



**T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYABETİK PERİFERAL NÖROPATİSİ OLAN TİP 2
DİYABETLİ HASTALARDA SİNİR İLETİ HIZI İLE UCP2
GENİ PROMOTER BÖLGESİNDE -866G/A
POLİMORFİZMİNİN VE A ALLELİ SIKLIĞININ İLİŞKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

**Dr. Zübeyde Şebnem AKTARAN
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI
BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ersin AKARSU**

Mayıs 2007

**T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**DİYABETİK PERİFERAL NÖROPATİSİ OLAN TİP 2
DİYABETLİ HASTALARDA SİNİR İLETİ HIZI İLE UCP2
GENİ PROMOTER BÖLGESİNDE -866G/A
POLİMORFİZMİNİN VE A ALLELİ SIKLIĞININ İLİŞKİSİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

**Dr. Zübeyde Şebnem AKTARAN
ENDOKRİNOLOJİ VE METABOLİZMA HASTALIKLARI
BİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ersin AKARSU**

Mayıs 2007

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresinde bilimsel ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan hocam Prof. Dr. Ersin Akarsu' ya, çalışmamızın genetik incelemelerinde özveriyle katkıda bulunan Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Öğr. Üyesi Yrd. Doç. Dr. Sibel Oğuzkan'a, elektrofizyolojik çalışmaları yapan Nöroloji Ana Bilim Dalından Doç. Dr. Mustafa Yılmaz'a ve bölüm içerisinde çalışmalarımızı beraber yürüttüğümüz arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Z. Şebnem Aktaran

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I	
İÇİNDEKİLER	II	
ÖZET	IV	
ABSTRACT	V	
KISALTMALAR	VI	
TABLO LİSTESİ	VII	
ŞEKİL LİSTESİ	VIII	
RESİM LİSTESİ	IX	
1.	GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.	GENEL BİLGİLER	3
2.1.	Diabetes mellitus	3
2.1.1.	Tanımı	3
2.1.2.	Sınıflandırılması	3
2.1.3.	Tanı ve tanı kriterleri	3
2.1.4.	Klinik evreleri	5
2.1.5.	Komplikasyonları	5
2.1.5.1.	Makrovasküler	5
2.1.5.2.	Mikrovasküler	7
2.1.5.2.1.	Nefropati	7
2.1.5.2.2.	Retinopati	8
2.2.	Periferik sinir sistemi	8
2.2.1.	Anatomisi	8
2.2.3.	Özellikleri	10
2.2.4.	Fizyolojisi	12
2.2.4.	Hasarı	13
2.2.4.1.	Wallerian dejenerasyonu	13
2.2.4.2.	Aksonal dejenerasyonu	14
2.2.4.3.	Segmental demyelinizasyon	15
2.3.	Diyabetik nöropati	15
2.3.1.	Tanımı	15
2.3.2.	Epidemioloji	15
2.3.3.	Sınıflandırılması ve evrenmesi	16
2.3.4.	Tanı kriterleri	16
2.3.4.1.	Sensoriyal nöropatilerde klinik bulgular ve tanı kriterleri	16
2.3.4.1.1.	Akut sensoriyal nöropati	16
2.3.4.1.2.	Distal sensorimotor polinöropati	16
2.3.4.2.	Fokal ve multifokal nöropatiler	19
2.3.4.2.1.	Mononöropatiler	19
2.3.4.2.2.	Tuzak nöropatileri	19
2.3.4.2.3.	Proksimal DN (Diyabetik amyotrofi)	19
2.3.4.3.	Otonom nöropati	20
2.3.5.	Patogenez	22
2.3.5.1.	Oksidatif stres	22
2.3.5.1.1.	DM ve oksidatif stres	23

2.3.5.1.2	DN ve oksidatif stres	25
2.4.	Mitokondri	29
2.4.1.	Mitokondrial taşıyıcı ailesi ve uncoupling proteinler	29
2.4.1.1.	Tanımı	29
2.4.1.2.	UCPs'lerin düzenlenmesi	30
2.4.1.3.	Endojen UCPs'in rolü	30
2.4.1.4.	Tipleri (UCP1, UCP2, UCP3)	31
2.4.1.5.	Fizyolojik fonksiyonları	31
2.4.1.5.1	Termogenezis	31
2.4.1.5.2.	Oksidatif hasardan koruma	31
2.4.1.5.3.	İnsülin sekresyonunun düzenlenmesi	32
2.4.1.5.4.	Metabolik sendrom	32
2.4.1.5.5.	Serbest yağ asitlerinin mitokondri dışına çıkarılması	32
2.4.1.5.6.	Sinir sistemini koruma	33
2.5.	Polimorfizm ve Hardy-Weinberg Yasası	34
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1.	Çalışmanın tanımı	35
3.2.	Hastaların seçimi çalışmaya alınma kriterler	35
3.3.	Mikrovasküler komplikasyonların değerlendirilmesi	36
3.3.1.	Nefropati ve retinopati	36
3.3.2.	Diabetik nöropati	36
3.3.2.1.	Fizik muayene	36
3.3.2.1.1.	Subjektif semptomlar ve skorlanması	36
3.3.2.1.2.	Nörolojik muayene	36
3.3.2.2.	Sinir ileti hızı ölçümü/EMG	36
3.3.2.3.	DN tanısı	37
3.4.	Kan örneklerinin alınması ve saklanması	37
3.4.1.	Biyokimyasal analiz	37
3.4.2.	UCP-2 genotipinin analizi	37
3.5.	Verilerin değerlendirilmesi	39
3.6.	İstatistiksel analizler	39
4.	BULGULAR	40
5.	TARTIŞMA	48
6.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	54
7.	KAYNAKLAR	55

KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
AGE	İlerlemiş glikasyon son ürünleri
ADA	American Diabetes Association
APG	Açlık plazma glukozu
ARE	Aldoz redüktaz enzim
ATP	Adenozin trifosfat
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DM	Diabetes mellitus
DN	Diyabetik polinöropati
DPN	Diyabetik periferel polinöropati
DR	Diyabetik retinopati
DSPN	Distal sensorimotor polinöropati
EMG	Elektronöromiyografi
GDP	Guanezin difosfat
GFR	Glomerül filtrasyon hızı
GSİS	Glukozla stimüle edilmiş insulin sekresyonu
KAH	Koroner arter hastalığı
H2O2	Hidrojen Peroksit
K-ATP	Potasyum kanalı
KON	Kardiyovaskular otonom nöropati
KVH	Kardiyovasküler hastalıklar
MI	Miyokardiyal iskemi
mRNA	Mesenger RNA
Na-K-ATPaz	Sodyum potasyum-ATPaz
NDDG	National Diabetes Data Group
NIS	Nöropatik sekel skoru (Neuropathic Impairment Score)
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentetaz
NPDR	Nonproliferatif
NSS	Nöropatik semptom skoru (Neuropathic Symptom Score)
O2	Süperoksit
OGTT	Oral glukoz tolerans testi
ON	Otonom nöropati
PDR	Proliferatif diyabetik retinopati
PSS	Parasempatik sinir sistemi
ROR	Reaktif oksijen radikalleri
SOD	Süperoksit dismutaz
SSS	Sempatik sinir sistemi
UCP	Uncoupling protein
UCPs	Uncoupling proteinler
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VPT	Vibrasyon algılama testi
WHO	World Health Organisation

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	DM'un etiyolojik olarak sınıflandırılması	4
Tablo 2.	DM ve diğer hiperglisemi gruplarının tanı kriterleri	5
Tablo 3.	DM'un komplikasyonları	6
Tablo 4.	Periferik sinir lifleri	11
Tablo 5.	DSPN prevalansı	16
Tablo 6.	Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması ve evrenmesi	17
Tablo 7.	Nöropatik Semptom Skoru (NSS)	19
Tablo 8.	Nöropatik Sekel Skoru (NIS)	19
Tablo 9.	Otonom nöropatinin semptomları ve testleri	21
Tablo 10.	Kalp hızı değişkenliği testleri	22
Tablo 11.	DN'de hiperglisemiye bağlı gelişen hasarın mekanizmaları	26
Tablo 12.	Diyabetiklere ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik veriler	40
Tablo 13.	DN ile ilişkili faktörler	41
Tablo 14.	DN'li hastalarda ve kontrol grubu arasında allel sıklığındaki farklılıklar	43
Tablo 15.	UCP2 genotipine göre diyabetik hastalarda klinik özellikler	44
Tablo 16.	UCP2 genotipine göre diyabetik hastalarda nörolojik muayene verileri	44
Tablo 17.	UCP2 genotipine göre gruplandırılmış diyabetik nöropatili hastalarda motor sinir ileti parametrelerinin karşılaştırılması	45
Tablo 18.	UCP2 genotipine göre gruplandırılmış diyabetik nöropatili hastalarda sensoriyal sinir ileti parametrelerinin karşılaştırılması	46
Tablo 19.	Sinir ileti fonksiyon testlerinin klinik faktörler ve UCP2 genotipleri ile ilişkisi	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	DM'un etiyolojik tipleri ve klinik evreleri	6
Şekil 2.	Periferik sinir anatomisi	9
Şekil 3.	Periferik duyuşal ve motor sinirin özellikleri	10
Şekil 4.	Periferik sinirde iyon dengesi	13
Şekil 5.	Periferik sinir lifinde iletim	13
Şekil 6.	Periferik sinir hücresi hasarının tipleri	14
Şekil 7.	UCP2 geni promoter bölgesi	33
Şekil 8.	Tip 2 DM'lu hastalarda mikrovasküler komplikasyonların oranı	41
Şekil 9.	Diyabetiklerin ve kontrol grubunun allel sıklığı	42
Şekil 10.	DPN'li hastalarda genotip oranlarının kontrol grubu ile karşılaştırılması	43
Şekil 11.	Genotip grupları arasında ulnar MCV farkı	45
Şekil 12.	Genotip grupları arasında median SCV farkı	46

RESİM LİSTESİ

Resim 1.	Periferik sinir lifi	11
Resim 2.	UCP2 geni promoter bölgesi	42

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Diyabetik polinöropati (DN) diabetes mellitusun (DM) multifaktoriyel bir komplikasyonu olup yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Hiperglisemi ile uyarılmış oksidatif stres diyabetik periferik polinöropatinin (DPN) gelişiminden sorumlu olan patolojik mekanizmalardan birisidir (1-4). Artmış oksidatif streste kontrolsüz olarak üretilen reaktif oksijen radikalleri (ROR) mitokondrinin fonksiyonunu bozar (1-3). Hasarlanmış mitokondriden salınan proapoptotik faktörler hücrede apoptozisi başlatırlar (3,4). DM'ta hücre kültürlerinde ve deneysel hayvan modellerinde periferik sinirin arka kök gangliyonlarındaki hasar hiperglisemi ile ilişkili bulunmuştur (1-7). Aynı zamanda oksidatif stres bloke edildiğinde DPN'nin ilerlemesi durmuştur (7-9).

