



LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

DIABETİK NÖROPATİDE SİRKADİEN RİTİM GENLERİNDEN
PER3'ÜN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Hüsniye RÜSTEMOĞLU

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi

Danışman
Doç. Dr. Serbülent YİĞİT

TOKAT – 2022

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, **Doç. Dr. Serbüent YİĞİT**'in danışmanlığında hazırlamış olduğum “**Diabetik Nöropatide Sirkadien Ritim Genlerinden PER3’ün İncelenmesi**” adlı Doktora tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

(.../.../2022)

Hüsniye RÜSTEMOĞLU

İmzası

(Faint watermark text, likely a signature or institutional mark, is visible in the background.)

TEŞEKKÜR

Tez konusunun seçiminden, çalışmaların yürütülmesi ve sonuçlandırılmasına kadar rahat alışabilmem için her aşamada yardım ve desteklerini esirgemeyen danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi **Sayın Doç. Dr. Serbülent YİĞİT**'e sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tez çalışmam sırasında araştırılacak hasta grubunun oluşturulmasını sağlayan **Dr. Öğr. Üyesi Süheyla UZUN**'a,

Bu dönem içerisinde, bilimsel katkılarından dolayı **Prof. Dr. Hacı Ömer Ateő, Doç. Dr. Nevin Karakuő** ve **Dr. Öğr. Üyesi Nihan Bozkurt**'a,

Laboratuvar çalışmalarımda yaptıkları katkılardan dolayı **Prof. Dr. Mehmet Taşpınar**'a,

Bugünlere ulaşmamda hiç őüphesiz, en büyük pay sahibi olan ve desteklerini hep hissettiğim **aileme**,

Teşekkür Ederim.

Hüsniye RüSTEMOğLU

TOKAT, 2022

ÖZET

DIABETİK NÖROPATİDE SİRKADİEN RİTİM GENLERİNDEN PER3'ÜN İNCELENMESİ

Rüstemoğlu, Hüsniye
Doktora Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serbülent Yiğit

Diyabet (Diabetes Mellitus- Şeker Hastalığı), günümüzde tüm dünyada ve Türkiye'de gittikçe artan sıklıkta gözlenen sağlık problemidir. Bu hastalık vücutta insülin salgılamada (Tip I), insülinin etki mekanizmasında (Tip II) veya bu işlevlerin her ikisinde de meydana gelen bozukluk ile kendini gösteren ve hiperglisemi ile karakterize edilen kronik bir hastalıktır. Diyabetli hastalarda diyabet tanısı konulduğunda hastaların %10'unda mikrovasküler komplikasyonlardan diyabetik nöropati geliştiği tespit edilirken, 20.yıl sonunda nöropatili hastaların %50 civarlarında tespit edildiği gözlemlenmiştir.

Sirkadiyen ritim, dünyanın kendi eksenini etrafındaki döngüsünün bir sonucu olarak, organizmaların gündüz ve gece ile ilişkili çevresel değişikliklere (örneğin aydınlık-karanlık ve sıcaklık döngüleri) maruz kalması sonucu fizyolojiyi ve metabolizmayı günün saatine göre optimize etmek ve uyarlamak için hücresel süreçlerin zamanlamasını düzenleyen bir sistemdir. Sirkadiyen ritmin arkasındaki temel moleküler mekanizmalar saat genleri tarafından kontrol edilmektedir.

Bu tez çalışmasında literatürde ilk kez sirkadiyen ritim genlerinden PER3'ün VNTR polimorfizminin niyabetik nöropatigelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran Diyabet tanısı almış 84 ve diyabetik nöropati tanısı almış 220 hasta ile kontrol grubu olarak sağlıklı 218 birey incelenmiştir. PER3 geni VNTR polimorfizmi gönüllülerin periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'lar kullanılarak klasik PZR yöntemi ile tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde edilen veriler incelendiğinde diyabetik nöropati hastaları ile kontrol ve diyabet grupları arasında PER3 VNTR polimorfizmi bakımından istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Ancak, kontrol grubu ile diyabet grubu arasında özellikle 5/5 genotipi ve 5 alleli bakımından hasta grubu ile kontrol grubu arasından anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Sonuç olarak, dünyada ilk kez, sirkadiyen ritim genlerinden PER3 geni VNTR polimorfizmi ile diyabetik nöropati ve diyabet arasında ilişki incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar PER3'ün diyabetle ilişkili olabileceğini fakat diyabetik nöropati ile ilişkili olmadığını göstermiştir.

AnahtarKelimeler: Diyabet, Diabetik Nöropati, PER3, VNTR

SUMMARY

INVESTIGATION OF PER3 OF THE CIRCADIENE RHYTHM GENES IN DIABETIC NEUROPATHY

Rustemoglu, Husniye

Doctoral Thesis, Department of Medical Biology

Thesis Advisor: Assoc. Dr. Serbulent Yigit

Diabetes (Diabetes Mellitus- Diabetes) is a health problem that is observed with increasing frequency all over the world and in Turkey today. This disease is a chronic disease characterized by hyperglycemia, manifested by a defect in insulin secretion (Type I), the mechanism of action of insulin (Type II), or both of these functions. When diabetes was diagnosed in diabetic patients, it was observed that 10% of the patients developed diabetic neuropathy due to microvascular complications, while at the end of the 20th year, it was observed that around 50% of the patients with neuropathy were detected.

The circadian rhythm is a system that regulates the timing of cellular processes to optimize and adapt physiology and metabolism to the time of day, as a result of the Earth's rotation around its axis, as a result of which organisms are exposed to environmental changes associated with day and night (for example, light-dark and temperature cycles). The basic molecular mechanisms behind the circadian rhythm are controlled by clock genes.

In this thesis, the effects of the VNTR polymorphism of PER3, one of the first circadian rhythm genes in the literature, on the development of diabetic neuropathy were investigated. For this purpose, 84 patients diagnosed with only diabetes and 220 patients diagnosed with diabetic neuropathy, who applied to Tokat Gaziosmanpaşa University Faculty of Medicine Research and Practice Hospital, Department of Internal Medicine, and 218 healthy individuals as the control group were examined. PER3 gene VNTR polymorphism was detected by classical PCR method using DNAs isolated from peripheral blood samples of volunteers.

When the data obtained in our study were examined, no statistically significant difference was observed between diabetic neuropathy patients, control and diabetes groups in terms of PER3 VNTR polymorphism. However, a significant difference was found between the control group and the diabetes group, especially in terms of 5/5 genotype and 5 alleles, between the patient group and the control group ($p < 0.05$).

In conclusion, first in the world, the relationship between PER3 gene VNTR polymorphism and diabetic neuropathy and diabetes, was investigated. Our results showed that PER3 may be associated with diabetes but not with diabetic neuropathy.

Keywords: Diabetes, Diabetic Neuropathy, PER3, VNTR.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1 Diyabetes Mellitus	5
2.1.1. <i>Diyabetes Mellitus Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi</i>	8
2.1.2. <i>Diyabetes Mellitus Tanısı ve Semptomları</i>	9
2.1.3. <i>Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırılması</i>	11
2.1.4. <i>Diyabetes Mellitus Komplikasyonları</i>	16
2.2.Sirkadiyen Ritim	23
2.2.1. <i>Sirkadiyen Ritim Genleri</i>	24
2.2.2. <i>Diyabet ve Sirkadiyen Ritim</i>	34
2.2.3. <i>Diyabetik Nöropati ve Sirkadiyen Ritim Genleri</i>	35
2.3. Literatür Özetleri	36
2.4. PER 3 Geni VNTR Polimorfizmi	40
3. MATERYAL VE METOD	42
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	49
4.1. ARAŞTIRMA GRUBUNA AİT BULGULAR	49
4.2. DNA'NIN KALİTATİF TAYİNİ.....	50
4.3. PER3 VNTR (rs57875989) POLİMORFİZMİNİN KLASİK PZR VERİLERİ	50
4.4. PER3 VNTR (rs57875989) POLİMORFİZMİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI	50
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	52
KAYNAKÇA.....	56

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1: Diyabetin Tarihsel Akışındaki Önemli Olaylar	6
Tablo 2.3: DM Kronik Komplikasyonları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Tablo 2.3: Sirkadiyen saat genleri: görevleri, ürünleri ve düzenlenmesi	24
Tablo 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar	42
Tablo 3.2. PER3 VNTR Bölgesi için Kullanılan Primer ve PZR Ürün Boyları	45
Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Klasik PZR Bileşenleri ve Miktarları	46
Tablo 3.4. PER3 VNTR Bölgesi İçin Kullanılan PZR Programı	46
Tablo 4.1. Çalışmada Yer Alan Örnek Gruplarının Cinsiyet ve Yaş Ortalamalarına Göre Dağılımı	49
Tablo 4.2. Çalışmada Yer Alan Hasta Gruplarının Çeşitli Tıbbi Parametreleri	49
Tablo 4.3. - Diyabetik Nöropati ve Kontrol Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması	51
Tablo 4.4. Diyabet ve Kontrol Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması	51
Tablo 4.5. Diyabetik Nöropati ve Diyabet Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Tahmini diyabetli yetişkin sayıları (milyon) (IDF Diyabet Atlası 1'den 10'a kadar) (International Diabetes Federation (IDF), 2021).....	2
Şekil 2.1: Diyabet Tanısı Kriterleri ve Sınır Değerleri (International Diabetes Federation (IDF), 2021).....	10
Şekil 2.2: Tip 1 Diyabet Evreleri (American Diabetes Association , 2018).....	13
Şekil 2.3: Tip 2 Diyabet Patofizyolojisi (Zaccardi ve ark., 2016)	14
Şekil 2.4: Diyabetik Nöropati Patogenezinde Rol Oynayan Önemli Faktörler (Kato ve ark., 2014).....	22
Şekil 2.5: Drosophila (A- Collins ve Blau, 2007) ve memelilerde (B- Cho, 2012) sirkadiyen ritim genlerinin düzenlenmesi.	25
Şekil 2.6: Karaciğerde sirkadiyen transkripsiyonel dalgalanma (Takahashi, 2018).	26
Şekil 2.7: Pozitif ve Negatif Düzenleyici Sirkadiyen Ritim Genlerinin Memeli Sirkadiyen Ritim Mekanizmasındaki Döngüleri (Bailey ve ark., 2014)	28
Şekil 2.8: PER3 polimorfizmleri ve sirkadiyen değişkenlerin genetik birliktelik çalışmaları (Mansour ve ark., 2017)	30
Şekil 2.9: Memeli Sirkadiyen Ritminin Temel Bileşenleri (Cox ve Takahashi, 2019)	32
Şekil 3.1: PER3 VNTR Bölgesi PZR Ürünlerinin %2.5'lik Agaroz Jel Görünümleri	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACR	:	Albümin:Kreatinin oranı
ADA	:	American Diabetes Association
AER	:	Albümin Atılım hızı
BMAL1	:	Brain and Muscle Arly Hydrocarbon Receptor Nuclear Antigen 1
CLOCK	:	Circadian Locomotor Output Cycles Kaput
CRY1	:	Cryptochrome 1
CRY2	:	Cryptochrome 2
DCTT	:	Diabetes Controls and Complications Trials
DM	:	Diyabetes Mellitus
DME	:	Diyabetik Maküler Ödem
DN	:	Diyabetik Nöropati
DPN	:	Diyabetik Periferik Nöropati
DR	:	Diyabetik Retinopati
GDM	:	Gestasyonel Diabetes Mellitus
mg	:	miligram
PDGF	:	Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü
PER1	:	Period Circadian Regulator 1
PER2	:	Period Circadian Regulator 2
PER3	:	Period Circadian Regulator 3
RNA	:	Ribo Nükleik Asit
T1DM	:	Tip 1 Diyabetes Mellitus
T2DM	:	Tip 2 Diyabetes Mellitus
TGF- β	:	Transforming Growth Faktör- β
TURDEP	:	Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
UKPDS	:	Birleşik Krallık Prospektif Diyabet Çalışması
VCAM 1	:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü1
VEGF	:	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

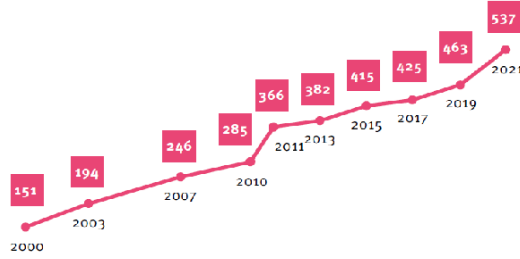
1.GİRİŞ

Diyabet, insülin salınımı, insülin etkisi veya her ikisindeki bozukluklardan kaynaklanan hiperglisemi ile karakterize bir grup metabolik hastalıktır. Tarih gözden geçirildiğinde, "diyabet" teriminin ilk olarak Memphis Apollonius tarafından MÖ 200 ila 300 civarında kullanıldığı görülmektedir (Goyal ve Jialal, 2022).

Diyabetli hasta sayısı yayılışına bakıldığında 1900'lerde gözle görülür bir artış gösterirken, 2000'lerden itibaren dünya üzerinde patlama yaşandığı göze çarpmaktadır. Bu hızlı artış, hastalığın yarattığı komplikasyonlar ve ekonomik yükü birleştiğinde diyabet, 21.yüzyılın en büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir (Zheng ve ark., 2018).

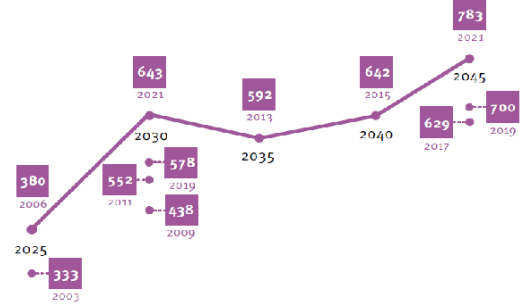
Uluslararası Diyabet Federasyonu'nun (IDF) 2000 yılından bu yana yayınladığı bilgilere göre, yetişkin diyabet hasta (Şekil 1.1) sayısı günden güne artmış ve 2021 verilerine göre yarım milyardan fazla kişide görülmeye başlanmıştır. Şekil 1.1'den de görüldüğü üzere, bu rakamın 2030 yılı itibarıyla 643 milyon ve 2045 yılına kadar ise 783 milyona ulaşacağı öngörülmektedir. Ülkemizi de içine alan Avrupa bölgesinde 2021 itibarıyla 10 yetiştikten birini de ifade eden 61.5 milyon diyabet hastası olup, diyabetli kişilerin üçte birinden fazlasına (27.45 milyon- %45) tanı konulmamış ve zararlı ve maliyetli komplikasyonlar gelişimi açısından yüksek risk altındadırlar. Türkiye 9 milyon diyabet hastası ile, Avrupa bölgesindeki en çok diyabetli hasta sayısına sahiptir (International Diabetes Federation (IDF), 2021).

20-79 yaş grubunda global diyabet proevakans tahminleri (milyon)



Anahtar
151 Diyabetli kişi sayısının (milyonla ifadesi)

20-79 yaş grubunda olası global diyabet prevalans projeksiyonları (milyon)



Anahtar
333 Projeksiyonun miyon ile ifadesi
2003 Projeksiyonun yapıldığı yıl

Şekil 1.1: Tahmini diyabetli yetişkin sayıları (milyon) (IDF Diyabet Atlası 1'den 10'a kadar) (International Diabetes Federation (IDF), 2021)

Öte yandan, 2021'de diyabet için yapılan global sağlık harcamaları 966 milyar doları bulmuştur ve bu rakamın 2030 yılı itibariyle 1030 milyar ve 2045 yılında ise 1050 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir. Ülkemizin de içinde bulunduğu Avrupa ise 2021 yılında 189 milyar dolar sağlık harcamasında bulunmuştur (International Diabetes Federation (IDF), 2021). Diyabetli hastaların %90'ında tip 2 diyabet bulunmakta olup (Zheng ve ark., 2018), bu finansal yükün büyük çoğunluğu tip 2 diyabet komplikasyonlarının yönetimine harcanmaktadır.

Tip 1 diyabet ve diğer tip diyabetler yüzde 5 ila 10 düzeylerinde olurken, tip 2 diyabet en yaygın çeşit diyabet olarak varlığını sürdürmeye devam etmektedir. Tip 2 diyabet, öncesinde yaşlılarda hafif bir rahatsızlık olarak algılanırken, şimdilerde profil değiştirerek genç yetişkinleri ve hatta hastalığın seyrinin daha agresif görüldüğü çocukları bile etkilemektedir (Zheng ve ark., 2018).

Düşük ve orta gelirli toplumlarda artan tip 2 diyabet salgını, diyabeti etkin şekilde kontrol altına almak için etkili stratejiler alınmazsa, vasküler komplikasyonları nedeniyle küresel çapta ciddi artışlara neden olacağına işaret etmektedir. (Mohan, 2017)

Diyabet, dünya çapında ölüme en çok sebebiyet veren 10 nedenden biridir. Yapılan değerlendirmelerde 2019 yılında 20-79 yaş grubundaki diyabet ve komplikasyonları kaynaklı ölümlerin 4.2 milyonu bulunduğu tahmin edilmektedir. Bu her 8 saniyede bir ölüme denk düşer. 20-79 yaş grubundaki diyabetle ilişkilendirilen ölümlerin neredeyse yarısı (%46.2) 60 yaş altındaki çalışma çağındaki insanlardır. Ülkemizi de kapsayan Avrupa bölgesinde, 2019 yılı itibarıyla 465,900 diyabet kaynaklı ölüm olduğu bildirilmiştir. Farklı gelir grupları arasında, diyabet kaynaklı ölümlerde en yüksek rakamlar %59 ile Rusya Federasyonu, Türkiye ve Ukrayna'yı içeren orta-gelirli ülkelerde görülmüştür (Williams ve ark., 2021).

Diyabetli hastalarda diyabet tanısı konulduğunda hastaların %10'unda mikrovasküler komplikasyonlardan diyabetik nöropati geliştiği tespit edilirken, 20.yıl sonunda nöropatili hastaların %50 civarlarında tespit edildiği gözlemlenmiştir. Tip 2 diyabet, 21.yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunlarından biri ve küresel boyutlarda sürekli büyüyen muazzam bir felaket haline gelmiştir (International Diabetes Federation (IDF), 2021).

Dünyanın kendi eksenini etrafındaki döngüsünün bir sonucu olarak, organizmalar gündüz ve gece ile ilişkili çevresel değişikliklere (örneğin aydınlık-karanlık ve sıcaklık döngüleri) maruz kalır. Çoğu organizma "sirkadiyen saat" olarak adlandırılan 24 saate yakın bir ritimle dahili bir zamanlama sistemi geliştirmiştir (Pittendrigh, 1960). Bu biyolojik saat, fizyoloji ve metabolizmayı günün saatine göre optimize etmek ve uyarlamak için hücresel süreçlerin zamanlamasını düzenler. Sirkadiyen saat sistemi, siyanobakteriler (Mori ve Johnson, 2000) gibi prokaryotlardan memeliler (Reppert ve Weaver, 2001) gibi ökaryotlara kadar tüm türler arasında korunmaktadır. Memeli sirkadiyen sistemi, hipotalamusun suprachiasmatik çekirdeğinde (SCN) merkezi bir saat ve vücudun hemen hemen tüm diğer hücrelerinde ve dokularında periferik saatlerden oluşur (Mohawk ve ark., 2012).

Sirkadiyen ritmin arkasındaki temel moleküler mekanizmalar saat genleri tarafından kontrol edilmektedir. Sirkadiyen ritim genleri iki transkripsiyon faktöründen (CLOCK ve BMAL1) ve bunların hedefleri olan Period (PER1, 2, ve 3), Cryptochrome (CRY 1 ve CRY 2) genlerinden oluşur (Sancar ve ark., 2010). Bir histon asetil transferaz olan CLOCK (circadian loco motor output cycles kaput), bir transkripsiyon faktörü olan

ve ARNTL (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like protein 1) olarak da bilinen BMAL 1 (Brain and Muscle ARNT-Like 1) ile heterodimerize olduğunda aktive olur. Bu kompleks sirkadiyen ritimde görev alan diğer saat genlerinin (PER1, 2, 3 ve CRY 1, CRY 2 gibi) transkripsiyonu sağlar (Kondratov, 2007). Bu saat gen ürünlerinden olan PER proteinleri hem biri birleriyle hem de diğer proteinler ile etkileşimlerini sağlayan ardı ardına iki PAS bölgesi içerir. Üç PER proteininden biri olan PER 3 ritim üretimi için gerekli olmamakla birlikte saat kontrolü altındadır. Diğer PER proteinleri PER 1 ve PER 2 saatin merkezi bileşenleridir (Beckett ve Roden, 2009).

Sirkadiyen bozulma onlarca yıldır diyabet ve diğer metabolik bozukluklarla epidemiyolojik olarak ilişkili olmasına rağmen, ancak son zamanlarda altta yatan moleküler mekanizmaları daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Deneysel sirkadiyen bozulma, gen-delesyonu fare modelleri kullanılarak çevresel veya genetik faktörlerin manipülasyonu yoluyla yapılan çalışmalar, sirkadiyen ritimlerin tüm vücut metabolizmasındaki önemini göstermiştir. Özellikle farelerdeki β hücrelerinde çekirdek saat genlerinin mutasyona uğratılmasıyla yapılan çalışmada düzenleyici fonksiyonda içsel β hücre saatinin önemini göstermiştir. Elde edilen veriler, tüm vücudun veya sadece β -hücre saatinin bozulması, mitokondriyal fonksiyonda önemli ölçüde bozulmaya, veziküler transportun bozulmasına, β -hücrelerinde oksidatif strese neden olduğunu göstermektedir. Böylece, bozulmuş glikoz metabolizması ve insülin sekresyonu sonucunda diyabet gelişimine yol açar (Lee ve ark., 2018).

Ardışık tekrar polimorfizmler insan genomunda belirli baz dizilimlerinden oluşan çekirdek ünitenin çeşitli sayılarda ardarda tekrarı ile oluşmaktadır. Dizinin tekrar sekansı birbirine benzemekte, ancak tekrarın sayısına bağlı olarak oluşan baz dizisinin uzunluğu popülasyondaki bireyler arasında farklılıklar göstermektedir. Bu polimorfizmler tekrar biriminin uzunluğuna bağlı olarak kısa (2-6 nükleotit) veya daha uzun (7-70 nükleotit) olarak sınıflandırılmaktadırlar. Kısa tekrar birimine sahip olanlar Kısa Ardışık Tekrarlar (Short Tandem Repeats- STRs), daha uzun sayıda tekrar birimine sahip olanlar ise genellikle Değişen Sayıda Ardarda Tekrarlar (Variable Number of Tandem Repeats; VNTRs) olarak bilinmektedir. VNTR'lar tekrar birimleri içerisinde ayrıca kısa delesyon ve insersiyonlar ve\veya tek nükleotit polimorfizmleri (Single Nucleotide Polymorphisms- SNPs) içerebilirler (Jeffeys ve ark, 1985; Sulovari ve ark, 2019).

Bu çalışmada Tip 2 Diyabetik nöropatili hastalarda sirkadiyen ritim genlerinden biri olan PER3 genindeki VNTR polimorfizminin dağılımını belirlemek ve hastalık ile PER3 genindeki bu polimorfizm arasında anlamlı bir ilişkinin olup olmadığını saptamak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Diyabetes Mellitus

Diyabetes mellitus (DM), veya daha basitçe ifade edebileceğimiz gibi diyabet, kişinin pankreasındaki beta hücrelerinden insülin hormonunun yeterince veya hiç üretilmediği ya da ürettiği insülini etkin olarak kullanamadığı için kanında gereğinden fazla glukoz varlığında oluşan kronik ve metabolik bir bozukluk durumudur (Mohan, 2017).

