). Ayrıca artmış aldoz redüktaz, protein kinaz C, siklooksijenaz, lipooksijenaz aktiviteleri ileri glike son ürünler de (AGE) patolojide

rol alırlar.<sup>23-25</sup> Diyabetik nöropati periferik ve otonom sinir sistemini etkileyerek, ilgili klinik tabloları oluşturur.

Diyabetik hastalarda periferik nöropati, subklinik, ağrılı, ağrısız, akut veya kronik, ya da fokal nöropati şeklinde olabilir. Diyabetik nöropati bir dışlama tanısıdır. Periferik nöropatinin yaklaşık yarısı asemptomatik seyreder.<sup>26</sup>

Diyabetik otonom nöropati, yaşam beklentisinin azalması, hedef organ hasarının artması ve yaşam kalitesinin bozulması açısından olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Diyabetik otonom nöropatide istirahat taşikardisi, ortostatik hipotansiyon, gastrointestinal semptomlar (gastroparezi, konstipasyon, dispepsi, diare ve fekal inkontinans gibi), mesane bozuklukları, terleme, hipogliseminin nöroglisemik ve adrenerjik semptomlarının fark edilememesi, erektil disfonksiyon gibi bozukluklar görülür.<sup>26</sup>

Otonom nöropati, diyabetik hastaların yaklaşık %40'ını etkiler. Tip 1 DM'li hastaların tanısından yaklaşık 5 yıl sonra ortaya çıkabilir, Tip 2 DM'li hastalarda ise tanı konduğu anda da mevcut olabilir. Retinopati ve diyabetik ayak gibi diyabete özgü komplikasyonların patogeneğinde anahtar başlatıcı rolü vardır. Etkin korunma için sıkı glisemik kontrol ve rutin takip önemlidir.<sup>11, 19, 27, 28</sup> B12 vitamini, pregabalin, duloksetin seçenekleri tedaviye eklenebilir. Gerekirse semptomlara yönelik tedavi yapılır (gastroparezide eritromisin verilmesi gibi).

#### **2.2.8.4. Diyabetik Ayak**

Dünyada travmatik olmayan alt ekstremitte amputasyonlarının %40-60'ı diyabete bağlıdır. Diyabetik ayak enfeksiyonu %20 oranında değişik seviyelerde ampütasyona yol açmaktadır. Periferik arter hastalığı, ayak ülseri ve enfeksiyon değişik seviyelerde ekstremitte ampütasyon riskini arttıran faktörlerdir. Bir diyabet hastasının hayatı boyunca diyabetik ayak ülseri olma insidansı %34'lindedir. Daha önce kişinin diyabetik ayak

ülseri geçirmiş olması, erkek cinsiyet, hastalık süresi, hastanın yaşı, sigara kullanımı, görme bozukluğunun olması, periferik arter hastalığı, periferik nöropati, kronik böbrek rahatsızlığı mevcudiyeti, ayak deformiteleri, nasırlar, organ nakli gibi durumlar diyabetik ayak riskini artırır.<sup>29</sup> Diyabete bağlı amputasyonlarda 5 yıl içinde mortalite oranı %70'i bulurken, tabloya böbrek nakli eklenmişse beklenen ölüm oranı 2 yılda %75'e çıkmaktadır.

Diyabetik ayak ülserinin fizyopatolojisinden nöropati, travmaya ikincil enfeksiyon ve mikro/makroanjyopati sorumludur (Şekil 2.1).<sup>3</sup>

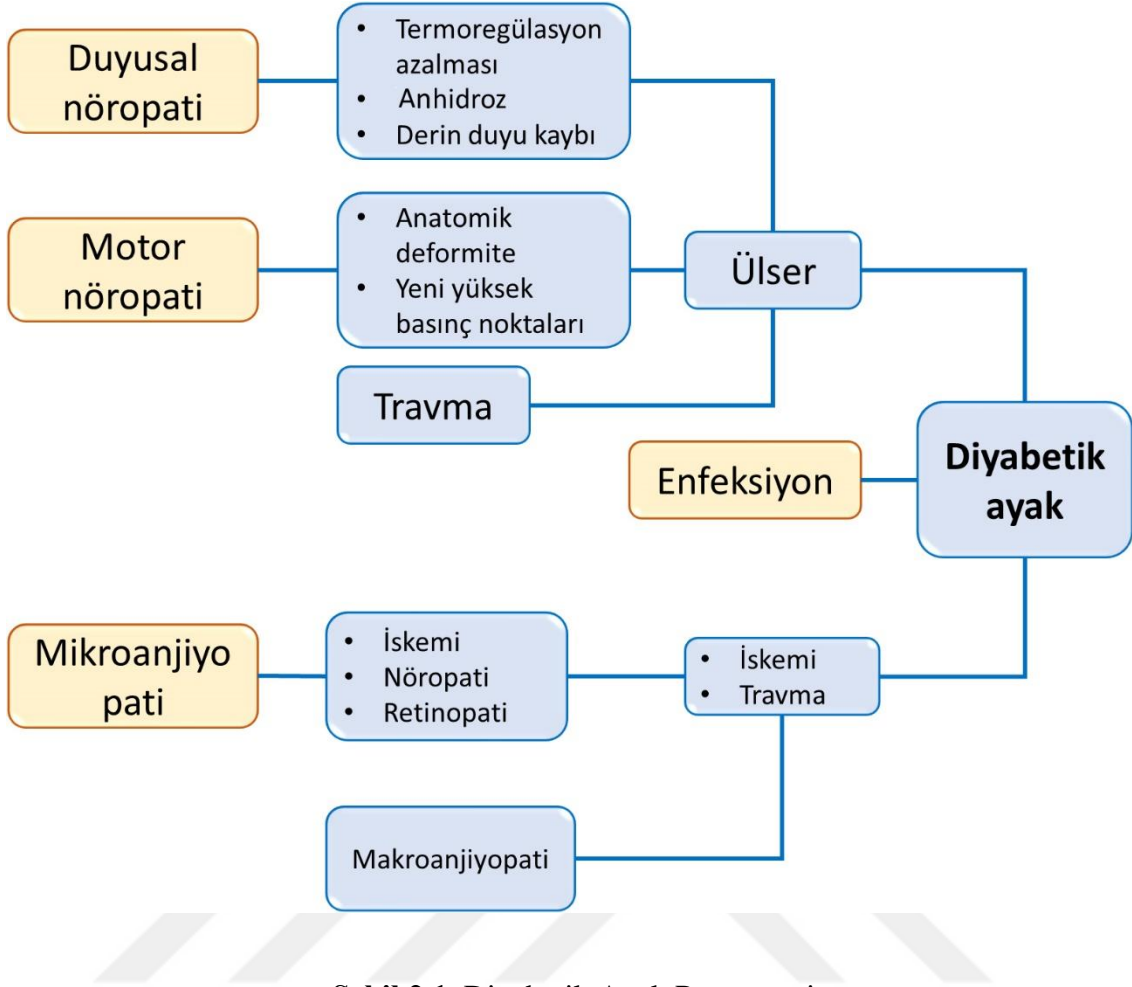
#### **2.2.8.5. Periferik Nöropatide**

- Motor komponent kaybı, intrinsik kas atrofisi ve çekiç parmak oluşumuna neden olur. Ayağın fonksiyonel anatomisi değişir; metatars başlarında, ayağın plantar yüzeyinde yüksek basınçlı yeni temas noktaları oluşur.
- Duyusal komponent kaybı, propriyosepsiyon, vibrasyon, basınç hissi, ağırlı uyarıların, sıcak ve soğukun hissedilememesine ve yürüme bozukluğuna neden olur. Bunların bir sonucu olarak, diyabetik hasta, ayak rahatsızlığını, yanma veya donmayı, bül oluşumunu ve hatta kemik kırığını anlayamadan tekraren ayak travması yaşar. Tekrarlayan travmalara, duysal kayıp, propriyosepsiyon azalması, atrofi, akabinde koruyucu yağ yastıklarının dislokasyonu ve ülserasyona kadar giden cilt yaralanması eşlik eder. Bozulmuş mikrovasküler termoregülasyon ve otonom sistem disfonksiyonu ile anhidroz oluşur. Cilt kurur, çatlamaya daha yatkın hale gelir. Cildin mikroorganizmalara karşı koruyucu bariyer etkisi azalır. Periferik arter hastalığı sonucunda oluşan iskemik duruma, düzensiz ayak bakımı, uygun olmayan ayakkabı gibi çevresel faktörlerin katılımı ile kızarıklıktan Charcot eklemi, ülser, gangren ve amputasyona kadar ilerleyen süreç başlamış olur. Sonrasında, travma ve enfeksiyonun yıkıcı süreçleri, derin

fasyaya nüfuz ederek enfeksiyonun orta ayak kaslarına, eklemlere ve ayak boyunca ilerlemesine sebep olur.<sup>29-35</sup>

Diyabetik ayak hastalığının altında yatan patofizyolojik mekanizmalar, nöropati, vaskülopati, iskemi, enfeksiyon ve anormal ayak biyomekaniği dahil olmak üzere karmaşık ve multifaktöryeldir.<sup>34</sup> DM'nin kendisi tek başına gecikmiş yara iyileşmesinin ve yara yeri enfeksiyonlarının başlıca nedenidir.<sup>36, 37</sup> Ayrıca kişinin diyabetik ayak sürecine çoğunlukla diyabetik retinopati de eşlik edeceğinden, hasta ayağındaki mevcut durumun görsel olarak da farkında olamayacak ve süreç erken fark edilemeyecektir. Ayrıca yürüyüş zeminindeki engel ve cisimleri göremeyerek çarpacak ve ayak travmasına fazlaca maruz kalacaktır.<sup>38</sup>

Proteinlerin ve bağ dokusunun glikasyonu, damar, sinir ve osteo-artiküler yapılarıdaki değişikliklerin temelini oluşturduğundan, kan glukoz seviyelerinin sıkı kontrolü hayati öneme sahiptir. Düzenli ayak bakışı ve kontrolü, uygun ayakkabı seçimi, cilt travmasının (kızarıklık, kabarcık) erken tanınması, cilt bakımına dikkat edilmesi, nemlendirici kremlerin kullanılması koruyucudur.<sup>35</sup> Diyabetik ayak ülseri tedavisinin anahtarı önce korunmak sonra ise agresif debridmandır.<sup>39</sup> Diyabetik ayakta, ülser alanında basınç kaldırılır, periferik arteriyel dolaşım düzeltilir ve enfeksiyon kontrol altına alınır, iyileşme sağlanabilir.<sup>37</sup> Hiperbarik oksijen tedavisi etkinliği tartışmalı olsa da uygulanmaktadır.<sup>40,41</sup> Topikal oksijen uygulanması, sodyum oktasülfatlı pansumanlar, lokal negatif basınç uygulamaları tedavide kullanılmaktadır.<sup>42, 43 44</sup> İyileşme sonrası bir yıl içinde nüks sıktır. Bu nedenle 'ülser iyileşmez, remisyona girer' denilmektedir.<sup>29, 45</sup>



Şekil 2.1. Diyabetik Ayak Patogenezi

### Diyabetle ilgili ağız hastalıkları

Glisemik kontrolün iyi olmaması ağız sağlığını da olumsuz etkiler. Diyabetli hastalarda ağız hijyeninin kötü olması, halitozise neden olur. Ayrıca periodontal hastalıkların hem sık hem daha ciddi seyretmesinin sebebidir.

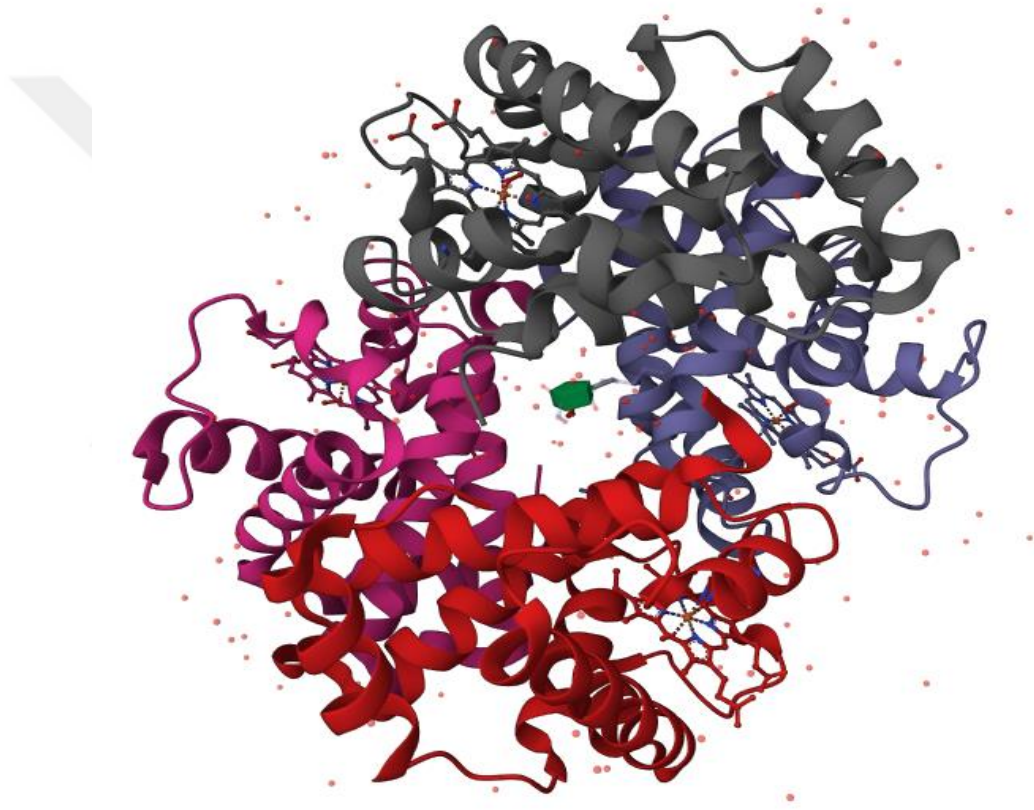
Dislipidemi, kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon diyabete sıkça eşlik eden durumlar arasındadır.

Ayrıca;

- Mikrovasküler (nefropati, retinopati, nöropati),
- Makrovasküler (koroner arter hastalıkları, periferik arter hastalıkları, serebrovasküler olaylar, kalp yetmezliği) şeklinde fizyopatolojik bir komplikasyon sınıflaması da yapılmaktadır.

### 2.3. Glikolize Hemoglobin -HbA1c

İnsan hemoglobininin  $\beta$ -zincirinin N-terminal ucuna non-enzimatik glukoz ilave olması durumudur. Glukozun bir proteinde uygun olan gruplara non-enzimatik bağlanmasına protein glikasyonu denir. HbA1c oluşumu da bir protein glikasyonudur ve spontane gelişir. Glukozun potansiyel bağlanma bölgeleri hemoglobinin beta zincirinin N-terminal ucundaki amino gruplarıdır. HbA1c elektroforetik yöntemlerle ölçülür. HbA1c'nin kristalografik yapısı Şekil 2.2'de gösterilmektedir. <sup>46</sup>



Şekil 2.2. Glikolize Hemoglobin HbA1c kristal yapısal şeması

Ayrıca hemoglobinin karbonhidratlarla nonenzimatik etkileşimi sonucu başka hemoglobin varyantları da oluşur.

Örneğin,

- **Hb1a1**; fruktoz 1.6 bifosfat
- **Hb1a2**; glukoz 6 fosfat

- **Hb1ab**; pirüvik asit bağlanması ile oluşur.