DPN'nin gelişiminde mitokondriyal oksidatif metabolizma hızının önemi bilinmektedir (1). Bu hız hücrenin adenozin trifosfat (ATP) ihtiyacına ve elektronların mitokondri dışına taşınmasına bağlıdır (3). Mitokondriyal taşıyıcı proteinler ailesinden olan uncoupling proteinler (UCPs) mitokondrinin iç membranında eksprese edilirler. Mitokondriyal membranın fonksiyonunda ve glukoza cevap olarak hücresel enerji düzenlenmesinde rol alırlar. UCPs, protonu mitokondri dışına çıkararak oksidatif fosforilasyon aracılığı ile ATP üretimini engellerler. Böylece mitokondriyal proton gradiyentini azaltırlar. UCPs'in farklı üyelerinin belirli hücre dağılımları vardır. UCP1 kahverengi yağ dokuda eksprese edilir ve vücudun ısı üretiminde rol oynar (10,11). UCP3 öncelikle kaslarda ve az miktarda nöronlarda tesbit edilmiştir (4,11,12).

UCP2 dalak, pankreas adacık hücreleri, akciğer, mide, beyaz yağ doku, beyin ve periferik nöronların arka kök gangliyonlarında eksprese edilir (5,6,10-12). UCP2 mitokondride ROR'nin üretiminde sensor görevindedir. Uzamış oksidatif streste devreye girerek üretimi durdurur. UCP2 gen delesyonu olan farelerin makrofajlarında yüksek düzeyde ROR bulunmuştur (13). Nöron kültürlerinde hiperglisemi ile uyarılmış oksidatif streste UCP2'nin artarak mitokondriyal hiperpolarizasyonu önleyip programlı hücre ölümünü bloke ettiği gözlenmiştir (4).

Oksidatif stres ile uyarılmış UCP2 aktivasyonunun ROR üretimini engelleyerek DPN gelişim hızını yavaşlatacağı ya da iskemik sinirde enerji eksikliğini artırarak hızlandıracağı öne sürülmüştür (6,25).

Farelerin pankreas adacık hücre mitokondrilerinde artmış UCP2 ekspresyonunun ATP üretimine engelleyerek glukozla stimüle edilmiş insulin sekresyonunu (GSİS) azalttığı gözlenmiştir (15). Prediyabetik dönemde pankreas beta hücrelerinde bozulmuş GSİS ile artmış UCP2 düzeyi ilişkili bulunmuştur (14). UCP2 gen delesyonu olan farelerde ise GSİS artmıştır (16).

UCP2 artış mekanizmalarından birisi de genin artmış ekspresyonu ile karakterize polimorfizmdir (17). İnsanlarda –866G/A polimorfizmi en sık görülenidir (6,16-25). İnsan yağ hücrelerinde polimorfizme bağlı A allelin artmış transkripsiyonel aktivitesi UCP2 mesenger RNA (m-RNA) düzeylerindeki artışla birlikte bulunmuştur. Orta yaş insanlarda UCP2 –866G/A gen polimorfizmi olanlarda obezite daha az görülmüştür (18). Tip 1 DM'ta A allel azalmış nöropati prevalansı ile birlikte bulunmuştur (25).

UCP2 aktivasyonunun yararlı etkilerini gösteren in vitro çalışmalar bulunmakla birlikte sadece bir klinik çalışmada UCP2 -866G/A gen polimorfizmi olan DPN'li farelerin periferik sinirinin arka kök ganglionlarında UCP2 m-RNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Artmış A alleli aktivitesi sinir ileti hızı ve vazomotor aktivitede azalma ile ilişkili bulunmuştur. Artmış oksidatif stresle uyarılmış UCP2 aktivasyonunun sinir hücresinin mitokondrisinde enerji (ATP) üretimini azaltarak sodyum/potasyum-ATPaz (Na/K-ATPaz) pompasının aktivitesini yavaşlattığı ve DPN gelişimini hızlandırdığı düşünülmüştür (6).

DPN'nin gelişim süreci bireysel olarak farklılık göstermektedir. Patogeneizde genetik yatkınlığın araştırılması, risk grubunu belirlemede ve tedavide yeni görüşlere yol açılmasında yararlı olacaktır. Bu nedenle çalışmamızda DPN'si olan tip 2 diyabetli hastalarda UCP2 genin promoter bölgesinde –866G/A polimorfizminin ve A alleli sıklığının sinir ileti hızları ve klinik faktörlerle ilişkisi araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes mellitus

2.1.1. Tanımı

DM kronik hiperglisemi ile seyreden sistemik kronik bir metabolizma hastalığıdır. İnsülinin kısmen ya da tamamen eksikliği ve/veya insülin direnci sonucu ortaya çıkan karbonhidrat, protein ve yağ metabolizması bozukluklarıyla karakterizedir. DM'ta kronik hiperglisemi akut metabolik komplikasyonların yanısıra, uzun dönemde vücudun çeşitli organ ve sistemlerinde özellikle gözler, böbrekler, kalp ve kan damarlarında olmak üzere hasarlara ve fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. DM klinikte polidipsi, poliüri, görme bozukluğu, kilo kaybı ve polifaji gibi belirtilerle ortaya çıkar. Nonketotik hiperozmolarite veya ketoasidoz gibi daha ağır formlarında hızlı ve etkin tedavi yapılmadığı takdirde stupor, koma ve ölüme yol açabilir. Semptomlar genellikle hafif bazen de yoktur. Çoğu kez klinik açıdan farkına varılamayan hiperglisemiler organ ve sistemlere hasar verir ve tanı sırasında hastada komplikasyonlara rastlanır (26,27).

2.1.2. Sınıflandırılması

DM'un sınıflandırılması ilk kez 1979 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde National Diabetes Data Group (NDDG) tarafından yapılmıştır (28). Bu sınıflama WHO (World Health Organisation) diyabet ekspert komitesi tarafından onaylanarak 1980 yılında yayınlanmıştır. 1985, 1997 ve 2003'te yeniden düzenlenmiştir (29-32). ADA (American Diabetes Association) tarafından 2007 yılında araştırma sonuçları incelenerek NDDG ve WHO tarafından önerilen sınıflandırmalarla birleştirilip yeniden yayınlanmıştır (27) (Tablo 1).

2.1.3. Tanı ve tanı kriterleri

DM'un ömür boyu süren bir hastalık olduğu için tanı doğrulanmalıdır. DM'un tanı kriterleri, ADA tarafından 1979'da NDDG ve 1985'de WHO tarafından önerilen kriterler gözden geçirilerek yeniden düzenlenmiştir (27,31,32).

Tablo 1. DM'un etiyolojik olarak sınıflandırılması

1. Tip 1 diabetes mellitus (Beta hücre yıkımı) Otoimmün İdiopatik	
2. Tip 2 diabetes mellitus İnsülin direncinin baskın olduğu rölatif insülin eksikliği İnsülin salınım defektinin baskın olduğu insülin direnci	
3. Diğer spesifik tipler	
A. Beta hücre fonksiyonunda genetik defektler Hepatik Nükleer Faktör(HNF)4 α (MODY 1) Glukokinaz (MODY 2) HNF-1- α (MODY 3) İnsülin promoter faktör-1 (MODY 4) Neuro D1 / β -2 (MODY 6) Mitokondrial DNA Mutant insülinler Hiperproinsülinemi Diğerleri	E. İlaç ve diğer kimyasallara bağlı Vakor Pentamidin Nikotik asit Glukokortikoidler Tiroid hormonu Diazoksid β -adrenerjik agonistler Tiazidler Dilantin α - interferon Proteaz inhibitörleri Atipik antipsikotikler Diğerleri
B. İnsülin etkisinde genetik defektler Tip A insülin direnci Leprehaunism Rabson-Mendenhall sendromu Lipoatrofik diyabet Diğerleri	G. Enfeksiyonlar Konjenital Rubella Sitomegalovirüs Diğerleri
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları Pankreatit Travma / pankreatektomi Neoplazi Kistik fibrozis Hemokromatozis Fibrokalkülöz pankreatopati Diğerleri	H. İmmün kökenli nadir görülen DM formları Stiff-Man Sendromu Antiinsülin antikorları Diğerleri
D. Endokrinopatiler Akromegali Cushing sendromu Glukagonoma Hipertiroidizm Somatostatinoma Aldosteronoma Diğerleri	I. Diyabetle birlikte olan genetik sendromlar Down sendromu Klinefelter sendromu Wolfram sendromu Friedrich ataksisi Huntington ataksisi Laurence-Moon-Biedl sendromu Myotonik distrofi Porfiri Prader Willi sendromu Diğerleri
4. Gestasyonel diabetes-mellitus (GDM)	

ADA tarafından önerilen tanı kriterlerine göre açlık plazma glukozu (APG) 126 mg/dl veya üzerindeyse tanı koyulur ancak test tekrarlanarak tanı doğrulanmalıdır. APG için (110-126 mg/dl) arasındaki değerler bozulmuş açlık glukozu olarak tanımlanmıştır. Oral glukoz tolerans testinde (OGTT) ikinci saat plazma glukoz düzeyinin (140-200 mg/dl) arasındaki değerleri bozulmuş glukoz toleransı olarak belirlenmiştir (Tablo 2) (27).