Diyabetin kronik etkileri hiperglisemi, disfonksiyon, uzun süreli hasar ile birlikte, özellikle böbrekler, gözler, sinirler, kalp ve kan damarları başta olmak üzere çeşitli dokulardaki hasarlarla ilişkilidir. Bazı patojenik süreçler Diyabet gelişiminde yer almaktadır. Bunlar, pankreasın β hücrelerinin otoimmün yıkımından, sonuçta insülin eksikliğine ve insülin etkisine direnç gibi anormalliklere kadar değişir. Diyabette metabolizmadaki (karbonhidrat, yağ ve protein) anormalliklerin temeli, insülinin hedef dokular üzerindeki yetersiz etkisidir. Yetersiz insülin etkisi, yetersiz insülin sekresyonu ve / veya doku yanıtlarının azalmasından kaynaklanır (Goyal ve Jialal, 2022).

İnsülin sekresyonunda bozulma ve insülin etkisindeki bozukluklar aynı hastada sıklıkla bir arada bulunur ve hiperglisemi söz konusuysa bu anormalliklerin hangisinin tek başına bunun birincil nedeni olduğu genellikle belirsizdir. Diyabetin patofizyolojisindeki ilk keşifler doğası itibariyle tarihsel olarak temel (ve tanısal) karakteristiği olduğu düşünülen poliüriye bağlanır. Hatta diyabet terimi de böbrekten aşırı idrar geçişini belirtmek amaçlı eski Yunancada ‘geçiş’ anlamına gelen ‘diabainen’ kelimesinden türemiştir (Zaccardi ve ark., 2016). Diyabetin tarihsel akışındaki önemli olaylar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Diyabetin Tarihsel Akışındaki Önemli Olaylar (Goldman, 2017)

M.Ö. 1500 dolaylarında, Ebers Papyrus	Eski Mısırlı hekimler tarafından diyabete ilk yazılı referans
M.Ö. 230, Apollonius of Memphis	Hastalığa diyabet isminin verilmesi (böbrekten aşırı idrar geçişini belirtmek için 'geçiş' anlamında, Yunanca 'diabainen' kelimesinden türemiştir)
M.S. 1.Yüzyıl, Aulus Cornelius Celsus	Diyabetin ilk klinik tanımlanması
M.S. 5.yüzyıl, Susruta and Charaka, Hindistan	Tip 1 ve Tip 2 diabetes mellitus arasındaki ilk ayırım
1776, Mathew Dobson, İngiltere	Diyabetik bireylerin idrarındaki tatlandırıcı maddenin şeker olduğunun belirlenmesi
1869, Paul Langerhans, Almanya	Pankreas kanalları tarafından boşaltılmayan, pankreastaki küçük hücre kümelerinin keşfi. Bu hücre kümeleri daha sonra "Langerhans adacıkları" olarak adlandırıldı
1889, Oscar Minkowski, Joseph von Mehring, Almanya	Hemen diyabet gelişimine neden olması için köpeklerdeki pankreasın kaldırılması
1893, Edouard Laguesse, Fransa	Langerhans adacıkları antidiyabetik maddenin kaynağı olabilir
1907, Georg Zuelzer, Almanya	Diyabetik köpeklerde kan ph'ını artıran, idrardaki şekeri azaltan, Zuelzer tarafından üretilen, pankreatik öz "acomatol"
1921–1922, Frederick Banting, Charles Best, James Collip, and John J.R. Macleod, Kanada	Köpeğin pankreatik özlerinin idrar şekerini düşürdüğü gösterildi. Diyabetik hasta için saf pankreatik özün ilk başarılı klinik kullanımı. Eli Lilly Şirketi insülinin ticari geliştirilmesi üzerine çalışmalara başlar.
1928, Almanya	Diyabet tedavisi için oral yoldan uygulanan Synthalin–a guanidin türevi
1939, C. Ruiz, L.L. Silva, Arjantin	Sülfonamid antibiyotiklerin hipoglisemik özellikleri ilk kez gözlemlendi
1958, Frederic Sanger, Büyük Britanya	Sığır insülinin yapısal formülü için Nobel Ödülü
1959, Rosalyn Yalow and Salomon Berson, USA	Radyoimmünanalizin (RIA) geliştirilmesi. Rosalyn Yalow, RIA için 1977'de Nobel Ödülü aldı.
1966, University of Minnesota, USA	Uygulanan ilk pankreas nakli

1969, Dorothy Hodgkin, Büyük Britanya	X-ray kristalografisi kullanarak domuz insülininin üç boyutlu yapısının tanımlanması
1978, Robert Crea, David Goeddel, USA	Rekombinant DNA teknolojisi kullanarak insan insülini üretimi
1985, Ora M. Rosen, USA	İnsan insülin reseptörünü kodlayan genin klonlanması
1993, Diabetes Control and Complications Trial, USA	Tip 1 diyabetin metabolik kontrolünün diyabetik komplikasyonların gelişimiyle ilişkisi
1998, United Kingdom Prospective Diabetes Study, Büyük Britanya	Tip 2 diyabetin metabolik kontrolünün diyabetik komplikasyonların gelişimiyle ilişkisi
2001, Diabetes Prevention Program, USA	Beslenme ve egzersizin yüksek risk popülasyonunda tip 2 diyabet gelişimi oranına ilişkisi
2003, Human Genome Project	İnsan genomunun dizilimi
2007, First Genome-Wide Association Studies for Diabetes	Tip 2 diyabet ile ilişkili olarak tanımlanan yeni bölgeler
2008, Results of the ACCORD trial published	Diyabetli kişilerde kardiyovasküler sonuçlar üzerine sıkı glisemik kontrolün etkileri
2013, Results of Look AHEAD trial published	Diyabetli insanlarda kardiyovasküler sonuçlar üzerine yoğun diyet ve kilo kaybı müdahalelerinin etkileri

Vücuttaki glukoz metabolizmasını anlamak diyabeti doğru anlayabilmek açısından oldukça önemlidir. Serbest yağ asitleri birçok organ için ana yakıt olmasına rağmen, glukoz fizyolojik koşullar altında beyin için zorunlu metabolik yakıttır. Bu durum, diğer olası alternatif maddelerin (keton cisimleri gibi) dolaşımda olan konsantrasyonlarının düşük miktarda olması veya kan-beyin bariyerleri boyunca taşınma limitleri (serbest yağ asitleri gibi nedenlerden) nedeniyle oluşmaktadır (Siesjö, 1988). Ancak, özellikle uzun süreli açlık sonrası, kan dolaşım konsantrasyonlarındaki artış nedeniyle, keton cisimleri beyin tarafından önemli ölçüde kullanılabilir (Morgan ve ark., 1967).

Beyin, glukoz sentezini veya uzun süreli taşınımından sonra fazla glukozun glukojen olarak depolanmasını gerçekleştiremez. Bu bağlamda, beyin plazmadan sürekli bir glukoz temin etmek zorundadır. Normal seviyelerin altındaki (20 mg/dl~1 mmol/l) plazma glukoz konsantrasyonlarında, glukoz taşınması beyin glikoz yararlanımı için hız sınırlayıcı olur. (Siesjö, 1988) Daha ciddi ve uzun süreli hipoglisemi konvülsiyonlara,

kalıcı beyin hasarına neden olurken, 55 mg/dl (3 mmol/l) altındaki glukoz plazma konsantrasyonları serebral fonksiyonu zayıflatır (Ryan ve ark., 1991). Plazma glukoz konsantrasyonları, glukozun dolaşıma girmesi ve ayrılmasına ilişkin oranlar tarafından belirlenir (Kelley ve ark., 1988).

Anlık düzeyde glukoz taşınımını etkileyen en önemli faktörler, hormonların (insülin, glukagon ve katekolaminler) ve diğer substratların (Free Fatty Acids- FFA) konsantrasyonuna ilaveten, sempatik sinir sistemi aktivitesidir. Daha uzun zamanlı bir açlık düzeyinde (saatler-günler), diğer hormonlar (kortizol ve büyüme hormonu), besinsel faktörler (diyet düzenlenmesi gibi), egzersiz ve fiziksel uygunluk önemli hale gelir. Kortizol, büyüme hormonu ve katekolaminler, insülin duyarlılığını değiştirerek ve aynı zamanda alternatif substratların varlığındaki değişimler yoluyla glukoz homeostazisini etkiler (Alsahli ve ark., 2017).

2.1.1. Diyabetes Mellitus Etiyolojisi ve Epidemiyolojisi

Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM) ve komplikasyonları özellikle gelişmekte olan ülkelerde epidemik seviyelere ulaşmıştır. Küresel olarak, yaklaşık her 11 yetişkinden biri T2DM hastalığına sahip ve diyabetli hastaların yaklaşık %75'i gelişmekte olan ülkelerde yaşamaktadır. Ayrıca, T2DM olan hastaların Amerika'da yaşam süresinde 8 yıllık bir azalma görülmüştür. T2DM'li çoğu hastanın komplikasyonları olduğundan hastalığın yaşam kalitesi üzerine negatif bir etkisi de vardır. (Zheng ve ark., 2018)

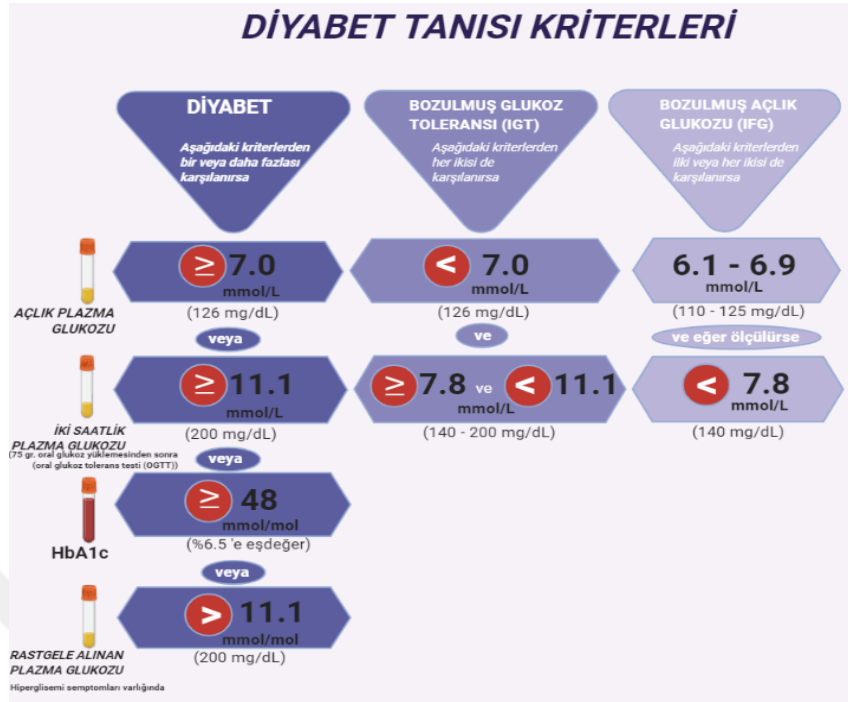
Ülkemizde de T.C. Sağlık Bakanlığı'nın sahada lojistik iş birliği ile İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi tarafından Ocak 2010-Haziran 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilen 'Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II (TURDEP-II Çalışması) saha araştırması, 20 yaş ve üzerinde, ilgili bölgenin nüfus yapısına uygun olarak rastgele seçilip davet edilen 26 499 kişinin katılımıyla ve %92 katılım oranı ile tamamlanmıştır. Elde edilen verilere göre erişkin Türk toplumunda diyabet sıklığının %13.7'ye ulaştığı görülmüştür (Satman ve ark., 2013).

2.1.2. Diyabetes Mellitus Tanısı ve Semptomları

Diyabet, üç bin yıldan fazla bir süre boyunca aşırı susama, sürekli idrara çıkma ve ciddi kilo kaybına neden olan bir medikal durum olarak tıbbi yazarların ilgisini çekmiştir. Yirminci yüzyılın erken dönemlerine kadar bu durumdaki bir hastanın prognozu 3000 yıl öncesinden daha iyi değildi. Eski hekimler hemen hemen yalnızca bugün tip 1 diyabet olarak bilinen durumları tanımladıklarından, sonucu değişmez şekilde ölümcüldü (Goldman, 2017).

DM'nin mevcut anlayışının önemli elementleri biyokimya ve deneysel fizyolojiyi içeren modern bilimsel çalışmaların ilk örnekleri on dokuzuncu yüzyıla uzanır. 1815'te Paris'te Eugene Chevreul diyabetli bireylerin idrarındaki şekerin glukoz olduğunu kanıtladı. Von Fehling 1848'te idrardaki glukoz için kantitatif bir test geliştirdi. Böylelikle, 19.yüzyılda glukozüri (idrardaki şeker) diyabetin onaylanmış bir tanı kriteri haline geldi (Goldman, 2017).

İnsülin pankreasta üretilen temel bir hormon olup, glukozun kan dolaşımından enerjiye dönüştürüldüğü hücrelere girmesine izin verir. İnsülin aynı zamanda yağ ve protein metabolizması için de gereklidir. İnsülin eksikliği veya hücrelerin insüline cevap verme yeteneğini kaybetmesi, diyabetin klinik göstergesi olan yüksek kan glukoz düzeylerine (hiperglisemi) götürür. Diyabet tanısı için sınır değerler Şekil 2.1'de görülebilir (International Diabetes Federation (IDF), 2021).



Şekil 2.1: Diyabet Tanısı Kriterleri ve Sınır Değerleri (International Diabetes Federation (IDF), 2021)

İnsülin eksikliği, uzun dönemde kontrol edilmezse, göz hastalığı (retinopati, görme kaybı ve hatta körlüğe yol açan), böbrek hasarı (nefropati), sinir hasarı (nöropati) ve kardiyovasküler hastalıklar (CVD) gibi hayatı tehdit edici sağlık komplikasyonları ile beraber organların çoğunun zarar görmesine yol açabilir (International Diabetes Federation (IDF), 2021).

Obezite ve diyabetin süregelen yaygınlığı, teşhis konmamış tip 2 diyabetli hamile kadınların sayısında bir artış ile doğurganlık çağındaki kadınlarda daha çok tip 2 diyabet olmasına yol açmaktadır (Lawrence ve ark., 2008). Tanı konulamayan tip 2 diyabetli hamile kadınların sayısı nedeniyle, standart tanı kriterini kullanarak doğum öncesi ilk ziyaretlerinde tip 2 diyabet için risk faktörleri olan kadınları test etmek oldukça akla yatkındır. Böylece, ilk üç ayında diyabet tanısı konmuş kadınlar önceden var olan gebelik öncesi diyabetine (tip 2 diyabet veya çok nadiren tip 1 diyabet) sahip olup sınıflandırması buna göre yapılmalıdır. GDM, önceden var olan tip 1 veya tip 2 diyabeti

olup olmadığı aşikar olmayan hamilelerin ikinci veya üçüncü üç aylık dönemlerinde tanısı ilk kez konmuş diyabet çeşidi olarak tanımlanmaktadır (American Diabetes Association, 2017).

2.1.3. Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırılması

1950'lerde radyoimmün analizlerin varlığı 'insülden bağımsız' diyabetten 'insüline bağımlı' olarak diyabetin sınıflandırılmasına yardım etti ve 1979'da tip 1 (insüline bağımlı) ve tip 2 (insülden bağımsız) diyabet kavramları resmen tanınarak kullanılmaya başlandı (Goldman, 2017).

Günümüzde diyabet dört ana başlıkta ele alınabilir, bunlar;

- Tip 1 Diyabetes Mellitus (T1DM), nedenleri açısından ikiye ayrılır.
 - ❖ Genellikle tam insülin eksikliğine götüren otoimmün kaynaklı beta hücreleri yıkımıyla gelişen T1DM
 - ❖ Bilinen sebepleri olmayan ve kuvvetli şekilde kalıtsal olan T1DM, başka bir deyişle idyopatik diyabet
- Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM) (sıklıkla insülin direncinin arka planında aşamalı bir β -hücre si insülin salınımının kaybı yüzünden gerçekleşir.)
- Gestasyonel Diyabetes Mellitus (GDM) (gebelik öncesi diyabeti olmayan hamileliğin ikinci veya üçüncü üç ayında tanımlanan diyabet)
- Diğer nedenle bağlı diyabet;
 - ❖ Monojenik diyabet sendromu (neonatal diyabet ve gençlerin erişkin tipi diyabeti (MODY))
 - ❖ Ekzokrin pankreas hastalıkları (kistik fibrozis gibi)
 - ❖ İlaç veya kimyasal kaynaklı diyabet (HIV/AIDS tedavisinde veya organ naklinden sonra glukokortikoid kullanımıyla olan diyabet) (American Diabetes Association, 2017)

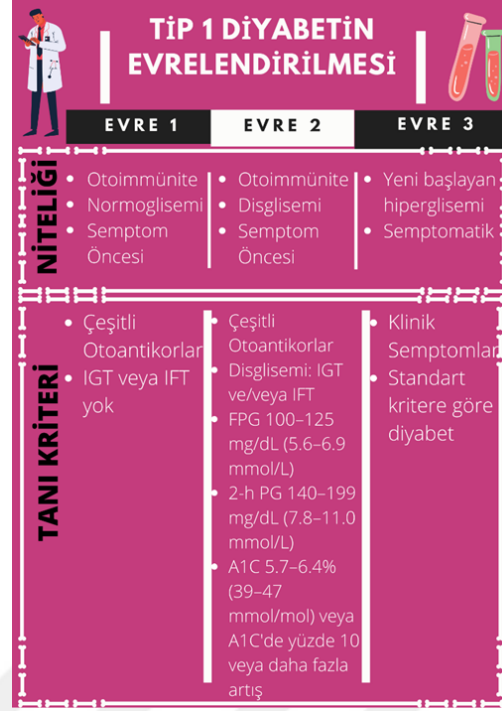
Tip 1 ve tip 2 diyabet klinik sunum ve hastalık aşaması önemli ölçüde çeşitlenebilecek heterojen hastalıklardır. Bu sınıflandırma tedaviyi belirlemede önemli olmakla beraber, bazı bireylerin tanımlanmasında kesin olarak tip 1 veya 2 diyabete sahip olduğu açıkça söylenemez. Tip 2 diyabetin sadece yetişkinlerde, tip 1 diyabetinse sadece çocuklarda var olduğu gibi eski varsayımlar artık doğru olmamakla beraber, her iki

hastalık da hemen her yaşta görülebilmektedir. Zaman zaman, tip 2 diyabetli hastalar, özellikle etnik azınlıklara ait olanlar, diyabetik ketoasidoz (DKA) sergileyebilir. Tip 1 diyabetli çocuklar ise poliüri/polidipsi belirgin özellikleri ile yaklaşık üçte biri DKA gösterir (Association, American Diabetes, 2017).

2.1.3.1. *Tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)*

T1DM, insülin üreten pankreatik β hücrelerinin yıkımıyla karakterize edilen bir otoimmün hastalık olup, diğer birçok immün sistem aracılı hastalık gibi T1DM de başlangıcı, otoimmün tepkisinin ağırlık derecesi ve tedavinin etkinliği bakımından çeşitlilik göstermektedir (Zaccardi ve ark., 2016). T1DM, DM'nin % 5 ila % 10'unu oluşturur ve pankreas adacıklarında insülin üreten beta hücrelerinin otoimmün yıkımı ile karakterizedir. T1DM en sık çocuklarda ve ergenlerde görülür, ancak her yaşta gelişebilir (Goyal ve Jialal, 2020).

Tip 1 diyabetin oluşumu ve yayılımı artmaya devam etmekte olup; tip 1 diyabetli hastalar sıklıkla akut diyabet semptomları ve belirgin şekilde yükselmiş kan glukoz seviyeleri göstermektedirler. Ayrıca T1DM olan hastaların yaklaşık üçte birine de yaşamı tehdit edici ketoasidoz tanısı konmaktadır. Tip 1 diyabetlilere ilişkin adacık otoantikörlerinin ölçümünün Tip 1 diyabet geliştirme riski olan bireyleri tanımlayabileceğini gösteren bazı çalışmalar da yapılmıştır (Insel ve ark., 2015). Böyle testlerle beraber diyabetin semptomları hakkında eğitim ve yakın takip birlikte uygulanırsa tip 1 diyabetin başlangıcı çok daha erken tanımlanabilir (American Diabetes Association, 2017). Tip 1 diyabetin evreleri Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: Tip 1 Diyabet Evreleri (American Diabetes Association , 2018)

2.1.3.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus (T2DM)

Tüm diyabet vakalarının yaklaşık %90'unu Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) oluşturur. T2DM'de oluşan durum insüline cevapta azalma ile karakterizedir ve bu insülin direnci olarak tanımlanmaktadır. Oluşan bu durumda insülinin etkisizliği söz konusudur ve başlangıçta insülin üretimi glikoz homeostazını korumak için artar, ancak zamanla azalan insülin üretimi T2DM'un ortaya çıkışına neden olur. T2DM en sık 45 yaşından büyük kişilerde görülür. Yine de, artan obezite, fiziksel hareketsizlik ve enerji yoğun diyetler nedeniyle çocuklarda, ergenlerde ve genç erişkinlerde giderek daha fazla görülmektedir (Goyal ve Jialal, 2020).

İnsülinden bağımsız olan T2DM'de, pankreatik beta hücrelerinden bozulmuş insülin salınımı ve insülin direnci yoluyla bozulmuş insülin eylemlerine götüren insüline duyarlı dokular arası düzeni bozan belirli mekanizmalar vardır. Bu tip diyabette gözlenen çeşitli genetik bozukluklar ve belirli çevresel faktörler, özellikle obezite, beta hücresi bozuklukları ve nispeten de periferik doku insülin direncinden sorumludur (Ullah ve ark., 2015).

T2DM, önceki tanımlarıyla ‘insülden bağımsız diyabet’ veya ‘yetişkin başlangıçlı diyabet’, tüm diyabetlilerin yüzde 90-95’ine tekabül eder. Bu yüzden nispi insülin eksikliği ve periferik insülin direncine sahip olan bireyleri de kapsar. En azından başlangıçta ve sıklıkla hayatları boyunca bu bireyler hayatta kalmak için insülin tedavisine ihtiyaç duymayabilirler (American Diabetes Association, 2017).

Tip 2 diyabetin çeşitli nedenleri olup, tip1 diyabette olduğu gibi otoimmün β - hücrelerinin yıkımı gerçekleşmez. Ayrıca hastalar da diyabetin diğer bilinen nedenlerinden hiçbirine sahip değildir. Bununla beraber, tip 2 diyabetli hastaların hepsi olmasa da çoğu fazla kilolu veya obezdir. Fazla kilonun kendisi bir dereceye kadar insülin direncinin sebebidir. Ketoasidoz tip 2 diyabette nadiren kendiliğinden oluşur; görüldüğünde de genellikle enfeksiyon gibi başka bir hastalığın stresiyle ilişkili olarak oluşur. Hiperglisemi aşamalı olarak geliştiğinden ve erken evrelerinde sıklıkla hasta için klasik diyabet semptomları farkedebilecek kadar ciddi seyretmediğinden, tip 2 diyabet yıllar boyu teşhis edilmeden seyreder. Ne yazık ki, teşhis konulamayan hastalarda bile mikrovasküler ve makrovasküler komplikasyonlar geliştirme riski önemli ölçüde yüksektir. Tip 2 diyabetli hastalar normal veya yükselmiş görünen insülin seviyelerine sahip olabilirken, bu hastalardaki daha yüksek kan glukoz seviyelerinin β -hücresi normal çalıştığından daha da yüksek insülin değerlerine yol açması beklenir. İnsülin direnci kilo vermek ve/veya hipergliseminin farmakolojik tedavisi ile düzelebilir fakat nadiren normale dönebilir (American Diabetes Association, 2017) (Şekil 2.3).



Şekil 4.3: Tip 2 Diyabet Patofizyolojisi (Zaccardi ve ark., 2016)

2.1.3.3. Gestasyonel Diabetes Mellitus (GDM)

Gestasyonel diabetes mellitus (GDM) geleneksel olarak değişken şiddette karbonhidrat intoleransı olarak gebelikte, başlangıçta veya gebelik sırasında tanımlanmaktadır (World Health Organization, 1999). Bu tanım, doğumdan sonra normalleşen anormal glikoz toleransını ve hamilelik öncesinde tanı konulmamış veya eşzamanlı olarak başlayan DM'ü kapsar. T2DM ve nadiren T1DM veya monojenik diyabeti içerir (Scottish Intercollegiate Guidelines Network, 2010). İlk olarak hamilelik sırasında tespit edilen hiperglisemi, hamilelikte hiperglisemi olarak da bilinen GDM olarak sınıflandırılır.