HbA1c tüm glike hemoglobinlerin yarısını oluşturur. HbA1c yaklaşık 8-12 haftalık ortalama glisemik durum hakkında bilgi vermesinin yanında diyabet komplikasyonları için de iyi bir risk göstergesidir.<sup>14, 30, 47-49</sup> İlk olarak 1997 yılında American Diabetes Association (ADA) tarafından şeker hastalığı tanısı için aday parametre olarak önerilmiştir.<sup>50</sup>

HbA1c artık diyabetin tanı ve takibinde kullanılır. Diyetle ilişkili ani glukoz iniş ve çıkışlarından çok etkilenmez. Test için herhangi bir ön hazırlık gerekmez. Anlık açlık tokluk gibi beslenme durumlarından etkilenmez. Ortalama glukoz değerlerini projekte eder.<sup>48, 49</sup>

Ortalama kan şekerinin hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanılır. <sup>51</sup>

$$\text{Ortalama kan şekeri (mg/dl)} = (\text{HbA1c} \times 35.6) - 77.3 \text{ ya da}$$

$$\text{Ortalama kan şekeri (mg/dl)} = (\text{HbA1c} \times 28.7) - 46.7$$

HbA1c'nin %6,5 üzeri değerleri diyabet hastası olarak tanı aldırırken, %5.7-%6.4 değerlerinde ise prediyabet tanısı konur. Diyabet hastalarında HbA1c nin %7' nin altında olması, ortalama glisemik kontrolün iyi olduğunun göstergesidir.<sup>49, 52, 53</sup> Bu eşik değerler hesaplanırken kriter olarak hastaların retinopati prevalansları dikkate alınmıştır.<sup>2</sup>

HbA1c, anemi, polisitemi, ilaç kullanımı, gebelik, vitamin takviyesi (C vit-E vit), vücut kitle indeksi, etnisite, fiziksel aktivite ve yaştan etkilenir.<sup>47, 54</sup>

HbA1c seviyesi ile diyabetik ayak ve ona bağlı alt ekstremitte amputasyonu riskinin pozitif korelasyonla arttığı gösterilmiştir. HbA1c seviyesindeki her %1'lik yükselme ile alt ekstremitte amputasyon sıklığında %1.3-%1.49 oranında artış olduğu gösterilmiştir.<sup>55</sup>

Düşük HbA1c değerleri her türlü yara iyileşme süresinde kısalma, daha düşük maliyet, daha düşük enfeksiyon riski ve daha iyi yaşam kalitesi ile sonuçlanır.<sup>55</sup>

#### 2.4. Flavin İçeren Monooksidaz (FMO3)

Enzim kodu EC;1.14.13.8'dir. FMO' lar Grup B flavin bağımlı monooksijenazların bir alt grubunu oluşturur. Sistemik ismi N,N- dimetilanilin NADPH: oksijen oksidoredüktaz'dır.

FMO' lar başlıca karaciğer, böbrek, akciğer, beyin gibi dokularda, hücrelerin endoplazmik retikulumunda bulunan polimorfizm gösteren bir dizi enzimdir. Ksenobiyotik ve ilaç metabolizmasında rol oynarlar. Cyp450'ler de ksenobiyotik ve ilaç metabolizmasında rol oynar. Ancak aralarında bazı yapısal ve fonksiyonel farklar vardır. FMO' lar prostetik grup olarak FAD (flavin adenin dinükleotid) içerirler ki; isimlendirmeleri de esasen buradan gelmektedir. Kofaktör olarak NADPH' ın indirgeyici gücünü kullanırlar, kosubstratları ise oksijendir.<sup>56, 57</sup> FMO3 enzimine ait kristalografik yap Şekil 2.3'te gösterilmektedir<sup>58</sup>

Cyp450' ler ise prostetik grup olarak Hem kullanırken, aynı şekilde kofaktör olarak NADPH kullanır. Bazı ortak substratları vardır.<sup>57</sup> FMO'lar ve CYP'ler benzer doku ve hücrenel yerleşim ile substrat spesifikliği gösterirler ve her iki grup da çoklu enzimlerdir.<sup>57</sup>



**Şekil 2.3.** FMO3 Enzimi İçin Kristal Yapısal Şeması

Yoğunlukla karaciğer olmak üzere çeşitli dokularda lokalize olan FMO' lar, azot, kükürt, selenyum gibi elementler içeren ksenobiyotik, ilaç ve endojen ürünleri oksijene edip, daha polar ve daha hidrofil hale getirerek, vücuttan daha hızlı uzaklaştırmalarını sağlarlar. Ksenobiyotikler ve diğer substratlarının lipofilitelerini azaltıp, detoksifikasyonlarına yardımcı olurlar. Genelde ilaçlar, CYP450' ler tarafından toksik ya da aktif bir metabolite katalize edilirken, FMO' lar ile oksijenasyonu, farmakolojik ve

toksik özellikleri azaltılmış metabolitlere dönüşümle sonuçlanır. FMO' lar, yüksüz substratları veya tek bir pozitif yüklü substratları tercih ederler. Azotlu bileşikleri n-oksijene, kükürtlü bileşikleri s-oksijene, amfetaminleri oksidatif deamine ederler. Bu nedenle biyojenik aminlerin FMO aracılı oksijenasyonu, inaktivasyon için bir mekanizma gibi görünmektedir. FMO tarafından belirgin şekilde metabolize edilen ilaçların potansiyel olumsuz ilaç ve ilaç-ilaç etkileşimleri en aza indirilir.<sup>56</sup>

FMO' lar için ilaç olan substratlar; trisiklik antidepresanlar, antihistaminikler ve monoamin oksidaz A ve B inhibitörleridir. FMO' ların diyet kaynaklı substratları ise; küçük aminler (trimetilamin), nörotoksinler (*N*-metil-1,2,3,6-tetrahidropiridin), GSH, sistein ve sisteamindir.<sup>59</sup>

Metamizol gibi bazı ilaçlar ile FMO' ların enzim aktivitesi inhibe edilebilir.

Cyp450'lerin aksine FMO' ların oksijene ettikleri substratlar genelde inaktif forma dönerler.<sup>57</sup> Bu durumun da Metionin sülfoksit, TMAO gibi istisnaları vardır.

FMO' ların katalize edici aktivitesi ilk 1964'te keşfedilmiştir. 1972 de Texas Üniversitesi'nden Dr. Daniel Ziegler ilk hepatik flavoproteini domuz karaciğerinden izole etmiştir. Buna istinaden bu enzime, izole edenin ismine atfen, Ziegler Enzimi de denmektedir.<sup>56</sup> Ayrıca aşağıdaki isimlendirmeler de kullanılmaktadır:

- Dimetilanilin *N*- oksidaz,
- FAD içeren monooksijenaz,
- *N,N*- dimetilanilin monooksijenaz,
- DMA oksidaz,
- Flavın karışık fonksiyonlu oksidaz,
- Flavın monooksijenaz,
- Metilfeniltetrahidropiridin *N*- monooksijenaz,
- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridin:oksijen *N*- oksidoredüktaz,

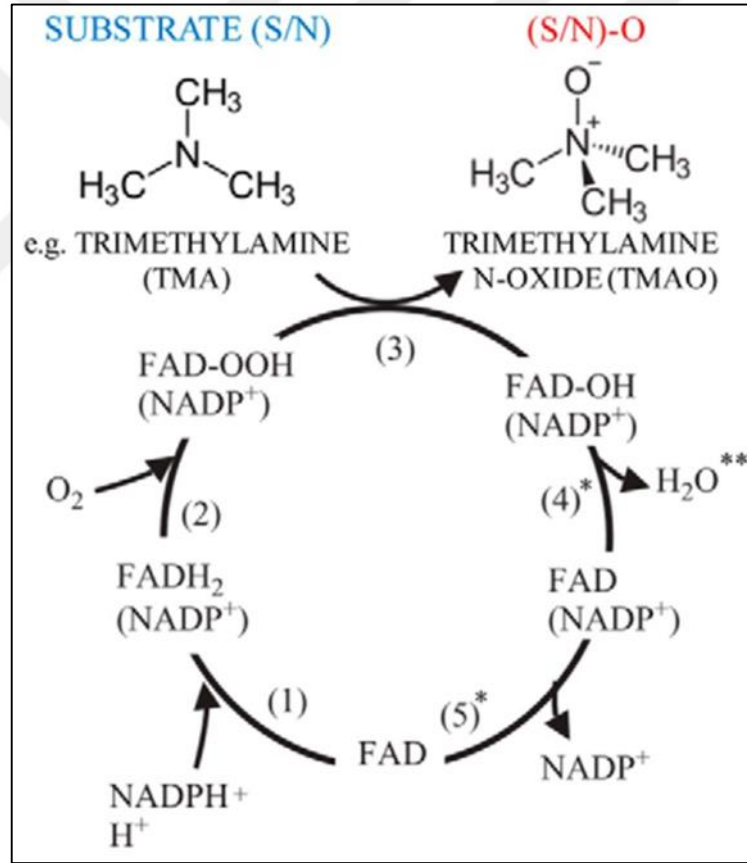
- Dimetilalanilin monooksijenaz ( *N* -oksit oluşturan),
- Karışık fonksiyonlu amin oksidaz.

FMO' larda CYP sisteminden farklı olarak, substrat bağlanmasının  $V_{max}$  üzerinde etkisi olmadığı gösterilmiştir. Diğer bir deyimle, tersi yayınlarsa da, FMO' lar kolayca indüklenemez veya kolayca inhibe edilemezler.<sup>60, 61 57</sup>.

Yani FMO' lar, ksénobiyotikler ve diğer kendi substratları tarafından indüklenmezler.

FMO moleküler oksijeni suya indirgemek için NADPH kullanır. Döngü Şekil'

teki gibi tanımlanmıştır.<sup>56, 62</sup>

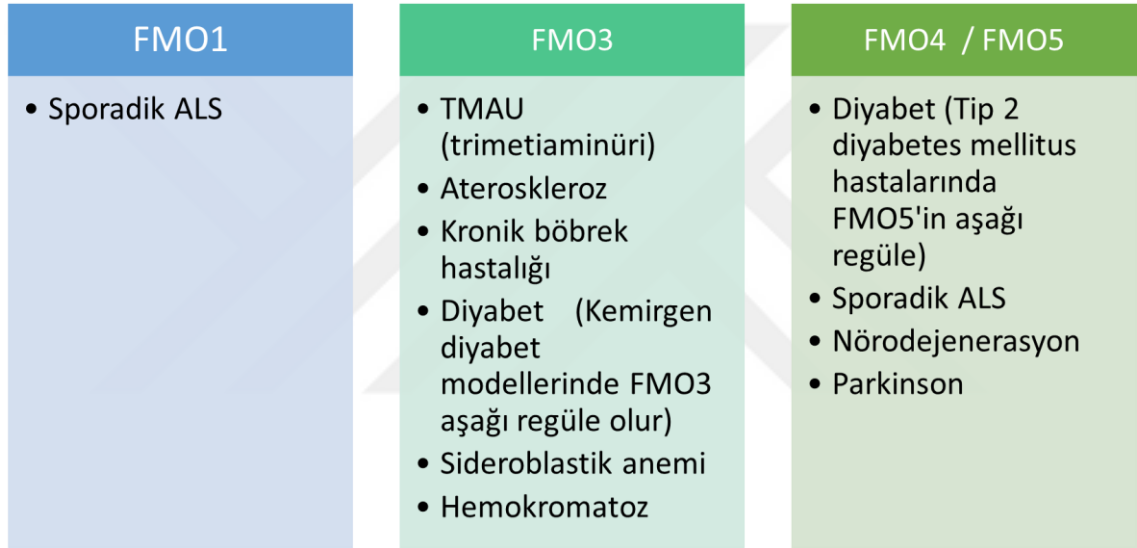


Şekil 2.4. FMO3 döngüsü

FMO' lar polimorfizm gösterirler. Beş fonksiyonel FMO vardır. İnsanda 1. kromozom üzerinde 5 adet FMO kodlayan gen bulunur ve bunlar diğer memeli türlerinde

de benzerdir. Ayrıca insanlar ve diğer memeliler, bir kaç tane de FMO psödogenine sahiptir.<sup>56</sup>

FMO' lar nedensel olarak tek bir hastalık, “trimetilaminüri” ile ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, FMO' ların birçok başka hastalığın patolojisini etkilediğine dair kanıtlar ve yayınlar vardır. FMO' ların bu hastalıklara katılım mekanizması büyük ölçüde izaha muhtaçtır. Çalışmamız temelde bu mekanizmaların varsa DM komplikasyonlarıyla ilişkisini izah etmeyi amaçlanmaktadır. FMO'ların bazı hastalıkların fizyopatolojileri ile olan ilişkileri **Şekil**'te verilmiştir.<sup>62</sup>



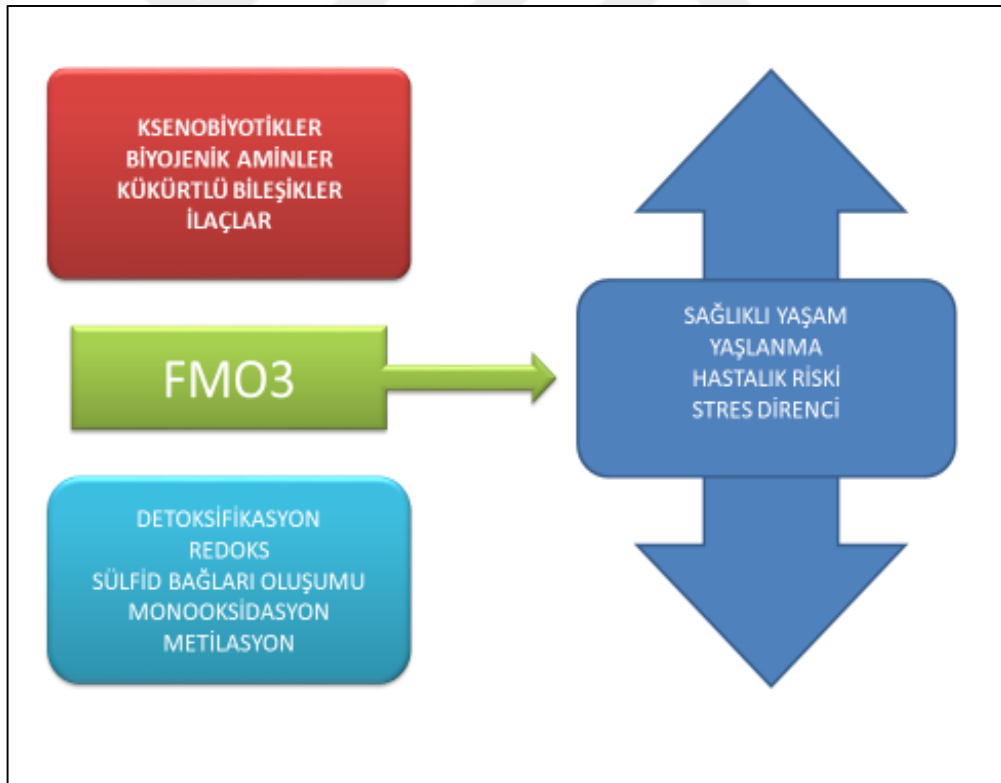
**Şekil 2.5.** FMO'ların bazı hastalıkların fizyopatolojileri ile olan ilişkileri

Son yıllardaki veriler FMO' ların yaşlanma sırasında önemli roller oynadığına dair kanıtlar içerir. Yaşlanmayı geciktirici müdahalelerde (diyet kısıtlaması, oruç tutma, rapamisin, İGF sinyal bozumu gibi) FMO gen ekspresyonunun uzun ömürlü farelerde genellikle arttığı gösterilmiştir. Uzun ömür ile FMO ekspresyonu artışı arasındaki pozitif korelasyon, FMO'ların uzun yaşam süresi üzerinde nedensel bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir.<sup>62, 63</sup>

Çalışmamızın konusu FMO3, daha çok karaciğerde lokalizedir, böbrekte de bulunmaktadır. Endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzeyinde yerleşiktir. Enzim,

GSH, sistein ve sisteamin dahil olmak üzere çeşitli tiyolleri oksitlemek için moleküler oksijen ve NADPH kullanır.<sup>57, 59</sup> FMO' ların bir şekilde genetik defekti veya fonksiyon kaybı durumunda, hücre indirgeyici ajanlara karşı duyarlı hale gelir.<sup>64</sup> Denilebilir ki; FMO aktivitesi olmadan ER, disülfid bağı içeren proteinlerin uygun şekilde katlanması için optimal oksitleyici ortamı koruyamaz.<sup>64, 65</sup> Flavin içeren monooksidazın bazı fonksiyonları Şekil 2.6'da gösterilmiştir.<sup>62</sup>

FMO3, kokulu TMA'yı kokusuz TMAO' ya okside eder. TMA aşırı derecede kokuluysen, TMA-n-Oksidin algılanabilir kokusu çok azdır veya hiç yoktur. FMO3 eksikliğinde veya yapısal-fonksiyonel mutasyonlarında Trimetilaminüri, Balık Kokusu Hastalığı oluşur.<sup>66</sup> Hastaların ter, idrar ve diğer vücut salgıları çürük balık gibi kokar, bazı tiplerine ağız kokusu da eşlik eder.