Tablo 2. DM ve diğer hiperglisemi gruplarının tanı kriterleri (27)

1. Açlık plazma glukozu	
< 110 mg/dl	: Normal açlık glukozu
110 -125 mg/dl	: Bozulmuş açlık glukozu
≥126 mg/dl	: DM tanısı (tanı doğrulanmalıdır)
2. OGTT kullanıldığında bu kategoriler aşağıdaki değerlere karşılık gelmektedir. (2. saat plazma glukozu değerlendirilir)	
<140 mg/dl	: Normal glukoz toleransı
140-199 mg/dl	: Bozulmuş glukoz toleransı
≥200 mg/dl	: DM tanısı (tanı doğrulanmalıdır)

2.1.4. Klinik evreleri

DM'a yol açan hiperglisemi aşamaları klinik evrelere göre gruplandırılmıştır. Altta yatan hastalığın doğal seyrine bağlı olarak, bir kişinin glisemi evresi zaman içinde değişebilir (32) (Şekil 1).

2.1.5. Komplikasyonları

DM'un komplikasyonları, akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılır. Kronik komplikasyonlar ise kendi içinde damar tutulum çapına göre makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılır (Tablo 3) (33).

2.1.5.1. Makrovasküler

Diyabetiklerde makrovasküler komplikasyonlar yaş gruplarına göre erken yaşta ortaya çıkar ve hızlı ilerler. Kötü metabolik kontrol, mikrovasküler komplikasyonların varlığı, obezite, sigara, alkol tüketimi, sedanter yaşam, genetik nedenler ve diğer bir kronik hastalığın eşlik etmesi makrovasküler komplikasyonların gelişiminde rol oynar (33). DM kardiyovasküler hastalıklar (KVH) için risk faktörüdür. Aynı zamanda KVH'da diyabetiklerde mortalite ve morbiditenin en önemli nedenlerindedir. Diyabetiklerde sessiz miyokard iskemisi (MI) sık görüldüğü için koroner arter hastalığı (KAH) mutlaka araştırılmalıdır. Ancak otonom nöropati (ON) eşlik ediyorsa ve elektrokardiyografide iskemik bulgu yoksa KAH tanısı koymak zordur (34).

DM Tipleri	Normoglisemi	Hiperglisemi			
	Glukoz ve insülin düzeyleri normal	IGT veya IFG	Diabetes Mellitus		
			İnsülin Gereksiz	Gerekli	Yaşam için şart
Tip 1	←—————→				
Tip 2	←—————→				
Diğer spesifik tipler β-hücre fonksiyonunda defektler İnsülin etkisinde genetik defektler Ekzokrin pankreas hastalıkları Endokrinopatiler İlaç yada kimyasal ajanlar	←—————→				
Gestasyonel DM	←—————→				

Şekil 1. DM'un etiojik tipleri ve klinik evreleri (11)
(IGT: Bozulmuş glukoz toleransı, IFG: Bozulmuş açlık glukozu)

Tablo 3. DM'un komplikasyonları (33)

1. Akut metabolik komplikasyonlar	2. Kronik komplikasyonlar
Ketoasidoz koması Nonketotik hiperosmolar koma Laktik asidoz koması Hipoglisemi koması	A. Makrovasküler komplikasyonlar: Serebrovasküler hastalıklar Kardiyovasküler hastalıklar Periferik damar hastalıkları Diyabetik ayak B. Mikrovasküler komplikasyonlar Diyabetik nefropati Diyabetik retinopati Diyabetik nöropati

Diyabetiklerde serebrovasküler hastalıklar erken yaşta ortaya çıkar (35). Diyabetik ayak görülme sıklığı diyabet süresiyle orantılı olarak artmıştır. Nontravmatik alt ekstremite amputasyonlarının %50 nedenidir. Normal popülasyona göre diyabetiklerde amputasyon riski 15-40 kat artmıştır (36). Hastaların üçte birinde diyabetik ayak gelişiminden ağrı duyusu kaybı, derin duyu kaybı ve ayağın intrinsek kaslarını tutan motor bozukluklar sorumludur. Patogeneğinde nörolojik faktörler, vasküler nedenler ve infeksiyon rol oynar. Mikrovasküler ve makrovasküler anjiyopati ayakta uç kısımlarda beslenmeyi bozar. Buna nöropatik olaylar eklendiğinde kolaylıkla yara açılır. Kanlanmanın bozuk

olması ve infeksiyona karşı azalmış direnç yaranın iyileşmesini geciktirir ve zorlaştırır (33,36).

2.1.5.2. Mikrovasküler

2.1.5.2.1. Nefropati

Diyabetik nefropati ilk kez 1936 yılında Kimmelstiel ve Wilson tarafından tanımlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde, son dönem böbrek yetmezliği nedeniyle diyalize giren hastalarda nedenin %60'ı diyabettir (37). Üç ile altı ay arasında en az iki kez idrar tetkikinde günlük ≥ 300 mg albüminüri veya günlük ≥ 500 mg proteinüri saptanması diyabetik nefropati tanısını koydurur. Bu hastalar tedavi edilmezlerse proteinüri sıklıkla nefrotik düzeye ilerler ve böbrek fonksiyonları zamanla bozulur. Hipertansiyon sıklıkla bu sendroma eşlik eder. Diyabetik nefropati gelişimi diyabet süresine bağlıdır. Tip 1 DM'da %30-40 oranında rastlanırken tip 2 diyabetiklerde prevalansı %5-10'dur. Ancak tip 2 DM'un sıklığı gelişmiş ülkelerde tip 1 DM'a göre 10-15 kat fazla olduğu için diyabetik nefropatili hastaların önemli bir bölümünü tip 2 diyabetliler oluşturur (39).

Diyabetik nefropatinin ortaya çıkışı ve ilerlemesi beş evrede tanımlanmıştır (40).

Evre 1 (hiperfiltrasyon dönemi): DM tanısı koyulduğunda glomerül filtrasyon değeri (GFR) %20-40, böbrek plazma akımı ise %9-14 oranında artmıştır. İdrar protein atılımı GFR ile paralel olarak artar ancak mikroalbuminüri düzeyinde değildir.

Evre 2 (sessiz dönem): GFR değerlerinde artış devam eder. İdrarda albüminüri çoğu kez normal sınırlardadır. Kan basıncı normaldir. Konvansiyonel insülin tedavisi ile bu dönem 5-15 yıl sürer. Glomerul bazal membranında kalınlaşma ve mezengium hacminde artma izlenir.

Evre 3 (mikroalbuminüri dönemi): DM başlama tarihinden itibaren 6-15 yıl sonra bu dönem ortaya çıkar. GFR yüksek veya normaldir. Kan basıncı normal veya artmıştır. İdrarda albümin miktarı 20-200 $\mu\text{g}/\text{dk}$ (30-300mg/saat) arasındadır.

Evre 4 (Aşık nefropati dönemi): Bu dönemde ≥ 300 mg/gün albuminüri veya ≥ 500 mg/gün proteinüri saptanır. Proteinüri miktarında artış GFR'de geriye dönüşümsüz azalmaya neden olur. Genellikle hipertansiyon vardır.

Evre 5 (Son dönem böbrek yetersizliği): Aşık proteinürüyü takiben ortalama yedi yıl sonra renal replasman tedavisi gerekmektedir.

2.1.5.2.2. Retinopati

Diyabetik retinopati (DR) prevalansı diyabetin süresi ile doğru orantılı olarak artar. Diyabet süresi on yıldan az olanlarda %7, 15 yıldan fazla olanlarda %63

oranında DR görülmüştür. Gelişmiş ülkelerde 20-74 yaşları arasında çalışan yaş grubunda en önemli körlük nedenidir. DR'ye bağlı körlük genellikle; rezorbe olmayan vitreus hemorajisi, fraksiyonel retina dekolmanı veya diyabetik maküler ödem nedeniyle gelişir. DR retinanın prekapiller arteriyol, kapiller ve venüllerini mikrovasküler tıkanma ve mikrovasküler sızıntı yoluyla etkilemektedir. DR nonproliferatif (NPDR) ve proliferatif (PDR) olarak ikiye ayrılır (41). NPDR klinikte hafif, orta ve şiddetli olarak sınıflandırılır. Hafif dereceli NPDR'de en az bir adet retinal mikroanevrizma bulunur. Orta derecede mikroanevrizma ve kanama sayısında artış görülür. Yumuşak eksüda, venöz değişiklikler ve intraretinal mikrovasküler anormallikler saptanır. Şiddetli derecede yaygın arteriolar tıkanma, yumuşak eksüda, kanama ve venöz değişiklik bulunur. PDR'de papilla ve retinada yeni damar oluşumu, vitreus içi kanamalar, fibrovasküler proliferasyon, retina dekolmanı, irisde yeni damar oluşumu saptanır. DR'nin her hangi bir evresinde gelişebilen makülopati ani görme kayıplarına neden olabilir. Tip 1 DM'lu hastalarda %20, insülin kullanan tip 2 diyabetiklerde %25, insülin kullanmayanlarda ise %14 oranında makülopati gözlenmiştir (42).

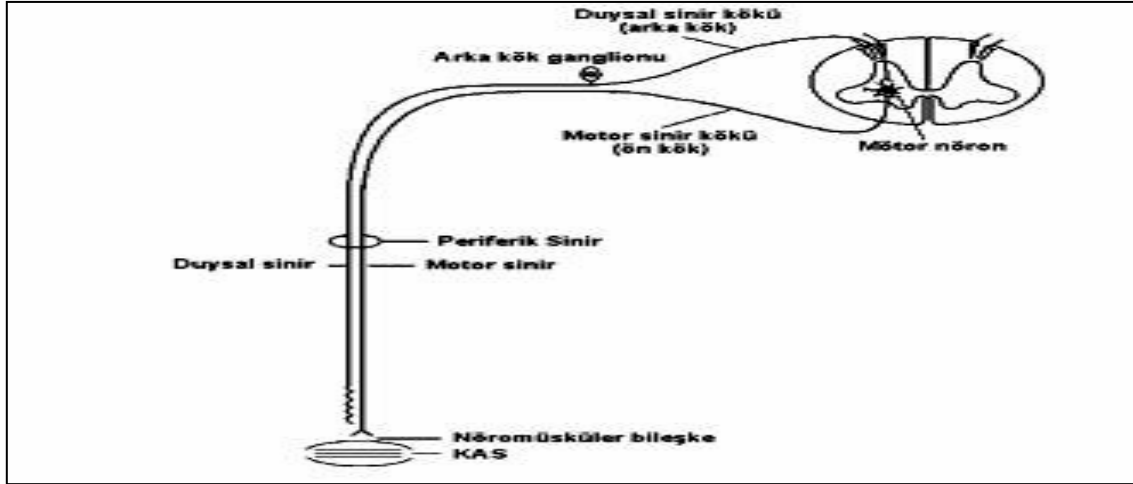
2.2. Periferik sinir sistemi

2.2.1. Anatomisi

Periferik sinirler sensoriyal, motor ve otonom sinir liflerini içerir. Omurilik ön boynuzunda yerleşmiş alt (ikinci) motor nöronların aksonları ön kökten omuriliği terkederek periferik motor sinir liflerini oluşturur (Şekil 2). Periferik duysal aksonların hücre gövdeleri omuriliğin dışında, intervetrebral foramende yerleşimli arka kök ganglionu içindedir. Buradaki bipolar duysal nöronların periferik uzantıları periferik sinir içinde yer alırken santral uzantıları arka kök yoluyla omuriliğe girer (Şekil 3-4) (43,44).