Gebelik sırasında herhangi bir zamanda ortaya çıkabileceği gibi, GDM genellikle ikinci ve üçüncü trimesterlerde hamile kadınları etkiler. Amerikan Diyabet Derneği'ne (ADA) göre GDM tüm gebeliklerin % 7'sinde oluşabilmektedir. GDM'li kadınlar ve bebekleri gelecekte T2DM geliştirme açısından artan riske sahiptirler. GDM hipertansiyon, preeklampsi ve hidramnios ile komplike olabilir ve ayrıca operatif müdahalelerin artmasına neden olabilir. Fetusun ağırlığı ve boyutu (makrozomi) veya konjenital anomaliler artabilir. Doğumdan sonra bile, bu tür bebeklerde solunum sıkıntısı sendromu ve daha sonra çocukluk ve ergen obezitesi gözlenebilir. İleri yaş, obezite, aşırı gebelik kilo alımı, önceki çocuklarda veya ölü doğumda konjenital anomali öyküsü veya ailenin diyabet öyküsü GDM için risk faktörleridir (Goyal ve Jialal, 2020).

GDM prevalansı popülasyon özelliklerine ve kullanılan tanı kriterlerine bağlı olarak büyük ölçüde değişir. 2010'dan önce Birleşik Krallık ve İrlanda'da yapılan kohort çalışmaları, gebeliklerin %1-3'ünün GDM ile komplike olduğunu göstermiştir (Farrar ve ark., 2016). Aksine, daha kapsamlı tanı ölçütleri uygulandığında Hiperglisemi ve Advers Gebelik Sonuçları (HAPO) çalışmasında yer alan 15 merkezde GDM prevalansı %9 ile %26 (ortalama %18) arasında değişmektedir (Sacks ve ark., 2012). 2017 yılında dünya çapında her yedi canlı doğumdan birinin GDM'den etkilendiği tahmin edilmektedir. Bu, küresel olarak gebelik sırasında diyabetten etkilenen toplam 21,3 milyon canlı doğumun %85'ini temsil etmektedir (International Diabetes Federation, 2017). GDM prevalansındaki artışın temel nedenleri obezite salgını, fiziksel hareketsizlik ve artan anne

yaşıdır. GDM şu anda en yaygın gebelik komplikasyonlarından biri olmasına rağmen, tarama zamanlaması, tanı eşikleri, optimal yönetim ve doğum sonrası takip konusunda önemli tartışmalar hala devam etmektedir (Lavery ve ark., 2016).

2.1.3.4. Diğer Diyabetes Mellitus Tipleri

Genetik bozukluklar, pankreasın ekzokrin bozuklukları, Cushing sendromu, akromegali gibi endokrinopatiler, ilaç ve kimyasallar, enfeksiyonlarla ilişkili diyabet gibi daha az sıklıkta görülen tiplerdir.

2.1.4. Diyabetes Mellitus Komplikasyonları

Diyabet hastalarının, hastalıklarının başlangıcından itibaren her zaman komplikasyon riski olup, bu komplikasyonlar akut ve kronik komplikasyonlar olarak 2 şekilde ele alınır.

- ❖ Metabolik, akut komplikasyonlar; kısa dönemli olup hipoglisemi, ketoasidoz ve hiperosmolar nonketonik komayı içerir.
- ❖ Sistemik, kronik komplikasyonlar; diyabetik nefropati, mikroanjyopati, diyabetik nöropati ve nefropati, damar tıkanıklığı ve enfeksiyonlarını içeren uzun dönemli, kronik tipteki komplikasyonlardır. (Ullah ve ark., 2015)

Kronik komplikasyonlar kendi arasında makrovasküler (koroner kalp hastalığı, periferik damar hastalığı ve inme), mikrovasküler (nöropati, retinopati ve nefropati) ve hem makro- hem de mikrovasküler (diyabetik ayak) olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2 DM Kronik Komplikasyonları

Makrovasküler Komplikasyonlar	Mikrovasküler Komplikasyonlar
1-Koroner Arter Hastalığı ve Ateroskleroz	1-Diyabetik Kardiyomiyopati
2-Serebrovasküler Olay	2-Diyabetik Retinopati
3-Periferik Vasküler Hastalık	3-Diyabetik Nefropati
4-Hipertansiyon	4-Diyabetik Nöropati

Mikrovasküler komplikasyonlar en küçük kan damarlarının hastalığı olup (kapiller ve prekapiller arteriyoller gibi), kapiller bazal membranın kalınlaşmasıyla oluşur ve nöropati, nefropati, retinopati gibi diyabete özgü değişikliklerin gözlemlendiği

durumlar vardır (Masharani ve German, 2017). Diyabet diyabetik mikroanjiyopatinin gelişimine götüren, glomerüller, retina, miyokard, deri ve kaslardaki küçük atardamarları içeren kılcal damar bazal membranın kalınlığını artırarak değişimlere neden olur. Bu kalınlık nihayetinde hipertansiyon, yara iyileşmesinde gecikme ve doku hipoksisi gibi çeşitli klinik problemlere neden olabilen damar fonksiyonundaki anormalliğe yol açar. Makrovasküler ateroskleroza da içeren sistemik diyabetik komplikasyonlarda mikrovasküler patolojinin rolü üzerinde durulması ve tartışılması gereken bir konu olarak kalmaya devam etmektedir (Donnelly ve ark., 1999).

Mikrovasküler komplikasyonlarla hastalığın süresi arasında, değişik yaş grupları içinden 25 yaş üstü beş yıldan fazla süredir diyabet hastası olanların yüzde 25-40'ında mikrovaskülopatinin varlığı belgelenecek doğrusal bir ilişki kurulmuştur. Yoğun glisemik kontrol, mikrovasküler komplikasyonların oluşmasını ve ilerlemesini azaltmasına rağmen, bu komplikasyonlara ilişkin morbidite halen artmaya devam etmektedir. (Donnelly ve ark., 1999)

Kronik diyabetik komplikasyonların oluşumunda glukozun rolü epidemiyolojik veriler ve DCTT (Diabetes Controls and Complications Trials) gibi prospektif çalışmalar ile doğrulanmıştır. Glukozun etkisiyle ortaya çıkan komplikasyonlar için ileri sürülen dört oluş mekanizması söz konusudur. Bunlar; (1) poliyol, (2) heksosamin yolaklarında ve (3) ileri glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumunda artış ve (4) protein kinaz C aktivasyonudur. AGE öncülleri olarak bilinen hücre içi dikarbonillerin (glioksal, 3-deoksiglukozon, metilglioksal) üretimi glukozun hücre içi otooksidasyonu sonucu artar. Bu AGE öncülleri, dokulardaki hasara matriks komponentleri ile, hücre içi ve hücre dışı proteinleri etkileyerek neden olur. Hücre içi proteinlerde gözlenen modifikasyonlar hücre fonksiyonunu değiştirebilirken, hücre dışı matriks proteinlerinde ortaya çıkan değişimler, diğer matriks proteinleri ve bileşenleriyle normal olmayan reaksiyonlara neden olabilir. Plazma proteinlerindeki değişimler sonucu bu proteinler mezenşiyum, makrofaj ve endotel reseptörlerine bağlanarak çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin (vasküler hücre adezyon molekülü 1 (VCAM 1), IGF-1, interlökin-1, transforming growth faktör- β (TGF- β), TNF- α , granülosit-makrofaj stimule edici faktör, makrofaj koloni stimule edici faktör, trombomodulin, trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) ve b.) ekspresyonunu uyarır. Bu sitokin ve büyüme faktörlerinin

ekspresyonundaki artışın diyabete bağlı oluşan komplikasyonların gelişiminde rol oynadığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Örneğin, diyabete bağlı vasküler hiperpermeabilite ile VEGF'nin indüksiyonunun ilişkili olduğu bulunmuştur (Inzucchi ve Sherwin, 2011). Yine VEGF'ün diyabetik proliferatif retinopatide arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca bazı çalışmalarda artan PDGF- β reseptör ekspresyonu ile vasküler düz kas hücrelerinde hipergliseminin ilişkili olduğunu ve vasküler düz kas hücrelerinin göçünün, büyümesinin ve DNA sentezinin PDGF- β aracılı arttığı gösterilmiştir (Inaba ve ark., 1996). Diyabette uzamış hiperglisemi sonuç olarak büyüme faktörleri ve sitokinlerin gen ekspresyonlarını değiştirip, trombosit ve makrofajları aktive edip, birçok mekanizma ile birlikte vasküler inflamasyonu düzenleyerek diyabetik vasküler komplikasyonların gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Bessa ve ark., 2012).

2.1.4. 1. Diyabetik Retinopati

Diyabetik retinopati (DR), retina hasarı ile karakterize edilen ve dünya çapında 150 milyon kişiyi etkileyen diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından biridir. Bu rakamın 2025 yılına kadar iki katına çıkması beklenmektedir. Diyabetik oftalmopatinin yanlış tedavisi veya gecikmiş tedavisi, retinal hücre dejenerasyonu ve görme kaybı gibi ciddi sonuçlara yol açabilir (Cheung ve ark., 2007). DR, inflamatuvar lezyonlar, oksijensiz radikaller ve lipid peroksidasyonu gibi birçok patojenik faktörün neden olduğu karmaşık bir patolojik süreçtir (Luo ve ark., 2015).

Retinopati, diyabetin yaygın bir komplikasyonudur: başlangıcı ve ilerlemesi plazma glikozu ile yakından ilişkilidir. HbA1c'de %1'lik bir artış retinopati riskinde %30 artış, ilerlemesinde %20 ve körlükte ise neredeyse %15 artış ile ilişkilidir (Wong ve ark., 2016). Son zamanlarda, DR kavramı, endotel hücreleri, perisitler, glial hücreler, mikroglia ve nöronlar dahil olmak üzere çeşitli hücreler fenotiplerden oluşan nörovasküler ünite kavramına dönüşmüştür ve diyabet tüm bu bileşenleri bozar (Simo ve ark., 2018). Diyabetik maküler ödem (DME), diyabetin başka bir görmeyi tehdit edici komplikasyonudur ve retinanın merkezi kısmı içinde kan-retinal bariyerin (BRB) başarısızlığının bir sonucu olarak ortaya çıkan bir sıvı birikimini temsil eder. Yaygın ödem yaygın kılcal sızıntıdan kaynaklanırken, lokal ödem ise gruplanmış

mikroanevrizmaların fokal sızıntısından kaynaklanmaktadır (Bandello ve ark., 2017). DME, retinadaki diğer mikroanjyopati belirtileri olmadan izole olabileceğinden DR'den ayrı bir yapı olarak sınıflandırılır. Wisconsin Diyabetik Retinopati Epidemiyolojik Çalışması, tip 1 diyabetli hastaların %20'sinin ve tip 2 diyabetli hastaların %25'inin 10 yıllık takipten sonra DME geliştirebileceğini göstermiştir (Klein ve ark., 2009). 2019 Diyabette Tıbbi Bakım Standartları, tip 1 diyabetli yetişkinlerin diyabetin başlamasından sonraki 5 yıl içinde kapsamlı bir göz muayenesi yapması gerektiğini belirtirken, tip 2 diyabetli hastaların hastalık teşhisinden hemen sonra kapsamlı bir göz muayenesi yaptırması gerektiğini bildirir (American Diabetes Association, 2019).

T2DM hastalarında DR gelişmesi riskinin hem hipergliseminin şiddet dereceleri hem de hipertansiyonun varlığıyla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Chawla ve ark., 2016).

2.1.4.2. Diyabetik Nefropati

Diyabetik nefropati, renal replasman tedavisine başlayan hastalarda kronik böbrek hastalığının önde gelen nedenidir (USRDS, 2003) ve artmış kardiyovasküler mortalite ile ilişkilidir (Valmadrid ve ark., 2000). Diyabetik nefropati klasik olarak $> 0.5\text{g}/24$ saat proteinüri varlığı ile tanımlanmıştır. Bu aşamaya açık nefropati, klinik nefropati, proteinüri veya makroalbuminüri denir. 1980'lerin başında, Avrupa'dan yapılan seminal çalışmalar, genellikle geleneksel yöntemlerle tespit edilmeyen idrardaki küçük miktarlarda albuminin tip 1 (Viberti ve ark., 1982) ve tip 2 diyabetik hastalarda proteinüri gelişimine etkisini göstermiştir. Böbrek tutulumunun bu aşamasına mikroalbuminüri veya yeni başlayan nefropati adı verilmiştir (Mogensen, 1984).

Mikroalbuminüri, diyabetik nefropatinin ilk belirtisidir; idrar albumin atılımında kalıcı bir artış (ardışık üç idrar örneğinden en az ikisinde) olarak tanımlanır. Genellikle sabah erken idrar örneklerinde ölçülür ve idrar albumin konsantrasyonu idrar konsantrasyonunu ayarlamak için idrar kreatinin oranı olarak ifade edilir. Diyabetik nefropati taraması genellikle tek bir sabah erken idrar örneğinde ACR (albumin:kreatinin oranı) ölçülerek yapılır. Erkeklerde $2,5 \text{ mg}/\text{mmol}$ veya daha fazla veya kadınlarda $3,5 \text{ mg}/\text{mmol}$ veya daha fazla ACR değerleri, zamanlanmış durumlarda AER (Albumin

Excretion Rate) için 20 mikrogram/dakika veya 30 mg/gün) anormaldir (American Diabetes Association, 2018).

Diyabetik nefropati Afrikalı Amerikalılar, Asyalılar ve Yerli Amerikalılar arasında Kafkasyalılardan daha yaygındır (Young ve ark., 2003). Renal replasman tedavisine başlayan hastalarda diyabetik nefropati insidansı 1991-2001 yılları arasında iki katına çıkmıştır (USRDS, 2003). Neyse ki, muhtemelen diyabetik nefropatinin erken teşhisine ve önlenmesine katkıda bulunan ve böylece yerleşik böbrek hastalığının ilerlemesini azaltan çeşitli önlemlerin klinik uygulamada benimsenmesi nedeniyle artış hızı yavaşlamıştır. Bununla birlikte, bu önlemlerin uygulanması arzulanan hedeflerin çok altındadır (Craig ve ark., 2003).

2.1.4.3. Diyabetik Nöropati

Diyabetik nöropati (DN), DM'un en sık görülen ve zor komplikasyonudur. DN en büyük morbidite ve mortaliteye yol açan ve aynı zamanda diyabet bakımı için büyük bir ekonomik yük oluşturan komplikasyondur. (Vinik ve ark., 2008) Dünyanın gelişmiş ülkelerinde, diğer diyabetik komplikasyonların toplamından daha fazla hastaneye yatıştan sorumludur ve travmatik olmayan amputasyonların %50 ila %75'inden sorumludur (Holzer ve ark., 1998). DN, vücudun daha çok sinir sistemini etkileyen bir hastalıktır. Sessiz kalabilir ve yıkımlarını yaparken fark edilmeyebilir veya spesifik olmayan diğer birçok hastalıkta görülenleri de taklit eden klinik semptom ve bulgularla ortaya çıkabilir (Caputo ve ark., 1994).

DN, 25 yıl ve üzeri diyabet hastalarının yarısından fazlasını etkileyen, periferik ve otonom sinirleri ilgilendiren ve yaşamı tehdit eden bir komplikasyondur. DN geliştirme riski hipergliseminin büyüklüğü ve süresi ile doğrudan doğruya ilişkili ve orantılıdır. Ayrıca bazı kişilerin böyle komplikasyonlar geliştirmeye doğal yatkınlıkları olmasını sağlayan genetik özelliklerinin de var olabildiği görülmektedir (Chawla ve ark., 2016).

DN dışavurumu, kronik inflamatuvar demiyelinizan polinöropati, alkolik nöropati ve diğer endokrin nöropatilerle oldukça benzediğinden, diyabetik nöropati teşhisinin doğruluğundan emin olmak amaçlı periferik sinir disfonksiyonunun tüm diğer olası nedenlerinin teşhis dışı kalması bir zorunluluktur (Greene ve ark., 1992).

2.1.4.3.1. Diyabetik Nöropati Çeşitleri

Diyabetik nöropatinin değişken doğasının tanımlanmasıyla 1893'te diyabetik nöropatinin sınıflandırılması ilk kez önerilip neredeyse 60 yıl sonrasında da nöropati ve diyabetin süresi arasındaki ilişki belirlenmiştir.

Diyabetik nöropati bir dizi farklı nöropatik sendromu içinde barındıran oldukça çeşitli bir komplikasyon olup, aşağıdaki gibi genel ve alt kategorilerde şematize edilebilir:

❖ Fokal ve multifokal nöropatiler:

- Mononöropati
- Amiyotrofi, Radikülopati
- Çoklu lezyonlar “mononöritis multipleks”
- Tuzak nöropati (medyan, ulnar, peroneal vb.)

❖ Simetrik nöropatiler:

- Akut duyusal
- Otonom
- Distal Simetrik Polinöropati (DSPN), diyabetik tipi aynı zamanda diyabetik periferik nöropati (DPN) olarak bilinir (en yaygın sunulandır) (Boulton, 2007)

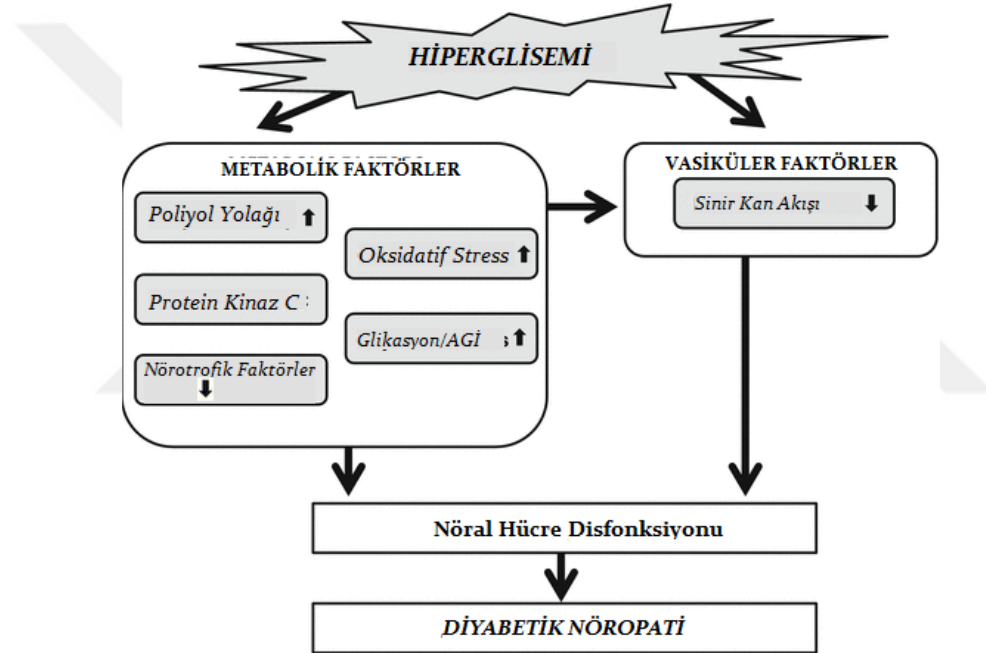
Diyabetik periferik nöropati (DPN), kronik hiperglisemiye dayandırılan T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonu olarak bilinir ve diğer nedenlerin elimine edilmesinden sonra diyabette periferik sinir disfonksiyonu olarak tanımlanır. DPN, enfeksiyonlar, ayak ülserleri ve travma dışı ampütasyonlarla da ilişkilendirilmektedir. T2DM'de ayak enfeksiyonları tahmini yıllık %4 ila 7'lik yaşam boyu risk aralığında şekillenir (Reddy, 2019).

2.1.4.3.2. Diyabetik Nöropatinin Patogenezi

Diyabette, kontrol edilemeyen ve yükselmiş kan glukozu seviyesi yetersiz plazma insülin seviyelerinin sonucudur. Sistemik bir çevre içinde, plazma insülin seviyeleri genellikle beta hücrelerinden insülin üretimi ve salınımının sonucudur. Böylece, salınan toplam miktardaki insülin, pankreatik Langerhans adacıklarındaki (beta hücre kütleli) beta hücrelerinin mutlak sayısına ve bu hücrelerin her birinin çıktısına (beta hücre fonksiyonu) bağlıdır. Yıllardır, yetersiz insülin seviyeleri ve diyabetin gelişimine beta hücre kütleli ve fonksiyonunun katkısı tartışılır. Ancak, diyabetin patogenezinin bu

yönü üzerine detaylı bilgi başarılı tedavi yaklaşımları geliştirmede çok önemlidir (Chen ve ark., 2017).

Obezite ve insülin direnci T2DM için önemli risk faktörleri olarak kalmaya devam ederken, beta hücrelerinin telafi etme kapasitesi obez ve insüline dirençli deneklerde T2DM geliştirmesini önlemede kullanılır. Bu bireylerde, artmış sekresyon ve/veya genişletilmiş beta hücre kütlesi yoluyla insülin çıktısındaki artma, hiperglisemi ve glikoz intoleransının gelişimine karşı koyar. Obezitede insan beta hücresi dengelenmesinin kanıtı, 1933'te, Ogilvie'nin 19 zayıf hastaya kıyasla 19 obezite vakasının pankreasında “anormal derecede yüksek bir adacık dokusu yüzdesi” tanımlamasıyla raporlanmıştır (Chen ve ark., 2017).



Şekil 5.4: Diyabetik Nöropati Patogenezinde Rol Oynayan Önemli Faktörler (Kato ve ark., 2014)

Diyabetik nöropatinin patogenezini birçok mekanizma içermekle beraber; nöropatiye katkıda bulunduğu düşünülen, diyabetteki büyük metabolik değişikliklerden bazıları; yükseltilmiş poliyol yolağı aktivitesi, oksidatif stres, gelişmiş glikasyon son ürünlerinin oluşumu ve çeşitli yükselmiş nükleer faktör κB (NFκB) ve p38 mitojenle aktive edilen protein kinaz (MAPK) sinyali gibi çeşitli proenflamatuar değişiklikleridir (Şekil 2.4). Bu mekanizmalar izole olarak çalışmaz ancak karşılıklı olarak kolaylaştırıcı

bir yaklaşımla güçlü bir etkileşim kurarlar. Diğer mekanizmalar artmış poli (ADP-ribose) polimeraz (PARP) aktivitesi, artmış lipooksijenaz aktivitesi ve yükselmiş Na⁺/H⁺ exchanger-1 aksiyonunu içermektedir. Son zamanlarda, endoplazmik retikulum (ER) stresinin aktivasyonu ve katlanmamış protein cevabının (UPR) nöropatiyi de içeren diyabetik komplikasyonlarda anahtar roller oynayabileceği bulunmuştur (Van Dam ve ark., 2013).

2.2.Sirkadiyen Ritim

Yaşam dört aşamada düzenlenen döngüsel kimyasal bir süreç olup, döngünün kısımlarını tek hücreden yetişkinliğe değişimleri tanımlayan gelişim ve yetişkinlikten ölüme olan değişimleri tanımlayan yaşlanma olarak ifade edebiliriz. Doğumdan ölüme bir döngü ve dairesel ritimler, menstrüal döngüler, semilunar döngüler ve günlük 24 saat veya sirkadiyen döngüler gibi, döngülerin de içinde döngüler vardır (Pittendrigh, 1960).

İçimizdeki günü yönlendiren bir iç ritim kurmak için dış zaman işaretlerini (dışımızdaki günü takip eden ışık ve sıcaklık değişimleri) kullanırız. Bu iç saat, akut dış faktörleri ölçme merceğimizdir, bu da algıladığımız durumu zaman olarak belirlememize önayak olur (Dunlap, 1999).