Şekil 2.6. Flavin İçeren Monooksidazın Bazı Fonksiyonları

## 2.5. Mikrobiyota

İnsan bağırsağı, başta bakteriler olmak üzere çok sayıda mikroorganizma tarafından kolonize edilmiştir.<sup>67</sup> Mikrobiyota terimi, floradan farklı olarak, bağırsağın normal sakinleri olarak bilinen birçok bakteriyel olmayan virüs ve mantarları hesaba katmamakta, sadece bakterileri kapsamaktadır.<sup>68</sup>

Mikrobiyota, yaklaşık 2 milyon gene karşılık gelen, 300 ile 1000 kadar bakteri türünden oluşan karmaşık bir ekosistemdir.<sup>69</sup> Bağırsaklardaki bakteri sayısı, insan vücudundaki tüm hücrelerin yaklaşık 10 katıdır ve toplam bakteri genomu, insan genomundan daha fazladır.<sup>68</sup> Mikrobiyotaya 'Gut Brain' de denmektedir.

Sahip olunan mikrobiyota yaşam boyunca değişir. Doğumda, tüm gastrointestinal sistem sterildir. Doğum sırasında bakteriler tarafından kolonize edilmeye başlar, beslenme ve diğer temas yollarıyla kolonizasyon devam eder.<sup>67</sup> Kolonizasyon, gebelik yaşı, doğum şekli (normal doğum, sezaryan ), diyet (anne sütü, formül mama), sanitasyon düzeyi ve antibiyotik kullanımından etkilenir. Yenidoğan döneminde mikrobiyotada çeşitlilik azdır. Bu dönemde Proteobacteria ve Actinobacteria türlerinin baskınlığı vardır. Daha sonra Firmicutes ve Bacteroidetes baskınlığı ortaya çıkar ve bakteriyel çeşitlilik giderek artar. Yaşamın ilk yılının sonunda her bebek için bakteri profili farklıdır. 2.5 yaşında mikrobiyota olgunlaşır ve bir yetişkinin mikrobiyotasına tamamen benzer duruma gelir.<sup>68, 70</sup>

Mikrobiyotanın bu olgunlaşması ve içeriği kritiktir ve kişiye özeldir. İçerdiği bakteri profili, bireyin hastalık ve sağlığını doğrudan etkiler. Gastrointestinal sistemin yaşa bağlı fizyolojik değişimi, kişinin yaşam ve beslenme tarzı ile konakçı bağışıklık sistemi bağırsak mikrobiyotasını etkileyerek enfeksiyon ve bazı hastalıklara duyarlılığı artırır veya azaltır. Mikrobiyotanın besin sindirimi, emilimi, patojenlere karşı savunma,

bağışıklık sistemini destekleme ve bağırsak sağlığını iyileştirme gibi önemli işlevleri vardır.<sup>68, 69</sup> Mikrobiyotanın:

**Metabolik olarak,**

- Sindirilemeyen gıda ve mukusun fermantasyonu,
- Kısa zincirli yağ asitlerinin SCFA sindirimi ve emilimi(asetat, propiyonat ve bütirat vb.),
- Safra asitlerinin konjugasyonu,
- K vitamini, folik asit sentezi
- İlaç metabolizması,
- Arginin, glutamin sentezi,
- Kalsiyum, magnezyum ve demir emilimi,
- Bazı küçük aminler (TMA) ve endotoksin üretimi,<sup>68, 71, 72</sup>

**Trofik olarak,**

- Epitelyal hücre proliferasyonu ve farklılaşması,
- İmmün sistem gelişiminin ve hemostazının kontrolü,

**Koruyucu olarak,**

- Patojenlere karşı koruma, bariyer etkisi (yerleşik bakteriler, eksojen mikroplar tarafından kolonizasyona karşı çok önemli bir direnç hattı oluşturur) görevleri vardır.<sup>68</sup>

Bağırsak mikrobiyotasının bileşimindeki ve işlevselliğindeki değişiklik ve dengesizlikle karakterize duruma bağırsak disbiyozu denir. Disbiyozda faydalı ve değerli mikroorganizmaların kaybı, genel çeşitlilik azalması ve kan bağırsak bariyerinin bozulması ve geçirgenlik artışı olur.<sup>73, 74</sup> Sigara, alkol, beslenme alışkanlıkları, yaşam tarzı, genetik ve çevresel faktörler, su ve gıda sanitasyonu disbiyoza neden olabilir. Oluşan mikrobiyal dengesizlik sonucu bazı bakteri grupları ve türlerinde artış olabilir.

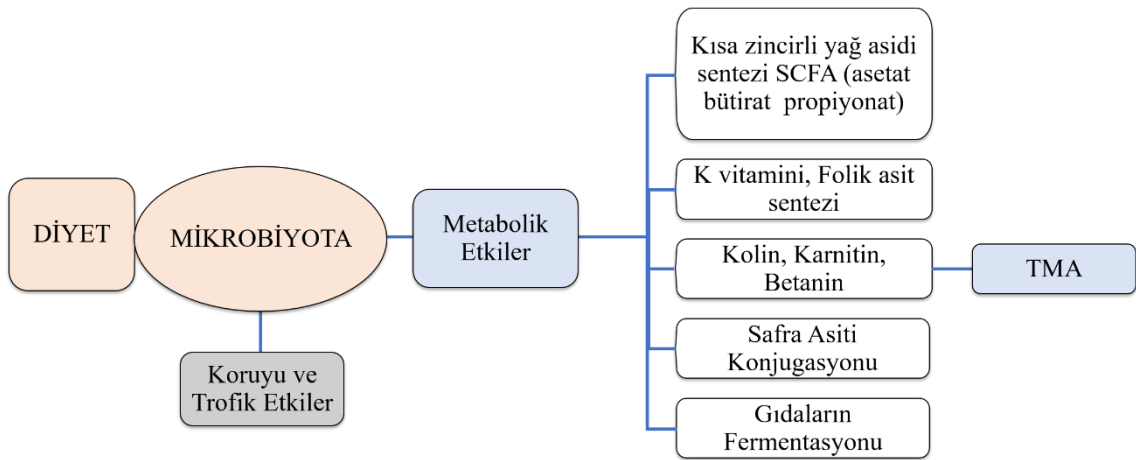
Bakteriyofajlar, enfeksiyonlar, antibiyotik ve ksenobiyotikler mikrobiyal çeşitliliğin azalmasına ve mikrobiyota fonksiyonunun etkilenmesine neden olurlar.<sup>74</sup>

Bununla birlikte, bağırsak disbiyozunda yer alan bakteriyel cins tanımlaması belirsizliğini korumaktadır.<sup>75</sup> Bazı araştırmalar bağırsak disbiyozunun p-kresil sülfat, indoksil sülfat, indol-3-asetik asit ve trimetilamin (TMA) gibi metabolit üreten bakterilerin artmasına neden olabileceğini bildirmiştir.<sup>76, 77</sup>

Mikrobiyota, obezite, insülin direnci, Tip 2 DM, metabolik sendrom, irritabl bağırsak sendromu, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, safra kesesi hastalıkları, kolon kanseri, kardiyak ve koroner hastalıklar, ateroskleroz, ruhsal hastalıklarla ilişkilendirilmiştir.<sup>68, 78, 79</sup>

Mikrobiyotanın Toll Like Reseptör 5 (TLR 5) üzerinden etkileşimi ile insülin direnci, metabolik sendrom ve obezite gelişimine katkısını tanımlayan çalışmalar mevcuttur. Mikrobiyota için benzer şekilde TMA-TMAO üzerinden; endotel disfonksiyonu, ateroskleroz, koroner sendromlar, hiperlipidemi, DM, obezite, insülin direnci, metabolik sendrom, kanser, böbrek yetmezliği vb. durumlarla ilişkisine dair geniş literatür oluşmuştur.<sup>60, 80</sup>

Mikrobiyotanın bazı metabolik etkileri Şekil 2.7’de özetlenmiştir.<sup>68, 81</sup>



Şekil 2.7. Mikrobiyota Bazı Görevleri

## 2.6. Trimetil Amin-n-Oksit (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>NO ( TMAO)

Trimetilamin N -oksit (TMAO), moleküler kütlesi 75.1 dalton olan amin oksitler sınıfında küçük organik bir bileşiktir.

Trimetilamin N-oksit (TMAO), gıda endüstrisinde deniz ürünlerin kalitelendirilmesinde, ürünlerin tazeliğinin tespitinde kullanılırken, insan sağlığı ile ilgilenen bilim insanlarının ilgisini çekmiş ve araştırmalara konu olmuştur. Daha önce gıda endüstrisinde çalışanlar, balıkların tazeliğini kokularından faydalanarak yapıyorlarmış. Bu sübjektif testi daha ölçülebilir yapmak için amonyağımsı, çürük balık kokusunu veren maddeyi bulup ölçmenin daha objektif, standartize ve kantitatif olacağından hareketle önce bu kokuyu veren TMA' yı keşfedip, sonra da miktarını ölçen yöntemler geliştirdiler. Deniz canlıları ve balıkların basınç ve ürenin denatüre edici etkilerine karşı koyabilmek için dokularında biriktirdikleri TMAO' nun çeşitli bakteriler tarafından deokside-redükte edilmesiyle kokulu TMA serbestleşir, Uçucudur ve rahatsız edici bilindik çürümüş balık kokusuna neden olur.<sup>82-84</sup> Bu kokuyu sağlayan TMA' nın burun epitelinde Trace Amine-Associated Receptor 2 ve 5 (TAAR 2,5) diye özel reseptörleri bulunmaktadır. TMA bu reseptörlerin tam agonistidir, kehribar ise antagonistidir.<sup>85</sup> TAAR 5'in sosyal kokularla ilgili olduğu, serotonin ve dopamin üzerinden nöropsikiyatrik olaylarla ilişkili olduğu ve hematolojik hücreler üzerinde ozmotik frajiliteyi artırma yönünde pozitif korelasyon gösterdiği ifade edilmektedir.<sup>85</sup>

Yüksek hidrostatik basınç koşulları altında, su moleküllerinin protein içine nüfuz etmesi ve protein yapısal geçişine yol açması iyi bilinen bir olgudur.<sup>80</sup>

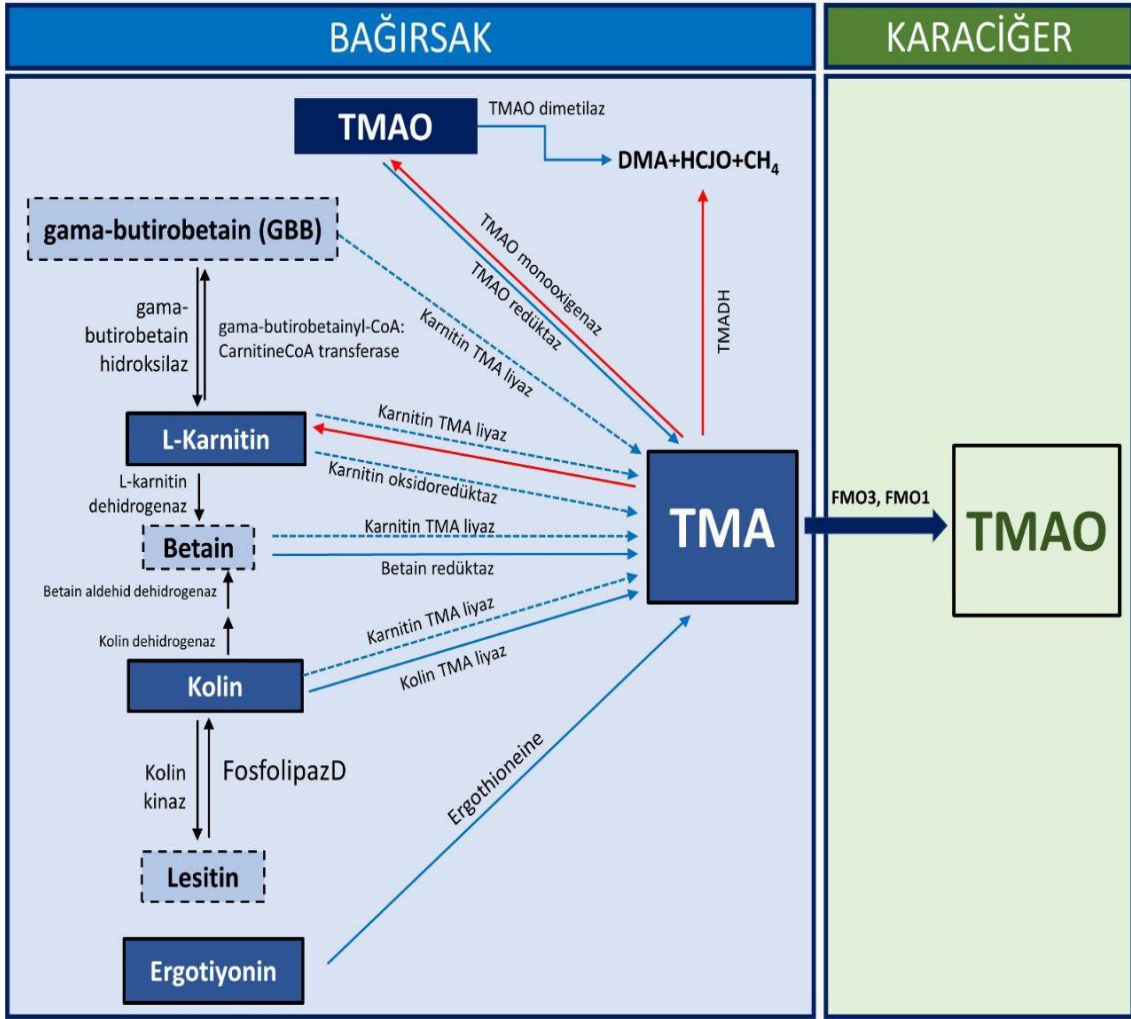
Birçok organizma, belirli fiziksel streslere yanıt olarak; şaperonlar, ısı şok proteinlerini ya da uyumlu ve karşı etkili telafi edici çözünenler, kimyasal şaperonlar olarak adlandırılan belirli küçük organik molekülleri biriktirir.<sup>82, 86, 87</sup>

TMAO deniz canlılarının dokularında yüksek konsantrasyonlarda birikir. TMAO renksiz ve kokusuzdur. Derin deniz hayvanlarının TMAO biriktirmesinin nedeni olarak, proteinleri yüksek hidrostatik basıncın ve ürenin denatüre edici etkilerinden korumak için olduğu öne sürülmüştür.<sup>86, 88</sup> TMAO deniz canlılarında protein katlanmasını ve ligand bağlanmasını artırabilir. Proteinler TMAO' nun yardımıyla ürenin, inorganik iyonların ve hidrostatik basıncın etkisi ile bozulmalara karşı koyabilirler.<sup>84, 86-88</sup>

TMAO' nun su hidrojen bağı yapısını nisbeten daha güçlendirdiği, üre-su arasındaki hidrojen bağlarının gevşemesini azalttığı, suyu peptit omurgalarından hariç tutarak protein katlanmasını ve stabilitesini, dolayısıyla tersiyer yapıyı desteklediği, üre ve sıcaklık gibi denge bozuculara karşı koyduğu, derinlikle doğrusal artışla biriktiği gösterilmiştir. TMAO' nun suda çözülmesi, sudaki hidrojen bağı ağını nispeten daha güçlü hale getirir ve üre-su hidrojen bağlarının gevşemesini azaltır.<sup>60, 86, 88-92</sup>