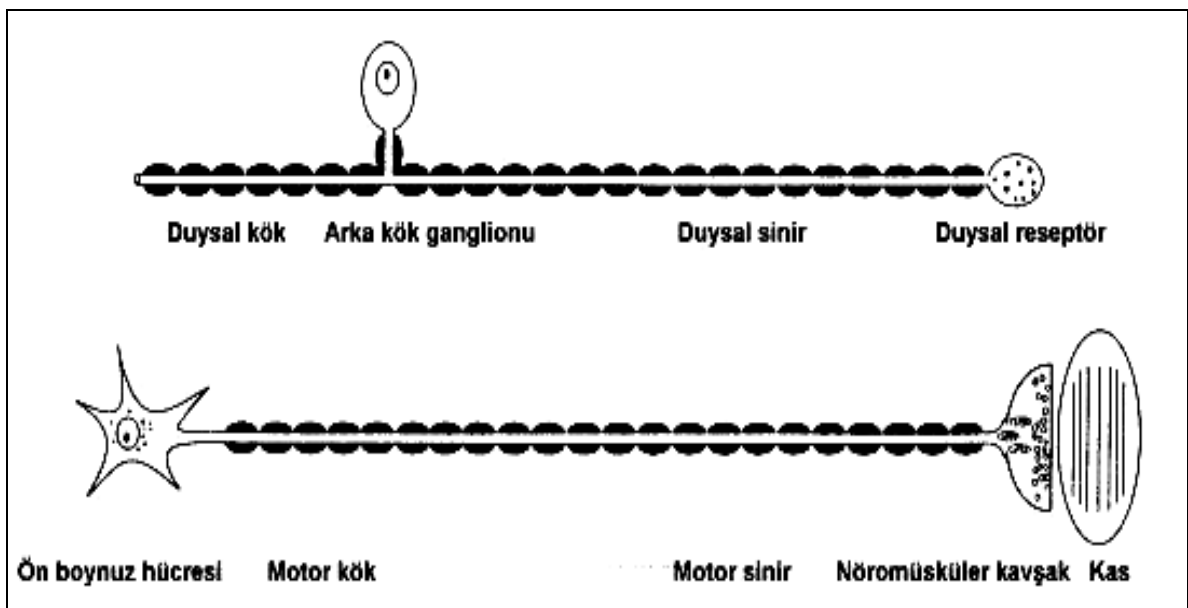
Her bir segmentte ön ve arka kökler omurilik dışında birleşerek spinal sinirleri oluştururlar. Spinal sinirler 31 çifttir. Arka (dorsal rami) ve ön (ventral rami) dallara ayrılır. Arka dallar, omurganın üzerindeki cildin duysunu ve paraspinal kasların innervasyonunu sağlar. Ön dallar ise göğüste interkostal sinirleri oluştururken, boyunda ve ekstremitelerde servikal, brakial ve lumbosakral pleksusları oluşturur. Brakial pleksusu oluşturan sinir lifleri önce üst, orta ve alt trunkusları yapar. Bunlar daha sonra anterior ve posterior bölümler halinde devam eder. Sonunda lateral, posterior ve medyal kordlar olarak son bulur. Kordlardan üst ekstremitenin periferik sinirleri çıkarlar. Alt ekstremitede ise lomber ve sakral pleksus net bir

ayrım göstermediği için lumbosakral pleksus olarak adlandırılır. Lumbosakral pleksus dorsal ve ventral bölümlere ayrılır. Daha sonra periferik sinirleri oluşturur (44)



Şekil 2. Periferik sinir anatomisi (44)

Periferik motor sinirler terminalerinde nöromüsküler kavşakta innerve ettikleri kasla bağlantı kurarlar. Sensoryal sinirler ise derideki çeşitli reseptörlerde son bulurlar. Bir spinal segmentin innerve ettiği tüm kaslar miyotom adını alırken, bu segmentin duyusundan sorumlu olduğu deri alanı ise dermatom adını alır. Genellikle bir kas birden fazla miyotoma aittir. Bir deri bölgesi de birden fazla dermatoma aittir (43,44).



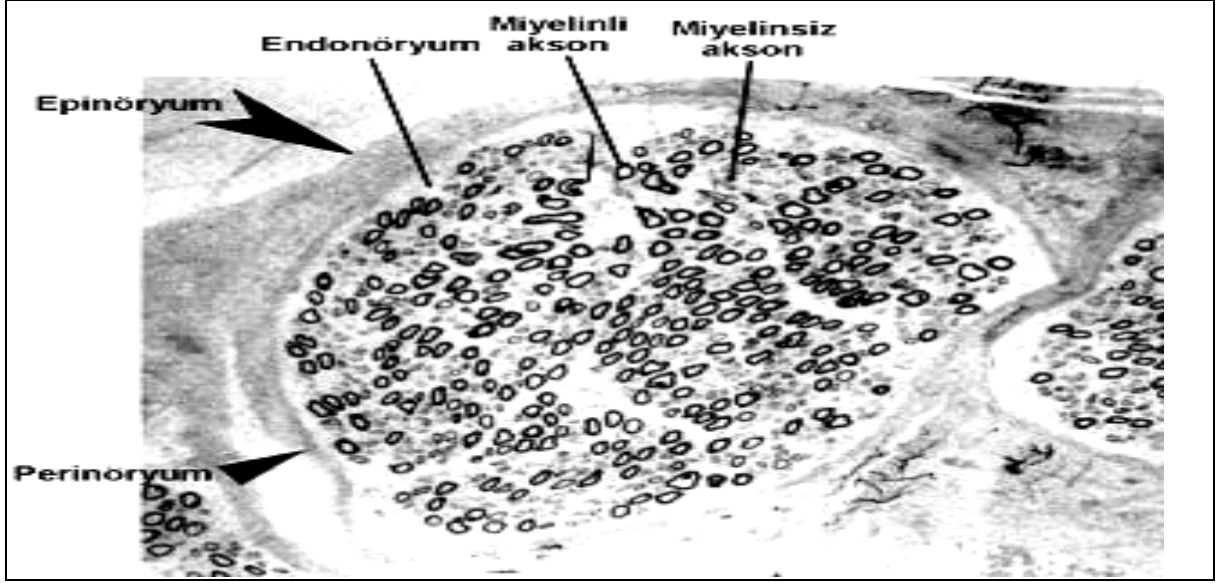
Şekil 3. Periferik duysal ve motor sinirin özellikleri (44)

Periferik mikst (motor ve sensoriyal lifleri taşıyan) bir sinirin enine kesitinde en dışta, sinirin bütünü örtün epinöryum tabakası yer alır. Bunun altında gruplar halinde motor ve sensoriyal aksonları içeren fasiküller vardır. Bir periferik sinir içinde ortalama 3-5 fasikül bulunur ve perinöryumla çevrelenir. Periferik sinir boyunca sinir lifi bir başka fasiküle geçebilir. Fasikülün içinde aksonların arasındaki bağ dokusuna ise endonöryum denir (Şekil 4). Periferik sinir içinde kanı taşıyan kapiller damar sistemi vasa nervorum adını alır. Bir periferik sinirin hücre gövdesi ve aksonu vardır. Hücre gövdesi arka kök ganglionunda veya omurilik ön boynuzunda bulunur. Aksonun uzunluğu bir metreyi aşabilir. Aksonun etrafını örtün miyelin hızlı ileten sinir liflerinde iletim fonksiyonunda rol oynar ve schwann hücrelerinin akson çevresinde kıvrılması ile oluşur (44,45).

2.2.2. Özellikleri

Her bir hücrenin miyelin sargısı arasında Ranvier nodu adı verilen kısa bir aralık bulunur. Ranvier nodları arasında Schwann hücresi büyük çaplı liflerde 150 kereye kadar kendi üzerine kıvrılarak miyelin tabakasını oluşturur. Nodlar arasındaki mesafede sinir lifine göre 250µm ile 2000µm arasında değişir. Akson çapı ne kadar büyükse nodlar arası mesafe o kadar uzundur ve miyelin tabakası o kadar kalındır. En kalın miyelinli aksonların çapları 20µm kadarken miyelinsiz aksonların çapları 0.2-3.0µm arasında olup genellikle 1.5µm civarındadır (44,45) (Resim 1).

Periferik sinir lifleri genişlik ve ileti özelliklerine göre A, B ve C lifleri olarak üç gruba ayrılır. Kalın miyelinli lifler olan A lifleri en hızlı iletimi yaparlar. Kas içciklerinden gelen afferent lifler, derinin duysal afferentleri ve omurilik ön boynuzunda yer alan motor hücrelerin kaslara giden efferent lifleri bu gruptadırlar. B lifleri daha ince miyelinli olup preganglionik otonomik efferent lifleri içerir. C lifleri küçük çaplı miyelinsiz lifleri içerir. Postganglionik otonomik efferent lifler ve ağrı, ısı duyumunda görevli somatik afferent liflerin çoğunluğu bu gruptadırlar (Tablo 4).



Resim 1. Periferik sinir lifi (44)

Tablo 4. Periferik sinir lifleri (44)

Periferik sinir lifleri
A lifleri (myelinli somatik sinir lifleri) 1- Kası innerve eden sinirler Efferent: Grup I-IV lifler Efferent: alfa motor nöron Gamma motor nöron 2- Kutanöz sinirler Afferent: alfa ve delta lifleri
B lifleri: Miyelinli otonomik preganglionik sinir lifleri
C lifleri: Miyelinsiz somatik ve otonomik sinir lifleri

Akson içinde, hücre gövdesinden periferde ve periferden hücre gövdesine doğru değişik hızlarda taşıma mekanizmaları bulunmaktadır. Periferde doğru olan yavaş transport 0.25-4mm/gün, hızlı transport ise 200-400mm/gün hızındadır. Yavaş taşıma sisteminin hızı, aksonun rejenerasyon hızına eşittir.