Genetik sirkadiyen saat, doğrudan transkripsiyonel düzenleme ve histon asetilasyon/deasetilasyon yoluyla gen ekspresyon ritimlerini düzenler. Birçok gen ve mekanizmaya rağmen, sirkadiyen saat genleri birçok farklı organizasyon seviyesinde biyokimyasal, metabolik ve fizyolojik süreçleri düzenlemede çok merkezi bir rol oynamaktadır.

Sirkadiyen ritimlerin genetik mekanizmasına dair ilk kanıtlar, kendi kendini sürdüren sirkadiyen ritimlerin çekirdek merkezinde genetik bir mekanizmanın yattığını göstermiştir. 1960'da Colin Pittendrigh, biyolojik saat mekanizmasının tek hücrelerde de bulunabileceğini ve basit bir kimyasal reaksiyon olarak görülmediğini belirtmiştir (Pittendrigh, 1960). Sirkadiyen saati içeren genlerin ve proteinlerin ne olduğunu belirlemek için hedefli mutasyonlar hem *Drosophila melanogaster* (Konopka ve Benzer, 1971) hem de farelerde en etkili yaklaşımı kanıtlamıştır (Vitamerna, 1994). Mutagenез ve

fenotipik tarama ile mantar *Neurospora crassa*, (Dunlap, 1996) bitkiler (Millar ve ark., 1995) ve siyanobakteriler gibi diğer organizmalardaki sirkadiyen saat genleri tanımlanmıştır (Kondo ve ark., 1994).

2.2.1. Sirkadiyen Ritim Genleri

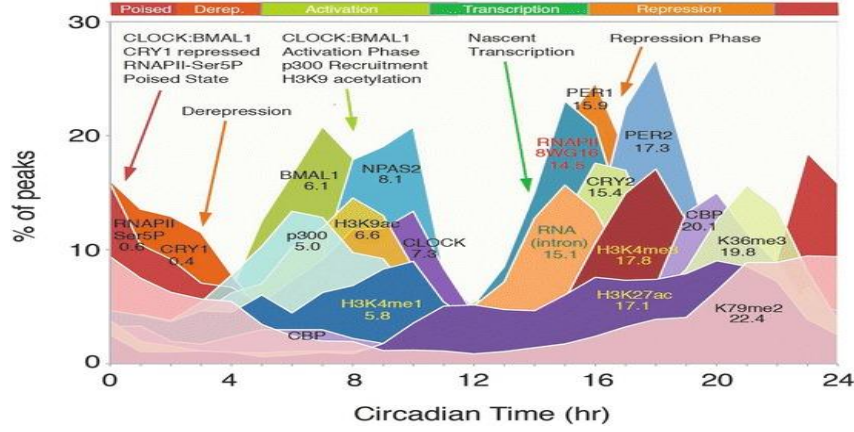
Memelilerdeki sirkadiyen ritimlerin moleküler mekanizmaları, transkripsiyonel otokontrollü geri besleme döngüsü oluşturan bir dizi gen tarafından üretilir. Temel ritim genleri; CLOCK (Circadian Locomotor Output Cycles Kaput), Bmal1 (Brain and muscle arly hydrocarbon receptor nuclear antigen 1), Period (PER1, PER2, PER3) ve Cryptochrome (CRY1 ve CRY2)'yi içerir (Takahashi, 2016).

Ritim genlerinin keşfi, sirkadiyen gen ekspresyonunun vücudun genelinde yaygın olduğu ve ritmin hücre temelinde olduğunun farkına varılmasına yol açmıştır. Periferik dokularda ritimlerin rolü, hastalık durumları için bir dizi önemli etkiye sahiptir. Sirkadiyen ritim mekanizmasında, CLOCK ve BMAL1, Period ve Cryptochrome genlerinin transkripsiyonunu aktive ettikten sonra, PERIOD ve CRY

PTOCHROME proteinleri geri beslemede bulunur ve kendi transkripsiyonlarını CLOCK ve BMAL1 ile etkileşimde olarak baskırlar (Takahashi, 2016).

Fare ve insanda ileri döngü, aynı zamanda bir heterodimerik transkripsiyon aktivatörü oluşturan CLOCK (dCLK- *Drosophila* CLOCK homoloğu) ve BMAL1'den (dCYC- *Drosophila* CYCLE homoloğu) oluşur. Sırasıyla 3 ve 2 üyeye sahip paralog genler tarafından kodlanan PERIOD ve CRYPTOCHROME (CRY) proteinleri, sineklerde sırasıyla PER ve TIM 'e (TIMELESS) işlevsel olarak homologtur ve negatif döngü görevi görür. *Drosophila* ayrıca transkripsiyonu düzenleyen ancak aynı zamanda bir fotosensör görevi gören bir CRY kullanır (Bae ve ark., 2001).

Moleküler saatler için birincil faktörlerin transkripsiyonel ve translasyon mekanizmaları büyük ölçüde korunurken, paraloglar için aynı durum söz konusu değildir. *Drosophila*'da PER birincil negatif regülatör görevi görür, ancak fare mPER1, mPER2 ve mPER3'te her biri moleküler saatlerin korunmasında bağımsız roller oynar (Bae ve ark., 2001). Bunun bir örneği, mPER3'ün beyindeki sirkadiyen ritimlerde ihmal edilebilir bir role sahip olmasıdır, ancak periferik dokulardaki sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde



Şekil 7.6: Karaciğerde sirkadiyen transkripsiyonel dalgalanma (Takahashi, 2018).

Yapılan çalışmalar epigenetik değişimlerde de sirkadiyen dalgalanmalar olduğunu göstermiştir. Gen ifadesinin kontrolünde önemli modifikasyonlar olan H3 histonundaki lizin 9 asetilasyonu (H3K9ac), lizin 27 asetilasyonu (H3K27ac) ve lizin 4 trimetilasyonu (H3K4me3) sirkadiyen dalgalanmalar göstermektedir. Bu sayede sirkadiyen ritim, RNA polimeraz II regülasyonu ile global transkripsiyonel ve kromatin durumunu regüle eder. Temel sirkadiyen ritim mekanizmasının tanımlanması, sirkadiyen ritim sisteminin metabolizma, kanser, immünoloji, nörodejeneratif ve psikiyatrik bozuklukların altında yatan hastalık mekanizmalarının yanı sıra davranış, fizyolojik ve hücrel moleküler fonksiyonları da nasıl etkilediği konusundaki anlayışımızı değiştirmiştir (Takahashi, 2016). Sirkadiyen ritim genlerinin görevi ve düzenlenme mekanizması Tablo 2.3’de verilmiştir.

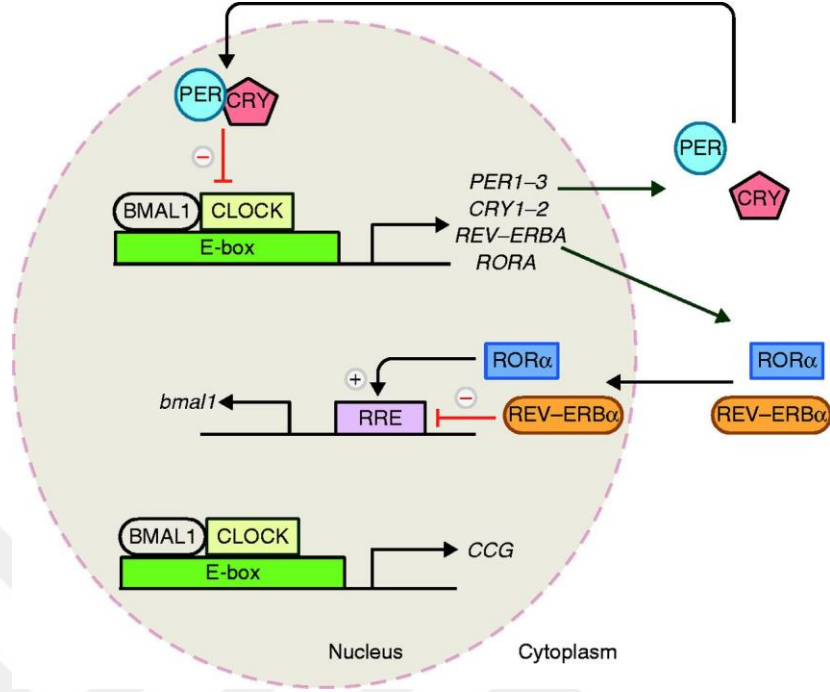
Tablo 2.3 Sirkadiyen saat genleri: görevleri, ürünleri ve düzenlenmesi (Özbayer & Değirmenci, 2011)

Gen	Saat görevi	Protein ürünü	Düzenlenmesi
PER 1	PER/CRY etkileşimi, CLOCK/BMAL1 inhibitörü	Diğer memeli PER proteinleriyle etkileşime aracılık eden PAS bölgeleri içerir.	Retina ve periferel dokuda geçici olarak ışık tarafından indüklenir.
PER 2	PER/CRY etkileşimi, CLOCK/BMAL1 inhibitörü,	Diğer memeli PER proteinleriyle etkileşime aracılık eden PAS bölgeleri içerir.	Retina ve periferel dokuda geçici olarak ışık tarafından indüklenir.

PER 3	PER/CRY etkileşimi	Diğer memeli PER proteinleriyle etkileşime aracılık eden PAS bölgeleri içerir.	Retina ve periferel dokuda ritmik olarak eksprese olmuyor veya haftalık ritmik.
CRY 1	PER lerle etkileşim, CLOCK/ BMAL1 inhibitörü	Flavoprotein	Böceklerde ve bitkilerde ışık/karanlık seviyesine göre eksprese olur. İnsan CRY sentezi ışık tarafından düzenleniyor olabilir.
CRY 2	PER lerle etkileşim, CLOCK/ BMAL1 inhibitörü	Flavoprotein	Böceklerde ve bitkilerde ışık/karanlık seviyesine göre eksprese olur. İnsan CRY sentezi ışık tarafından düzenleniyor olabilir.
Clock	Transkripsiyon faktörü	Transkripsiyon faktörü: BMAL1 ile heterodimerizasyona aracılık eden PAS bölgesi içerir.	Ritmik olarak eksprese olmuyor.
Bmal 1 (mop 3)	Transkripsiyon faktörü	Transkripsiyon faktörü: CLOCK ile heterodimerizasyona aracılık eden PAS bölgesi içerir.	Sıçanlarda ritmik olarak eksprese oluyor; farede ritmik olmayabilir.

2.2.2.1. Negatif Düzenleyici Sirkadiyen Ritim Genleri

Temel sirkadiyen ritim mekanizması BMAL1 ve CLOCK transkripsiyon faktörleriyle uyumlanan bir transkripsiyonel-translasyonel geribildirim döngüsüne dayanmaktadır. Döngünün pozitif kısmında, BMAL1 ve CLOCK heterodimer oluşturup geribildirim döngüsünün negatif üyeleri PER1-3 ile CRY1-2'yi şifreleyen PER ve CRY genlerindeki E-box elementlerine bağlanırlar ve transkripsiyonlarını tetiklerler. PER ve CRY proteinleri CLOCK-BMAL1 aktivitesiyle çakışarak kendi transkripsiyonunu baskılar. Bu negatif düzenleyiciler heterodimer oluşturur ve CLOCK/BMAL1 ile doğrudan etkileşerek kendi gen transkripsiyonunu baskıladığı çekirdeğin içine yer değiştirir (Michael ve ark., 2017; Rosensweig ve ark., 2018). Bu doğrudan transkripsiyonel geribildirime ilaveten PER 1,2 ve 3 ile CRY 1,2'nin mRNA ekspresyonu çeşitli mekanizmalarla düzenlenir (Kojima ve ark., 2011; Lim ve Allada, 2013). REV-ERBa ve RORa nükleer reseptörlerinin karşıt aksiyonlarını içeren ikinci bir geribildirim döngüsü, sirkadiyen sistem ritimlerinin üretimi için gerekli olan BMAL1'in ritmik ekspresyonunu kontrol eder. CLOCK-BMAL1 birçok çekirdek olmayan ritim ve metabolik genlerin veya diğer adıyla ritim-kontrollü genlerin transkripsiyonunu da teşvik eder (Bailey ve ark., 2014). Mekanizma Şekil 2.7'te gösterilmiştir.



Şekil 8.7: Pozitif ve Negatif Düzenleyici Sirkadiyen Ritim Genlerinin Memeli Sirkadiyen Ritim Mekanizmasındaki Döngüleri (Bailey ve ark., 2014)

2.2.2.1.1. *Period Genleri*

Period ilk tespit edilen saat bileşeni geni, 1971'de *Drosophila*'da, genomdaki kimyasal olarak indüklenen rastgele mutasyonlardan oluşan ve değiştirilmiş ritmiklik için mutajenleştirilmiş bireylerin soyunu tarayarak sirkadiyen ritimleri etkileyen mutasyonları tespit eden “ileri genetik” bir yaklaşımla keşfedilmiştir (Konopka ve Benzer, 1971). Genin işlevi, her genin yaban tipli alelinin aritmik mutant fenotipli sineklere aktarılmasından sonra anlaşılmıştır (Hardin ve ark., 1990). 2017 Nobel Ödülü'nün verildiği Hall, Rosbash ve Young tarafından PER geninin moleküler mekanizmasının tanımlanmasıyla merkezi bir sirkadiyen saat bileşeni olarak öneminin doğrulanması mümkün olmuştur. Memelilerde de bu genin homologu olduğu gösterilen üç tane Period geni (PER1, PER2 ve PER3) tanımlanmıştır. Bu genlerin hem tümör baskılayıcı özellik

gösterdikleri hem de hücre çoğalmasında rol oynadıkları tespit edilmiştir (Hardin ve ark., 1990; Albrecht ve ark. , 1997).

2.2.2.1.1.1 PER3 Geni

Periyot geni (PER), Drosophila'da tanımlanan sirkadiyen saat genidir. Memelilerde PER familyasının geninin üç homologu bulunmaktadır (PER1, 2 ve 3). PER3, sirkadiyen saatin moleküler bir bileşenidir ve protein dimerizasyonunu sağlayan PAS (PER-ARNT-SIM) alanları içeren protein bağlama ailesinin bir üyesidir. PER3 geni PER1 ve PER2 genlerinin paralogudur. PER3, yalnızca SCN'te ifade edilmekle kalmaz, aynı zamanda insan ve yetişkin farede çeşitli dokularda ifade edilir. PER3 geni, insanlarda 1. kromozomda lokalize, 25 ekzondan oluşmuş ve 1201 aa uzunluğunda sirkadiyen protein homolog 3 proteinini kodlar. Transkripsiyonel/translasyonel geri besleme döngüsünün negatif kısmındaki diğer PER ve CRY proteinlerine bağlanır, çekirdek saat genlerinin ve CLOCK/BMAL1 heterodimer transkripsiyon faktörü tarafından ekspresyonu tetiklenen diğer saat kontrollü genlerin ekspresyonunu inhibe eder (Mohawk ve ark., 2012). Son zamanlarda, elektron mikroskobu ile fare karaciğer hücre özütlerinde PER3 proteininin PER1, PER2, CRY1, CRY2, Kazein Kinaz 1 Delta (CK1 δ) ile olgun bir sitoplazmik multi-globüler kompleksin bir parçasını oluşturduğu ve çekirdeğe bu kompleksin göçü ile CLOCK / BMAL1'i inhibe ettiği gösterilmiştir (Aryal ve ark., 2017).

2.2.2.1.1.1.1 PER3 Geni Polimorfizmleri

PER3 geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmış olup, bu polimorfizmlerin birçok hastalıkla ilişkili olabileceği önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Mansour ve arkadaşları 2017 yılında yayınlanan makalelerinde PER3 geni polimorfizmleri ile ilgili yapılmış olan çalışmalardan bazılarını Şekil 2.8'de gösterildiği şekliyle özetlemişlerdir.

Yazar	Soy	Örnek Büyüklüğü	İlişki
Ebisawa et al. (2001)	Yapon	- DSPS'li 48 hasta - 100 kontrol	'PER ₃ SNP'lerin DSPS ile anlamlı ilişkisi
Archer et al. (2003)	Kafkas	- Ekstrem günlük tercihlili 35 örnek	- PER ₃ VNTR is significantly correlated with diurnal preference
Johansson et al. (2003)	Kafkas	- DSPS'li 16 hasta - Mevsimsel duygudurum bozukluğu olan 159	Kısa allel anlamlı olarak DSPS ile korelasyon rs10462020 SNP'nin G alleli sabah tercihiyle ilişkili
Pereira et al. (2005)	Latin Amerika	159 eşleşmiş kontrol 17 DSPS'li hasta	PER ₃ SNP'lerin DSPS ve günlük tercihle anlamlı ilişkisi
Archer et al. (2010)	Kafkas	156 Gönüllü - 1590 Gönüllü	PER ₃ SNP'lerin günlük tercih ve DSPS ile anlamlı ilişkisi
Barclay et al. (2011)	Kafkas	- 23 DSPS'li hasta	İlişki Bulunamadı
Osland et al. (2011)	Kafkas	947 birey	Anlamlı İlişki Bulunamadı
Voinescu and Coogan (2012)	Kafkas	432 üniversite öğrencisi	Anlamlı İlişki Bulunamadı
Chellappa et al. (2014)	Kafkas	NA	İnsan homozigot PER ₃ ^{3/3} olanlar ışığın uyku üzerine etkisine daha duyarlılar
Hida et al. (2014)	Yapon	18 sağlıklı erkek gönüllü	rs228697 SNP günlük tercihle ilişkilidir ve minor allel akşam tipinde sabaha göre daha yaygındır

Şekil 9.8: PER₃ polimorfizmleri ve sirkadiyen değişkenlerin genetik birliktelik çalışmaları (Mansour ve ark., 2017)

PER 3 geninin ekson 18'in (GenBank erişim no. AB047686) 54-bp tekrar dizisindeki PER₃ "uzunluk" polimorfizmi, varsayılan bir fosforilasyon alanını kodlayan bir bölgeye 18 amino asidin sokulması veya silinmesine bağlı yapısal bir polimorfizmdir. PER 3'teki bu polimorfizm günlük tercih ve gecikmiş uyku fazı sendromu ile ilişkilendirilmiştir. Daha uzun bir alel polimorfizmi "sabahlık" ve kısa alel "akşamlık" ile ilişkilidir. Kısa alel ayrıca gecikmiş uyku fazı sendromu (DSPD) ile ilişkilidir (Archer ve ark., 2003).

Uzunluk polimorfizminin adipogenezi inhibe ettiği gösterilmiştir ve Per₃ nakavt farelerinin yaban tipe kıyasla adipoz dokuda artma ve kas dokusunda azalma olduğu gösterilmiştir. Ek olarak, uzunluk polimorfizminin mevcudiyetinin, diyabetik olmayan kontrol hastalarına kıyasla T2DM hastaları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Karthikeyan ve ark., 2014).

PER₃-P415A/H417R polimorfizmi, insanlarda ailesel ileri uyku fazı sendromuyla ve mevsimsel affektif bozuklukla ilişkilendirilmiştir, ancak transgenik farelerde bu polimorfizmin kısalmış bir uyku fazıyla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2016).

Yapılan bir nöro görüntüleme çalışması, işitsel bir çalışma belleği görevine verilen beyin tepkilerinin PER3^{4/4} kişilere kıyasla PER3^{5/5}'te uykusuz bir geceyi takip eden sabah saatlerinde mavi ışığa kısa (1 dakika) maruz kalmaya yanıt olarak arttığını ortaya koymuştur. Normal bir uyku gecesini izleyen sabah saatlerinde, mavi ışığın bilişsel beyin tepkileri üzerindeki etkisi PER3^{5/5}'te değil PER3^{4/4} bireylerde saptanmıştır (Vandewalle ve ark., 2011).

Yapılan bir çalışmada, 5 tekrar için homozigot olan kişilerin sıklığı sabah tiplerinde akşam tiplerine göre daha yüksek iken DSPD'de (Delayed Sleep Phase Syndrome) 5 tekrarlı alelin prevalansı çok düşük bulunmuştur (Taqueti ve Di Carli, 2018). Aynı çalışma günlük tercih ve VNTR polimorfizmi genişletilmiş bir örnekte devam etmiş ve ilişkinin yaşa bağlı olduğuna dair bazı kanıtlara ulaşılmıştır (Zaccardi ve ark., 2014).

PER3'ün günlük tercihin belirlenmesine katılımı ve CRSWD'lere (Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorder) katkısı PER3 içindeki diğer polimorfizmlerle ilişkilendirmelerle de desteklenir. PER3 promotör bölgesi içinde üç SNP (rs2797687, G / T; rs2794664, C / A; rs228730, G / A) ve bir tandem 21-nükleotid tekrarının bir veya iki kopyasından oluşan bir VNTR polimorfizmi tanımlanmış ve ilişkilendirilmiştir (Ojeda ve ark., 2013).

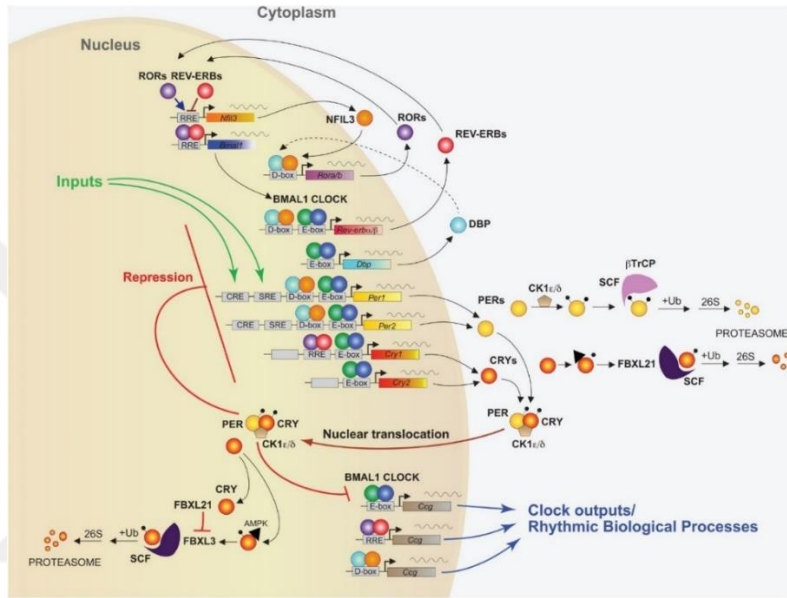
Promotör polimorfizmlerin spesifik bir haplotipi (TA2G), DSPD'de daha yaygın ve ayrıca bu haplotipi içeren PER3 promotörü, diğer promotör haplotiplerini içeren yapılara kıyasla gen ekspresyon seviyelerini arttırmıştır. PER3 kodlama bölgesi içinde dört missense tek nükleotid polimorfizminin (SNP'ler; rs10462020, rs228697, rs2640909, rs10462021) ve VNTR'nin spesifik bir haplotipinin DSPD hastalarında daha yaygın olduğu bulunmuştur (Ebisawa ve ark., 2001).

2.2.2.2. Pozitif Düzenleyici Sirkadiyen Ritim Genleri

Drosophila mutant araştırmaları ile yapılan çalışmalar sonucunda Period geninin keşfinden sonra bu çalışmaların kapsamı genişletilerek, ilk memeli çekirdek ritim geni,

Clock, anormal sirkadiyen davranış paternli farelerin ön genetik taramasında keşfedilmiştir (King ve ark., 1997).

CLOCK/BMAL1'in ana hedefleri, memeli Period ortoloğu (PER1, PER2 ve PER3) (Shearman ve ark., 1997) ve Cryptochrome (CRY1 ve CRY2) baskılayıcı proteinlerini kodlayan çekirdek ritim genleridir. Bunun yanı sıra çeşitli ritim ve ritim kontrollü genlerde CLOCK/BMAL1'in hedefleri arasındadır. Memeli sirkadiyen ritim bileşenleri Şekil 2.9'da gösterilmiştir.