Sığ yaşayan canlı türleri için de; ozmoregülasyon için biriken yüksek üre seviyelerinin istikrarsızlaştırıcı etkilerine karşı koymak için TMAO seviyelerinin yükseltildiği köpekbalıklarında gösterilmiştir.<sup>84, 90</sup> TMAO' nun laboratuvar ortamlarında da proteinler üzerinde basınç etkilerini kısmen veya tamamen önleyebildiği deneysel olarak gösterilmiştir.<sup>93</sup> Trimetilamin N-oksit (TMAO), hücre içi bileşenleri yıkıcı stres koşullarına karşı koruyan, doğal olarak oluşan bir ozmolittir. Çalışmalar özellikle, TMAO' nun protein stabilitesini artırabildiğini ve denatüre edici etkilere karşı koyabildiğini göstermiştir.<sup>84, 87, 88, 92</sup>

TMA memeli mikrobiyotasında kolin, karnitin ve betaninden sentezlenmekte ve sonrasında emilip portal ven yoluyla karaciğere gelip FMO3 tarafından TMAO' ya oksitlenmektedir. Bu yol ana sentez ve emilim yolağı olarak kabul görmüştür. Mevcut başka sentez yolları şekilde Şekil'de gösterilmiştir.<sup>79, 80, 89</sup>



Şekil 2.8. TMAO Sentez Yolakları

Kırmızı et, yumurta, süt ürünleri ve tuzlu su balıkları kolin, lesitin ve karnitin bakımından zengindir, dolayısıyla TMAO kaynağıdır.<sup>83</sup> Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalar deniz ürünlerinin direkt TMAO kaynağı olduğu yönündedir.<sup>94,95</sup>

Bağırsak mikrobiyotasının probiyotikler, prebiyotikler, antibiyotikler ve fekal transplantasyon kullanılarak modülasyonu, TMA sentezini azaltabilir. Üzüm ve meyve çekirdeklerinde bulunan prebiyotik etkiye sahip doğal bir polifenol olan Resveratrol ya da kolinin yapısal analogu olan 3-dimetil-1-butanol (DMB) mikrobiyal enzimleri inhibe ederek TMA oluşumunu engeller, sonuç olarak TMAO da azalır.<sup>78,81</sup> TMA ve TMAO

her ikisi de esas olarak üriner sistemden idrar ile itrah edilerek, %4' ü dışkıyla ve %1' den azı ise nefes ve ter gibi yollarla vücuttan uzaklaştırılır.<sup>96-99</sup>

TMAO'nun ateroskleroz, platelet agregasyonu, makrofaj aktivasyonu, inflamasyon gibi mekanizmalarda aktif roller oynadığı ve yüksek bulunduğu, koroner ve vasküler sendromlara neden olduğunu gösteren yayınlar mevcut olsa da; son yıllardaki çalışmalar bu durumun tersine de olabileceği şeklindedir. Bu zararlı etkilere TMA'nın neden olduğu, TMAO'nun yüksek bulunmasının bu patolojik durumlara neden olmadığı, tam tersine sonuç olarak yükselen protektif bir mekanizma olduğu yönündedir.<sup>79, 96, 100</sup> Son çalışmalarda, TMA'nın kalp damar hastalıklarının ilerlemesinde rolü olabileceği varsayılmıştır ve TMA'nın sitotoksik etkileri tariflenmiştir.<sup>101</sup> TMA'yı kalsiyum kanalları üzerinden hipertansiyonla, TMAO'yı ise hipotansiyon ile ilişkilendiren, TMAO'nun kardiyak diyastolik fonksiyonları ve kardiyak fibrozisi düzelttiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.<sup>101, 102</sup>

TMAO'nun metabolik etkileri de mevcuttur. Molekülü diyabetle ilişkilendiren mevcut çalışmalara karşın TMAO'nun yağ dokuda ER stresini, lipogenezi ve adipogenezi azalttığını, izole pankreas beta adacık hücrelerinden insülin sekresyonunu doğrudan artırdığını ve diyet ilişkili bozulmuş glukoz toleransını düzelttiğini, glukoz dengesini sağladığını belirten araştırma sonuçları mevcuttur.<sup>103-106</sup> Ayrıca TMAO'nun diyabetik sıçanlarda cilt içi myelin örtü kaybını ve oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.<sup>22</sup>

TMAO, periferik nöropatide kilit rolü olan ER stresinin önlenmesinde. bir gösterge olarak kabul edilen katlanmamış protein stresinin (UPR) başlamasını engellediği gösterilmiştir.<sup>22</sup> . Son dekadtaki deneysel çalışmalar ER stresinin engellenmesinin DM'de nöropatinin yanında nefropati, retinopati gibi diyabet komplikasyonlarındaki koruyucu

rolüne işaret etmektedir.<sup>107, 108</sup> Yüksek TMAO seviyelerine ilişkin farklı bir bakış ise, TMAO' nun yalnızca işlev bozuklukları için bir belirteç olabileceği şeklindedir.<sup>109</sup>



### 3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için gerekli izinler 01.10.2020 tarihinde Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı. Diyabetik ayak kliniğine diyabetik ayak ülseri nedeni ile; diğer poliklinik ve servislere ise çeşitli rahatsızlıkları veya kontrolleri amacıyla gelen hastaların antekubital bölgelerinden, vacutainer aracılığı rutin tetkikleri yapılmak üzere, jelli propilen tüplere kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin pıhtılaşması için 20 dakika beklendikten sonra 3000 rpm de 10 dakika santrifüj edildi. Hastaların rutin tetkikleri çalışıldıktan sonra arta kalan serum örnekleri eppendorf tüplere porsiyonlandı ve çalışma gününe kadar -80°C de muhafaza edildi. Çalışma günü donmuş serum örnekleri oda ısısında bekletilerek, donun çözülmesi ve ortam sıcaklığına gelmesi beklendi. Daha sonra

FMO3: Analizler için MyBioSource marka, ( katalog No:MBS1606101 ) kiti kullanılarak RT-2600Microplate Washer (India) yıkayıcısı ve BMG LABTECH (German) Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) okuyucusu aracılığı ile kit prospektüsündeki çalışma protokollerine uyularak analizler gerçekleştirildi.

FMO3 için ölçüm birimi ng/L olarak kabul edilmiştir,

TMAO Ölçümü;

Döteryumlu Trimetilamin-N-oksit (d9-TMAO), Cambridge Isotope Laboratories'den (Catalog: DLM-4779-1) satın alındı. Diğer tüm reaktifler, Sigma-Aldrich den satın alındı.

Çalışma, Liam M. Heaney ve arkadaşlarının çalışması modifiye edilerek gerçekleştirildi. Çalışmada Q1 ve Q3 olarak TMAO için sırası ile en fragmanlar olan 59-76, d9-TMAO için ise 68-85 seçildi.<sup>110</sup> (Heaney, LM; Jones, DJL; (...); Suzuki, T. High mass accuracy assay for trimethylamine N-oxide using stable-isotope dilution with liquid chromatography coupled to orthogonal acceleration time of flight mass spectrometry with

multiple reaction monitoring. ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY  
Jan 2016 408 (3) , pp.797-804).

Analizler için önceden hazırlanmış plazma örnekleri oda ısısında çözdürüldükten sonra Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) cihazında Phenomenex Luna (50x4.6mm, 5 $\mu$ ) C18 HPLC kolon kullanılarak Turbo Ion ElektroSpray (ESI) kaynaklı pozitif modda çalışıldı. Analiz sırasında iki mobil faz kullanıldı. A pompasında %0,1'lik formik asit içeren Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) grade su, B pompasında %0,1'lik formik asit içeren metanol akışı ile gradient oluşturuldu. Akış hızı 1mL/dakika ve çalışma süresi ise 5 dakikadır.

Serum örnekleri ependorf tüplere 250  $\mu$ L olacak şekilde pipetlendi. Üzerine TMAO' nun izotopu olan, d9 dan 100  $\mu$ L internal standart olarak eklendi. Serumdan proteinleri ayırıştırmak için denatürasyon işlemi yapıldı. Bunun için d9 izotop eklenmiş örneğe 1000  $\mu$ L alkol ilave edildi. Alkol ilave edildikten sonra numuneler önce 30 saniye vortekslenip daha sonra santrifüj edildi. Daha sonra tüplerden süpernatant kısmı alınarak başka tüplere 250  $\mu$ L distile su ilave edilerek vortekslendi. Çözünen numuneler HPLC viallere konarak, viallerin kapakları kapatıldı ve otomatik numune kabına yerleştirilerek analiz için HPLC aracılığı cihaza enjekte edildi. Enjeksiyon hacmi 20ml olarak ayarlandı. Sonuçlar, LC-MS/MS cihazının Analiz yazılım programından elde edildi.

### **3.1. İstatistiksel Analiz**

Tüm istatistiksel analizler R version 3.6.0 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.r-project.org>) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Verilerin normalliğini kontrol etmek için Shapiro-Wilk'in normallik testi ve Q-Q grafikleri, grup varyanslarının homojenliğini değerlendirmek için ise Levene'nin varyans homojenlik testi kullanıldı. Normal dağılıma uygun olduğu belirlenen

parametrelerin tanımlayıcı istatistikleri ortalama  $\pm$  standart sapma, normal dağılıma uygun olmayanları ise medyan değerleri çeyreklikler arası genişlik (IQR, interquartile range: 25.persantil – 75.persantil) ile birlikte sunuldu. Hastaların yaşları ve değerlerinin çalışma gruplarına göre kıyasında Tek Yönlü Varyans analizi (One-Way ANOVA) kullanılırken, bu parametrelerin gruplar arasında ikili karşılaştırılmasında Tukey HSD post-hoc testinden yararlanıldı. Öte yandan, HbA1c, TMAO, FMO-3, ÜRE ve BUN parametrelerine göre gruplar arasında anlamlı bir fark olup olmadığı ise Kruskal Wallis testi ile incelendi ve ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmiş Dunn testi uygulandı. Her bir çalışma grubunda TMAO ile FMO3 parametrelerinin yaş, HbA1c, ÜRE ve BUN değerleri ile aralarındaki ilişkiler Spearman'ın rho korelasyon katsayısı ile incelendi. İstatistiksel hipotezler için anlam seviyesi %5 (0.05) alındı.

## 4. BULGULAR

**Tablo 4.1.** Sağlıklı Kontrollere Ait Sonuçlar

Sağlıklı Kontrol Grubu						
N. No	Yaş	HbA1c	TMAO	FMO3	Üre	BUN
1	52	5.2	296	2579.7	29.9	13.8
2	60	5.2	104	1738.2	48.5	22.7
3	60	5.2	93.2	1251.7	33	15.4
4	65	5.5	310	1893.5	20.9	9.8
5	51	5.9	53.9	2231.5	20.5	9.6
6	76	5.6	227	1388.7	31	14.5
7	73	5.7	286	2424.4	39	18.2
8	51	5.9	313	2188.1	23.5	11
9	56	5.6	151	2370.8	28.4	13.3
10	55	5.6	280	1297.4	35.9	16.8
11	56	5.7	969	1718.7	26.9	12.6
12	77	5.8	538	340.5	29	13.5
13	63	5.9	228	152.1	34.2	16
14	55	5.1	46.8	128.1	26	12.1
15	58	5.6	198	348.5	41.5	19.4
16	66	5.3	168	170.3	27.8	13
17	67	5.7	439	391.9	29.5	13.8
18	67	5.3	156	501.5	26.3	12.3
19	58	5.7	135	371.3	36.8	17.2
21	58	5.7	84.7	72.1	40.8	19.1
22	61	5.4	134	560.9	36	16.8
23	57	5.9	816	2133.3	33.8	15.8
24	55	5.1	194	120.1	24	11.2
25	59	5	426	453.5	44	20.5
26	61	5.4	19.4	453.8	31	14.4
27	56	5.1	241	132.6	30	14
28	51	5.8	165	156.6	37.8	17.7
29	54	5.7	82.7	120.1	28	14.4
30	58	5.1	139	423.8	19	8.8
31	58	5.6	450	665.9	22	10.2

**Tablo 4.2.** Diyabetik Kontrol Grubuna Ait Sonuçlar

<b>Diyabetik Kontrol Grubu</b>						
<b>N. No</b>	<b>Yaş</b>	<b>HbA1c</b>	<b>TMAO</b>	<b>FMO3</b>	<b>Üre</b>	<b>BUN</b>
1	65	10.3	234	1228.9	24	11.2
2	69	13.2	305	1127.2	58.6	27.5
3	68	10.1	1640	1090.7	48	22.4
4	68	10.1	322	1204.9	22	10.2
5	76	10.2	248	981.1	20	9.3
6	67	10.6	198	1275.7	83	38.7
7	64	7.4	293	1851.2	42	19.6
8	59	10.9	218	1814.7	50	23.4
9	59	11.4	713	1294	41	19.4
10	65	11.4	403	1272.3	50	23.1
11	60	8.2	436	1335.1	22	10.2
12	56	13.1	268	1228.9	33	14.9
13	71	10	168	838.3	53	24
14	62	9.6	207	958.2	23.5	11
15	66	10.4	345	2524.9	51	23.8
16	61	7.7	291	751.6	44	20.5
17	56	8	215	439.8	23	10.7
18	51	8.9	32	676.2	40	18.7
19	57	9	29.6	930.8	29	13.5
20	50	8.4	198	750.4	27.6	12.9
21	57	11.3	347	914.9	35	16.6
22	56	12.1	13.2	308.5	50	23.3
23	58	9.8	294	430.9	65	30
24	58	11.2	204	480.9	21.6	10
25	52	12.3	183	1702.8	32	15.1
26	67	10.8	265	373.6	38	17.7
27	65	10.2	313	449	78	36.4
28	67	7.5	881	332.5	34	16.2
29	51	7.6	22	211.4	27	12.6
30	61	9.7	1580	192	46	21.5

**Tablo 4.3.** Diyabetik Ayaklı Kontrol Grubuna Ait Sonuçlar

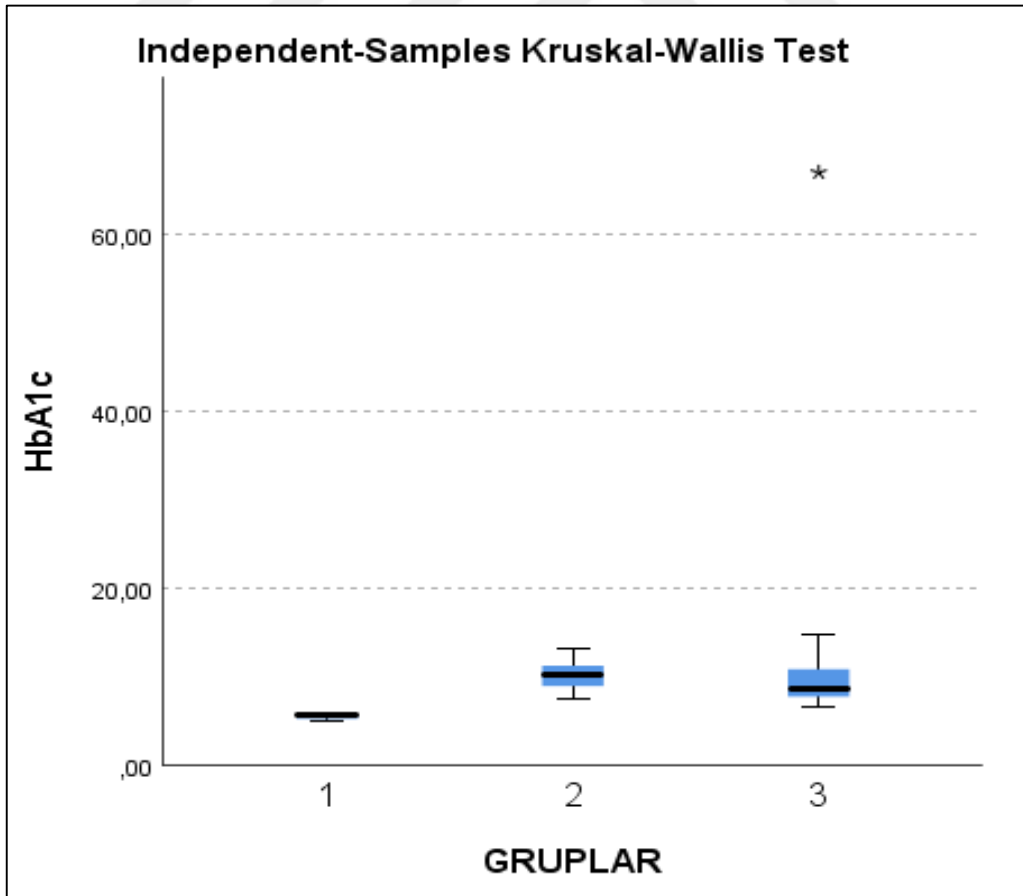
Diyabetik Ayaklı Hasta Grubu						
N. No	Yaş	HbA1c	TMAO	FMO3	Üre	BUN
1	65	14.7	153	133.8	49	22.9
2	51	8.9	941	64.1	36	16.8
3	78	8.6	17.7	66.4	33	15.4
4	62	7.6	316	85.8	95	44.3
5	71	6.6	58.2	117.8	43	20
6	62	9.1	235	439.8	94	43.9
7	56	10.6	104	165.8	19	8.8
8	59	8	410	252.5	40	18.6
9	67	12.7	251	152.1	36	16.8
10	55	8.9	906	161.2	120	56
11	61	6.7	545	1152.4	50	24.3
12	65	11.1	22.4	129.2	57	26.6
13	54	13.3	207	126.9	94	43
14	73	8.6	32.8	208	31	14.5
15	72	11.6	162	61.9	142	36.3
16	56	10.7	914	1916.3	72	33.6
17	60	8.7	6.85	2155	47	22.9
18	57	8	239	249.1	30	14
19	68	11.5	42.1	172.6	64	29.9
20	63	6.8	56.7	120.1	29	13.5
21	61	8.4	155	511.8	64	29.9
22	65	10.8	570	205.7	65	30
23	81	6.7	835	213.7	61	28.5
24	68	7	4080	168	81	37.8
25	73	10.5	1690	146.4	108	50.4
26	80	7.7	83.8	124.7	82	40.6
27	85	7.3	164	195.5	25	11.6
28	68	8.5	462	366.7	87	40.6
29	74	7.8	577	206.9	95	44.3
30	76	7.3	419	1083.9	37	17.2

#### 4.1. Sonuçlar

Çalışmaya 50 ile 85 yaşları ( $62.47 \pm 7.84$ ) arasında toplam 90 kişi dahil edildi. Bu 90 kişinin 30'u sağlıklı kontrol grubunu, 30'u diyabetli kontrol grubunu ve 30'u diyabetik ayaklı hasta grubunu oluşturdu.