Hızlı taşıma sistemi enerjiye bağımlı ve ısıya duyarlıdır. Transmitter sentezleyen enzimler, glikoproteinler ve membran bileşenleri taşınır. Periferden gövdeye doğru olan (retrograd) transport hızlı işleyen bir sistemdir. Bu yolla membranöz prelizozomal yapılar ve ekstraselüler materyaller taşınır (44,45).

2.2.3. Fiziyojisi

Akson zarının istirahatte transmembran potansiyeli -60 miliVolt (mV)'dur. Aksona uyarı geldiğinde hücre içi ve dışındaki sıvı arasında membran potansiyel farkı oluşur. Aksiyon potansiyeline bağlı voltaj kapılı sodyum kanalları açılır ve

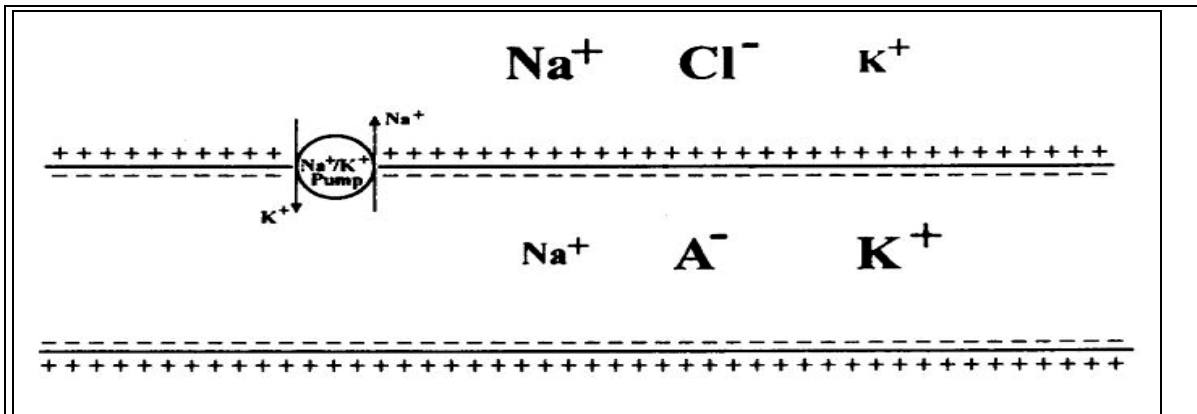
membrandan hücre içerisine sodyum iyon transferi gerçekleşir. Transmembran potansiyeli +40 mV'a ulaşır (depolarizasyon). Sodyumun hücre içine girişi, voltaj kapılı sodyum kanallarının kapanması ile son bulur. Açığa çıkan aksiyon potansiyeli sinir lifi boyunca yayılım gösterir. Ardından voltaj kapılı potasyum kanalları açılarak potasyum iyonları bu kanallardan hücre dışına çıkar. Böylece, sodyum girişi ile depolarize olan membran, potasyum çıkışı ile repolarize olmaya başlar. Hatta potasyum çıkışı repolarizasyon sırasında transmembran potansiyelini bir süre istirahatteki değerinin de altına taşır (hiperpolarizasyon). Depolarizasyon ve repolarizasyon fırtınasının ardından Na-K-ATPaz pompası hücre içindeki fazla sodyumu hücre dışına taşıyıp, potasyumu geri alarak, iyon paylaşımını aksiyon potansiyeli oluşmadan önceki haline getirir. Bu sırada pompa, istirahat membran potansiyelini sürdürmek için gösterdiği çabanın çok daha üstünde bir gayretle çalışarak daha çok ATP harcar (Şekil 4) (44,45).

Miyelinsiz sinir liflerinde potansiyelin yayılımı zar boyunca kesintisiz iletilir. Miyelinli sinirlerde depolarizasyon yalnızca Ranvier nodlarında olur. Akım, bir noddan diğerine sıçrayarak ilerlerler (sıçrayıcı iletim).

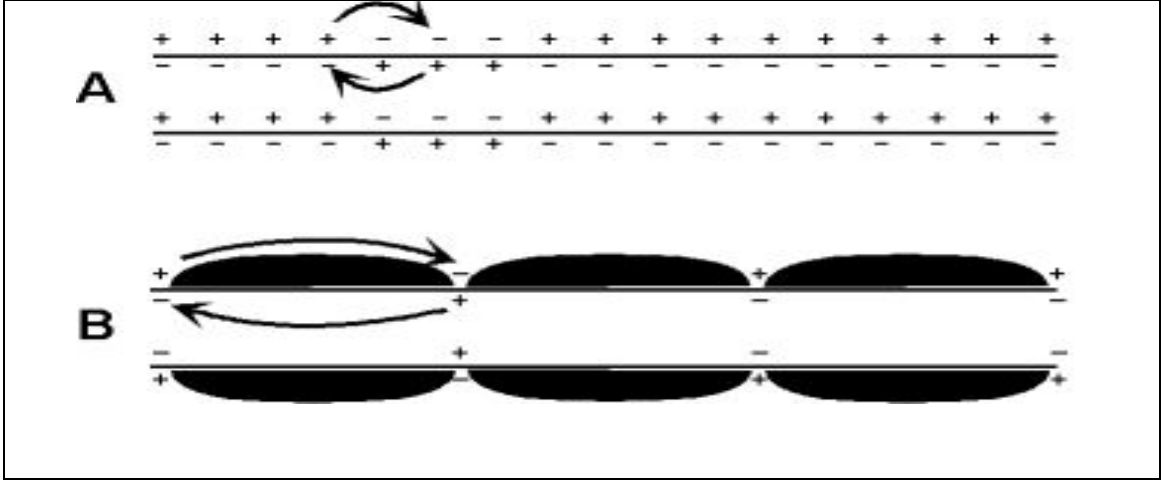
Miyelinli lifler sıçrayıcı ileti sayesinde miyelinsiz liflerden çok daha hızlı iletiler (Şekil 5) (43,44).

2.2.4. Hasarı

Periferik sinir hücresinde üç tip zararlanma olur. 1) Wallerian dejenerasyonu 2) Aksonal dejenerasyon 3) Segmental demiyelinizasyon (Şekil 6)(44-45).



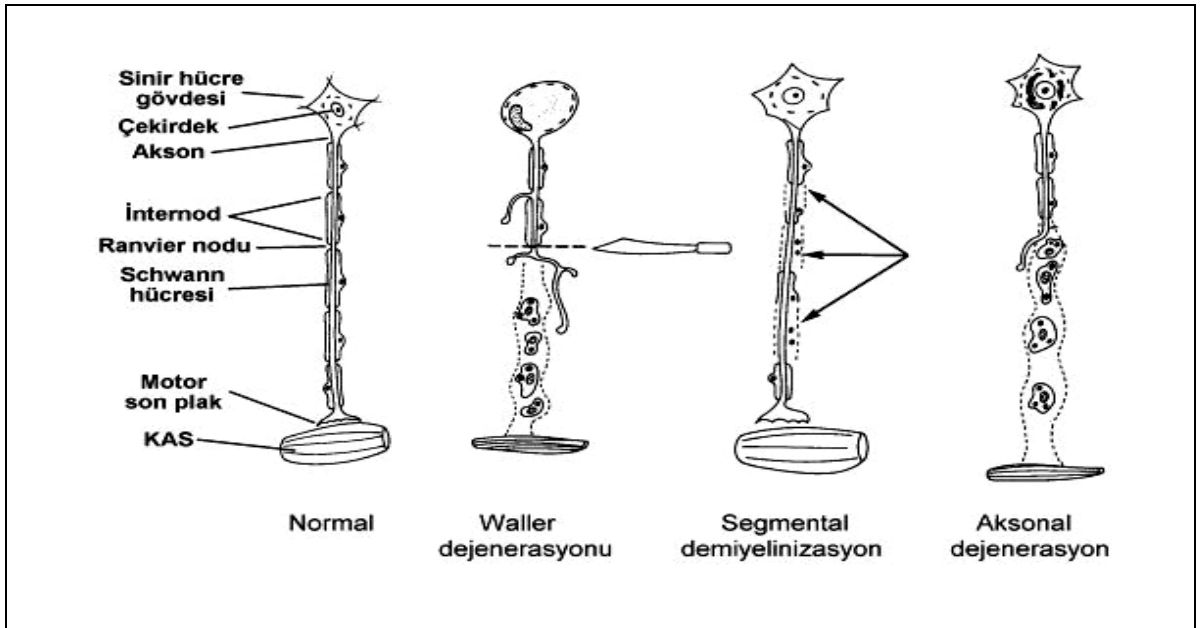
Şekil 4. Periferik sinirde iyon dengesi (44)



Şekil 5. Periferik sinir lifinde iletim. A-Miyelinsiz B-Miyelinli (44)

2.2.4.1. Wallerian dejenerasyonu

Periferik sinir aksonunun travma, infarktüs, uzamış veya şiddetli baskı gibi bir nedenle bütünlüğünün bozulmasına wallerian dejenerasyonu denir. Aksonun kesintiye uğradığı yerin distalinde akson ve çevresindeki miyelin kılıf dejenere olur ve makrofajlarca fagosite edilir. Dejenerasyonunun gelişimi dört ile onbir gün arasında değişir (44,45).



Şekil 6. Periferik sinir hücre hasarı tipleri (44)

2.2.4.2. Aksonal dejenerasyon

Periferik sinir hücre gövdesinin veya aksonunun metabolik veya toksik nedenlere bağlı olarak hasar görmesidir. Aksonun bütünlüğü bozulmadan neden ortadan kaldırılırsa akson haftalar aylar içinde fonksiyonuna kavuşabilir. Aksonun

bütünlüğü bozulduysa yavaş seyreden bir rejenerasyon süreci başlar. Aksonal dejenerasyonda sinir ileti incelemelerinde sinir uyarılabiliriyorsa ileti hızı normal veya normale yakın değerlerdedir. Aksonal dejenerasyonun olduğu motor sinirde Birleşik Kas Aksiyon Potansiyeli (CMAP) amplitüdü, sensoriyal sinirde ise Sensoriyal Sinir Aksiyon Potansiyeli (SNAP) amplitüdü azalmıştır. Şiddetli aksonal dejenerasyonda motor veya sensoriyal sinir uyarımıyla hedeften potansiyel kaydedilmez. İğne EMG incelemesinde, aksonal dejenerasyonu takiben on gün sonra denervasyonun neden olduğu spontan potansiyeller (fibrilasyon, pozitif keskin dalga, kompleks ardışık boşalım) kaydedilir.