Şekil 10.9: Memeli Sirkadiyen Ritminin Temel Bileşenleri (Cox ve Takahashi, 2019)

2.3. Diyabet ve Genetik

Aile öyküsü, Tip 1 ve Tip 2 diyabet gelişiminde en önemli risk faktörlerindedir. Nadir durumlarda diyabetin monogenik bir hastalık olarak aktarıldığı aileler söz konusudur. Genel olarak Tip 1 diyabetli hastanın kardeşinin alakasız bir bireyin hastalık geliştirme riskine (%0.4) göre 15 kat daha yüksek (%6) risk barındırdığı görülür (Field, 2002). Tip 2 diyabette de, %7 prevalanstaki bir popülasyona kıyasla kardeşlerin belirgin risk oranı 4 ila 6 kat civarında daha fazla olup % 30-40 civarında olmaktadır. Tip 1 ve Tip 2 diyabette konkordans oranları çift yumurta ikizlerine kıyasla tek yumurta ikizlerinde çok daha yüksektir. Özellikle Tip 1 diyabette tek yumurta ikizlerinin konkordans oranının, çift yumurta ikizleri için raporlanan %0-13 aralığından çok daha

yüksek olup %21-70 aralığında seyrettiği ölçülmektedir (Redondo ve ark., 2001). Tip 2 diyabet için, bir çalışmada 53 tek yumurta ikiz çiftlerinden 48'inin eğer yeterince uzun takip edilirse tip 2 diyabete uyumlu olduğu görülmüştür (Barnett ve ark., 1981). Başka bir çalışma Danimarkalı tek yumurta ikizlerindeki %63'lük orana karşın çift yumurta ikizlerinde %43'lük bir uyumluluk oranı olduğunu tanımlamıştır (Poulsen ve ark., 1999).

Her ne kadar T1DM ve T2DM'nin ortak formlarıyla birçok varsayılan genetik ilişki bildirilmiş olsa da sadece bir kısmı genişletilerek tekrarlanmıştır. Tip 1 diyabette üç ilişkilendirme vardır: HLA bölgesi (uzun aralıklı LD yüzünden, hiçbir spesifik genin kesin olarak ilişkilendirilmemiş olmasına rağmen), insülin VNTR ve CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4). Bu üç gen, Tip 1 diyabetin genetik riskinin yaklaşık yarısını açıklar ve bu nedenle karmaşık, poligenik bir hastalığın genetik temelini belirlemede sıra dışı bir başarı göstermektedir. İki genin (HLA ve CTLA4) moleküler kimliği, Tip 1 diyabette birincil immün regülatör bir hatayı destekler ve insülin VNTR, insülinin, beta hücresi tahribatının masum bir seyircisi olmaktan ziyade, tolerans ve otoimmün atak başlatmada önemli bir rol oynadığını gösterir (Florez ve ark., 2003).

Tip 2 diyabetin popülasyon riski ile genetik bir varyasyon arasındaki en kapsamlı kurulmuş ilişki, peroksizom proliferatör-aktivasyonlu reseptör- γ 'de (PPAR γ) Pro12Ala polimorfizminin ilişkisidir. PPAR γ adiposit gelişiminde merkezi bir rol oynar ve tip 2 diyabeti klinik olarak tedavi etmede kullanılan tiazolidindion gibi ilaçlar için bir hedefdir (Spiegelman, 1998). Deeb, ve ark. 1998 yılındaki çalışmalarında, daha az yaygın alanin alelinin insülin duyarlılığının artmasına neden olduğu, Finli ve ikinci kuşak Japon popülasyonlarında tip 2 diyabete karşı koruyucu olduğunu raporlamıştır. Tip 2 diyabete ilişkin bu raporda, etkinin büyüklüğü minör (alanin) alel ile ilişkili riskte %70 azalma olarak gözlemlenmiştir (Deeb ve ark., 1998). Ancak, bundan kısa zaman sonra, tip 2 diyabetteki bu varyantın dört ilave çalışması yayınlanmış ve bunlardan hiçbiri Deeb ve diğerlerinin çalışmasındakine benzer ölçümlenen olasılık oranına veya istatistiksel öneme ulaşmamıştır.

Tip 2 diyabette, PPAR γ Pro12Ala'nın ilişkisi genişletilmiş olarak tekrarlanmış ve bunun yanı sıra ATP'ye duyarlı potasyum kanalı Kir6.2 (KCNJ11) genindeki E23K'nin polimorfizminin T2DM ile ilişkisi artık çeşitli gruplar tarafından gösterilmiştir. Tip 2 diyabet anti diyabetik ilaç tedavileri için iki farklı ilaç hedefi (PPAR γ ve SUR1 / Kir6.2)

belirlenmiştir. Bu ilişkilendirmeler doğrulanırsa, kalıtsal riske neden olmak üzere mutasyona uğratılmış genler ile küçük bir molekül tarafından modüle edildiğinde terapötik hale gelen gen ürünleri arasında genel bir ilişki önerilebilir (Florez ve ark., 2003). Patofizyolojik bir bakış açısından, PPAR γ 'deki varyasyonun diyabete katkıda bulunduğu mekanizma belirsizdir. MIDD (ve belki de PGC1 (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gama Coactivator 1)) tarafından belirlenen mitokondriyal yol ile uyum içinde, tanımlı MODY genleri gibi aynı yolak vasıtasıyla veya beklenmedik bir mekanizma yoluyla adiposit üzerindeki bir etki (Spiegelman, 1998) aracılığıyla olabilir.

2.2.2. Diyabet ve Sirkadiyen Ritim

Sirkadiyen ritim fonksiyonları tarafından düzenlenen ritmik değişimler, glukoz homeostazisinde görülen metabolik süreçlerde de gözlenir. Bu metabolik süreçler, hem karaciğer hem de pankreastaki plazma glukoz seviyeleri, insülin sentezi ve duyarlılığı, besin alımı, adipogenez, immün yanıtlar ve genom ekspresyonundaki değişiklikleri kapsamaktadır (Bailey ve ark., 2014).

Saat kontrollü genlerin ekspresyonundaki endojen veya serbest çalışan ritim, hipotalamusun suprakiazmik çekirdeğinde (SCN) bulunan sirkadiyen hız ayarlayıcıdan veya dahili uyaranlarla uyarılabilir. SCN'deki yüksek derecede birbirine bağlı nöron ağı, retino-hipotalamik ağ yoluyla retinadan doğrudan girebilir. Işık, SCN'deki sirkadiyen salınımların ana itici gücü iken, sıcaklığın da onu etkilediği gösterilmiştir (Herzog ve Huckfeldt, 2003). Işığa maruz bırakıldığında, transkripsiyonel ve translasyonel aktivite sonrası moleküler olaylar harekete geçirilir, bu da SCN'de saat kontrollü genlerin ekspresyonunun sirkadiyen salınımlarına neden olur. Bunlar da vücudun geri kalanına (periferel saatler) nöro-humoral yollarla iletilir (Kiessling ve ark., 2010; Green ve ark., 2008).

Merkezi SCN saati ile karaciğer periferel saati arasındaki bu iletişimin doğasını karakterize etmek için mekanik çalışmalar yapılmıştır. Karaciğer, pankreas (β -hücreleri dahil), kas vb. gibi dokuların da günün saatine göre merkezi saatten gelen ipuçlarından önemli ölçüde etkilendiği kabul edilmiştir. Bununla birlikte, gıda mevcudiyeti

kısıtlandığında ve SCN tarafından yönlendirilen aktivite fazı ile uzun süreli bir zamansal ziddiyet içinde kalındığında, periferik osilatörler merkezi düzenleyiciden ayrılır. Işık periyodundaki ani değişikliklere benzer şekilde, beslenme süresindeki ani büyük değişiklikler, ritmik gen ekspresyonunun fazını kademeli olarak sıfırlar ve bu nedenle saate bağlı bir mekanizma yoluyla hareket etmesi muhtemeldir. Aynı zamanda bu besin ipuçlarının zamanı ve doğası gibi besinsel işaretlerle, yiyeceklerin zamanlaması normal ışık/karanlık döngüsünden ayrıldığında, karaciğer gibi metabolik olarak aktif dokuların birçoğu, sirkadiyen salınımlarını besin ipuçlarıyla hizalanacak şekilde sıfırlayarak bu ipuçlarının bu dokular için baskın duruma geçmesini sağlar. Benzer şekilde, aktivitenin periferik saatleri düzenlediği de gösterilmiştir (Damiola ve ark., 2000; Lamia ve ark., 2008; Sasaki ve ark., 2016; Gerber ve ark., 2013).

Daha önce belirtildiği gibi, metabolik süreçler hem merkezi hem de periferik saatler ile etkileşime girer. Bunun yoğun olarak araştırıldığı bir alan metabolik hastalıklar, özellikle diyabet bağlamındadır. Clk mutant fareler hiperglisemik olma eğilimindedir ve diyetle indüklenen obeziteye karşı artan duyarlılığa sahiptirler (Turek ve ark., 2005). Pankreatik saat aktivitesi doğrudan insülin salınımı ve beta hücre sağlığı ile ilgilidir. Karaciğer ve yağ dokusu gibi diğer periferik dokulardaki çalışmalar, CLK işlevindeki bozulmaların metabolik sendromda önemli bir suçlu olabileceği fikrini daha da artırmıştır (Marcheva ve ark., 2010; Feng ve ark., 2011; Paschos ve ark., 2012).

İnsanlarda CLK polimorfizmleri, obezite ve metabolik sendrom ile doğrudan ilişkilidir. Ayrıca T2DM hastalar, pankreatik adacıklarında sağlıklı bireylere göre hPER2, hPER3 ve hCRY2'nin aşağı regülasyonunu göstermiştir (Stamenkovic ve ark., 2012). Vardiyalı çalışan bireylerde T2DM görülme oranlarının artışı metabolik sendromun belirgin küresel artışında sirkadiyen ritimlerin bozulmasının da rol oynayabildiğini göstermektedir (Gan ve ark., 2015).

2.2.3. Diyabetik Nöropati ve Sirkadiyen Ritim Genleri

Sirkadiyen ritim gen aktivitesi optimal sağlığın altında yatan, normal çalıştığında doğal ritimleri sürdüren düzenleyici bir ağ üretir. Ancak, bu ağın ritimleri zayıf uyku alışkanlıkları veya bozulmuş uyku gibi nedenler aracılığıyla engellendiğinde diyabet ve

buna bağlı diyabetik nöropati gibi belirli patolojik durumlar gelişebilmektedir (Karthikeyan ve ark., 2018).

2.3. Literatür Özetleri

Stamenkovic ve ark. tarafından 2012 yılında insan iskeletinde çekirdek ritim genlerinin düzenlenmesine ilişkin yapılan bir çalışmada, T2DM hastası donörlerden alınan iskeletlerdeki PER2, PER3 ve CRY2 mRNA seviyeleri, diyabetsiz donörlerdeki iskeletler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde düşük çıkmıştır. Patogenetik koşulların taklit edildiği in vitro bir modelde, 48 saat boyunca her 1 mmol/L palmitat için (P = 0.003) 16.7 mmol/L glukoza maruz bırakılan insan iskeletlerinde de PER3 mRNA seviyesi düşmüştür. İlgili çalışmadan elde edilen veri, sirkadiyen ritim bileşenlerindeki bozulmaların tip 2 diyabetli insanda iskelet patofizyolojisine katkıda bulunabileceğini önermektedir (Stamenkovic ve ark., 2012).

Pappa ve ark. tarafından 2013 yılında, dördü T2DM hastası olmak üzere 40 GDM hastası hamile kadın ve 20 normal kontrol ile oluşturulan örnekleme sirkadiyen ritim gen ekspresyonunun araştırıldığı çalışmada; 10 ritim geninin (CLOCK1, BMAL1, PER1, PER2, PER3, PPARA, PPARG, CRY1 ve CRY2) periferik kan mRNA transkript seviyeleri gerçek zamanlı kantitatif PCR ile belirlenmiştir. GDM hastası hamile kadınlardaki BMAL1, PER3, PPARG ve CRY2 transkript ekspresyon seviyeleri, kontrol grubundaki hamile kadınlarla karşılaştırıldığında (p < 0.05) önemli ölçüde düşük gözlenmiştir. Ayrıca, PER3 ekspresyonunun da HbA1c seviyeleriyle negatif korelasyonlu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, normal hamile kadınlara kıyasla GDM hastası hamile kadınlarda BMAL1, PER3, PPARG ve CRY2 genleri ekspresyonunun değişmiş olduğunu ilk kez belgelemiş ve ritim genlerinin bozuk ekspresyonunun GDM hastalarında patojenik bir rol oynayabileceği kavramını destekler niteliktedir (Pappa ve ark., 2013).

Bracci ve ark. tarafından 2014 yılında 2 yıldan fazla vardiyalı çalışan 60 hemşire ile sürekli gündüz çalışan 56 hemşireyi kapsayan bir çalışma yapılmış, BMAL1, CLOCK, NPAS2, CRY I, CRY2, PER1, PER2, PER3 ve REV-ERB α sirkadiyen genlerinin transkript seviyeleri lenfositlerde kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

(RT-PCR) ile belirlenmiş olup, tüm katılımcılar menstrüal döngülerinin erken foliküler evresinde test edilmiştir. Örnekler bir gün izinli oldukları düzenli bir gece uykusu sonrası sabah vardiyasının başlangıcında toplanmış olup kronotip ve sosyodemografik özellikler de ayrıca değerlendirilmiştir. Çalışma neticesinde, vardiyalı çalışan hemşirelerde gündüz çalışan hemşirelere kıyasla periferik ritim geni ekspresyonlarında önemli oranda değişim olduğu (BMAL1, CLOCK, NPAS2, PER1, PER2 ve REV-ERB α 'nın daha yüksek ekspresyonu ve PER3, CRY1 ve CRY2'nin azalmış ekspresyonu) saptanmıştır (Bracci ve ark., 2014).

Leproult ve ark., 2014 yılında içsel olumsuz metabolik etkileri içeren, vardiyalı çalışmada tipik olarak meydana gelen sirkadiyen ritimlerdeki sapmayı uyku kaybından bağımsız olarak belirleyebilmek için 26 sağlıklı yetişkinle, bir çalışma tasarlamıştır. Paralel olarak oluşturulan gruplara farklı uyku kısıtlamaları ve düzeni uygulamıştır. Her iki grupta da uyku kısıtlaması sonrası, insülin salınımında dengeleyici bir artış olmaksızın insülin duyarlılığında (SI) önemli ölçüde azalma ve enflamasyonda artış olduğu tespit edilmiştir. Sirkadiyen sapmaya maruz kalan erkek katılımcılarda, düzenli gece uykusu sürdürenlere oranla hem insülin duyarlılığındaki azalma hem de enflamasyondaki artış iki kat olarak bulunmuştur. Çalışma, vardiyalı çalışmada meydana gelen sirkadiyen sapmanın uyku kaybından bağımsız olarak diyabet riski ve enflamasyonu artırabildiğini göstermiştir (Leproult ve ark., 2014).

Coomans ve ark. tarafından (2013) fareler üzerinde yüksek yağlı beslenme ve sürekli ışık maruziyetinin additif etkileri çalışılmıştır. Bu maksatla fareler, davranışsal sirkadiyen ritimlerin gen ekspresyonunu azaltan 12 saatlik ışık-ışık (LL) döngüsüne maruz bırakılmıştır. Serbestçe hareket eden faredeki in vivo kayıtlar yaşlanan farelerde daha önce gözlemlenen değerlere karşılık gelirken, sürekli ışıkta LL ye maruz bırakılanlar SCN ritim genişliğinde%56 azalma göstermiştir. SCN ritmikliğinde azalma, farede yüksek yağlı diyetle olduğu gibi enerji metabolizması ve insülin duyarlılığında sirkadiyen varyasyonun tamamen kaybına yol açtığı gözlemlenmiştir. Sonuçlar SCN genişliğinde bir azalmanın glukoz ve enerji homeostazisini kuvvetli şekilde bozduğunu ve dolayısıyla obezite ve insülin direnci gelişimine katkıda bulunduğunu işaret etmektedir (Coomans ve ark., 2013).

Epidemiyolojik çalışmalar daha yüksek riskli metabolik sendrom ve diyabetle kısa uyku süresi ve sirkadiyen bozulmayı ilişkilendirmiş olup, Buxton ve ark. 2012’de vardiyalı çalışan insanlarda meydana geldiği gibi, uzun süreli uyku kısıtlaması ve eşzamanlı sirkadiyen bozulmanın glukoz regülasyonu ve metabolizmayı bozması üzerine bir çalışma hazırlamıştır. Çalışma kapsamında sağlıklı yetişkinlere, optimal uykunun başlangıç temel segmentini deneyimledikleri kontrollü laboratuvar ortamında 5 haftayı aşan sürede, sirkadiyen bozulma (tekrarlayan 28 saatlik “günler”) ile kombine edilen 3 saatlik uyku kısıtlamasını (5.6 saat uyku) takiben 9 günlük iyileşme uykusu ile sirkadiyen yeniden düzenlenmeyi içeren program uygulanmıştır. Aynı sirkadiyen fazda alınan önlemlerle, eşzamanlı sirkadiyen bozulmayla uzun süreli uyku kısıtlaması maruziyeti katılımcıların dinlenme metabolizma hızını azaltıp, yetersiz pankreatik insülin salınımından doğan bir etkiyle yemek sonrası plazma glukoz konsantrasyonlarını artırdığı gözlenmiştir. Bu parametreler 9 günlük iyileşme uykusu ve stabil sirkadiyen yeniden düzenlenme boyunca normalleşmiştir. Bu çalışmayla, insanlarda eşzamanlı sirkadiyen bozulmayla uzun süreli uyku kısıtlamasının metabolizmayı değiştirebileceği, obezite ve diyabet riskini artırabileceği görülmüştür (Buxton ve ark., 2012).

Gamble ve ark., 2011 yılında yaptıkları çalışmada hastanede gündüz ve gece vardiyasında çalışan 388 hemşirede uyku stratejileri, kronotip ve sirkadiyen ritim genlerindeki polimorfizmler için genotipler değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar CLOCK, NPAS2, PER2 ve PER3’teki polimorfizmler, hem tek ve hem de multilokus modellerde alkol/kafein tüketimi ve uyku halinin yanı sıra, uyku fazı, atalet ve süre gibi sonuçlarla önemli ölçüde ilişkili bulunmuştur. Uyku stratejisi, kronotip ve genotip, sirkadiyen sistemin aydınlık-karanlık döngüsünün farklı programları ve sosyal/işyeri zamanı arasında sık veya düzensiz geçiş yapan bir çevreye adaptasyonla katkıda bulunur. Vardiyalı çalışan hemşirelere ilişkin bu çalışma fizyoloji ve metabolizmanın zamansal organizasyonuna çevresel bir stresin davranışsal ve sağlığa ilişkin nasıl sonuçları olabileceğini göstermiştir (Gamble vd, 2011).

Scheer ve ark., 2009’da yaptıkları çalışmada 5’i kadın olmak üzere 10 yetişkin denegİ, deneklerin sirkadiyen döngünün tüm aşamalarında yemek yiyip uyudukları 10 günlük laboratuvar protokolüne maruz bırakmıştır. Deneklere yinelenen 28 saatte bir 4 izokalorilik günlük yemek verilmiştir. Katılımcıların 8 gün boyunca, plazma leptin,

insülin, glukoz ve kortizol değerleri saatlik, idrar katekolaminleri 2 saatte bir, kan basıncı, kalp atış hızı, kardiyak vagal modülasyonu, oksijen tüketimi, solunum değişim oranı ve polisomnografik uykuları günlük olarak ölçülmüştür. Temel vücut sıcaklığı sirkadiyen fazı değerlendirmek üzere 10 gün boyunca sürekli kaydedilmiştir. Denekler alışkanlık zamanlarından yaklaşık 12 saatlik faz dışı yiyip uyuduklarında sirkadiyen sapmanın söz konusu olduğu; sistematik olarak leptin (-17% , $P < 0.001$) azalmasına, artmış insüline ($+22\%$, $P = 0.006$) rağmen glukoz artışına ($+6\%$, $P < 0.001$), günlük kortizol ritminin ($P < 0.001$) tamamen tersine çevrilmesine, artmış ortalama arter basıncına ($+3\%$, $P = 0.001$) ve azalmış uyku verimliliğine (-20% , $P < 0.002$) yol açtığı tespit edilmiştir. Sirkadiyen sapma, yeterli mevcut veri ile, 8 denekten 3'ünün prediyabetik durumun tipik aralığında tokluk glukoz yanıtları göstermesine neden olmuştur. Bu bulgular, kronik vardiyalı çalışma veya akut jet lag ile meydana gelen sirkadiyen sapmanın, olumsuz kardiyometabolik etkileri olduğunu göstermiştir (Scheer ve ark., 2009).

Kan glukozundaki günlük dalgalanmaların zamanlaması sirkadiyen ritim tarafından sıkı şekilde kontrol edilir. DNA metilasyonu sirkadiyen ritme eşlik eder ve anormal DNA metilasyonu sirkadiyen bozulma ve hiperglisemi ile ilişkilendirilmiştir. Ancak, glukoz metabolizmasındaki sirkadiyen genlerin metilasyonunun belirgin rolü bilinmemektedir. Peng ve ark., 2019 yılında, Monozigotik (MZ) ikiz çiftlerde gen kümesi yaklaşımı kullanarak, 138 orta yaşlı, erkek-erkek MZ ikizlerinde (69 çift) glukozla ilişkin özellikler üzerinde beş temel sirkadiyen genlerindeki (CLOCK, BMAL1, PER1, PER2, PER3) 77 farklı CpG'lerin ortak etkisini incelemiştir. DNA metilasyonu, bisülfid pirosekanslama ile ölçülmüş olup, önce glukoz metabolizması ile tek CpG metilasyonunun ilişkisini incelemek amacıyla eşleşmiş ikiz çifti analizi yapılmış; ardından, glukoz metabolizması üzerindeki bir yolak olarak tüm beş sirkadiyen gende veya bir gendeki çeşitli CpG'lerde DNA metilasyonunun birleşik etkisini incelemek için kesilmiş ürün yöntemiyle (truncated product method) gen bazlı ve gen kümesi analizleri uygulanmıştır. İncelenen 77 farklı CpG'nin yalnızca bir bölgesi, (False Discovery Rate) $FDR < 0.05$ 'te bireysel olarak insülin direnci ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak, tüm beş sirkadiyen gendeki DNA metilasyonunun ortak etkisi glukoz metabolizması ile önemli bir ilişki göstermiştir. Çalışmanın sonuçları, sirkadiyen ritmin kan glukozunun düzenlenmesinde biyolojik bir mekanizmanın olabileceğini ve epigenetik analizde çeşitli

CpG'lerin ortak etkisinin test edilmesinin önemli olduğunu göstermiştir (Peng ve ark., 2019).

2.4. PER 3 Geni VNTR Polimorfizmi

İnsan genomunun %45 kadarı tekrar eden bölgelerden oluşur. Bunlar Mendel Kurallarına uyan kalıtsal bölgeler olup, tekrar birimi sayılarındaki farklılıkları nedeniyle yüksek düzeyde polimorfiktirler ve bu nedenle ayırım güçleri çok yüksektir. VNTR (variable number of tandem repeat) veya minisatellit adı verilen ardışık tekrar bölgeleri bu sistemlerin örneklerinden biridir. İlk kez 1980 yılında Wyman ve White tarafından tanımlanmış, 1985 yılında Alec Jeffreys ve arkadaşları tarafından minisatellit olarak adlandırılmış olan VNTR lokusları tekrarlayan ünitelerin sayısına bağlı olarak uzunluk polimorfizmleri gösterirler (Wyman ve White, 1980; Jeffreys ve ark., 1985).

İnsanlarda PER3'ün 18. ekzonunda bulunan ve 18 aa kodlayan 54 bazlık bir değişken sayıda ardışık tekrar polimorfizminin (VNTR) tekrar sayısının (4 veya 5 tekrar) çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Karthikeyan ve ark., 2014; Lipkova ve ark., 2014; Carvalho ve ark., 2019; Magee ve ark., 2020).