Çalışma gruplarına göre parametrelerin kıyası Tablo. 4. 4 'de verildi. Elde edilen bulgulara göre, çalışma gruplarına göre katılımcıların yaşları arasında anlamlı bir farklılık vardı ( $F=6.03$ ,  $p=.004$ ). Tukey HSD çoklu karşılaştırma testi sonucuna göre, diyabetik ayaklı hasta grubunun yaş ortalaması ( $66.20 \pm 8.73$ ) diyabetli kontrollerden ( $61.40 \pm 6.46$ ,  $p=.037$ ) ve sağlıklı kontrollerden ( $59.80 \pm 6.90$ ,  $p=.004$ ) anlamlı şekilde yüksekken, diyabetli hastalar ile sağlıklı kontrollerin yaş ortalamaları benzerdi ( $p=.683$ ).

Kruskal Wallis testine göre, çalışma gruplarının HbA1c değerleri farklılık göstermekteydi ( $\chi^2=61.08$ ,  $p<.001$ ). Bonferroni düzeltilmeli Dunn çoklu karşılaştırma testine göre, Diyabetik ayaklı hasta ( $8.6$  [IQR,  $7.62 - 10.67$ ],  $p<.001$ ) ve diyabetli kontrol ( $10.15$  [IQR,  $8.93 - 11.12$ ],  $p<.001$ ) grubunda HbA1c değerleri sağlıklı kontrol ( $5.6$  [IQR,  $5.23 - 5.7$ ]) grubuna kıyasla anlamlı şekilde yüksekti, fakat diyabetik ayaklı hasta ve diyabetli kontrol grubunda benzerdi ( $p=.581$ ).



Şekil 4.1. Gruplar arası HbA1c ilişkisi

Kruskal Wallis testine göre, çalışma gruplarının TMAO ( $\chi^2=3.27$ ,  $p=.195$ , Şekil 4. 1) ve K ( $\chi^2=4.12$ ,  $p=.121$ ) değerleri benzerdi.

Kruskal Wallis testine göre, çalışma gruplarının FMO3 değerleri farklılık göstermekteydi ( $\chi^2=9.64$ ,  $p=.008$ ). Bonferroni düzeltilmeli Dunn çoklu karşılaştırma testine göre, Diyabetik ayaklı hastaların FMO3 medyanı diyabetli hastalardan anlamlı şekilde düşüktü (206.3 [IQR, 164.52 – 799.58] vs. 751 [IQR, 456.98 – 975.38],  $p=.008$ ) (Şekil 4. 3).

Kruskal Wallis testine göre, çalışma gruplarının ÜRE değerleri farklılık göstermekteydi ( $\chi^2=23.04$ ,  $p<.001$ ). Bonferroni düzeltilmeli Dunn çoklu karşılaştırma testine göre, diyabetik ayaklı hasta grubunun ÜRE medyanı (59 [IQR, 36.25 – 85.75]) diyabetli kontrollerden (39 [IQR, 27.15 – 50],  $p=.017$ ) ve sağlıklı kontrollerden (29.95 [IQR, 26.45 – 35.98],  $p<.001$ ) anlamlı şekilde yüksekti.

Kruskal Wallis testine göre, çalışma gruplarının BUN değerleri farklılık göstermekteydi ( $\chi^2=23.00$ ,  $p<.001$ ). Bonferroni düzeltilmeli Dunn çoklu karşılaştırma testine göre, diyabetik ayaklı hasta grubunun BUN medyanı (27.55 [IQR, 16.9 – 39.9]) diyabetli kontrollerden (18.2 [IQR, 12.67 – 23.25],  $p=.015$ ) ve sağlıklı kontrollerden (14.2 [IQR, 12.38 – 16.8],  $p<.001$ ) anlamlı şekilde yüksekken, diyabetli kontroller ile sağlıklı kontrollerin BUN değerleri benzerdi ( $p=.148$ ).

**Tablo 4.4.** Çalışma Gruplarına Göre Parametrelerin Karşılaştırılması

Parametre	Çalışma Grupları	Ort. ± SS / Medyan [IQR]	p- değeri	Çoklu Karşılaştırmalar		
				K- DM	K- DA	DM- DA
Yaş (yıl)	Kontrol (n=30)	59.80 ± 6.90	.004 <sup>1</sup>	.683	.004	.037
	DM (n=30)	61.40 ± 6.46				
	Diyabetik ayak (n=30)	66.20 ± 8.73				
HbA1c	Kontrol (n=30)	5.6 [5.23 – 5.7]	<.001 <sup>2</sup>	<.001	<.001	.581
	DM (n=30)	10.15 [8.93 – 11.12]				
	Diyabetik ayak (n=30)	8.6 [7.62 – 10.67]				
TMAO	Kontrol (n=30)	166.5 [111.5 – 284.5]	.195 <sup>2</sup>	.213	.991	>.999
	DM (n=30)	241 [198 – 311]				
	Diyabetik ayak (n=30)	215.5 [116.25 – 407.5]				
FMO3	Kontrol (n=30)	477.65 [212.85 – 1352.45]	.008 <sup>2</sup>	>.999	.097	.008
	DM (n=30)	751 [456.98 – 975.38]				
	Diyabetik ayak (n=30)	206.3 [164.52 – 799.58]				
Üre	Kontrol (n=30)	29.95 [26.45 – 35.98]	<.001 <sup>2</sup>	.135	<.001	.017
	DM (n=30)	39 [27.15 – 50]				
	Diyabetik ayak (n=30)	59 [36.25 – 85.75]				
BUN	Kontrol (n=30)	14.2 [12.38 – 16.8]	<.001 <sup>2</sup>	.148	<.001	.015
	DM (n=30)	18.2 [12.67 – 23.25]				
	Diyabetik ayak (n=30)	27.55 [16.9 – 39.9]				

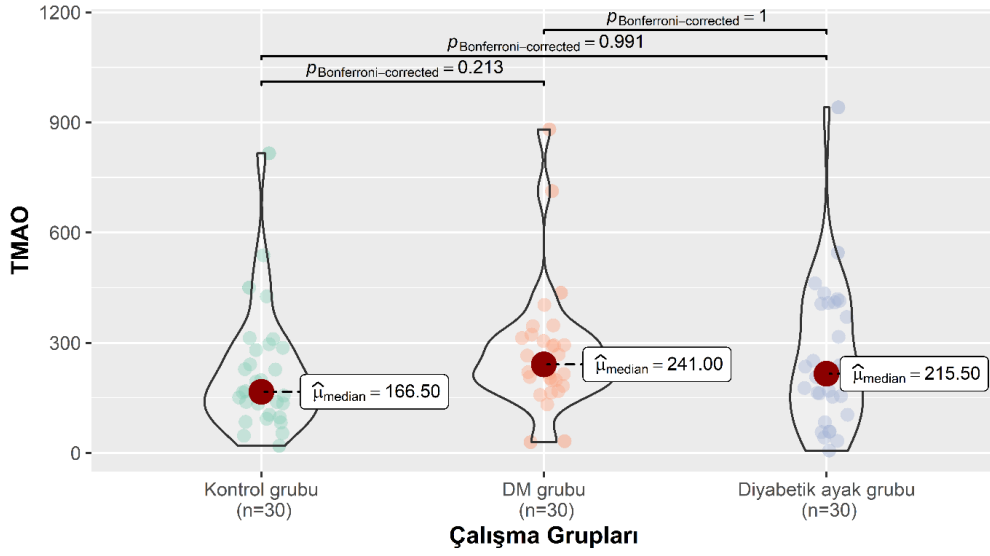
Veriler ortalama ± standart sapma veya medyan (çeyreklikler arası genişlik: 25.persantil – 75.persantil) olarak sunuldu.  $p < .05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

<sup>1</sup> Tek Yönlü Varyans Analizi, çoklu karşılaştırmalar için Tukey HSD testi

<sup>2</sup> Kruskal Wallis testi, çoklu karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltilmeli Dunn testi

### Çalışma gruplarına göre TMAO'nun dağılımı

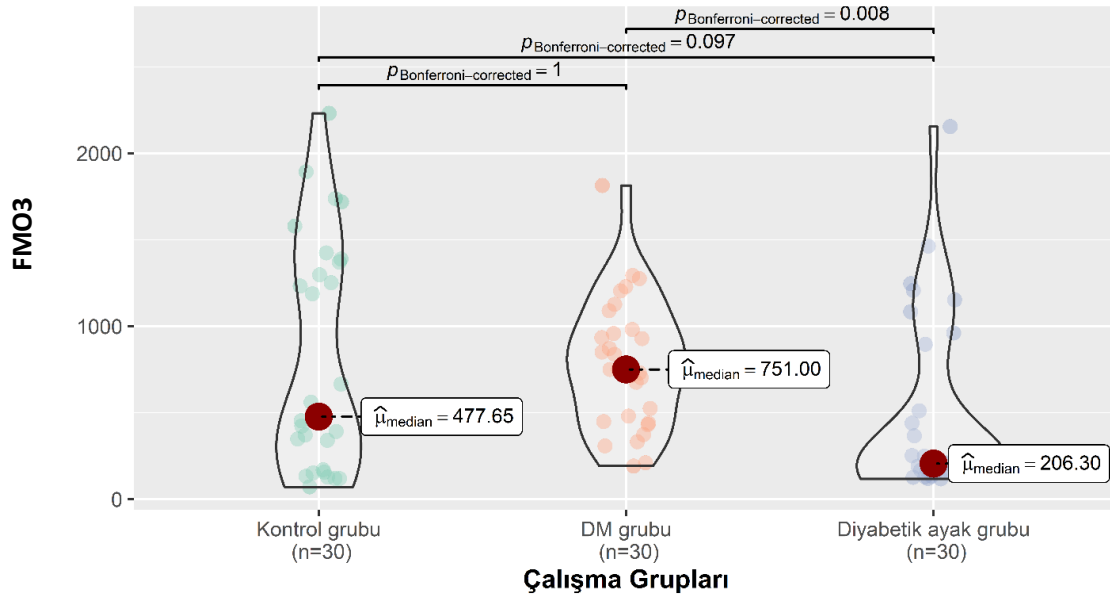
$\chi^2_{\text{Kruskal-Wallis}}(2) = 3.27, p = 0.195, \hat{\epsilon}^2_{\text{ordinal}} = 0.04, CI_{95\%} [7.39e-03, 0.14], n_{\text{obs}} = 90$



Pairwise test: **Dunn test**; Comparisons shown: **all**

Şekil 4.2. TMAO parametresinin gruplara göre dağılımını gösteren Violin grafiği

$\chi^2_{\text{Kruskal-Wallis}}(2) = 9.64, p = 0.008, \hat{\epsilon}^2_{\text{ordinal}} = 0.11, CI_{95\%} [0.04, 0.27], n_{\text{obs}} = 90$



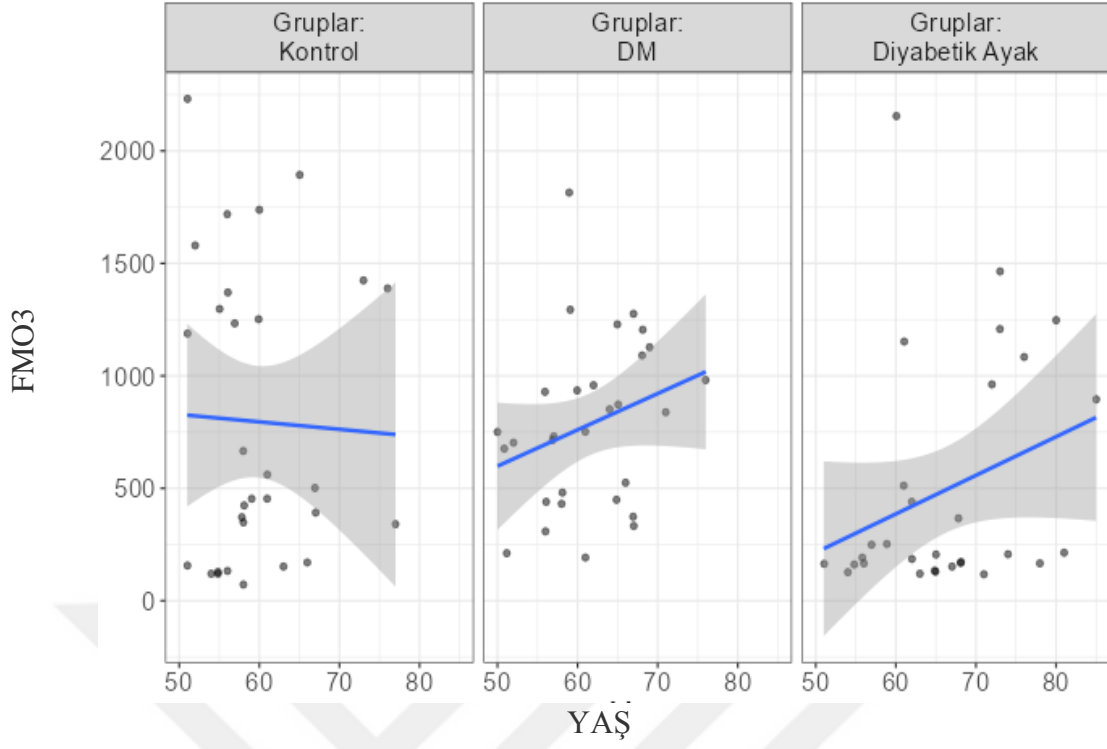
Pairwise test: **Dunn test**; Comparisons shown: **all**

Şekil 4.3. FMO-3 parametresinin gruplara göre dağılımını gösteren Violin grafiği

Her bir çalışma grubunda TMAO ve FMO3 ile yaş, HbA1c, Üre ve BUN değerleri ile arasındaki Spearman'ın rho korelasyon katsayısı Tablo.4. 5' de verildi. Elde edilen sonuçlara göre, sadece diyabetli kontrollerde yaş ve FMO3 arasında pozitif ve anlamlı bir ilişkinin varlığı saptandı (Spearman rho=0.376,  $p=.040$ ) (Şekil 4. 3). TMAO ve FMO3 ile diğer parametreler arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.5.** Çalışma Gruplarına Göre HbA1c ile TMAO ve FMO3 Arasındaki İlişki