Parsiyel dejenerasyonun olduğu durumlarda (bir kısım aksonun fonksiyonel kaldığı durumlarda kas içinde kollateral filizlenme yoluyla denerve kas liflerinin sağlam aksonlarca reinnervasyonu sonucu) bir iki ay sonrasında nörojenik motor ünite potansiyelleri (polifazik, geniş süreli, normal veya büyük amplitüdü) kaydedilir. Daha ilerleyen dönemde ise bu potansiyeller daha büyük amplitüd kazanırlar (44-45).

2.2.4.3. Segmental demiyelinizasyon

Periferik miyelinli sinir liflerinde akson sağlamken etrafındaki Schwann hücrelerinde ve/veya miyelin kılıfta hasar olmasına segmental demiyelinizasyon denir. Demiyelinizasyon, tüm sinir boyunca veya belirli bir sinir segmentinde olabilir. Miyelin yenilenebilir olması nedeniyle demiyelinizasyon geri dönüşü olan bir süreçtir. Demiyelinizasyonu takiben 15 gün ile 6 ay arasında remiyelinizasyon tamamlanır. Ancak remiyelinize olan segmentlerde miyelin, öncekine göre daha ince ve internodal aralıklar daha kısadır. Demiyelinize segmentte ileti hızı yavaşlamıştır.

Sensoriyal sinir ileti incelemesinde genellikle SNAP kaydedilemez. Motor ileti incelemesinde ise sıklıkla normal ya da normale yakın amplitüdde CMAP elde edilir. Demiyelinize segmentte sinir ileti hızı yavaşlamıştır. Demiyelinizasyon, sınırlı bir bölümdeyse distal uyarıldığında motor ya da duyusal yanıtlar normal düzeydedir. Bu bölgenin proksimali uyarıldığında demiyelinizasyonun ağırlığına göre yanıt azalmıştır veya hiç kaydedilemez. Buna "ileti bloğu" adı verilir (45).

2.3. Diyabetik nöropati

2.3.1. Tanımı

DN sinir sisteminin farklı bölgelerini tutan diyabetin süresi ile ilişkili değişik klinik bulgularla ortaya çıkan heterojen bir klinik tablodur. Fokal veya yaygın

olabilir. Kronik simetrik distal sensorimotor polinöropati (DSPN) ve otonom nöropati (ON) en sık görülen DN tipleridir (46-50). Diyabetiklerde DN'de erken tanı önemlidir çünkü bu hastalarda nondiyabetik nöropatilerde görülür. Ayrıca semptomatik DN için tedavi seçenekleri vardır. DN'si olan hastaların %50'si asemptomatik olmasına rağmen diyabetik ayak için yüksek risk grubundadır. ON vücutta bir çok sistemi tutabilir. Özellikle kardiovaskular otonomik nöropati (KON) yüksek oranda mortaliteye ve morbiditeye neden olur (46).

2.3.2. Epidemioloji

Diyabetin geç komplikasyonlarından en sık görüleni DN'dir (46). Epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan tanı yöntemleri farklı olduğu için DN prevalansının doğru olarak belirlenmesi zordur. United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) ve Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) sonuçlarına göre DN'nin yıllık insidansının %2 civarında olduğu bulunmuştur (48). Avrupa'da yapılan klinik çalışmalarda DSPN prevalansı %22.7-28.5, populasyon çalışmalarında ise %41.6-47.6 arasındadır (Tablo 5) (53-58). DN gelişiminde hiperglisemi, ilerlemiş yaş, alkol alımı, KAH ve sigara risk faktörlerindedir (47,51,52). Tip 1 ve tip 2 DM'ta DN patogenezi benzer olup glisemi kontrolünün iyi olmasının ilerlemeyi yavaşlattığı düşünülmüştür (46,48,50).

Tablo 5. DSPN prevalansı

Klinik çalışma	Sayı	DM'un tipi	Prevalansı(%)
Tesfaye ve ark.(53)	3250	1,2	28
Cabezas-Cerrato ve ark.(54)	2644	1,2	22.7
Young ve ark.(55)	6487	1,2	28.5
Populasyon çalışmaları	Sayı	DM tipi	Prevalansı(%)
Kumar ve ark.(56)	811	2	41.6
Partanen ve ark.(57)	133	2	41.9
Dycke ve ark.(58)	380	1,2	47.6

2.3.3. Sınıflandırılması ve evrenmesi

Diyabet periferik sinir sisteminde sensoriyal, otonom ve motor nöronları etkiler. Vücuttaki tüm organ sistemlerinin fonksiyonu için gerekli innervasyonu bozarak patolojilere neden olur. DN diyabetin etkilediği sinir liflerine bağlı olarak ortaya çıkan sendrom tiplerine göre sınıflandırılır (Tablo 6) (59).

2.3.4. Tanı kriterleri

2.3.4.1. Sensoriyal nöropatilerde klinik bulgular ve tanı kriterleri

2.3.4.1.1. Akut sensoriyal nöropati

Kötü metabolik kontrolü takiben veya glisemik kontrolde ani değişikliklere bağlı olarak ortaya çıkan nadir bir tablodur. Ani başlayan geceleri şiddetlenen duyuusal semptomlarla karakterizedir. Muayenede nörolojik bulgu çok azdır (60).

2.3.4.1.2. Distal sensorimotor polinöropati (DSPN)

DN'nin en sık görülen tipidir. Yeni tanı tip 2 diyabette ilk klinik bulgu olarak karşımıza çıkabilir. Öncelikle miyelinsiz ve ince miyelinli sinir liflerini etkiler ve genellikle düzelmez. Sensoriyal liflerde kayıp nedeniyle duyuusal bulgular ön plandadır. Ağrı ve ısı duyusu azalır. Kalın lif kaybı vibrasyon duyusu ve derin duyuda azalma ve sinir iletim hızında yavaşlamaya neden olur (46).

Tablo 6. Diyabetik nöropatinin sınıflandırılması ve ve evrenmesi (59)

Subklinik nöropati
A. Anormal elektrodagnostik test 1. Sinir ileti hızında azalma 2. Uyarılmış kas veya sinir aksiyon potansiyelinin amplitüdünde azalma
B. Anormal nörolojik muayene 1. Vibrasyon algılama eşiği testleri 2. Termal ısıtma ve soğutma testleri 3. Diğer
C. Anormal otonomik fonksiyon testleri 1. Anormal kardiyovaskular refleksler 2. Kardiyovaskular reflekslerde değişme 3. Anormal hipoglisemiye anormal biokimyasal cevaplar
Klinik nöropati
A. Difüz somatik nöropati 1. Distal simetrik sensorimotor polinöropati Primer ince-lif nöropatisi Primer kalın-lif nöropatisi Mikst
B. Fokal Nöropati 1. Mononöropati 2. Mononöropati multipleks 3. Amyotrofi
C. Otonom nöropati 1. Kardiyovaskular otonom nöropati 2. Anormal pupiller fonksiyon 3. Gastrointestinal otonom nöropati Gastroparezis Konstipasyon Diyabetik diyare Anorektal inkontinans 4. Genitouriner otonom nöropati Mesane disfonksiyonu Seksüel disfonksiyon

Ekstremitelerde distallerinde yanma, batma ya da sızlama şeklinde ağrılarla veya paresteziler ve hipoesteziden oluşan duyuusal belirtilerle başlar. Zaman içerisinde bulgulara otonom sinir sistemine ilişkin semptomlar, hafif derecede distal motor

güçsüzlük ve atrofi eklenir. Ayak parmaklarından sinsi şekilde başlayan yakınmalar üst ekstremitelere ve proksimallere doğru yayılır. Zamanla klinik tabloya ayak ülserleri ve nöropatik artropati (Charcot eklemleri) eklenir. Elektrofizyolojik incelemelerde genellikle aksonal hasarla seyreden sensorimotor polinöropatiyi yansıtan bulgular vardır. Ancak ön planda ince sinir lifleri tutulursa erken dönemde sinir ileti incelemeleri normal bulunabilir (63).

Erken tanı için diyabetik hastalar her yıl subjektif nöropati semptomları, nörolojik muayene, elektronörografik ölçümler (EMG) ve otonomik fonksiyon testleri ile değerlendirilmelidir (46,59,60-62). Subjektif nöropati semptomlarından kollarda ve bacaklarda kas güçsüzlüğü, dengesiz yürüme, uyuşma, keçelenme, iğnelenme, ağrı, yanma, ortostatik baş dönmesi ve diğer duyuşal (dokunma, ağrı, ısı) bozukluklar sorgulanır. Nörolojik sistem muayenesinde kranial sinirler, derin tendon refleksleri ve motor ve duyuşal fonksiyonlar değerlendirilir. Periferik nöropati varlığı hafif dokunma, basınç, pozisyon, ısı ve vibrasyon algılama eşiği ve iğne batırma testi ile araştırılır. Vibrasyon algılama testi (VPT) lateral maleol kemik üzerinden (128 Hz) vibrasyon aleti ile basınç duyusu muayenesi ise distal halluces bölgesinde 10-g monofilament ile yapılır. Diz ve derin tendon reflekslerine bakılır. Ayaklarda nabızlar, ülserler, kalluslar ve deformitelerin varlığı muayene edilir. DSPN tanısında bu testlerden herhangi ikisinin varlığı %87 sensitivite gösterir (63). Özellikle vibrasyon algılama kaybı ve basınç duyusunun azalması ayak ülserlerinin gelişebileceğine dair en iyi göstergedir (64).

DN tanısı için 2005 yılında ADA tarafından aşağıdaki kriterler önerilmiştir.