Magee ve ark. 2020 yılında yaptıkları bir çalışmada PER3 VNTR polimorfizminin uyku fazı sendromu ile ilişkili olabileceğini göstermişlerdir. Araştırmacılar uyku-uyanma fazı bozukluğuna (DSWD) ve gecikmiş loş ışık melatonin başlangıcına (DLMO) sahip yüz dört kişiden alınan yanak sürüntüsünden genotipleme yapmışlardır. Katılımcılar, istenen uyku zamanında, istenen uyku zamanından 1 saat önce (veya DLMO'dan ~1.45 saat önce) verilen plasebo veya 0.5 mg melatonin'e randomize edilerek, uyku kaliteleri Pittsburgh Uyku Kalitesi İndeksi (PSQI), Uykusuzluk Şiddet İndeksi (ISI), Hasta Tarafından Raporlanan Sonuçlar Ölçüm Bilgi Sistemi (PROMIS: Uyku Bozukluğu, Uykuyla İlişkili Bozukluk), Sheehan Engellilik Ölçeği (SDS) ve Hasta ve Klinisyen-Küresel İyileştirme (PGI-C, CGI-C) ölçekleriyle değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, PER34/4 DSWD hastalarının melatonin tedavisine daha fazla yanıt verdiklerini göstermekte olup, bu nedenle PER3 genotiplemesinin DSWD hastalarında melatonin tedavisi için önemli olabileceği ileri sürülmüştür (Magee ve ark., 2020).

Carvalho ve ark. 2019 yılında, PER3 ritim geni VNTR polimorfizmine göre bir şartlı ağrı modülasyonu (CPM) paradigması kullanarak azalan ağrı düzenleyici sistemin (DPMS) sirkadiyen varyasyon paternini değerlendirmek amaçlı bir çalışma yapmışlardır.

Çalışmada ısı ağrısı eşiği (HPT), soğuk basınç testi (CPT), BDNF ve S100-B proteini serum seviyeleri ölçümleri kullanarak gün boyunca geçici varyasyon paterni ve PER3 4/4 ile PER3 5/5 genotipleri arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çalışmada, 18 ila 30 yaş arası 15'i kadın 18 sağlıklı gönüllü ile çalışılmıştır. Genelleştirilmiş Doğrusal Model (GLM), sırasıyla (SD'ler) 0.41 (0.78) vs. 0.67 (0.90) ($\chi^2 = 7.256$; $df = 1$ P = 0.007) ortalamalarıyla, PER3 4/4 ve PER3 5/5 genotipleri arasında Δ -CPM-görevinde önemli bir farkı açığa çıkarmıştır. Δ -BDNF 'nin, Δ -CPM-görevi (0.015, 95% CI = 0.01 to 0.03) ile pozitif korelasyonlu olduğu görülürken; hem günde en az 2 saat uyku eksikliği (B = -0.96, 95% güven aralığı (CI) = -1.86 to -0.11)) hem de Δ -S100-B proteininin (-0.03, 95% CI = -0.06 to -0.02) Δ -CPM-göreviyle negatif korelasyonlu olduğu görülmüştür. PER3 4/4 ve PER3 5/5 (sırasıyla, 0.11 (4.51) vs. 4.00 (2.60)) ($\chi^2 = 22.251$; $df = 1$ P = 0.001) arasındaki Δ -CPT 'de de önemli bir fark gözlenmiştir. Tüm bu bulgular, PER3 5/5 polimorfizminin gün boyunca DPMS'nin inhibisyon yapan fonksiyonunda bir azalma ile ilişkilendirildiğini göstermektedir. Ancak, uyku eksikliğinin, PER3 VNTR polimorfizmine bakılmaksızın, aynı zamanda DPMS'nin inhibisyon yapan fonksiyonunu azaltan bağımsız bir faktör olduğu da görülmüştür. (Carvalho ve ark., 2019)

Akut miyokard enfarktüsünde (AMI) etki alanı ve infarkt büyüklüğü sirkadiyen varyasyonlara konu olmuştur. Moleküler seviyede, kardiyomiyositleri içeren farklı hücrelerdeki sirkadiyen ritimler 24 saatlik biyokimyasal süreçler üretirler. Hücre ritim mekanizmasındaki olası dengesizlik veya bozukluklar kardiyak metabolizma ve fonksiyonları değiştirip kardiyovasküler hastalıklara duyarlılığı artırabilmektedir. PER3 geninin, kalbi de içeren farklı dokulardaki çeşitli genlerin sirkadiyen ekspresyonunu etkilediği, PER3 genindeki VNTR polimorfizminin (rs57875989) günlük tercihler, uyku dengesi, enfeksiyon ve kanseri içeren çoklu fenotipik parametrelerle ilişkili olduğu bildirilmektedir. Lipkova ve ark. 2014 yılında, ST yükselmesiyle olan AMI'de (STEMI) bu polimorfizmin etkisini araştırmak üzere bir çalışma yapmıştır. Çalışmaya katılmayı kabul eden denekler (314 Kafkas kökenli STEMI hastası ve 332 sağlıklı kontrol grubu) PER3 VNTR polimorfizmi bakımından genotiplendirilmiştir. PER3 5/5 varyant taşıyıcılar, daha yüksek seviyelerde interleukin-6, B tipi natriüretik peptitler ve daha düşük A vitamini seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir. AMI başlangıcının sirkadiyen dağılım paternlerinin genotip ve alelik frekans seviyesine bağlı olarak farklılandığı tespit edilmiştir.

Özellikle erkeklerde en az bir 4 tekrarlı alleli olan genotiplere (*PER3 4/5* ve *PER3 4/4*) ($N = 264$) sahip bireylerin, *PER3 5/5* ($N = 50$) genotipine sahip bireylerle kıyaslandığında dikkat çekici ölçüde sirkadiyen aktivite gösterdiği gözlenmiştir. *PER3 VNTR* polimorfizminin genotip ve/veya alel frekansları bakımından STEMI vakaları ve kontroller arasında önemli farklar gözlenmemiştir. Çalışmanın sonuçları, *PER3 VNTR*'nin miyokard enfarktüsünün gelişimi ve ilerlemesinde bireyler arası farklılıklara ve kardiyak fonksiyonların modüle edilmesine katkıda bulunabileceğine işaret etmiştir (Lipkova ve ark., 2014).

Literatürde *PER3 VNTR* polimorfizmi ile diyabet arasında ilişki inceleyen tek çalışma olan Karthikeyan ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada araştırmacılar 302 T2DM hastası ve 330 diyabet hastası olmayan kontrol grubunu çalışmaya dahil etmişlerdir. *PER3 VNTR* genotipleme sunucunda T2DM hasta grubunda 5/5 genotip sıklığının kontrole nazaran istatistiksel olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (%19 vs %12; $p=0.006$). Allelik olarak da 5 alleli T2DM hasta grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir (%43 vs %35; $p=0.0082$) (Karthikeyan ve ark., 2014).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. ÇALIŞMA GRUPLARI

Çalışmaya; Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran Diyabet tanısı almış 84 ve DN tanısı almış 220 hasta alındı. Yine İç Hastalıkları Polikliniğine başvuran sağlıklı 218 bireyden kontrol grubu oluşturuldu.

3.1.1. Etik Kurul İzni ve Bilgilendirilmiş Onam

Çalışma Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulunun 05/12/2019 tarih ve 2019/18 sayılı toplantısında 19-KAEK-225 karar numarayısıyla onaylanmıştır. Çalışmaya katılan tüm gönüllüler araştırma ile ilgili ayrıntılı olarak bilgilendirilmiş ve onam formu kan örneği alınmadan önce imzalatılmıştır.

3.2. ÇALIŞMADA KULLANILAN ALET ve CİHAZLAR

Çalışmada kullanılan cihaz ve markaları Tablo 3.1. de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Tez Çalışmasında Kullanılan Cihazlar ve Markalar

Real-Time PZR PZR (Thermal Cycler) Bilgisayar Jel Görüntüleme Cihazı Elektroforez Tankı Güç Kaynağı Santrifüj Vorteks Manyetik Karıştırıcı Su Banyosu Buzdolabı Mikrodalga Fırın Hassas Terazı PH Metre	Applied Biosystems Step One Plus Prime Thermal Cycler, 5PRIMEG102 Exper, intelcore Vilber QUANTUM Cleaver Scientifica, MHCHOICE Consort, EV26 Mikro 120, Hettich Zentrifugen VELP Scientifica, F20220176 VELP Scientifica, F20520162 Memmert İndesit, TN5 FNF Arçelik MD554 KERN, ABJ 220-4M İhanna, 507702
--	--

3.3. ÇÖZELTİLER

3.3.1. Agaroz jel hazırlanmasında kullanılan kimyasallar;

1. Trizma Baz (Bioshop, Lot: 1L22940)
2. Borik Asit (Carlo Erba, Lot: 0L057180L)
3. Agaroz (İnvitrogen, Lot:0000230689)
4. EDTA (Amresco, Lot: 3228B038)
5. NaOH (Sodyum Hidroksit) (Riedel- de Haen, Lot: 70440 UN 1823)
6. Ethidium Bromide (Serva, 090107)

3.3.2. Agaroz Jel Hazırlanmasında Kullanılan Çözeltiler;

1. EDTA (Etilendiamin Tetra Asetik Asit) hazırlanması-100 ml, 0,5M: Hassas terazide 18,16 gr EDTA tartılıp, 80 ml saf suda yaklaşık 2g NAOH ilave edilerek çözüp

100 ml'ye tamamlandı ve pH'sı pH metre ile (HANNA, 507702) 8'e ayarlanıp otoklavlandı.

2. Tris-Borik Asit-EDTA (5xTBE): Bir miktar saf suda, 27,5 gr Borik asit ve 54 gr Tris hazırlanan EDTA çözeltisinden 20 ml ilave edilerek çözdükten sonra 1 L'ye tamamlandı.

3. Etidyum bromür (10mg/ml) solüsyonunun hazırlanması; Ethidium Bromid 0,1 gr tartılıp 10 ml distile su içerisinde bir gece boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılarak çözüldü. Hazırlanan çözelti kullanılacak tüpler paylaşılırak alüminyum folyo ile kaplandı. Oda sıcaklığında veya +4 C de saklandı.

3.4. PERİFERİK KAN LÖKOSİTLERİNDEN DNA İZOLASYONU

Toplam 522 gönüllüden EDTA'lı tüplere alınan 1-2 ml periferik kan örnekleri çalışma yapılncaya kadar buzdolabında +4 derecede saklandı. Bu kan örneklerinin DNA'ları, 200µl kan alınarak DNA izolasyon kiti yardımıyla izole edildi.

3.4.1. DNA İzolasyonu İçin Kullanılan Sarf Malzemeler

- DNA izolasyon kiti (Thermo Scientific, Lot: 00169383)
- Mikro pipetler (Gilson Pipetman, Finnepipette)
- Ependorf tüp (1,5 ml'lik)
- Pipet Ucu (10 µl, 100 µl,1000 µl)
- Rak
- Etiket
- Filtreli Tüp

3.4.2. Kandan DNA İzolasyonunda Kullanılan Protokol

1. 1,5 ml'lik ependorf tüplere alınan 200 µl EDTA'lı kanın üzerine 20 µl RNAz ve 20 µl proteinaz K ilave edililerek vortekslendi.

2. 200 µl Genomic/Lysis Binding Buffer bu karışımın üzerine ilave edilerek vortekslendi ve daha sonra 10 dk 55°C'lik su banyosunda bekletildi.

3. Toplamda 440 µl olan bu karışıma 200 µl saf etanol (Merck, K3659586) ilave edililerek homejenizasyon için vortekslendi.

4. Homojenize olan karışım filtrelili tüpe alınarak 11.000 rpm 'de (dakikadaki devir) 1 dk santrifüj edildi (DNA filitrede kaldı).

5. Temiz bir tüpe alınan filtre üzerine 500 µl ilk yıkama solüsyonu (Wash Buffer 1) ilave edilerek 11.000 rpm 'de 1 dk santrifüj yapıldı.

6. Filtre tekrar başka bir temiz tüpe alınarak üzerine ikinci yıkama solüsyonundan (Wash Buffer 2) 500 µl ilave edildi ve 13.000 rpm 'de 3 dk santrifüj yapıldı.

7. Temiz ve steril yeni bir ependorf tüpüne alınan filitre üzerine 200 µl ayrıştırma tamponu (Elution Buffer) ilave edilip 1 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 1 dk 13.000 rpm 'de santrifüj yapılarak DNA'nın çözelti halinde ependorfa sızması sağlandı. Böylece tüpte 200 µl, yaklaşık 25-50 ng/ µl konsantrasyona sahip DNA çözeltisi elde edilmiş oldu.

3.5. PER3 VNTR (rs57875989) POLİMORFİZMİ POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

PZR-Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik DNA dizilerini in vitro DNA sentezi ile üssel olarak çoğaltmak için kullanılan moleküler teknolojik yöntemlerden biridir. Bu işlem üç ana adımda meydana gelir: 1) DNA'nın yüksek ısı ile çözülmesi (Denatürasyon), 2) Denatüre olan DNA zincirlerine çoğaltılması hedeflenen bölgeye spesifik, sentetik olarak üretilmiş iki oligonükleotid primerin bağlanması (Hibridizasyon) ve 3) Isıya dayanıklı (termostabil) DNA polimeraz enzimi ile bağlanan primer uçlarından hedef bölgenin sentezi (Polimerizasyon)'yı içermektedir. Bu döngü defalarca tekrarlanmaktadır. Her döngüde sentezlenen yeni DNA iplikçikleri, sonraki adımlarda DNA sentezinin hedefi olarak kullanılır (Henson ve French, 1993). PZR işlemi, ilgili basamaklardaki sıcaklık ayarlarını otomatik yapan özel cihazlarda (Thermal cycler) gerçekleştirilir. Özel PZR tüpleri içerisinde örnek DNA, hedef bölgeye özgü spesifik sentetik primerler, ısıya dayanıklı Taq veya farklı bir polimeraz, deoksिनükleotit trifosfat(dNTP), tampon solüsyonu, divalen katyonlar (genelde Mg⁺²) konarak çalışma karışımı oluşturulur ve PZR cihazında çoğaltılacak DNA bölgesine özgü sıcaklık ve döngü sayısına göre işlem gerçekleştirilir (Sambrook & Russell, 2001). Bu tez çalışmasında PER3 geni VNTR polimorfizminin tespiti için klasik PZR yöntemi kullanıldı. Bu yöntem için kullanılan primerler Tablo 3.2. de verilmiştir.

Tablo 3.2. PER3 VNTR Bölgesi için Kullanılan Primer ve PZR Ürün Boyları

Gen Polimorfizm	ID	Primerler	PZR Ürün Boyları
PER3 VNTR	rs57875989	Forward:5'-TGTCTTTTCATGTGCCCTTACTT-3' Reverse: 5'-TGTCTGGCATTGGAGTTTGA-3'	4 tekrar- 347 bç 5 tekrar- 401 bç

Klasik PZR reaksiyonu; toplam 25 µl son reaksiyon hacmi içerisinde 1U Tag DNA Polimeraz (Gene All, Lot: TQ016A28007), 0,2mM dNTP karışımı (Thermo Scientific, 25 mM), 1X Tag Reaction Buffer (Gene All Lot: TB016G15000), son konsantrasyon 0,8 pmol olacak şekilde primerler, 3µl genomik DNA ve toplam hacmi 25 µl'ye tamamlayacak kadar dH₂O konuldu. PZR bileşenleri ve miktarları Tablo 3.3.'te verilmektedir.

Tablo 3.3. Çalışmada Kullanılan Klasik PZR Bileşenleri ve Miktarları

PZR Bileşenleri	Miktarları (µl/Reaksiyon)
Steril su (dH ₂ O)	14,3 µl
Tag Buffer (10xTampon)	2,5 µl
MgCl	2 µl
dNTP Mix (5mM)	1,0 µl
Primer (Forward) (20pmol/ µl)	1,0 µl
Primer (Reverse) (20pmol/ µl)	1,0 µl
Tag DNA Polimeraz	0,2 µl
Genomik DNA(25-50 ng/ µl)	3,0 µl

Reaksiyon sonucunda PER3 VNTR 4 alleli için 347 bç, 5 alleli için ise 401 bç uzunluğunda ürünler beklenmektedir. PER3 VNTR polimorfizminin belirlenmesi için kullanılan PZR programı Tablo 3.4. da verilmiştir (An ve ark, 2014).

Tablo 3.4. PER3 VNTR Bölgesi İçin Kullanılan PZR Programı

İşlem	Sıcaklık(°C)	Süre(sn)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	96	5 dk	1
Denatürasyon	94	40 sn	
Bağlanma	60	30 sn	30
Uzatma	72	40 sn	
Son Uzatma	72	12 dk	1

Uygulanan PZR koşulları ile belirlenen PER3 VNTR bölgesine ait PZR ürünleri %2.5'lik agaroz jel hazırlanarak jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülendi.

3.6. AGARUZ JEL ELEKROFOREZİ

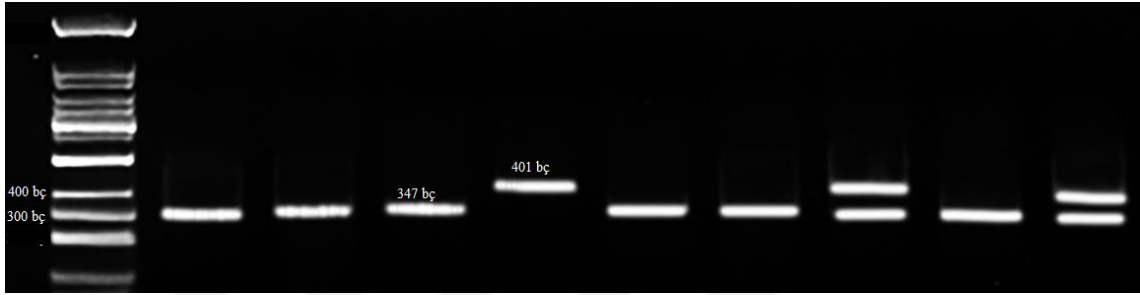
Genellikle 100 bç'den büyük DNA fragmanlarını ayırmak için Agaroz jelleri kullanılır. Jelin konsantrasyonu farklı uzunluklarda DNA fragmanlarının arasındaki mesafeyi belirler. Jele yüklenen DNA fragmanlarının hareketi DNA fragmanlarının konformasyonuna, jeldeki agaroz konsantrasyonuna, akımın kuvvetine ve tamponların iyonik kuvvetine bağlıdır. Küçük DNA molekülleri genel olarak agaroz jelde oluşan küçük kanallardan daha hızlı geç ederler ve böylece daha uzun DNA moleküllerinden daha uzağa geç ederler. Jel konsantrasyonu kanal çapını belirlediği için, düşük konsantrasyonlu jeller büyük DNA fragmentlerinin, yüksek konsantrasyonlu jeller ise küçük DNA fragmanlarının daha iyi ayrılmasını kolaylaştırır (Lee & Bahaman., 2010).

Çalışmamızda, Bromofenol mavisi ve griserol (BBF, Lot: OLB00) içeren yükleme ve takip tamponu ile jele yüklenen PER3 VNTR bölgesine özgü PZR reaksiyon ürünleri %2.5'lik agaroz jelde yürütüldü.

Agaroz Jel Elektroforez için %2.5'lik Jel Hazırlanması: hassas terazide 2.5 gr agaroz (Invitrogen, Lot:0000186100) tartılıp erlenmayer içerisine kondu ve üzerine 100 ml 1x TBE (200ml 5xTBE + 800 ml distile su) ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışımın 2-3 dk mikrodalga fırında ısıtılarak çözünmesi sağlandı. Tamamiyle çözülüp homojenize olduktan sonra oda sıcaklığında hafif soğumaya bırakıldı. Hafif soğuyan çözeltiye DNA'ya bağlanarak ışına yapıp jel görüntüleme cihazında görünmesini sağlayan yaklaşık 3 µl etidyum bromid ilave edildi. Elektroforez jel kasetinin iki kenarını kapatmak için yapılmış olan kalın lastik bariyerler kasete takıldı ve PZR ürünlerinin yükleneceği kuyucukların oluşması için kasete taraklar yerleştirildi. Hazırlanan jel kasetinin içerisine agaroz çözelti dökülerek yaklaşık 20 dk donması için bekletildi. Hazırlanan % 2.5'lik agaroz jelden öncelikle kuyucukların oluşumu için yerleştirilen tarak çıkarıldı ve jel kaset içerisinde elektroforez tankına yerleştirildi. PER3 VNTR bölgesi için yapılan PZR reaksiyonların her birinden ayrı ayrı yüklemek üzere 10 µl alınıp, PZR ürünlerini jelde takip etmek ve ürünlerin jel kutucuklarına oturmasını sağlamak için yaklaşık 1 µl jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve PZR ürünleri jel kuyucuklarına yüklendi. İçinde

DNA'nın (-) kutuptan (+) kutupa doğru göç etmesini sağlayan ve elektriksel ortam için gerekli olan 1XTBE çözeltisi bulunan elektroforez tankının kapağı kapatılıp ve elektrik bağlantıları yapıp güç kaynağından 125 Volt sabit elektrik verilerek DNA yürütme işlemi yapıldı. PZR ürünleri yaklaşık 30 dakika kadar marker eşliğinde yürütüldü. Marker olarak GeneAII GENESTA™ 100bp DNA Ladder kullanıldı.

Yürütme işlemi yapıldıktan sonra jel, jel görüntüleme cihazına konarak UV ışığı altında görünür hale getirildi ve Quantum ST4 programında görüntülendi.



Şekil 3.1: PER3 VNTR Bölgesi PZR Ürünlerinin %2.5'lik Agaroz Jel Görünümleri

3.7. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Çalışma verileri SPSS 16.00 programına kaydedildi ve istatistiksel analizi için bu program kullanıldı. Ayrıca, Winpepi yazılım programı da kullanılarak genotip ve allel dağılımları bakımından hasta ve kontrol grupları arasında p ve OR değerleri hesaplandı. Genotip/allel dağılımları bakımından gruplararası farklılıklar ve Hardy – Weinberg denkliği, Ki kare testi ile araştırıldı. Çalışmada tespit edilen p değerlerinin $P < 0.05$ olanları istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. ARAŞTIRMA GRUBUNA AİT BULGULAR

Bu tez çalışmasında, PER3 geninin kodlama bölgesinde (18. Ekson) yer alan 54 nt uzunluğunda VNTR tekrar bölgesi (rs57875989) klasik PZR yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Çalışma kapsamında toplam 522 gönüllü çalışılmıştır. Çalışma gruplarının yaş ortalamaları ve cinsiyet dağılımı Tablo 4.1.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada Yer Alan Örnek Gruplarının Cinsiyet ve Yaş Ortalamalarına Göre Dağılımı

Çalışma Grupları	DN N (%)	Kontrol N (%)	Diyabet N (%)	Toplam N (%)
Cinsiyet	220 (%100)	218 (%100)	84 (%100)	522 (%100)
Kadın	165 (%75)	166 ((%76.15)	53 (%63.10)	384 (%73.56)
Erkek	55 (%25)	52 (%23.85)	31 (%36.90)	138 (%26.44)
Yaş (Ortalama±St.Sapma)	56.83 ±10.61	55.61± 8.62	55.78± 9.21	56.16 ±9.60

Ayrıca hasta gruplarının çeşitli parametrelerle ilgili değerleri Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.2. Çalışmada Yer Alan Hasta Gruplarının Çeşitli Tıbbi Parametreleri

Parametreler	Hasta Grupları	
	DN (n=220)	Diyabet (n=84)
Hastalık süresi (yıl)	7.66±6.05	9.76±6.38
HBA1c (%)	6.93±1.57	8.54±2.13
Hb (gr/dL)	12.81±1.18	13.57±1.80
HDL (mg/dL)	41.53±9.96	48.58±12.69
LDL (mg/dL)	129.32±32.64	123.95±57.71
Total Kolesterol (mg/dL)	186.05±53.54	193.01±56.30
Trigliserid (mg/dL)	168.21±81.01	179.17±89.70
Sistolik kan basıncı (mmHg)	129.14±22.58	129.55±24.45
Diastolik kan basıncı (mmHg)	80.87±14.81	82.33±16.05
Boy (cm)	162.74±6.77	160.73±10.00
Kilo	78.52±9,08	94.76±19.54
VKİ	29.78±4.31	36.50±8.40

4.2. DNA'NIN KALİTATİF TAYİNİ

Elde edilen genomik DNA'lar % 2'lik agaroz jelde 120V'da 20 dk yürütülerek analiz edildi.