Çalışma Grupları	TMAO		FMO3	
	Spearman rho	p	Spearman rho	p
Yaş (yıl)				
Kontrol (n=30)	0.141	.457	0.064	.737
DM (n=30)	0.296	.113	0.376	.040
Diyabetik ayak (n=30)	-0.233	.215	0.319	.086
HbA1c				
Kontrol (n=30)	0.119	.531	0.079	.679
DM (n=30)	0.067	.726	0.276	.140
Diyabetik ayak (n=30)	-0.133	.484	-0.214	.255
Üre				
Kontrol (n=30)	0.028	.885	-0.091	.634
DM (n=30)	0.021	.913	-0.022	.907
Diyabetik ayak (n=30)	0.135	.477	0.147	.437
BUN				
Kontrol (n=30)	-0.003	.989	-0.121	.524
DM (n=30)	0.010	.959	-0.021	.913
Diyabetik ayak (n=30)	0.152	.424	0.128	.499
FMO3				
Kontrol (n=30)	0.140	.461	0.140	.461
DM (n=30)	0.162	.394	0.162	.394
Diyabetik ayak (n=30)	-0.022	.910	-0.022	.910



Şekil 4.4. Çalışma gruplarına göre FMO3 ile yaş arasındaki saçılım grafiği

## 5. TARTIŞMA

Çalışmamız çift kontrol grubuyla yapıldı. Çalışmamıza dahil edilen diyabetik ayaklı hastaların örnek numuneleri diyabetik ayak servisinde yatan hastalardan sağlandı. Hastaların ilk yatış sırasında rutin tetkikler için alınan kan örneklerinden artan numuneler çalışma için kullanıldı. Kontrol gruplarına ait örnekler ise, çeşitli polikliniklere müracaat eden hastalardan rutin tetkikler yapıldıktan sonra, HbA1c'leri ve yaşları çalışmamıza uygun olanların, artan kan numuneleri zamana yayılarak toplandı. Türk Diyabet Vakfı'nın ve ADA'nın DM için kabul ettiği tanı kriterlerinden, HbA1c'nin % 6.5 lik eşik değeri gözetilerek DM hastası ve sağlıklı ayrımı yapıldı.<sup>3,5</sup> Toplanan numuneler -80°C de derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı. Grup ayrımında % 6.5 lik eşik değerinin altında ve aktif metabolik sıkıntısı olmayan 50 yaş üstü kişiler sağlıklı (diyabet hastası olmayan) kontrol grubunu oluşturdu. HbA1c değeri % 6.5 üstü olan ancak diyabetik yarası olmayan 50 yaş üstü hastalar DM'li kontrol grubunu, diyabetik ayak servisine başvuran % 6.5 üzeri HbA1c değerine sahip diyabetik ayak ülseri olan hastalar ise diyabetik ayaklı hasta grubunu oluşturdu.

Ksenobiyotik detoksifikasyonu, ilaç metabolizması gibi önemli rolleri olan FMO3'ün ve ürünlerinden araştırmacıların en çok ilgisini çeken TMAO'nun gruplar arasında varsa anlamlı farkını ve akabinde de olası moleküler mekanizmalarını açıklamayı amaçladık. Araştırmalarımızda TMAO, FMO3 ve mikrobiyota aksı ve muhtemel metabolik etkileri ile ilgili bilimsel literatür, başta DM ve çeşitli hastalıklar özelinde kısmen geniş olsa da, diyabet komplikasyonları alanında oldukça sınırlı idi. TMAO ile ilgili aterosklerozdan, akut/kronik koroner sendromlar, metabolik olaylar, nefropati, dislipidemi, ve osmoregülasyona kadar gibi geniş bir literatür oluşmuştur.<sup>80</sup> Bu yaygın veri ve bilgi birikimi TMAO ve öncülü TMA için de benzerdir ve yer yer keşşmektedir. Güncel yayınlarda organizmaya zararlı etkilerden TMA sorumlu

tutulurken, FMO3'ün detoksifiye ettiği TMAO' nun koruyucu etkilerinden bahsedilmeye başlanılmıştır.<sup>60, 100, 111-113</sup> TMA TMAO ve FMO3 arasındaki ilişki nedeniyle FMO3' ü metabolik yolların merkezine koyan araştırma sayısı günden güne artmaktadır.<sup>65, 90, 114, 115</sup> Biz bu çalışmamızda mikrobiyotada kolin, karnitin ve betaninden bakteriler tarafından sentezlenen TMA' yı karaciğerde oksitleyen FMO3' ün ve son ürünü TMAO' nun diyabetik ayak patogenezinde olası etkilerini araştırdık. FMO3'ü, ELISA yöntemi ile TMAO' yu ise LC-MS/MS yöntemi ile ölçtük. ELISA yöntemi bilindiği üzere yaygın kullanılan temel immünolojik bir yöntemdir. LC-MS/MS ise günümüzde birçok analiz için altın standart yöntem olarak kabul edilir.<sup>116-118</sup> Analiz sonrası çıkan sonuçları uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirdik.

FMO3 diyabetik ayaklı hasta grubunda diğer kontrol ve diyabetik ayaklı hasta grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Ayrıca FMO3 DM' li kontrol grubunda yaşla pozitif korele çıktı. TMAO sonuçları ise gruplar arasında istatistiksel olarak farklı değildi.

Çalışmamızda TMAO' nun medyan değerlerini DM'li ve diyabetik ayaklı hasta grubunda, sağlıklı gruba göre yüksek bulmuş olsak da bu veriler istatistiksel olarak anlamlı değildi. (Şekil 1.) FMO3 ve TMAO arasında anlamlı bir korelasyon yoktu. Gruplar arasında TMAO' daki farkın anlamlı olmaması, FMO3 aktivitesi ile ilişkili olabilir.

Bazı klinik gözlem ve deneysel çalışmalar, yüksek TMAO seviyeleri ile artan Tip 2 DM riski arasında bir ilişkiyi desteklemektedir. Ancak bazı çalışmalardan çıkan sonuçlar, TMAO' nun diyabet oluşumuna katkı sağlamadığını ve hatta yüksek TMAO düzeyleri olan kişilerde bile Tip 2 DM gelişme riskinin düşüklüğünü göstermektedir.<sup>119</sup> Ayrıca TMAO' nun Tip 2 DM gelişimi ve hastalık süreci üzerindeki etkileri ve moleküler mekanizmaları ilgili çalışmalar kısıtlıdır.<sup>79</sup> TMAO' nun DM hastalık sürecine katılımı daha çok ER stresi ve UPR üzerinden tanımlanmaya çalışılmıştır.<sup>120</sup> Bizim çalışmamızda

TMAO medyanı DM' li grupta yüksek olarak bulunmuş olsa da tek başına ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Çalışmamızda FMO3 diyabetik ayaklı hasta grubunda istatistiksel olarak farklı ve düşük bulundu.(Şekil.4.2) FMO3 ekspresyonunun azalmasının, mikrobiyota-TMA-FMO3-TMAO yolağında TMA' nın plazmada fazlaca birikmesine neden olduğu çeşitli araştırmalarda gösterilmiştir.<sup>115</sup> Bu da diyabetik ayaklı hasta grubundaki FMO3 düşüklüğünü, TMA' nın plazma ve dokularda aşırı birikmesinin takip edeceğini düşündürür.<sup>77, 115, 121</sup> Öyle ki bu durum trimetilaminüri diye bilinen hastalığa da neden olur. Ayrıca FMO3'ün inhibisyonu, başta vasküler endotelial sistemde olmak üzere insan vücudunda çeşitli koruyucu etkileri ile bilinen HDL'nin kandaki seviyelerini, karaciğerdeki bir dizi yolağı etkileyerek düşürür.<sup>115</sup> TMA' yı aterosklerozla ilişkilendiren çok sayıda çalışma mevcuttur. TMA vazokonstrüksiyon yapar, vasküler düz kas harabiyeti ve hipertansiyon yapar.<sup>101, 112, 113</sup> TMA ayrıca hücre büzülmesine ve sitotoksiteye neden olur. Yaşlanma ile TMA' nın hem plazmadaki hem de kolondaki konsantrasyonu artar.<sup>113</sup> TMA' nın aksine, organizmalar TMAO' yu hücrelerinin osmotik regülasyonunu sağlamak ve basınç stresine karşı koruyucu bir cevap olarak biriktirirler.<sup>122</sup> Diyabetik nöropatide, gastroparezi ve disbiyoz sıkça oluşur ve disbiyozda TMA üretim ve emilimi artar. Nöropati intrinsik ayak kaslarını etkileyerek yeni anormal ayak anatomisine ve yüksek basınçlı ayak temas noktaları oluşuma neden olur. TMA' nın vaskülopatik ve sitotoksik etkilerine karşın, TMAO ve FMO3'ün proflaktik etkilerinin yeterince olmayışı beraber düşünüldüğünde, diyabetik ayak (basınç) ülserlerinin oluşması belki daha iyi anlaşılabilir.<sup>77</sup>

Uzun ve sağlıklı yaşam ile, lifçe ve omega yağ asitlerince zengin sebze ve deniz ürünleri temelli Akdeniz ve Uzakdoğu diyetlerinin eşleştirilmesi genel kabuldür. Deniz ürünleri TMAO açısından da zengindir ve serum konsantrasyonlarını direkt etkiler.<sup>95</sup>

Sağlıklı görünen 349 denekte TMAO plazma seviyeleri LC-MS/MS yöntemiyle ölçülmüş, cinsiyet farkı göstermeksizin medyan değer 3,45 µmol/L bulunmuştur.<sup>123</sup> Yapılan 694 örneklem büyüklüğündeki kapsamlı bir başka çalışmada LC-MS/MS yöntemiyle yapılan ölçümlerde, erkeklerde medyan TMAO plazma konsantrasyonu 3.91 µmol/L, kadınlarda ise 3.67 µmol/L bulunmuştur.<sup>117</sup> Yine 620 denekli Afro-Amerikalı erkeklerde yapılan çalışmada medyan değer 4.1 µmol/L bulunmuştur. Söz konusu 620 Afro-Amerikalı' da yapılan çalışmada, sağlıklı erkeklerde balık ve kabuklu deniz ürünleri dahil olmak üzere, düzenli deniz ürünleri tüketimiyle, dolaşımdaki plazma TMAO konsantrasyonları arasında güçlü pozitif ilişkili bulunmuştur.<sup>95</sup> Yine aynı çalışmada kırmızı et ve TMAO arasında zayıf ilişki, bitkisel beslenme ile ise negatif korelasyonlu ilişki bulunmuştur.<sup>95</sup> Aradaki fark ise, diyet, böbrek fonksiyonu, mikrobiyota çeşitliği, bağırsak geçirgenliği, FMO3 polimorfizmi, ırk ve cinsiyet farkıyla açıklanmıştır.<sup>116</sup> Bizim çalışmamızda cinsiyet ile ilişki bulamadık. Bizim araştırmamızda medyan TMAO değerlerimiz ise sırasıyla sağlıklı kontrol grubunda 2.21 µmol/L, diyabetli kontrol grubunda 3.2 µmol/L, diyabetik ayaklı grupta ise 2.86 µmol/L çıktı. Bizim çalışmamızdaki bu düşüklük, benzer şekilde bölgesel beslenme alışkanlıklarından, mikrobiyom çeşitliliğinden, FMO3'ün genetik polimorfizminden veya demografik diğer nedenlerden kaynaklı olabilir.<sup>78, 80, 94, 95, 124</sup>

Çalışmamızda FMO3 diyabetik ayaklı grupta anlamlı olarak düşüktü. Modern yaşlanma teorilerinde, yaşlanmaya; detoksifikasyon kapasitesinde düşme ve sonucunda biriken reaktif ara maddelerin makromoleküllere hasar vermesinin yol açtığı ileri sürülmektedir.<sup>125</sup> FMO3 ekspresyonunun uzun yaşamla ilişkili olduğu, rapamisin ve diyet kısıtlaması ile 12 aya kadar kalıcı artışlarının olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>125</sup> Çalışmalar sonucunda yaşlanma süreçleriyle ilgili olarak, karaciğerdeki yüksek FMO3 seviyelerinin glutatyon (GSH) ve glutatyon-S-transferaz (GST) depolarını artırarak uzun

ömürlülüğe katkıda bulunduğu ve bunun daha sonra oksidatif strese karşı direncin artmasında rol oynadığı makul bir hipotez olarak kabul edilmiştir.<sup>57, 65, 126</sup> Diğer yandan FMO3 azalması ile artışı beklenen TMA deney hayvanlarında yaşlılıkla ilişkili bulunmuştur.<sup>101</sup> Bilindiği gibi non-travmatik alt ekstremite amputasyonlarının %60'ı diyabetik ayak hastalarına aittir. Olası amputasyon akabinde 5 yıllık mortalite %70'e ulaşmakta ve beklenen ömür ciddi anlamda kısalmaktadır. Çalışmamızda beklenen ömürdeki azalmaya paralel şekilde diyabetik ayaklı hasta grubunda FMO3 seviyelerinde azalma bulduk.

Bizim çalışmamızda FMO3'ü DM' li kontrol grubunda yaşla pozitif korele bulduk.(Şekil.4.4) FMO3 aktivesinin son ürün veya substrattan etkilenmediği, indüklenmediği veya inhibe edilmediği varsayılmıştır.<sup>57</sup> Diyabetik yaşlılarda artmış bulunması ve diyabetik ayaklılarda azalması, beklenen ömür beklentisi ile ilişkili bir belirteç olabilir. FMO3'ün yenidoğanda sentezi yok veya çok azdır. Doğumla sentezi ve miktarı artmaya başlar ve ergenliğe kadar bu artış devam eder.<sup>127</sup> Yaşlılarda özellikle faz 1 karaciğer enzimlerinin sentez ve aktivitesinin azalması beklenir. FMO3 miktarını DM'li kontrol grubunda yaşla pozitif korele bulmamız, yaşlı DM' lilere özel bir durum olabilir ve yeni bir veridir.

FMO3 hücre endoplazmik retikulumunda lokalizedir. Kükürtlü amino asitleri s-oksitle eder. Enzim, GSH, sistein ve sisteamin gibi çeşitli tiyollerini oksitlemek için moleküler oksijen ve NADPH kullanır.<sup>57, 100, 128</sup> Enzimin kendisinin bir şekilde azalması hücreyi indirgeyici ajanlara duyarlı hale getirir. FMO aktivitesi olmadan, ER'de disülfid bağı içeren proteinlerin uygun şekilde katlanması için optimal oksitleyici ortam oluşmaz. Sonuçta ER'de proteinler uygun şekilde katlanamazlar. FMO3 eksikliğinde defektif katlanmalar oluşur, bu UPR oluşturur. UPR' de ER' den sitoplazma ve çekirdeğe hücre içi sinyal yolları aktive olur. ER' deki protein yükünü sınırlamak için, de novo protein

sentezi geçici olarak zayıflatılır. Sonra ER 'deki protein katlama kapasitesini artırmak için şaperonların sentezi aktive edilir. Ubikuitin-proteozom sistemi yanlış katlanmış proteinleri proteolize etmek için devreye sokulur. Bunlara rağmen ER fonksiyonları ciddi şekilde bozulur ve geri döndürülemez olduğunda, UPR apoptozu da aktive eder.<sup>120, 129</sup> UPR, hücreyi osmotik/hacim stresi, ER stresi ve fonksiyonel stresten, inflamasyon ve apoptozise kadar götürür.<sup>22, 57, 65, 88, 130, 131</sup> ER stresi periferik nöropatide anahtar rol oynar.<sup>22</sup> Metabolik analizler FMO' ların, mitokondriyal solunumu arttırdığını, glikolitik aktiviteyi azalttığını göstermektedir. Mitokondriyal solunumu artırır, amino asit ve enerji metabolizmasının modülasyonuna katılırlar. Mitokondriyal oksijen tüketiminin FMO ekspresyonu ile arttığı gösterilmiştir.<sup>65</sup> Bu durum, enerji kaynaklarının daha verimli kullanılması, daha çok ATP ve sonuçta nöropati/ mikroanjiopati ile etkilenmiş hücreyi hipoksik strese karşı daha rahat korumak anlamına gelmektedir. Ayrıca artmış FMO3 ekspresyonu, hücreyi ağır metaller (kadmiyum, arsenik), UV radyasyon, rotenon gibi birçok yabancı stres etkenine karşı daha dirençli hale getirir. Tersine FMO3 ekspresyonunun azalması daha az ATP, daha az enerji ve stresörlere daha duyarlı hale gelmiş hücre anlamına gelecektir.<sup>65</sup>

Proteomik analizler FMO3' ün üre döngüsü ve mitokondriyal fonksiyonla ilgili olan birçok protein ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Bu analizlerde FMO3' ün Karbomoil Fosfat Sentaz 1 (CPS1) ile de böyle bir etkileşimin olduğu ve FMO3 kaybının hepatik üre seviyelerini arttırdığı gösterilmiştir.<sup>90</sup> Çalışmamızda BUN-ÜRE DM'lilerde yüksek bulundu. Ürenin kendisi tek başına bozulmuş böbrek fonksiyonlarının bir göstergesidir. Ayrıca FMO3 azalmasıyla üre artışının destekleneceği ve üre artışının protein denatürasyonunu artıracığı, buna artmış ER stresinin eşlik edeceği ve yeterli TMAO artışının sağlanamamasından dolayı osmotik basınç ve travmatik strese yeterli yanıt verilemeyeceği öngörülmüştür.<sup>65, 84, 89</sup>

FMO3 RNA ekspresyonunun obezite ile pozitif korele olduğu ve FMO3 sentezinin antisens oligo n¼kleotid y¼ntemiyle engellenmesinin fareleri y¼ksek yağlı diyete bağlı obeziteye karşı koruduğu keşfedilmiştir.<sup>132</sup> Bilindiği üzere diyabetik ayaklı hastalar genelde kilo olarak zayıftır ve bu durum çalışmamızla da uyumludur.