1. Distal duyuşal kayıp ile birlikte tipik semptomların varlığı ve reflekslerin yokluğu
2. Nöropatik semptomlar olmadan duyuşal kaybın varlığı (Duyuşal defekt)
3. Nöropatinin bilinen diğer bir nedeni olmaksızın DSPN'ye ithaf edilebilecek bozulmuş refleks. Periferik nöropatinin diğer bulguları hastanın hikayesi, fizik muayenesi ve laboratuvar bulguları ile ekarte edilmelidir (62).

DN'nin ilerlemesinin takibinde veya ilaçlara cevabı değerlendiren çalışmalarda farklı skorlama sistemleri kullanılmıştır. Bunlardan en kabul görenleri Nöropatik Semptom Skoru (Neuropathic Symptom Score: NSS) ve Nöropatik Sekel Skoru (Neuropathic Impairment Score: NIS) dur (Tablo 7 ve 8) (68).

Sinir ileti hızı ölçümü EMG yapılır. Benzer yaş grubundaki kontrol grubuna göre eğer iki veya daha çok sinirde bir veya daha çok anormallik varsa elektrofizyolojik olarak DN olarak kabul edilmesi önerilmiştir (62).

Tablo 7. Nöropatik Semptom Skoru (NSS) (68)

Öykü		
Uyuşukluk Yanma Karıncalanma	var: 2	yok: 0
Bitkinlik Kramp Ağrı	Var: 1	yok: 0
Dağılım		
Ayaklar		2
Baldırlar		1
Diğer		0
Zaman (artma)		
Gece alevlenme		2
Gündüz ve gece		1
Sadece gündüz		0
Uykudan uyandırma		1
Yürüme		2
Nöropati	3-4 Hafif 5-6 Orta 7-9 Şiddetli	

Tablo 8. Nöropatik Sekel Skoru (NIS) (68)

Ayak bileği refleksi	normal:0	zorlama ile var: 1	iki tarafta yok: 2
Vibrasyon algılama eşiği	Var: 0	azalmış veya yok: 1	
İğne batma duyumu	Var: 0	azalmış veya yok:1	
Nöropati	3-4 Hafif 5-6 Orta 7-9 Şiddetli		

2.3.4.2. Fokal ve multifokal nöropatiler

2.3.4.2.1. Mononöropatiler

Fokal nöropatide periferik sinirlerden sıklık sırasına göre median, ulnar, radial ve peroneal sinirler tutulur. Kraniyal nöropatilerde öncelikle III., IV., VI. ve VII. kraniyal sinirler tutulur. Genellikle ileri yaşta, glisemik kontrolü kötü olan hastalarda akut ortaya çıkar. Üçüncü sinir felci göz çevresi ve arkasında şiddetli ağrı ile başlar. Aylar içinde spontan ve tam düzelme gösterir. Pupilla genellikle üçüncü sinir felcine katılmaz çünkü sinirin orta kesimindeki iskemik lezyon sinirin periferindeki otonom lifleri etkilemez. Diyabetiklerde VII. sinir felci sık görülür

ancak genel toplumda da sıktır. EMG'de görülen sinir ileti hızında ve amplitüdünde azalma demyelinizasyon ve aksonal dejenerasyonu gösterir (60).

2.3.4.2.2. Tuzak nöropatileri

Periferik sinirin fibröz tünel içinde sıkışması veya mekanik distorsiyonu ile ortaya çıkar. DN varlığı tuzak nöropatilerinin oluşumunu kolaylaştırır. En sık görülen tuzak nöropatisi karpal tünel sendromudur. Tuzak nöropatisi olan asemptomatik diyabetiklerde EMG'de sinirlerin mutad tuzaklanma yerlerinde iletim yavaşlaması (subklinik tuzak nöropatisi) saptanır. Kronik bası sonucu ilgili sinirde fokal demyelinizasyon, şiddetli durumlarda ise wallerian dejenerasyonu görülür. Tanıda EMG ile sinir ileti çalışmaları yapılır. Tedavide tuzaklanan sinir dekomprese edilir (60).

2.3.4.2.3. Proksimal DN (Diyabetik amyotrofi)

DSPN'ye oranla daha az görülür. Akut veya subakut olup gürültülü ve sıklıkla asimetric başlar. Genellikle 50 yaş üstü erkeklerde kilo kaybı ile birlikte. Alt ekstremitelerde, kalça ve uyluk üzerinde şiddetli ağrı vardır. Bu bölge femoral sinir alanına uyduğu için diyabetik femoral nöropati de denir. Klinik tabloya günler içinde aynı ekstremitenin kök kaslarında belirgin olan kuvvetsizlik ve giderek atrofi eklenir. Nörolojik muayenede tutulan tarafta femoral sinir ya da üst lumbosakral pleksusu ilgilendiren alanda hipoestezi, kök ve uyluk kaslarında zaaf ve atrofi, patella refleksinin kaybı vardır. Zamanla belirtiler aynı ekstremitelerde diz altı ve siyatik sinirin motor ve duysal dallarının innerve ettiği alana da uzanabilir. Klinik tablo kompressif lumbosakral radikülopati ile karışabilir. Bilgisayarlı tomografi veya spinal manyetik rezonans incelemelerinde hafif diskopati bulguları olan hastalar bu disklere yönelik gereksiz cerrahi girişimlere maruz kalabilirler. Aylar içinde spontan düzelme görülmekle birlikte %20 hastada nüks bildirilmiştir (60).

2.3.4.3. Otonom nöropati

DPN'si olanların yaklaşık %50'sinde görülen ON bir çok organ ve sistemi tutabilir. Önemli oranda morbidite ve mortalite nedenidir. Parasempatik sinir sistemi (PSS), sempatik sinir sisteme (SSS) göre daha erken tutulur. Tanı anamnez ve klinik bulgularla koyulur ve testlerle doğrulanır (Tablo 9) (66). En önemli klinik bulgular istirahat taşikardisi, egzersiz intoleransı, konstipasyon, gastroparezis, erektil disfonksiyon, diyabetik diyare, mesane atonisi, ayaklarda terleme kaybı ve çeşitli kardiyovasküler bozukluklardır.

Tablo 9. Otonom nöropati semptomları ve testleri

Semptomlar	Testler
Kardiyak Egzersiz intoleransı, Erken yorulma ve egzersiz intoleransı Postural hipotansiyon Baş dönmesi Güçsüzlük ve senkop Yorgunluk	Kalp hızı değişkenliği Talyum sintigrafisi 1231 metaiodobenzilguanidin sintigrafisi Kalp hızı değişkenliği Otururken ve ayakta kan basıncı ölçümü Katekolamin ölçümü
Gastrointestinal Gastroparezis Abdominal ağrı ve rahatsızlık Erken doyma Bulantı Kusma Şişkinlik	Mide boşalma çalışması Baryum çalışması Endoskopi Manometri Elektrogastrogram
Konstipasyon	Endoskopi
Diyare	
Seksüel disfonksiyon Eretil disfonksiyon Vajinal kuruluk	Anamnez ve fizik muayene Kalp hızı değişkenliği Penil brakial basınç indeksi Nokturnal penil tumescence
Mesane disfonksiyonu Sık idrara çıkma İnkontinans	Sistometrogram Postvoiding sonografi
Sudomotor (terleme) disfonksiyonu Anhidrozis Sıcak intoleransı Kuru deri Hiperhidrozis	Kantitatif sudomotor akson refleksi Terleme testi, Deri kan akımı
Pupilmotor Görmede bozulma Işığa adaptasyonda bozulma Viseral duyuda bozulma	Pupilometri Kalp hızı değişkenliği

Hastaların bir kısmında ayağa kalkınca başdönmesi ya da senkop gibi postural hipotansiyon belirtileri vardır. Diyabetiklerde anormal kalp ritmi değişkenliği ve buna bağlı kardiyak aritmiler mortaliteyi artıran en önemli faktörlerdendir (67).

Diyabetiklerde KON ani ölüm ve sessiz miyokardiyal iskemiye neden olabilir. Yakın zamanda yayınlanan meta-analizde KON'si olan diyabetiklerde sessiz MI ile mortalite yakından ilişkili bulunmuştur (62,67).

PSS'nin tutulumunu belirleyen testler istirahat taşikardisi, valsalva manevrasına cevap olarak EKG'de RR intervalinin değerlendirilmesi, derin

solunumda kalp hızı ve ayağa kalkışta kalp hızıdır. Postüral hipotansiyon ise SSS'nin tutulumuna işaret etmektedir (62,66,67). KON'nin tanısı için anamnez ve muayeneye ilaveten kalp hızı değişikliği için testler yapılır. Ayrıca KAH tanısında istirahat ve stres talyum miyokardiyal sintigrafisi yeterli ve yararlı bir noninvazif testir (Tablo 10) (62).

Tablo 10. Kalp hızı değişkenliği testleri

İstirahatte kalp hızı	>100 anormal
Ayağa kalkışı takiben kalp hızı cevabı	Yatar pozisyondan ayağa kalkışta 15. ve 30. kalp atımları arasındaki RR intervali ölçülür. Normalde taşikardiyi refleks bradikardi takip eder. Bu oran 30:15 oranı >1.03 ise normaldir.
Derin solunumla kalp hızı değişkenliği	İstirahatte ve yatar pozisyonda dakikada altı derin solunum yapar. İnspiryum ve ekspiryum noktaları işaretlenir. R-R intervalinin ekspirasyon/inspirasyona oranı yaşa göre değişir.>15atım/dakika normaldir
Valsalva manevrasına kalp hızı cevabı	EKG monitörizasyonu esnasında 40mmHg basınçlı manometerin ağızına 15 saniye maksimum ekspiryum yapar. Ekspiryum bittikten sonra 30 saniye EKG çekimine devam edilir. En uzun RR/en kısa RR oranı >1.2 olması normaldir.
Ayağa kalkışı takiben kan basıncı (Ortostatik hipotansiyon)	Ayağa kalkışı takiben 2 dakika sonra kan basıncı ölçülür. Sistolik kan basıncında <10 mmHg düşüş normal, 10-29 mmHg sınırdadır, >30 mmHg ve semptom varlığı anormal

2.3.5. Patogenez

2.3.5.1. Oksidatif stres

Atomlardaki elektronlar yörüngede hareket ederler. Her bir yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Moleküler ya da atomik yörüngesinde reaktif çiftleşmemiş elektron bulunduran kimyasal ürüne ROR denir. ROR pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötraldir. ROR en fazla elektron transferi ile oluşur. Serbest radikal reaksiyonları bağışıklık sistemi hücrelerinin savunma mekanizması için gereklidir ancak fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümüne yol açar. Artmış ROR hücrelerin lipid, protein, DNA ve karbohidratlardan oluşan yapısını bozar. ROR zincir reaksiyonları genellikle moleküllerden hidrojenin uzaklaştırılmasıyla başlar. Süperoksit anyonu, hidroksil radikali, nitrik oksit (NO),

peroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli göstergeleridir (68).