4.3. PER3 VNTR (rs57875989) POLİMORFİZMİNİN KLASİK PZR VERİLERİ

PER3 VNTR bölgesi için 220 DN hastası, 84 Diyabet hastası ve 218 kontrol örneğinden genotipleme yapılabilmektedir.

4.4. PER3 VNTR (rs57875989) POLİMORFİZMİNİN İSTATİSTİKSEL ANALİZ BULGULARI

PER3 geninin 18. ekzonunda bulunan VNTR bölgesi (rs57875989) için yaptığımız genotiplendirme bulgularına göre; toplam üç genotip (4/4, 4/5, 5/5) belirlenmiştir. Bu genotiplerden 4/5 genotipi tüm çalışma gruplarında en yüksek oranda bulunmuş olup, DN, Diyabet ve Kontrol grupları için sırasıyla % 45.45, % 46.43 ve % 43.58 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz veriler ışığında her üç grup için ayrı ayrı karşılaştırma yaptık. Öncelikle DN ve Kontrol gruplarının verilerini karşılaştırdık (Tablo 4.3.). Bu iki grup açısından baktığımız zaman 4/4 genotipinin (%40 vs %34.86) ve 4 allelinin (%62.73 vs %56.65) DN hastalarında kontrole nazaran daha yüksek olduğunu gözlemledik. Buna karşın 5/5 genotipi (%14.55 vs %21.56) ve 5 alleli (%37.27 vs %43.35) DN hastalarında sağlıklı kontrole nazaran daha düşük bulundu, fakat istatistiksel olarak anlamlılık bulunamadı (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. - Diyabetik Nöropati ve Kontrol Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması

Gruplar	Genotipler			Alleller	
	4/4	4/5	5/5	4	5
DN (n=220)	88 (%40.00)	100 (%45.45)	32 (%14.55)	276 (%62.73)	164 (%37.27)
Kontrol (n=218)	76 (%34.86)	95 (%43.58)	47 (%21.56)	247 (%56.65)	189 (%43.35)
P	0.279	0.702	0.063	0.073	
OR, 95%CI	1.25, 0.85-1.83	1.08, 0.74-1.57	0.62, 0.38-1.01	1.29, 0.98-1.69	

Daha sonra Diyabetli hastalarla kontrol grubunu karşılaştırdık (Tablo 4.4.). Diyabetli hasta grubunda 4/4, 4/5 ve 5/5 genotiplerinin yüzdesi sırasıyla %42.86, %46.43 ve %10.71 olarak bulundu. Bu oranlar kontrol grubunda sırasıyla %34.86, %43.58 ve %21.56 olarak tespit edildi. Allel oranları da 4 ve 5 alleleri için sırasıyla Diyabetli hastalarda %66.07 ve %33.93, sağlıklı gönüllülerde %56.65 ve %43.35 olarak bulundu. İstatistiksel olarak bu iki grup arasında 5/5 genotipi (p=0.032; OR, 95%CI=0.44 0.20-0.93) ve alleler bakımından anlamlı fark tespit edildi (p=0.042; OR, 95%CI=1.49, 1.03-2.16) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Diyabet ve Kontrol Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması

Örnek Grupları	Genotipler			Alleller	
	4/4	4/5	5/5	4	5
Diyabet (n=84)	36 (%42.86)	39 (%46.43)	9 (%10.71)	111 (%66.07)	57 (%33.93)
Kontrol (n=218)	76 (%34.86)	95 (%43.58)	47 (%21.56)	247 (%56.65)	189 (%43.35)
P	0.232	0.699	0.032	0.042	
OR, 95%CI	1.40, 0.84-2.34	1.12, 0.68-1.86	0.44 0.20-0.93	1.49, 1.03-2.16	

Bu karşılatırmaların yanı sıra iki hasta grubunun sonuçlarını da bir biriyle karşılaştırdık (Tablo 4.5.). Karşılaştırma sonucunda DN ve Diyabet grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (Tablo 4.5.)

Tablo 4.5. Diyabetik Nöropati ve Diyabet Gruplarının PER3 VNTR Genotip ve Allel Verilerinin Karşılaştırılması

Gruplar	Genotipler			Alleller	
	4/4	4/5	5/5	4	5
DN (n=220)	88 (%40.00)	100 (%45.45)	32 (%14.55)	276 (%62.73)	164 (%37.27)
Diyabet (n=84)	36 (%42.86)	39 (%46.43)	9 (%10.71)	111 (%66.07)	57 (%33.93)
P	0.696	0.898	0.455	0.453	
OR, 95%CI	0.89, 0.54-1.48	0.96, 0.58-1.59	1.42, 0.65-3.10	0.86, 0.60-1.25	

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

DM'nin en sık görülen komplikasyonlarından biri olan DN aynı zamanda DM'nin en zor komplikasyonlarından biridir. Morbidite ve mortalitesi en büyük komplikasyon olan DN ayrıca diyabet bakımı için büyük bir ekonomik yük oluşturur (Vinik ve ark., 2003). Travmatik olmayan amputasyonların % 50 ila % 75'inden sorumlu olan DN, gelişmiş ülkelerde diğer diyabetik komplikasyonların toplamından daha fazla hastaneye yatıştan sorumludur (Holzer ve ark., 1998). DN, vücudun daha çok sinir sistemini etkiler, belli bir dönem sessiz kalabilir ve yıkımlarını yaparken fark edilmeyebilir (Caputo ve ark., 1994). DN, periferik ve otonom sinirleri ilgilendiren ve yaşamı tehdit eden bir komplikasyon olup, uzun süreli (25 yıl ve daha fazlası) diyabet hastalarının yarısından fazlasını etkilemektedir (Chawla ve ark., 2016).

DN prevalansı bölgesel ve toplumsal farklılıklar göstermekle birlikte, diyabetin ilk teşhisinde dahi %7.5'lük prevalansa sahip olduğu ve bir duraklama noktası olmadan daima aşamalı olarak da arttığı bildirilmektedir (Reddy, 2019). Tip 1 ve tip 2 diyabet popülasyonlarıyla yapılan bir çalışmada, DN prevalansı sırasıyla %54 ve %45 olarak bulunmuştur (Tsfaye ve ark., 2013). DN'nin sınıflandırılması diyabetik nöropatinin değişken doğasının tanımlanmasıyla ilk kez 1893'te önerilmiştir. DN'nin sınıflandırmasından yaklaşık 60 yıl sonra nöropati ve diyabetin süresi arasındaki ilişki belirlenmiştir. Günümüzde kronik hiperglisemiye dayandırılan T2DM'nin mikrovasküler komplikasyonu olarak bilinen DN, diğer nedenlerin elimine edilmesinden sonra diyabette periferik sinir disfonksiyonu olarak tanımlanır (Reddy, 2019).

DN'nin patogenezinde bazı mekanizmalarla beraber diyabetteki büyük metabolik değişikliklerin rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu değişikliklerden bazıları oksidatif stres, ileri glikasyon son ürünlerinin oluşumu, yükselmiş nükleer faktör κB (NFκB) ve p38 mitojenle aktiveleştirilen protein kinaz (MAPK) sinyali gibi çeşitli proenflamatuar değişikliklerdir. Bu mekanizmalar tek başlarına etkilerini gösteremeseler de birlikte kolaylaştırıcı bir yaklaşımla güçlü bir etkileşim kurarlar. Bunların yanı sıra artmış poli(ADP-ribose) polimeraz (PARP) ve lipooksijenaz aktivitesinin de DN gelişiminde rol oynadığı bildirilmiştir. Yine, endoplazmik retikulum stresinin ortaya çıkması ve katlanmamış protein cevabının (UPR) nöropatiyi de içeren diyabetik komplikasyonlarda rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (Van Dam ve ark., 2013).

Sirkadiyen ritim; canlılarda, dünyanın kendi eksenini etrafındaki dönüşünün etkisiyle oluşan çeşitli fizyolojik, biyokimyasal ve davranışsal döngülerin tekrarlanması olarak tanımlanmaktadır (Pittendrigh, 1960). Bu döngüler bir hiyerarşi içinde gerçekleşir. Sirkadiyen ritim merkezi ve perifer olmak üzere iki yapı tarafından kontrol edilmektedir. Merkezi yapı Hipotalamusta yer alır ve bu yapı için ışık en önemli zamanlayıcıdır. Ama ışığın yanı sıra farklı etmenler de; sıcaklık, melatonin, vardiya değişim ve jet-lag gibi durumlar da ritmi etkiler. Birçok periferel doku, örneğin karaciğer, pankreas, iskelet kası gibi dokular hipotalamustan gelen sinyaller ile yönetilmektedir. Ancak, sadece merkezi yapı değil, beslenme de bu dokular için potansiyel zamanlayıcıdır (Takahashi, 2016; Michael ve ark., 2017; Rosensweig ve ark., 2018). Sirkadiyen ritimde oluşan düzensizliklerin vücut ağırlığı, lipid düzeyleri, obezite, metabolik sendrom, Tip 2 diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Bailey ve ark., 2014; Lee ve ark., 2018).

Sirkadiyen ritim proteinlerinin düzenlediği ritmik değişimler, glukoz dengesini düzenleyen metabolik süreçlerde de gözlenmektedir. Yapılan çalışmalar sirkadiyen ritimdeki bozulmaların (Damiola ve ark., 2000; Marcheva ve ark., 2010; Stamenkovic ve ark., 2012) ve ritim genlerindeki ifade değişimlerinin (Pappa ve ark., 2013; Bracci ve ark., 2014; Peng ve ark., 2019) diyabet gelişiminde rol oynayabildiğini göstermektedir. Ayrıca, DM komplikasyonlarından DR ile sirkadiyen ritim genleri arasında ilişki olduğuna dair literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Vieira, 2014; ClinicalTrials.gov 2020; Alex ve ark., 2020; Bhatwadekar and Rameswara, 2020). Fakat literatürde DN ile sirkadiyen

ritim genleri arasında ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışma bulunamamıştır. Bu anlamda çalışmamız literatürde ilk çalışma özelliğindedir.

Çalışmamızda DN'li diyabetli hasta ve herhangi bir komplikasyonu olmayan diyabetli hasta grupları ile sağlıklı kontrol grubu incelenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara baktığımız zaman PER3 VNTR polimorfizmi bakımından diyabetli hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark olduğunu tespit ettik. PER3 VNTR 5/5 genotipi iki grup arasında anlamlı olarak farklı bulunmuştur ($p=0.032$; OR, 95%CI=0.44 0.20-0.93) (Tablo 4.4.). Literatürü araştırdığımız zaman PER3 VNTR polimorfizmi ile diyabet arasında ilişkiyi araştıran tek bir çalışma olduğunu görmekteyiz. Karthikeyan ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada 302 T2DM hastası ve 330 diyabet hastası olmayan kontrol grubu çalışmaya dahil etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçlarda PER3 VNTR 5/5 genotipinin sıklığı T2DM hasta grubunda kontrole nazaran yüksek bulunmuştur (%19 vs %12). Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.006$). Allelik olarak da 5 alleli hasta grubunda anlamlı olarak yüksek tespit edilmiştir (%43 vs %35; $p=0.0082$) (Karthikeyan, 2014). Ancak bizim sonuçlarda tersi bir durum gözlenmiştir. T2DM'li hastalarda PER3 VNTR 5/5 genotip sıklığı kontrole nazaran anlamlı olarak daha düşük çıkmıştır (% 10.21 vs %21.56; $p=0.032$; OR, 95%CI= 0.44, 0.20-0.93). Yine 5 alleli kontrol grubunda anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (%33.93 vs %43.35; $p=0.042$; OR, 95%CI= 1.49, 1.03-2.16) (Tablo 4.4.). Bu farklılığın muhtemelen PER3 VNTR polimorfizminin popülasyonlar arasındaki farkından kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz. 2005 yılında yapılan bir çalışmada PER3 VNTR 4 allelinin dünyadaki dağılımının çok geniş bir aralıkta (0.2-0.89) olduğu vurgulanmıştır (Nadkarni ve ark, 2005). Nitekim, Türkiye toplumunda PER3 VNTR lokusu için yapılan sınırlı sayıda çalışmaları incelediğimizde sağlıklı gruplarda 5/5 genotipi frekansının %16 ile %22.3 arasında değiştiğini görmekteyiz (Yegin, 2020; Ozsoy, 2021; Yesil Sayin, 2021; Yegin, 2021). Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda 5/5 genotipinin frekansı (%21.56), literatürdeki çalışmalarda Türkiye toplumu için tespit edilen frekanslara uyumlu çıkmıştır (%16-22.3). Aynı şekilde 4/4 genotipi için tespit edilen oran (%34.86), yukarıda belirtilen çalışmalarda elde edilen oranlarla (%24-39.7) uyumlu çıkmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçların Karthikeyan ve ark. (2014) yaptıkları çalışmadan elde ettikleri sonuçlardan farklı çıkma nedeni tam olarak anlaşılmamış olsa da, sonuçlarımızın

literatürdeki Türkiye toplumuna yönelik çalışmalardaki sonuçlarla uyumlu çıkması verilerimizin doğruluğunu desteklemektedir.

Literatürde PER3 VNTR polimorfizmi ile DN arasındaki ilişkiyi inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca sirkadiyen ritim genleri ile DN arasında herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bu anlamda çalışmamız dünyada ilk olma özelliği taşımaktadır. Çalışmamızda elde edilen veriler incelendiğinde DN hastaları ile kontrol grubu arasında PER3 VNTR polimorfizmi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Her ne kadar 5/5 genotipi DN hasta grubunda kontrole nazaran önemli ölçüde daha düşük tespit edilse de (%14.55 vs 21.56) bu fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ($p=0.063$; OR, 95%CI= 0.62, 0.38-1.01). Allelik olarak da 4 alleli hasta grubunda yüksek olsa da istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır ((%62.73 vs %56.65; $p=0.073$; OR, 95%CI=1.29, 0.98-1.69) (Tablo 4.3).

Çalışmamızda ayrıca DN ve diyabetli hasta grupları PER3 VNTR polimorfizmi bakımından karşılaştırılmıştır. İki hasta grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 4.5.).

Biz ayrıca tüm hastaları (DN ve diyabet) diyabetli hasta olarak kabul edip kontrol grubu ile karşılaştırdık. Elde ettiğimiz sonuçlar kontrol grubu ile bu yeni diyabet grubu arasında özellikle 5/5 genotipi bakımından anlamlı fark olduğunu göstermektedir (%13.49 vs %21.56; $p=0.018$; OR, 95%CI= 0.57, 0.36-0.90). Yine allelik olarak 5 allelinin hasta grubunda kontrole nazaran anlamlı olarak düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0.025$; OR, 95%CI= 0.75, 0.58-0.96) (sonuçlar tablo olarak sunulmamıştır).

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada dünyada ilk kez sirkadiyen ritim genlerinden PER3 geninin VNTR polimorfizmi ile DN arasında bağlantı incelenmiştir. Çalışmamız, aynı zamanda, herhangi bir sirkadiyen ritim genleri ile DN arasında ilişkiyi inceleyen ilk çalışmadır. Ayrıca, çalışmamızda diyabet ile PER3 VNTR ilişkisi de incelenmiştir. Çalışmamızda toplam 522 örnek çalışılmış olup, bulardan 220 DN hastası, 84 diyabetli hasta ve 218 kontrol örneğidir. Elde ettiğimiz sonuçlar PER3'ün diyabetle ilişkili olabileceğini fakat DN ile ilişkili olmadığını göstermiştir. Özellikle PER3 VNTR 5 allelinin diyabete karşı resesif olarak koruyucu etkisi söz konusudur. Ancak bu etkiyi DN gelişiminde tespit edemedik. Çalışmamızın kapsamı ve elde ettiğimiz sonuçlar ilk olması bakımından önemlidir. Literatürde benzer çalışmaların olmaması (veya çok sınırlı

olması) nedeniyle sonuçlarımızın daha geniş örneklem içeren çalışmalarla teyid edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKÇA

- Albrecht, U., Sun, Z. S., Eichele, G. (1997). A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell*, 91(7), 1055–1064.
- Alex, A., Luo, Q., Mathew, D., Di, R., & Bhatwadekar, A. D. (2020). Metformin Corrects Abnormal Circadian Rhythm and Kir4.1 Channels in Diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 61(6), 46.
- Alsahli, M., Shrayyef, M. Z., & Gerich, J. E. (2017). Physiology of Glucose Metabolism. In L. M. Poretsky, *Principles of Diabetes Mellitus* (p. 25). Springer Nature.
- American Diabetes Association. (2017). Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 40(Suppl 1), S11–S24.
- American Diabetes Association. (2018). Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 41, 13–27.
- American Diabetes Association. (2019). Microvascular Complications, Foot Care, Standards of medical care in diabetes. *Diabetes Care* 42 , 124–138.
- An, H., Zhu, Z., Zhou, C., Geng, P., Xu, H., Wang, H., Chen, R., Qu, X., Qian, H., Gao, Y., Zhao, X., & Qian, Y. (2014). Chronotype and a PERIOD3 variable number tandem repeat polymorphism in Han Chinese pilots. *International journal of clinical and experimental medicine*, 7(10), 3770–3776.
- Archer, S. N., Robilliard, D. L., Skene, D. J., Smits, M., Williams, A., Arendt, J., & von Schantz, M. (2003). A length polymorphism in the circadian clock gene Per3 is linked to delayed sleep phase syndrome and extreme diurnal preference. *Sleep*. 26 (4), 413–415.
- Aryal, R. P., Kwak, P. B., Tamayo, A. G., Gebert, M., Chiu, P. L., Walz, T., & Weitz, C. J. (2017). Macromolecular assemblies of the mammalian circadian clock. *Mol Cell*, 67(5), 770-782.
- Bae, K., Jin, X., Maywood, E. S., Hastings, M. H., Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2001). Differential functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN circadian clock. *Neuron*.30(2), 525–536.
- Bailey, S. M., Udoh, U. S., & Young, M. E. (2014). Circadian regulation of metabolism. *The Journal of endocrinology*, 222(2), R75–R96. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0200>Zaccardi F, Webb DR, Yates T, & Davies MJ. (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*, 92(1084):63-9.

- Bandello, F., Battaglia Parodi, M., Lanzetta, P., Loewenstein, A., Massin, P., Menchini, F., & Veritti, D. (2017). Diabetic Macular Edema. *Dev. Ophthalmol.* 58, 102–138.
- Barnett, A. H., Eff, C., Leslie, R. D., & Pyke, D. A. (1981). Diabetes in identical twins. A study of 200 pairs. *Diabetologia*, 20(2), 87–93.
- Beckett, M., Roden, L.C. (2009). Mechanisms by which circadian rhythm disruption may lead to cancer. *South African J Sci*, 105 (11-12), 415-20.
- Bessa, S. S., Hussein, T. A., Morad, M. A., & Amer, A. M. (2012). Urinary Platelet-Derived Growth Factor-BB an Early Marker of Nephropathy in patients with Tip 2 Diabetes;An Egyptian study. *Renal failure*, 34(6), 670–675.
- Bhatwadekar, A. D., & Rameswara, V. (2020). Circadian rhythms in diabetic retinopathy: an overview of pathogenesis and investigational drugs. *Expert opinion on investigational drugs*, 29(12), 1431–1442
- Boulton A. J. (2007). Diabetic neuropathy: classification, measurement and treatment. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 14(2), 141–145.
- Bracci, M., Manzella, N., Copertaro, A., Staffolani, S., Strafella, E., Barbaresi, M., Copertaro, B., Rapisarda, V., Valentino, M., & Santarelli, L. (2014). Rotating-shift nurses after a day off: peripheral clock gene expression, urinary melatonin, and serum 17- β -estradiol levels. *Scandinavian journal of work, environment & health*, 40(3), 295–304.
- Buxton, O. M., Cain, S. W., O'Connor, S. P., Porter, J. H., Duffy, J. F., Wang, W., Czeisler, C. A., & Shea, S. A. (2012). Adverse Metabolic Consequences in Humans of Prolonged Sleep Restriction Combined with Circadian Disruption. *Science Translational Medicine*. 4(129), 129ra43.
- Caputo, G. M., Cavanagh, P. R., Ulbrecht, J. S., Gibbons, G. W., & Karchmer, A. W. (1994). Assessment and management of foot disease in patients with diabetes. *The New England journal of medicine*, 331(13), 854–860.
- Carvalho, F., Pedrazzoli, M., Gasparin, A., dos Santos, F., Zortea, M., Souza, A., Torres, I. S. L., Fregni, F., & Caumo, W. (2019) PER3 variable number tandem repeat (VNTR) polymorphism modulates the circadian variation of the descending pain modulatory system in healthy subjects. *Sci Rep* 9, 9363
- Chawla, A., Chawla, R., & Jaggi, S. (2016). Microvascular and macrovascular complications in diabetes mellitus: Distinct or continuum? *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 20(4), 546–551.
- Chen, C., Cohrs, C. M., Stertmann, J., Bozsak, R., & Speier, S. (2017). Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis. *Molecular metabolism*, 6(9), 943–957.
- Cheung, N., Mitchell, P., & Wong, T. Y. (2010). Diabetic retinopathy. *Lancet (London, England)*, 376(9735), 124–136.
- Cho, C.H. (2012). Molecular mechanism of circadian rhythmicity of seizures in temporal lobe epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*. 6,55.
- Collins, B., Blau, J. (2007). Even a stopped clock tells the right time twice a day: circadian timekeeping in Drosophila. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 454(5), 857-67.
- Coomans, C. P., van den Berg, S. A., Houben, T., van Klinken, J. B., van den Berg, R., Pronk, A. C., Havekes, L. M., Romijn, J. A., van Dijk, K. W., Biermasz, N. R., & Meijer, J. H. (2013). Detrimental effects of constant light exposure and high-fat diet on circadian energy metabolism and insulin sensitivity. *FASEB journal* :

official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 27(4), 1721–1732.

- Cox, K. H., & Takahashi, J. S. (2019). Circadian clock genes and the transcriptional architecture of the clock mechanism. *Journal of Molecular Endocrinology*, 63(4), R93–R102.
- Craig, K. J., Donovan, K., Munnery, M., Owens, D. R., Williams, J. D., & Phillips, A. O. (2003). Identification and management of diabetic nephropathy in the diabetes clinic. *Diabetes Care* 26(6), 1806–1811.
- Damiola, F., Le Minh, N., Preitner, N., Kornmann, B., Fleury-Olela, F., & Schibler, U. (2000). Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes Dev* 14(23), 2950-2961.
- Diabetic Retinopathy: Effects of Melatonin Treatment on Visual Functions and Circadian Rhythm - Full Text View - *ClinicalTrials.gov* 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03478306>
- Donnelly, R., Peacock, I., & King, P. (1999). The UK Prospective Diabetes Study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. *Br J Clin Pharmacol.* 48(5), 643–648.
- Dunlap J. C. (1999). Molecular bases for circadian clocks. *Cell*, 96(2), 271–290.
- Herzog, E. D., & Huckfeldt, R. M (2003). Circadian entrainment to temperature, but not light, in the isolated suprachiasmatic nucleus. *J Neurophysiol* 90(2), 763-770.
- Dunlap, J. C. . (1996). Genetics and molecular analysis of circadian rhythms. *Annu Rev Genet* ;30, 579–601.
- Ebisawa, T., Uchiyama, M., Kajimura, N., Mishima, K., Kamei, Y., Katoh, M., Watanabe, T., Sekimoto, M., Shibui, K., Kim, K., Kudo, Y., Ozeki, Y., Sugishita, M., Toyoshima, R., Inoue, Y., Yamada, N., Nagase, T., Ozaki, N., Ohara, O., Ishida, N., ... Yamauchi, T. (2001). Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*, 2(4), 342-346.
- Farrar D, Simmonds M, Griffin S, Duarte A, Lawlor D A, Sculpher M, Fairley L, Golder S, Tuffnell D, Bland M, Dunne F, Whitelaw D, Wright J & Sheldon T A. (2016). The identification and treatment of women with hyperglycaemia in pregnancy: an analysis of individual participant data, systematic reviews, meta-analyses and an economic evaluation. *Health Technol. Assess.* 20, 1– 348 .
- Feng, D., Liu, T., Sun, Z., Bugge, A., Mullican, S. E., Alenghat, T., Liu, X. S., & Lazar, M. A. (2011). A circadian rhythm orchestrated by histone deacetylase 3 controls hepatic lipid metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 331(6022), 1315–1319.
- Field, L. L. (2002). Genetic linkage and association studies of Type I diabetes: challenges and rewards. *Diabetologia*, 45(1), 21-35.
- Florez, J. C., Hirschhorn, J., & Altshuler, D. (2003). The inherited basis of diabetes mellitus: implications for the genetic analysis of complex traits. *Annual review of genomics and human genetics*, 4, 257–291.
- Gamble, K. L., Motsinger-Reif, A. A., Hida, A., Borsetti, H. M., Servick, S. V., Ciarleglio, C. M., Robbins, S., Hicks, J., Carver, K., Hamilton, N., Wells, N., Summar, M. L., McMahon, D. G., & Johnson, C. H. (2011). Shift work in nurses: contribution of phenotypes and genotypes to adaptation. *PloS one*, 6(4), e18395.