Burada sunulan t¼m çalışmalar ve veriler ele alındığında, FMO' ların protein hemostazını artırıcı etkileri olduğu, sağlıklı ve uzun yaşamı etkileyecek fonksiyonel mekanizmalarda rol oynadığı, FMO' ların uygun şekilde ekspresyonunun artırılmasının, sağlıklı yaşamı ve yaşlanmayı destekleyebileceği kanaati oluşabilir. Ayrıca bu durum DM ve komplikasyonlarında hastalara fayda sağlayabilir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız DM' nin kronik komplikasyonlarından diyabetik ayak hastalarında TMAO, FMO3 ve ilişkilerini araştıran ilk çalışma olduğu kanaatindeyiz.

Çalışmamızda TMAO ve DM ilişkisi için mevcut çok sayıdaki kaynağa rağmen biz anlamlı ilişki bulamadık. Ayrıca TMAO için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark da bulmadık. FMO3 ise diyabetik ayak hastalarında istatistiksel olarak anlamlı düşük çıktı. TMAO' nun protein yapısını stabilize ederek hidrostatik ve ozmotik streslere karşı koruyucu rolü vardır. Bu rol yetersiz kaldığında bir şekilde oluşan TMA' nın da zararlı bozuk gıdaların yenmemesi için kötü kokusu üzerinden uyarıcı ve koruyucu rolü dikkate değerdir.<sup>111</sup> TMAO'nun sorumlu tutulduğu zararlı etkiler için literatür TMA' yı da işaret etmeye başlamıştır.<sup>101, 111, 112</sup> FMO3' ün metabolik yollara direkt etkileri de göz önünde bulundurularak konuyla ilgili yapılacak yeni çalışmalarda TMAO/TMA oranına bakılmasının yararlı olacağını düşünmekteyiz. Elisa yöntemi ile FMO3 'ün miktarını ölçtük. Ancak miktarla beraber aktivitesinin ölçümü daha faydalı olabilir FMO3 için geliştirilecek daha ulaşılabilir ve standardize enzim aktivite analizleri daha yararlı sonuçlar sağlayacaktır. Ayrıca hastaların DM' ye yönelik çeşitli ilaçlar kullanıyor olmasının (akarboz, miglitol, metformin gibi) direkt mikrobiyota ve FMO3 üzerinden test sonuçlarını etkileyebileceği düşünülmelidir. Mikrobiyota müdahaleleri (pre-probiyotik, nakil vb.) akabinde yapılacak TMA -TMAO ölçümleri yolakla ilgili teorilere daha iyi izahlar getirebilir.<sup>133</sup> Çalışma daha büyük ve daha kontrollü gruplarla yapılabilirdi. Bilindiği üzere Covid 19 pandemi sürecinde ciddi sağlık problemleri olmadıkça, özellikle DM hastaları hastanelere başvurmaktan çekinmekte idi. Hatta sistem çoğu kronik hastalıkta, hastanede olası bulaşı engellemek için rapor uzatma, direkt eczaneden raporlu ilaç temini gibi ek önlemler almıştı. Bu yüzden ek şikayeti olmayan DM ve diyabetik

ayak hastası bulmak oldukça zordu. Bu nedenle benzer çalışma hayvan modellerinde daha kontrollü gruplarda yapılabilir.



## KAYNAKLAR

1. Federation. ID. IDF\_Atlas\_10th\_Edition\_2021.pdf. 2021.
2. Genuth SM, Palmer JP, Nathan DM. Classification and diagnosis of diabetes. 2021.
3. Grubu UDK. TURKDİAB Diyabet Tanı ve Tedavi Rehberi.
4. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 2014, 37: S81-S90.
5. ElSayed NA, Aleppo G, Aroda VR, Bannuru RR, Brown FM, Bruemmer D, Collins BS, Hilliard ME, Isaacs D, Johnson EL. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Care in Diabetes—2023. *Diabetes care*, 2023, 46: S19-S40.
6. Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. 2010.
7. Badaru A, Pihoker C. Type 2 diabetes in childhood: clinical characteristics and role of  $\beta$ -cell autoimmunity. *Current diabetes reports*, 2012, 12: 75-81.
8. Association AD. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*, 2013, 36: S67.
9. Forlenza GP, Moran A, Nathan B. Other specific types of diabetes. 2021.
10. Sperling MA, Garg A. Monogenic forms of diabetes. 2021.
11. Ismail-Beigi F, Craven T, Banerji MA, Basile J, Calles J, Cohen RM, Cuddihy R, Cushman WC, Genuth S, Grimm Jr RH. Effect of intensive treatment of hyperglycaemia on microvascular outcomes in type 2 diabetes: an analysis of the ACCORD randomised trial. *The Lancet*, 2010, 376: 419-430.
12. Eckstein ML, Williams D, O'Neil L, Hayes J, Stephens J, Bracken R. Physical exercise and non-insulin glucose-lowering therapies in the management of Type 2 diabetes mellitus: a clinical review. *Diabetic Medicine*, 2019, 36: 349-358.

13. Goyal R, Jialal I. Diabetes mellitus type 2. 2018.
14. *HARPERİN RESİMLİ BİYOKİMYASI*. Çeviri: YÜCEL D. 31 Baskı. ANKARA, GÜNEŞ TIP KİTABEVLERİ, 2019: 55, 215, 553.
15. Ates O, Bilen H, Keles S, Alp HH, Keleş MS, Yıldırım K, Öndaş O, Pınar LC, Civelekler M, Baykal O. Plasma coenzyme Q10 levels in type 2 diabetic patients with retinopathy. *International journal of ophthalmology*, 2013, 6: 675.
16. Solomon SD, Chew E, Duh EJ, Sobrin L, Sun JK, VanderBeek BL, Wykoff CC, Gardner TW. Diabetic retinopathy: a position statement by the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 2017, 40: 412-418.
17. Wykoff CC. Management of Diabetes-Related Retinopathy. 2019.
18. Committee IE. International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 2009, 32: 1327-1334.
19. Holman RR, Paul SK, Bethel MA, Matthews DR, Neil HAW. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *New England journal of medicine*, 2008, 359: 1577-1589.
20. Maturi RK, Glassman AR, Josic K, Antoszyk AN, Blodi BA, Jampol LM, Marcus DM, Martin DF, Melia M, Salehi-Had H. Effect of intravitreal anti-vascular endothelial growth factor vs sham treatment for prevention of vision-threatening complications of diabetic retinopathy: the Protocol W Randomized Clinical Trial. *JAMA ophthalmology*, 2021, 139: 701-712.
21. Gross JG, Glassman AR, Jampol LM, Inusah S, Aiello LP, Antoszyk AN, Baker CW, Berger BB, Bressler NM, Browning D. Panretinal photocoagulation vs intravitreal ranibizumab for proliferative diabetic retinopathy: a randomized clinical trial. *Jama*, 2015, 314: 2137-2146.

22. Lupachyk S, Watcho P, Stavniiichuk R, Shevalye H, Obrosova IG. Endoplasmic reticulum stress plays a key role in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes*, 2013, 62: 944-952.
23. Cameron NE, Cotter M, Jack A, Basso M, Hohman T. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. *Diabetologia*, 1999, 42: 1120-1130.
24. Bierhaus A, Fleming T, Stoyanov S, Leffler A, Babes A, Neacsu C, Sauer SK, Eberhardt M, Schnölzer M, Lasitschka F. Methylglyoxal modification of Nav1. 8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy. *Nature medicine*, 2012, 18: 926-933.
25. Yagihashi S, Yamagishi S-I, Wada R-i, Baba M, Hohman TC, Yabe-Nishimura C, Kokai Y. Neuropathy in diabetic mice overexpressing human aldose reductase and effects of aldose reductase inhibitor. *Brain*, 2001, 124: 2448-2458.
26. Committee ADAPP, Committee: ADAPP. 12. Retinopathy, Neuropathy, and Foot Care: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. *Diabetes Care*, 2022, 45: S185-S194.
27. Callaghan BC, Little AA, Feldman EL, Hughes RA. Enhanced glucose control for preventing and treating diabetic neuropathy. *Cochrane database of systematic reviews*, 2012.
28. Lachin J, White N, Hainsworth D, Sun W, Cleary P, Nathan D. The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT)/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Research Group. Effect of intensive diabetes therapy on the progression of diabetic retinopathy in patients with type 1 diabetes: 18 years of follow-up in the DCCT/EDIC. *Diabetes*, 2015, 64: 631-642.

29. Boulton AJ, Armstrong DG, Kirsner RS, Attinger CE, Lavery LA, Lipsky BA, Mills JL, Steinberg JS. Diagnosis and management of diabetic foot complications. *Compendia*, 2018, 2018.
30. Bandyk DF In *The diabetic foot: Pathophysiology, evaluation, and treatment*, Seminars in vascular surgery, (editör).^(editörler). Elsevier: 2018; 43-48.
31. Singh N, Armstrong DG, Lipsky BA. Preventing foot ulcers in patients with diabetes. *Jama*, 2005, 293: 217-228.
32. Rogers LC, Frykberg RG, Armstrong DG, Boulton AJ, Edmonds M, Van GH, Hartemann A, Game F, Jeffcoate W, Jirkovska A. The Charcot foot in diabetes. *Journal of the American Podiatric Medical Association*, 2011, 101: 437-446.
33. Monteiro-Soares M, Boyko E, Ribeiro J, Ribeiro I, Dinis-Ribeiro M. Predictive factors for diabetic foot ulceration: a systematic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2012, 28: 574-600.
34. Tsapogas P. Anatomic Risk Factors for Diabetic Foot Ulceration. *Atlas of the Diabetic Foot*, 2010: 21.
35. Van Netten J, Price PE, Lavery L, Monteiro-Soares M, Rasmussen A, Jubiz Y, Bus S, Foot IWGotD. Prevention of foot ulcers in the at-risk patient with diabetes: a systematic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2016, 32: 84-98.
36. KELEŞ MS. Determination of free fatty acid composition in plasma membranes of neutrophils in diabetics. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 2000, 30: 465-468.
37. Boulton AJ. The diabetic foot. *Medicine*, 2015, 43: 33-37.
38. Uccioli L, Faglia E, Monticone G, Favales F, Durola L, Aldeghi A, Quarantiello A, Calia P, Menzinger G. Manufactured shoes in the prevention of diabetic foot ulcers. *Diabetes care*, 1995, 18: 1376-1378.

39. Lipsky BA, Aragón-Sánchez J, Diggle M, Embil J, Kono S, Lavery L, Senneville É, Urbančič-Rovan V, Van Asten S, Peters EJ. IWGDF guidance on the diagnosis and management of foot infections in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32: 45-74.
40. Löndahl M, Boulton AJ. Hyperbaric oxygen therapy in diabetic foot ulceration: Useless or useful? A battle. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2020, 36: e3233.
41. Fedorko L, Bowen JM, Jones W, Oreopoulos G, Goeree R, Hopkins RB, O'Reilly DJ. Hyperbaric oxygen therapy does not reduce indications for amputation in patients with diabetes with nonhealing ulcers of the lower limb: a prospective, double-blind, randomized controlled clinical trial. *Diabetes care*, 2016, 39: 392-399.
42. Sepúlveda G, Espíndola M, Maureira M, Sepúlveda E, Fernández JI, Oliva C, Sanhueza A, Vial M, Manterola C. Negative-pressure wound therapy versus standard wound dressing in the treatment of diabetic foot amputation. A randomised controlled trial. *Cirugía Española (English Edition)*, 2009, 86: 171-177.
43. Game F, Apelqvist J, Attinger C, et al., Hartemann A, Hinchliffe R, Löndahl M, Price P, Jeffcoate W, Foot IWGotD. Effectiveness of interventions to enhance healing of chronic ulcers of the foot in diabetes: a systematic review. *Diabetes/metabolism research and reviews*, 2016, 32: 154-168.
44. Niederauer MQ, Michalek JE, Liu Q, Papas KK, Lavery LA, Armstrong DG. Continuous diffusion of oxygen improves diabetic foot ulcer healing when compared with a placebo control: a randomised, double-blind, multicentre study. *Journal of wound care*, 2018, 27: S30-S45.

45. Armstrong DG, Boulton AJ, Bus SA. Diabetic foot ulcers and their recurrence. *New England journal of medicine*, 2017, 376: 2367-2375.
46. Saraswathi N, Syakhovich, VE , Bokut, SB , Moras, D. , Ruff, M. Crystal Structure of Glycated Human Haemoglobin. 2008.
47. BAKAN E. *Klinik Biyokimya*. 2 Baskı. Erzurum, Aktif, 2016.
48. GÜRDOL F. *Tıbbi Biyokimya*. 4 Baskı. İstanbul, Nobel, 2019.
49. Association AD. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care*, 2015, 38: S8-S16.
50. Peters AL, Davidson MB, Schriger DL, Hasselblad V. A clinical approach for the diagnosis of diabetes mellitus: an analysis using glycosylated hemoglobin levels. *Jama*, 1996, 276: 1246-1252.
51. Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ, Group Ac-DAGS. Translating the A1C assay into estimated average glucose values. *Diabetes care*, 2008, 31: 1473-1478.
52. Fonseca V, Inzucchi SE, Ferrannini E. Redefining the diagnosis of diabetes using glycated hemoglobin. 2009, 32: 1344-1345.
53. Colagiuri S. Glycated haemoglobin (HbA1c) for the diagnosis of diabetes mellitus—practical implications. *Diabetes research and clinical practice*, 2011, 93: 312-313.
54. Coban E, Ozdogan M, Timuragaoglu A. Effect of iron deficiency anemia on the levels of hemoglobin A1c in nondiabetic patients. *Acta haematologica*, 2004, 112: 126-128.
55. Zhou Z-Y, Liu Y-K, Chen H-L, Yang H-L, Liu F. HbA1c and lower extremity amputation risk in patients with diabetes: a meta-analysis. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 2015, 14: 168-177.