- Gan, Y., Yang, C., Tong, X., Sun, H., Cong, Y., Yin, X., Li, L., Cao, S., Dong, X., Gong, Y., Shi, O., Deng, J., Bi, H., & Lu, Z. (2015). Shift work and diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. *Occupational and environmental medicine*, 72(1), 72–78.
- Gerber, A., Esnault, C., Aubert, G., Treisman, R., Pralong, F., & Schibler, U. (2013). Blood-Borne Circadian Signal Stimulates Daily Oscillations in Actin Dynamics and SRF Activity. *Cell* 152(3), 492-503.
- Goldman, R., Zajac, J., Shrestha, A., Patel, P., Poretsky. (2017). The Main Events in the History of Diabetes Mellitus. In M. Leonid Poretsky (Ed.), *Principles of Diabetes Mellitus* (3rd edition ed., pp. 1- 19). Springer Nature.
- Goyal, R., Jialal, I. Diabetes Mellitus Type 2. [Updated 2021 Sep 28]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513253/>
- Green, C. B., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2008). The meter of metabolism. *Cell* 134(5), 728-742.
- Greene, D. A., Sima, A. A., Stevens, M. J., Feldman, E. L., & Lattimer, S. A. (1992). Complications: neuropathy, pathogenetic considerations. *Diabetes care*, 15(12), 1902–1925.
- Lavery, J., Friedman, A., Keyes, K., Wright, J., & Ananth, C. (2016). Gestational diabetes in the United States: temporal changes in prevalence rates between 1979 and 2010. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 124(5), 804–813.
- Hardin, P. E., Hall, J. C., Rosbash, M. (1990). Feedback of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels. *Nature* ;343(6258), 536–540.
- Henson, J.M. and French, R. 1993. The polymerase chain eaction and plant disease diagnosis. *Ann. Rev. Phytopathol.* 31, 81-109.
- Holzer, S. E., Camerota, A., Martens, L., Cuerdon, T., Crystal-Peters, J., & Zagari, M. (1998). Costs and duration of care for lower extremity ulcers in patients with diabetes. *Clinical therapeutics*, 20(1), 169–181.
- Inaba, T., Ishibashi, S., Gotoda, T., Kawamura, M., Morino, N., Nojima, Y., Kawakami, M., Yazaki, Y., & Yamada, N. (1996). Enhanced expression of platelet-derived growth factor-beta receptor by high glucose. Involvement of platelet-derived growth factor in diabetic angiopathy. *Diabetes Apr*;45(4), 5.
- Insel, R. A., Dunne, J. L., Atkinson, M. A., Chiang, J. L., Dabelea, D., Gottlieb, P. A., Greenbaum, C. J., Herold, K. C., Krischer, J. P., Lernmark, Å., Ratner, R. E., Rewers, M. J., Schatz, D. A., Skyler, J. S., Sosenko, J. M., & Ziegler, A. G. (2015). Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. *Diabetes care*, 38(10), 1964–1974.
- International Diabetes Federation (IDF). (2021). *IDF Diabetes Atlas Ninth Edition 2021*. International Diabetes Federation (IDF). International Diabetes Federation (IDF).
- International Diabetes Federation. (2017). *IDF Diabetes Atlas 2017*. (8th edn),. International Diabetes Federation.
- Inzucchi, S. E., & Sherwin, R. S. (2011). Type 2 diabetes mellitus. *Cecil Medicine*. 24th ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier., 1748-1760.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985). Hypervariable Minisatellite Regions In Human DNA. *Nature*, 314, 67-73.

- Karthikeyan, R., Marimuthu, G., Sooriyakumar, M., BaHammam, A. S., Spence, D. W., Pandi-Perumal, S. R., Brown, G. M., & Cardinali, D. P. (2014). Per3 length polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 18 (3), 145-149.
- Karthikeyan, R., Spence, D. W., Brown, G. M., & Pandi-Perumal, S. R. (2018). Are Type 2 Diabetes Mellitus and Depression Part of a Common Clock Genes Network?. *Journal of circadian rhythms*, 16, 4.
- Kato, K., Feldman, E. L., & Nakamura, J. (2014). Pathogenesis of Diabetic Neuropathy from the Point of View of Schwann Cell Abnormalities. K. Sango, & J. Yamauchi içinde, *Schwann Cell Development and Pathology* (s. 135-146). Springer. Japan.
- Kelley, D., Mitrakou, A., Marsh, H., Schwenk, F., Benn, J., Sonnenberg, G., Arcangeli, M., Aoki, T., Sorensen, J., & Berger, M. (1988). Skeletal muscle glycolysis, oxidation, and storage of an oral glucose load. *The Journal of clinical investigation*, 81(5), 1563–1571.
- Kiessling, S., Eichele, G., & Oster, H. (2010). Adrenal glucocorticoids have a key role in circadian resynchronization in a mouse model of jet lag. *J. Clin. Invest* 120(7), 2600-2609.
- King, D. P., Zhao, Y., Sangoram, A. M., Wilsbacher, L. D., Tanaka, M., Antoch, M. P., Steeves, T. D., Vitaterna, M. H., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1997). Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell*, 89(4), 641–653.
- Klein, R., Knudtson, M. D., Lee, K. E., Gangnon, R., & Klein, B. E. (2009). The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy XXIII: the twenty-five-year incidence of macular edema in persons with type 1 diabetes. *Ophthalmology* 116(3), 497–503.
- Kojima, S., Green, C. B., & Shingle, D. L. (2011). Post-transcriptional control of circadian rhythms. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 3), 311–320.
- Kondo, T., Tsinoremas, N. F., Golden, S. S., Johnson, C. H., Kutsuna, S., & Ishiura, M. (1994). Circadian clock mutants of cyanobacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5188), 1233–1236.
- Kondratov, R.V. (2007). A role of the circadian system and circadian proteins in aging. *Ageing Res Rev* ;6(1), 12-27.
- Konopka, R. J., & Benzer, S. (1971). Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(9), 2112–2116.
- Lamia, K. A., Storch, K. F., & Weitz, C. J. (2008). Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105(39), 15172-15177.
- Lawrence, J. S., Contreras, R. M., Chen, W. M., & Sacks, D. M. (2008). Trends in the Prevalence of Preexisting Diabetes and Gestational Diabetes Mellitus Among a Racially/Ethnically Diverse Population of Pregnant Women, 1999–2005. *Diabetes Care*. 31(5), 899–904.
- Lee J, Ma K, Moulik M, & Yechoor V. (2018). Untimely oxidative stress in β -cells leads to diabetes – Role of circadian clock in β -cell function. *Free Radical Biology and Medicine*, 119, 69–74.
- Lee, S. V., & Bahaman, A. R. (2010). Modified gel preparation for distinct DNA fragment analysis in agarose gel electrophoresis. *Tropical biomedicine*, 27(2), 351–354.

- Leproult, R., Holmbäck, U., & Van Cauter, E. (2014). Circadian misalignment augments markers of insulin resistance and inflammation, independently of sleep loss. *Diabetes*, *63*(6), 1860–1869.
- Lim, C., & Allada, R. (2013). Emerging roles for post-transcriptional regulation in circadian clocks. *Nature neuroscience*, *16*(11), 1544–1550.
- Lipkova, J., Splichal, Z., Bienertova-Vasku, J. A., Jurajda, M., Parenica, J., Anna, V., & Goldbergova, M. P. (2014). Period3 VNTR polymorphism influences the time-of-day pain onset of acute myocardial infarction with ST elevation. *The Journal of Biological and Medical Rhythm Research*. *31*(8):878-890
- Luo, D. W., Zheng, Z., Wang, H., Fan, Y., Chen, F., Sun, Y., Wang, W. J., Sun, T., & Xu, X. (2015). UPP mediated diabetic retinopathy via ROS/PARP and NF-κB inflammatory factor pathways. *Curr. Mol. Med.* *15*, 790–799.
- Magee, M., Sletten, T. L., Murray, J. M., Gordon, C. J., Lovato, N., Bartlett, D. J., Kennaway, D. J., Lockley, S. W., Lack, L. C., Grunstein, R. R., Archer, S. N., Rajaratnam, S., & Delayed Sleep on Melatonin (DelSoM) Study Group (2020). A PERIOD3 variable number tandem repeat polymorphism modulates melatonin treatment response in delayed sleep-wake phase disorder. *Journal of pineal research*, *69*(4), e12684.
- Mansour, H. A., Wood, J., Chowdari, K. V., Tumuluru, D., Bamne, M., Monk, T. H., Hall, M. H., Buysse, D. J., & Nimgaonkar, V. L. (2017). Associations between period 3 gene polymorphisms and sleep-/chronotype-related variables in patients with late-life insomnia. *Chronobiology International*, *34*(5), 624–631.
- Marcheva, B., Ramsey, K. M., Buhr, E. D., Kobayashi, Y., Su, H., Ko, C. H., Ivanova, G., Omura, C., Mo, S., Vitaterna, M. H., Lopez, J. P., Philipson, L. H., Bradfield, C. A., Crosby, S. D., JeBailey, L., Wang, X., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2010). Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature*, *466*(7306), 627–631.
- Masharani U, & German M.S. (2017). Pancreatic hormones and diabetes mellitus. Gardner D.G., & Shoback D(Eds.), *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology*, 10e. McGraw Hill.
- Michael, A. K., Fribourgh, J. L., Chelliah, Y., Sandate, C. R., Hura, G. L., Schneidman-Duhovny, D., Tripathi, S. M., Takahashi, J. S., & Partch, C. L. (2017). Formation of a repressive complex in the mammalian circadian clock is mediated by the secondary pocket of CRY1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(7), 1560–1565.
- Millar, A. J., Carré, I. A., Strayer, C. A., Chua, N. H., & Kay, S. A. (1995). Circadian clock mutants in Arabidopsis identified by luciferase imaging. *Science (New York, N.Y.)*, *267*(5201), 1161–1163.
- Mogensen, C.E. (1984). Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med* *310* (6), 356–360.
- Mitrakou, A., Ryan, C., Veneman, T., Mokan, M., Jenssen, T., Kiss, I., Durrant, J., Cryer, P., & Gerich, J. (1991). Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. *The American journal of physiology*, *260*(1 Pt 1), E67–E74.
- Mohan, V. (2017). The Global Burden of Diabetes and Its Vascular Complications. In S. R. C.C. Kartha, *Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus* (p. 4). Springer Nature.

- Mohawk, J.A., Green, C.B., Takahashi, J.S. (2012). Central and peripheral circadianclocks in mammals. *Annu Rev Neurosci*, 35, 445-462.
- Morgan, A., Owen, O., Kemp, H., Sullivan, J., Herrera, M., & Cahill Jr., G. (1967). Brain Metabolism during Fasting. *The Journal of Clinical Investigation*, 46(10), 1589–1595
- Nadkarni, N. A., Weale, M. E., von Schantz, M., & Thomas, M. G. (2005). Evolution of a length polymorphism in the human PER3 gene, a component of the circadian system. *Journal of biological rhythms*, 20(6), 490–499.
- Ojeda, D. A., Perea, C. S., Niño, C. L., Gutiérrez, R. M., López-León, S., Arboleda, H., Camargo, A., Adan, A., & Forero, D. A. (2013). A novel association of two non-synonymous polymorphisms in PER2 and PER3 genes with specific diurnal preference subscales. *Neurosci Lett*, 553, 52-56.
- Özbayer, C. & Değirmenci İ. (2011). Circadian clock, cell cycle and cancer. *Dicle Medical Journal / Dicle Tıp Dergisi*, 38(4), 514–518.
- Pappa, K. I., Gazouli, M., Anastasiou, E., İliodromiti, Z., Antsaklis, A., & Anagnou, N. P. (2013). Circadian clock gene expression is impaired in gestational diabetes mellitus. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 29(4), 331–335.
- Paschos, G. K., Ibrahim, S., Song, W. L., Kunieda, T., Grant, G., Reyes, T. M., Bradfield, C. A., Vaughan, C. H., Eiden, M., Masoodi, M., Griffin, J. L., Wang, F., Lawson, J. A., & Fitzgerald, G. A. (2012). Obesity in mice with adipocyte-specific deletion of clock component Arntl. *Nature medicine*, 18(12),
- Pendergast, J.S., Oda, G.A., Niswender, K.D., Yamazaki, S. (2012). Period determination in the food-entrainable and methamphetamine-sensitive circadian oscillator(s) . *Proc Natl Acad Sci USA*. 28;109(35), 14218–14223.
- Peng, H., Zhu, Y., Goldberg, J., Vaccarino, V., & Zhao, J. (2019). DNA Methylation of Five Core Circadian Genes Jointly Contributes to Glucose Metabolism: A Gene-Set Analysis in Monozygotic Twins. *Frontiers in genetics*, 10, 329.
- Pittendrigh, C. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* ,25, 159–184.
- Pittendrigh, C.S. (1960). Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 25 , 159–184.
- Poulsen, P., Kyvik, K. O., Vaag, A., & Beck-Nielsen, H. (1999). Heritability of type II (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and abnormal glucose tolerance--a population-based twin study. *Diabetologia*, 42(2), 139–145.
- Reddy, E. D. R. (2019). A Basic Review on Diabetic Neuropathy. *International Journal of Trend in Scientific Research and Development (IJTSRD)*. ISSN: 2456-6470, Volume-3 | Issue-2, February 2019, pp.508-511
- Redondo, M. J., Fain, P. R., & Eisenbarth, G. S. (2001). Genetics of type 1A diabetes. *Recent progress in hormone research*, 56, 69–89.
- Reppert, S.M., Weaver, D.R. (2001). Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu. Rev. Physiol.* 63 , 647–676.
- Rosensweig, C., Reynolds, K. A., Gao, P., Laothamatas, I., Shan, Y., Ranganathan, R., Takahashi, J. S., Green, C. B. (2018). An evolutionary hotspot defines functional differences between CRYPTOCHROMES. *Nature Communications*, 9, 1138.
- Sacks DA, Hadden DR, Maresh M, Deerochanawong C, Dyer AR, Metzger BE, Lowe LP, Coustan DR, Hod M, Oats JJ, Persson B, Trimble ER; HAPO Study

- Cooperative Research Group. (2012). Frequency of gestational diabetes mellitus at collaborating centers based on IADPSG consensus panel-recommended criteria: the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *Diabetes Care*, 35, 526–528.
- Sambrook, J. & Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd Edition, Vol. 1, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Kang, T.H., Reardon, J.T., Lee, J.H., Ozturk, N. (2010). Circadian clock control of the cellular response to DNA damage. *FEBS Lett* ;584(12), 2618-2625.
- Sasaki, H., Hattori, Y., Ikeda, Y., Kamagata, M., Iwami, S., Yasuda, S., Tahara, Y., & Shibata, S. (2016). Forced rather than voluntary exercise entrains peripheral clocks via a corticosterone/noradrenaline increase in PER2::LUC mice. *Sci Rep* 6, 27607.
- Satman, I., Omer, B., Tutuncu, Y., Kalaca, S., Gedik, S., Dinccag, N., Karsidag, K., Genc, S., Telci, A., Canbaz, B., Turker, F., Yilmaz, T., Cakir, B., Tuomilehto, J., & TURDEP-II Study Group (2013). Twelve-year trends in the prevalence and risk factors of diabetes and prediabetes in Turkish adults. *European Journal of Epidemiology*, 28(2), 169–180.
- Scheer, F. A., Hilton, M. F., Shea, S. A., & Mantzoros, C. S. (2009). Adverse metabolic and cardiovascular consequences of circadian misalignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(11), 4453–4458.
- Scottish Intercollegiate Guidelines Network. (2010). Management of Diabetes. *SIGN Guideline 116, SIGN 3*.
- Shearman, L. P., Zylka, M. J., Weaver, D. R., Kolakowski, L. F., Jr, & Reppert, S. M. (1997). Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*, 19(6), 1261–1269.
- Siesjö, B. (1988). Hypoglycemia, brain metabolism, and brain damage. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 4(2),113-144.
- Simó, R., Stitt, A. W., & Gardner, T. W. (2018). Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter?. *Diabetologia*, 61(9), 1902–1912.
- Spiegelman, B. M. (1998). PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes*, 47(4), 507-514.
- Stamenkovic, J. A., Olsson, A. H., Nagorny, C. L., Malmgren, S., Dekker-Nitert, M., Ling, C., & Mulder, H. (2012). Regulation of core clock genes in human islets. *Metabolism: clinical and experimental*, 61(7), 978–985.
- Sulovari, A., Li, R., Audano, P. A., Porubsky, D., Vollger, M. R., Logsdon, G. A., Human Genome Structural Variation Consortium, Warren, W. C., Pollen, A. A., Chaisson, M., & Eichler, E. E. (2019). Human-specific tandem repeat expansion and differential gene expression during primate evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(46), 23243–23253.
- Mori, T., Johnson, C.H. (2000). Circadian control of cell division in unicellular organisms. *Prog Cell Cycle Res.* 4, 185–192.
- Takahashi, J. S. (1995). Molecular neurobiology and genetics of circadian rhythms in mammals. *Annual review of neuroscience*,18, 531–553.

- Takahashi, J.S. (2016). Molecular Architecture of the Circadian Clock in Mammals. In: Sassone-Corsi P, Christen Y, editors. *A Time for Metabolism and Hormones [Internet]. Cham (CH): Springer.*
- Taqueti, V.R., & Di Carli, M.F. (2018). Coronary microvascular disease pathogenic mechanisms and therapeutic options: JACC state-of-the-art review. *Journal of the American College of Cardiology*, 72(21), 2625–2641.
- Tesfaye, S., Boulton, A. J., & Dickenson, A. H. (2013). Mechanisms and management of diabetic painful distal symmetrical polyneuropathy. *Diabetes care*, 36(9), 2456–2465.
- Turek, F. W., Joshu, C., Kohsaka, A., Lin, E., Ivanova, G., McDearmon, E., Laposky, A., Losee-Olson, S., Easton, A., Jensen, D. R., Eckel, R. H., Takahashi, J. S., & Bass, J. (2005). Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5724), 1043–1045.
- Ullah, A., Khan, A., & Khan, I. (2015). Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. *Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 24(5), 547–553.
- United States Renal Data System (USRDS). (2003). *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States.*: Bethesda, MD, National Institute of Health.
- Valmadrid, C. T., Klein, R., Moss, S. E., & Klein, B. E. (2000). The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus. *Archives of internal medicine*, 160(8), 1093–1100.
- Van Dam, P. S., Cotter, M. A., Bravenboer, B., & Cameron, N. E. (2013). Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *European journal of pharmacology*, 719(1-3), 180–186.
- van der Horst, G. T., Muijtjens, M., Kobayashi, K., Takano, R., Kanno, S., Takao, M., de Wit, J., Verkerk, A., Eker, A. P., van Leenen, D., Buijs, R., Bootsma, D., Hoeijmakers, J. H., & Yasui, A. (1999). Mammalian CRY1 and CRY2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature*. 398(6728), 627–630.
- Vandewalle, G., Archer, S. N., Wuillaume, C., Balteau, E., Degueldre, C., Luxen, A., Dijk, D. J., & Maquet, P. (2011). Effects of light on cognitive brain responses depend on circadian phase and sleep homeostasis. *J Biol Rhythms*, 26(3), 249–259.
- Viberti, G. C., Hill, R. D., Jarrett, R. J., Argyropoulos, A., Mahmud, U., & Keen, H. (1982). Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet (London, England)*, 1(8287), 1430–1432.
- Vieira, E. (2014). The impact of metformin on circadian clock gene. *J Diabetes Metab Disord Control.*, 1(3), 00016.
- Vinik, A. I., Maser, R. E., Mitchell, B. D., & Freeman, R. (2003). Diabetic autonomic neuropathy. *Diabetes care*, 26(5), 1553–1579.
- Vinik, A. I., Strotmeyer, E. S., Nakave, A. A., & Patel, C. V. (2008). Diabetic neuropathy in older adults. *Clinics in geriatric medicine*, 24(3), 407–v. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2008.03.011>
- Vitaterna, M. H., King, D. P., Chang, A. M., Kornhauser, J. M., Lowrey, P. L., McDonald, J. D., Dove, W. F., Pinto, L. H., Turek, F. W., & Takahashi, J. S. (1994).

- Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5159), 719–725.
- Williams, R., Karuranga, S., Malanda, B., Saeedi, P., Basit, A., Besançon, S., Bommer, C., Esteghamati, A., Ogurtsova, K., Zhang, P., & Colagiuri, S. (2020). Global and regional estimates and projections of diabetes-related health expenditure: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 162, 108072.
- Wong, T. Y., Cheung, C. M., Larsen, M., Sharma, S., & Simó, R. (2016). Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16012.
- World Health Organization. (1999). Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. World Health Organization, Department of Noncommunicable Disease Surveillance, Geneva.
- Wyman, A. R., & White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11), 6754–6758.
- Yegin, Z., Sarisoy, G., Erguner Aral, A., & Koc, H. (2021). For whom the circadian clock ticks? Investigation of PERIOD and CLOCK gene variants in bipolar disorder. *Chronobiology international*, 38(8), 1109–1119.
- Yeğin, Z., Özen, F., Altinisik, Y., Yıldırım, I., Yıldırım, A. (2020). Per3 Vntr Genotypes May Predict Overall Survival In Bladder Cancer Patients In The Turkish Population. *Mugla Journal of Science and Technology*, 6(1), 120 - 135
- Yesil Sayin, G., Pehlivan, S., Serin, I., Medetalibeyoglu, A., Kose, M., Agacfidan, A., Senkal, N., Isoglu-Alkac, U., & Tukek, T. (2021). Is There a Link between Circadian Clock Protein PERIOD 3 (PER3) (rs57875989) Variant and the Severity of COVID-19 Infection?. *Current medical science*, 41(6), 1075–1080.
- Young, B. A., Maynard, C., & Boyko, E. J. (2003). Racial differences in diabetic nephropathy, cardiovascular disease, and mortality in a national population of veterans. *Diabetes Care* 26, 2392–2399.
- Zaccardi F., Khan, H., Laukkanen, J.A. (2014). Diabetes mellitus and risk of sudden cardiac death: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cardiol.* 177(2) , 535–537.
- Zhang, L., Hirano, A., Hsu, P. K., Jones, C. R., Sakai, N., Okuro, M., McMahon, T., Yamazaki, M., Xu, Y., Saigoh, N., Saigoh, K., Lin, S. T., Kaasik, K., Nishino, S., Ptáček, L. J., & Fu, Y. H. (2016). A PERIOD3 variant causes a circadian phenotype and is associated with a seasonal mood trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), E1536–E1544.
- Zheng, Y., Ley, S. H., & Hu, F. B. (2018). Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 14(2):88-98.