56. Krueger SK, Williams DE. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & therapeutics*, 2005, 106: 357-387.
57. Cashman JR. Some distinctions between flavin-containing and cytochrome P450 monooxygenases. *Biochemical and biophysical research communications*, 2005, 338: 599-604.
58. Nicoll CR, Bailleul G, Fiorentini F, Mascotti ML, Fraaije MW, Mattevi A. Ancestral-sequence reconstruction unveils the structural basis of function in mammalian FMOs. *Nature structural & molecular biology*, 2020, 27: 14-24.
59. Özhan D, Topal P. Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı.
60. Nergiz-Unal R, Gönen B. Kardiyovasküler Hastalıklarda Bağırsak Mikrobiyota Metaboliti Trimetilamin N-oksit (TMAO): Önleme ve Tedavi İçin Yeni Bir Molekül mü? *Akdeniz Tıp Dergisi*, 7: 436-447.
61. YÜKSEL N. Sitokrom p450 enzim sistemi ve ilaç etkileşimleri. *Klinik Psikiyatri*, 2001, 1: 5-16.
62. Rossner R, Kaeberlein M, Leiser SF. Flavin-containing monooxygenases in aging and disease: Emerging roles for ancient enzymes. *Journal of biological chemistry*, 2017, 292: 11138-11146.
63. Fu ZD, Klaassen CD. Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 274: 137-146.
64. Suh J-K, Poulsen LL, Ziegler DM, Robertus JD. Yeast flavin-containing monooxygenase generates oxidizing equivalents that control protein folding in the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 96: 2687-2691.

65. Huang S, Howington MB, Dobry CJ, Evans CR, Leiser SF. Flavin-containing monooxygenases are conserved regulators of stress resistance and metabolism. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 630188.
66. Treacy E, Akerman B, Chow L, Youil R, Lin CB, J, Bruce A, Knight M, Danks D, Cashman J, Forrest S. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human molecular genetics*, 1998, 7: 839-845.
67. Comstock LE. The inside story. *Nature*, 2007, 448: 542-544.
68. Quigley EM. Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology*, 2013, 9: 560.
69. O'Toole PW, Cooney JC. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2008, 2008.
70. O'Toole PW, Claesson MJ. Gut microbiota: changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 2010, 20: 281-291.
71. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 2003, 361: 512-519.
72. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 2010, 464: 59-65.
73. Petersen C, Round JL. Defining dysbiosis and its influence on host immunity and disease. *Cellular microbiology*, 2014, 16: 1024-1033.
74. Moludi J, Maleki V, Jafari-Vayghyan H, Vaghef-Mehrabany E, Alizadeh M. Metabolic endotoxemia and cardiovascular disease: A systematic review about

- potential roles of prebiotics and probiotics. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2020, 47: 927-939.
75. Illiano P, Brambilla R, Parolini C. The mutual interplay of gut microbiota, diet and human disease. *The FEBS journal*, 2020, 287: 833-855.
76. Wong J, Piceno YM, DeSantis TZ, Pahl M, Andersen GL, Vaziri ND. Expansion of urease-and uricase-containing, indole-and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD. *American journal of nephrology*, 2014, 39: 230-237.
77. Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease. *Drug Metabolism and Disposition*, 2016, 44: 1839-1850.
78. Coutinho-Wolino KS, de F Cardozo LF, de Oliveira Leal V, Mafra D, Stockler-Pinto MB. Can diet modulate trimethylamine N-oxide (TMAO) production? What do we know so far? *European Journal of Nutrition*, 2021, 60: 3567-3584.
79. Du L, Li Q, Yi H, Kuang T, Tang Y, Fan G. Gut microbiota-derived metabolites as key actors in type 2 diabetes mellitus. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 149: 112839.
80. Janeiro MH, Ramírez MJ, Milagro FI, Martínez JA, Solas M. Implication of trimethylamine N-oxide (TMAO) in disease: potential biomarker or new therapeutic target. *Nutrients*, 2018, 10: 1398.
81. Leustean AM, Ciocoiu M, Sava A, Costea CF, Floria M, Tarniceriu CC, Tanase DM. Implications of the intestinal microbiota in diagnosing the progression of diabetes and the presence of cardiovascular complications. *Journal of diabetes research*, 2018, 2018.

82. Yancey PH, Blake WR, Conley J. Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2002, 133: 667-676.
83. Mackay RJ, McEntyre CJ, Henderson C, Lever M, George PM. Trimethylaminuria: causes and diagnosis of a socially distressing condition. *The Clinical Biochemist Reviews*, 2011, 32: 33.
84. Zou Q, Bennion BJ, Daggett V, Murphy KP. The molecular mechanism of stabilization of proteins by TMAO and its ability to counteract the effects of urea. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124: 1192-1202.
85. Berry MD, Gainetdinov RR, Hoener MC, Shahid M. Pharmacology of human trace amine-associated receptors: Therapeutic opportunities and challenges. *Pharmacology & therapeutics*, 2017, 180: 161-180.
86. Yancey P. Protein, osmolytes and water stress. *Am. Zool*, 2001, 41: 699-709.
87. Welch WJ, Brown CR. Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell stress & chaperones*, 1996, 1: 109.
88. Krywka C, Sternemann C, Paulus M, Tolan M, Royer C, Winter R. Effect of Osmolytes on Pressure-Induced Unfolding of Proteins: A High-Pressure SAXS Study. *ChemPhysChem*, 2008, 9: 2809-2815.
89. Ma J, Pazos IM, Gai F. Microscopic insights into the protein-stabilizing effect of trimethylamine N-oxide (TMAO). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111: 8476-8481.
90. Yang Z, Stemmer PM, Petriello MC. Proteomics-Based Identification of Interaction Partners of the Xenobiotic Detoxification Enzyme FMO3 Reveals Involvement in Urea Cycle. *Toxics*, 2022, 10: 60.

91. Mondal J, Stirnemann G, Berne B. When does trimethylamine N-oxide fold a polymer chain and urea unfold it? *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117: 8723-8732.
92. Sarma R, Paul S. Exploring the molecular mechanism of trimethylamine-N-oxide's ability to counteract the protein denaturing effects of urea. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117: 5691-5704.
93. Street TO, Bolen DW, Rose GD. A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 13997-14002.
94. Lenz E, Bright J, Wilson I, Hughes A, Morrisson J, Lindberg H, Lockton A. Metabonomics, dietary influences and cultural differences: a <sup>1</sup>H NMR-based study of urine samples obtained from healthy British and Swedish subjects. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2004, 36: 841-849.
95. Cheung W, Keski-Rahkonen P, Assi N, Ferrari P, Freisling H, Rinaldi S, Slimani N, Zamora-Ros R, Rundle M, Frost G. A metabolomic study of biomarkers of meat and fish intake. *The American journal of clinical nutrition*, 2017, 105: 600-608.
96. Cho CE, Caudill MA. Trimethylamine-N-oxide: friend, foe, or simply caught in the cross-fire? *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2017, 28: 121-130.
97. Hai X, Landeras V, Dobre MA, DeOreo P, Meyer TW, Hostetter TH. Mechanism of prominent trimethylamine oxide (TMAO) accumulation in hemodialysis patients. *PloS one*, 2015, 10: e0143731.
98. Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P, Bergman P. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PloS one*, 2016, 11: e0141738.

99. Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine N-oxide, the microbiome, and heart and kidney disease. *Annual review of nutrition*, 2017, 37: 157-181.
100. Ünal RN, Gönen B. Kardiyovasküler Hastalıklarda Bağırsak Mikrobiyota Metaboliti Trimetilamin N-oksit (TMAO): Önlenme ve Tedavi İçin Yeni Bir Molekül mü? *Akdeniz Tıp Dergisi*, 2021, 7: 436-447.
101. Jaworska K, Bielinska K, Gawrys-Kopczynska M, Ufnal M. TMA (trimethylamine), but not its oxide TMAO (trimethylamine-oxide), exerts haemodynamic effects: implications for interpretation of cardiovascular actions of gut microbiome. *Cardiovascular research*, 2019, 115: 1948-1949.
102. Huc T, Drapala A, Gawrys M, Konop M, Bielinska K, Zaorska E, Samborowska E, Wyczalkowska-Tomasik A, Pączek L, Dadlez M. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2018, 315: H1805-H1820.
103. Dumas M-E, Barton RH, Toyé A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, Fearnside J, Tatoud R, Blanc V, Lindon JC. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103: 12511-12516.
104. Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, Pettersson S. Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 2012, 336: 1262-1267.
105. Dumas M-E. The microbial-mammalian metabolic axis: beyond simple metabolism. *Cell metabolism*, 2011, 13: 489-490.
106. Dumas M-E, Rothwell AR, Hoyles L, Aranas T, Chilloux J, Calderari S, Noll EM, Péan N, Boulangé CL, Blancher C. Microbial-host co-metabolites are prodromal

- markers predicting phenotypic heterogeneity in behavior, obesity, and impaired glucose tolerance. *Cell reports*, 2017, 20: 136-148.
107. Wu J, Zhang R, Torreggiani M, Ting A, Xiong H, Striker GE, Vlassara H, Zheng F. Induction of diabetes in aged C57B6 mice results in severe nephropathy: an association with oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and inflammation. *The American journal of pathology*, 2010, 176: 2163-2176.
  108. Zhong Y, Li J, Chen Y, Wang JJ, Ratan R, Zhang SX. Activation of endoplasmic reticulum stress by hyperglycemia is essential for Müller cell–derived inflammatory cytokine production in diabetes. *Diabetes*, 2012, 61: 492-504.
  109. Ufnal M, Zadło A, Ostaszewski R. TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition*, 2015, 31: 1317-1323.
  110. Heaney LM, Jones DJ, Mbasu RJ, Ng LL, Suzuki T. High mass accuracy assay for trimethylamine N-oxide using stable-isotope dilution with liquid chromatography coupled to orthogonal acceleration time of flight mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2016, 408: 797-804.
  111. Ufnal M. Trimethylamine, a toxic precursor of trimethylamine oxide, lost in medical databases. *The Journal of Nutrition*, 2020, 150: 419-419.
  112. Restini CB, Fink GD, Watts SW. Abstract p145: The bacterial metabolite trimethylamine (tma), but not trimethylamine n-Oxide (tmao), causes vascular contraction. *Hypertension*, 2018, 72: AP145-AP145.
  113. Jaworska K, Konop M, Hutsch T, Perlejewski K, Radkowski M, Grochowska M, Bielak-Zmijewska A, Mosieniak G, Sikora E, Ufnal M. Trimethylamine but not trimethylamine oxide increases with age in rat plasma and affects smooth muscle cells viability. *The Journals of Gerontology: Series A*, 2020, 75: 1276-1283.

114. Warriar M, Shih DM, Burrows AC, Ferguson D, Gromovsky AD, Brown AL, Marshall S, McDaniel A, Schugar RC, Wang Z. The TMAO-generating enzyme flavin monooxygenase 3 is a central regulator of cholesterol balance. *Cell reports*, 2015, 10: 326-338.
115. Shih DM, Wang Z, Lee R, Meng Y, Che N, Charugundla S, Qi H, Wu J, Pan C, Brown JM. Flavin containing monooxygenase 3 exerts broad effects on glucose and lipid metabolism and atherosclerosis [S]. *Journal of lipid research*, 2015, 56: 22-37.
116. Hamaya R, Ivey KL, Lee DH, Wang M, Li J, Franke A, Sun Q, Rimm EB. Association of diet with circulating trimethylamine-N-oxide concentration. *The American journal of clinical nutrition*, 2020, 112: 1448-1455.
117. Gessner A, di Giuseppe R, Koch M, Fromm MF, Lieb W, Maas R. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) determined by LC-MS/MS: distribution and correlates in the population-based PopGen cohort. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 2020, 58: 733-740.
118. Rox K, Rath S, Pieper DH, Vital M, Brönstrup M. A simplified LC-MS/MS method for the quantification of the cardiovascular disease biomarker trimethylamine-N-oxide and its precursors. *Journal of pharmaceutical analysis*, 2021, 11: 523-528.
119. Papandreou C, Bulló M, Zheng Y, Ruiz-Canela M, Yu E, Guasch-Ferré M, Toledo E, Clish C, Corella D, Estruch R. Plasma trimethylamine-N-oxide and related metabolites are associated with type 2 diabetes risk in the Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) trial. *The American journal of clinical nutrition*, 2018, 108: 163-173.

120. Akerfeldt MC, Howes J, Chan JY, Stevens VA, Boubenna N, McGuire HM, King C, Biden TJ, Laybutt DR. Cytokine-induced  $\beta$ -cell death is independent of endoplasmic reticulum stress signaling. *Diabetes*, 2008, 57: 3034-3044.
121. Schmidt AC, Leroux J-C. Treatments of trimethylaminuria: where we are and where we might be heading. *Drug discovery today*, 2020, 25: 1710-1717.
122. Yancey PH. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology*, 2005, 208: 2819-2830.
123. Wang Z, Levison BS, Hazen JE, Donahue L, Li X-M, Hazen SL. Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 2014, 455: 35-40.
124. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, Allayee H, Lee R, Graham M, Crooke R. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell metabolism*, 2013, 17: 49-60.
125. Gems D, McElwee JJ. Broad spectrum detoxification: the major longevity assurance process regulated by insulin/IGF-1 signaling? *Mechanisms of ageing and development*, 2005, 126: 381-387.
126. Swindell WR. Gene expression profiling of long-lived dwarf mice: longevity-associated genes and relationships with diet, gender and aging. *BMC genomics*, 2007, 8: 1-22.
127. Hines RN. The ontogeny of drug metabolism enzymes and implications for adverse drug events. *Pharmacology & therapeutics*, 2008, 118: 250-267.

128. Ates I, Kaplan M, Yuksel M, Mese D, Alisik M, Erel Ö, Yilmaz N, Guler S. Determination of thiol/disulphide homeostasis in type 1 diabetes mellitus and the factors associated with thiol oxidation. *Endocrine*, 2016, 51: 47-51.
129. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2000, 2: 326-332.
130. Liao BM, McManus SA, Hughes WE, Schmitz-Peiffer C. Flavin-containing monooxygenase 3 reduces endoplasmic reticulum stress in lipid-treated hepatocytes. *Molecular Endocrinology*, 2016, 30: 417-428.
131. Tatar M, Tatar T. Endoplazmik retikulum stresi ve ilişkili hastalıklar. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 2018, 41: 294-303.
132. Schugar RC, Shih DM, Warriar M, Helsley RN, Burrows A, Ferguson D, Brown AL, Gromovsky AD, Heine M, Chatterjee A. The TMAO-producing enzyme flavin-containing monooxygenase 3 regulates obesity and the beiging of white adipose tissue. *Cell reports*, 2017, 19: 2451-2461.
133. Din AU, Hassan A, Zhu Y, Yin T, Gregersen H, Wang G. Amelioration of TMAO through probiotics and its potential role in atherosclerosis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103: 9217-9228.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

<b>Kişisel Bilgiler</b>
<b>Adı Soyadı:</b> <b>Doğum tarihi:</b> <b>Doğum Yeri:</b> <b>Medeni Hali:</b> <b>Uyruğu:</b> <b>Adres:</b> <b>Tel:</b> <b>Faks:</b> <b>E-mail:</b>
<b>Eğitim</b>
<b>Lise:</b> <b>Lisans:</b> <b>Yüksek lisans:</b> <b>Doktora:</b>
<b>Yabancı Dil Bilgisi</b>
<b>İngilizce:</b> <b>Almanca:</b> - <b>Rusça:</b> -
<b>Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar</b>
- -
<b>İlgi Alanları ve Hobiler</b>
-

## EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

### ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU<sup>1</sup>

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Mehmet Emin Özhan
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Tıbbi Biyokimya
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 7	% 15
II. Genel Bilgiler	% 8	% 35
III. Materyal ve Metod	% 30	% 35
IV. Bulgular	% 4	% 15
V. Tartışma	% 0	% 20

*Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.*

Tez Yazarı (Öğrenci)

Tez Danışmanı

## EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



### ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



#### KARAR

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	
	FAKS	
	E-POSTA	
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		<b>Prof.Dr.Mevlüt Sait KELEŞ</b>
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		<b>Diyabetik Ayaklı Hastalarda Serum Trimetilamin n-Oksit (TMAO) ve Flavin İçeren Monooksidaz (FMO3) Seviyelerinin Araştırılması</b>
<b>KARAR BİLGİLERİ</b>	Toplantı Sayısı: 08 Karar No: 12	Tarih: 01.10.2020
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin <b>BAP tarafından</b> karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.  <b>Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik</b> kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	