ROR'nin oluşumunu ve yaptıkları hasarı önlemek için vücutta antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılardır. ROR'nin neden olduğu hasarı hücrenin içinde ve dışında savunarak etkisizleştirirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin ve ürik asit gibi çeşitli molekülleri içerir. Asıl antioksidan savunmayı hücre içi ROR toplayıcı enzimler sağlar. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementlerde bu enzimlerin fonksiyonlarını düzenler (69).

ROR'nin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızının denge içinde olmasına oksidatif denge denir. Bu denge bozulduğunda oksidatif stres ortaya çıkarak doku hasarına yol açar (68-70).

Serbest radikal zincir reaksiyonlarından lipit peroksidasyonunun artmış ROR ile birlikte KVH, nörolojik hastalıklar, astım, DM, romatolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma dahil birçok hastalığın patogenezinde rol aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca uzamış oksidatif stresin ve azalmış antioksidan kapasitenin diyabetin kronik komplikasyonlarının ortaya çıkışı ile de ilişkili olabileceği düşünülmektedir (70,71).

2.3.5.1.2. DM ve oksidatif stres

DM'ta nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, artmış sorbitol yol aktivitesi, uzamış hipoksi ve iskemi sonucunda oluşan doku hasarı ROR üretimini artırırken antioksidan savunma sistemini zayıflatır (71). Aynı zamanda diyabetiklerde plazma lipoproteinlerinde, eritrosit membran lipitlerinde ve çeşitli dokularda lipit peroksidasyonu artar. Lipit peroksidasyonu yaygın vasküler inflamasyon sonucu aktiveleşen lipooksijenaz yolu ile prostoglandinlerden ayrıca endotelial ve fagositik hücrelerin membranlarında bulunan lipitlerden ROR uyarısıyla nonenzimatik yolla oluşur (68-70).

DM'ta pankreasın beta hücrelerinde, endotel ve düz kas hücrelerinde oksidatif stresin arttığı antioksidan kapasitenin azaldığı gösterilmiştir (72-74). Glikasyona bağlı ROR'nin üretimi insulinin gen transkripsiyonunu azaltarak beta hücre apoptozisine yol açar. Ayrıca T ve B lenfositlerinin ve makrofajların beta hücrelerine toksik etkilerinin de ROR aracılığıyla yaptıkları bilinmektedir (73). DM'ta

kollajen, elastin ve miyelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin artmış oksidasyonu ile lensde katarakt, bazal membranda kalınlaşma, damarlarda mikroanjyopati gelişir (71).

Hiperglisemi aracılı ROR'nin üretimi başlıca üç mekanizma ile açıklanır (75).

1. Glukozun oto-oksidasyonu ve süperoksit üretimi

Hücre içi ROR'nin üretim kaynağı mitokondride solunum zinciridir. Solunum zinciri reaksiyonları sırasında fizyolojik olarak süperoksit radikalleri oluşur. Hücre içi glukoz oksidasyonu sırasında NADH solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon yolu ile ATP üretimi için gerekli enerjiyi sağlamak üzere kullanılır. Solunum zincirindeki bu reaksiyon sırasında süperoksit radikali açığa çıkar. Hiperglisemik ortamda glukoz reaktif ketoaldehitlere ve süperoksit anyonuna çevrilir. Reaksiyonlar zinciri, süperoksit radikalinin hidrojen peroksit üzerinden son derece reaktif olan hidroksil radikalini oluşturması ile sonuçlanır. Hiperglisemi bu yolla süperoksit radikal üretimini artırır. Diyabetiklerde patolojilerin bir çoğu artmış mitokondriyal ROR üretimi ile ilişkili bulunmuştur (76,77).

2. Proteinlerin glikasyonu ve ilerlemiş glikasyon son ürünlerinin (AGE) oluşumu

Hiperglisemik ortamda glukoz nonenzimatik yolla proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonunu başlatır. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek ROR'ni oluşturur (77). Glukoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen nonenzimatik glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, takiben daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir (75,76). Reseptör aracılı mekanizma ile AGE ROR üretimini artırırken aynı zamanda artmış ROR'de hücre içi AGE oluşumuna neden olur (75). AGE lipid peroksidasyonunu artırırlar, proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirirler, reseptörleri ile oksidatif stresi uyararak nükleer faktör kapa B (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive ederler. Ayrıca prokoagülant doku faktörü endotelin-1, adhezyon molekülü, VCAM-1 gibi genlerin ekspresyonlarını artırır. Endotelin-1 aracılığıyla vazokonstriksiyonu arttırarak endotel hasarına yol açarlar. Çalışmalarda AGE ve ROR'nin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ederek vasküler kan akımını ve damar geçirgenliğini artırdığı, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkilediği böylece vasküler komplikasyonların patogenezinde rol oynadığı düşünülmüştür (75,76).

3. Poliöl Yol

Hiperglisemi poliöl yolun aktivitesini artırarak glukozdan aldoz redüktaz enzim (ARE) aracılığıyla sorbitol üretimine neden olur. ARE aktivitesi için hücre içi NADPH tüketilir. Ayrıca okside glutatyonun redükte forma çevrilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi içinde NADPH gereklidir. Buna bağılı olarak DM'ta artmış poliöl yol aktivitesi NADPH'ın yokluğuna dolayısıyla hücrenin antioksidan kapasitesinin azalmasına yol açar (75). Vazodilatasyonda görev yapan NO sentezinin ve redükte glutatyonun azalması diyabetin vasküler komplikasyonlarının ortaya çıkışını kolaylaştırır (74). Özellikle DN'de nöronlarda vazodilatör mediatörlerin kaybı endonöronal kan akımını azaltarak endonöronal hipoksi veya iskemiye yol açar. Böylece nöronlarda ve schwann hücrelerinde hasar meydana gelir (78).

2.3.5.1.2. DN ve oksidatif stres

DN patogenezinde metabolik ve vasküler faktörler rol oynar. Metabolik faktörlerden hipergliseminin değerlendirildiği DCCT isimli klinik çalışma iyi bir glisemik kontrolün DN gelişme riskini 5 yılda %64 oranında azalttığını göstermiştir (48).

DN patogenezinde üzerinde en çok durulan metabolik hipotez poliöl yolun aktivitesinin artmasıdır (Tablo 11) (70).

Tablo 11. DN'de hiperglisemiye bağılı gelişen hasarın mekanizmaları

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1-Poliöl yolunun aktivitesinin artması2-İleri glikasyon son ürünlerinin (AGE) yapımının artması3-Protein kinaz-C aktivasyonunun artması4-Hekzamin yolağının aktivitesinin artması |
|--|

Hiperglisemiye bağılı olarak poliöl yol aşırı çalıştığında glukoz aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole dönüşür. Hücre içinde biriken sorbitol myoinositol ve taurini azaltarak Na-K-ATPaz aktivitesini yavaşlatır. Sinir ileti hızı düşer. Ancak DN tedavisinde aldoz redüktaz enzim inhibitörlerinin uygulanması başarılı bulunmamıştır (78). Diğer taraftan nörotrofik faktörlere ilişkin bozukluklarında DN'den sorumlu olabileceği düşünölmüştür. Deneysel hayvan modellerinde ve diyabetiklerde azalmış sinir büyüme faktörü (NGF) düzeyinin hedef dokulardan sinir hücre gövdesine retrograd aksonal transportu bozduğu gösterilmiştir (79).

Mikrovasküler komplikasyonlar yüksek morbiditeye sahiptir ve makrovasküler komplikasyonlarla birleştğinde yüksek oranda mortaliteye neden olur. En sık görülen mikrovasküler komplikasyon nöropatidir ve insidansı diyabet süresi ve kötü glisemik kontrol ile artar (1-4,70). Yirmi yıl diyabet süresi olanların %50'sinde DN olup bunların %10'nunda anormal duyum ve ağrı gözlenmiştir.

DN patogenezininde rol alan mikrovasküler anjiopatide histopatolojik olarak sinirleri besleyen damar duvarlarında kalınlaşma ve endonöral küçük damar lümenlerinde daralma görülür. Mikrovasküler anjiopati sinir liflerinde akson distrofisine bağlı sekonder segmental demiyelinizasyon yapar. Endonöral hipoksi ise sinir liflerinde aksonal transportu ve Na-K-ATPaz aktivitesini azaltarak aksonal atrofiye ve sinir ileti hızının yavaşlamasına neden olur (78,79).

Diyabetiklerde komplikasyonlu dokular kronik oksidatif strese maruz kalırlar. Artmış oksidatif streste ROR hücrel antioksidanlar tarafından ortadan kaldırılamazsa, ROR proteinlerin, lipitlerin, nükleik asitlerin, okside ve nitrozile ürünlerin biyolojik aktivitelerini azaltır. Böylece hücrelerin metabolizma enerjileri, hücre sinyalizasyonları, transportları ve diğer önemli fonksiyonları bozulur. Takiben protozom parçalanır ve hücre fonksiyonunu yitirir. Bu tür hasarın devamlı olması nekrotik veya apoptotik mekanizma aracılığı ile hücre ölümüne neden olur (1-4,47-49). Özellikle nöronlarda ve glial hücrelerde oksidatif stresin apoptozis gelişimiyle ilişkisi bulunmuştur (1-4).

DN'de nöron kaybına ilaveten rejenerasyonun ve dejenerasyonunun birlikte bozulması patogenezin dinamik bir süreç olduğunu gösterir (49). İlerleyen zaman içerisinde bu denge dejenerasyona tarafına kayar. Nöropatinin derecesine bağlı olarak özellikle ince liflerde belirgin olmak üzere rejenerasyon yeteneği bozulur (79). DM'ta hiperglisemi, hipoksi, oksidatif stres, bozulmuş insülin sekresyonu, büyüme faktörlerinin ve spesifik protein kinaz C izoformlarının azalması rejenerasyondan sorumlu schwann hücrelerinin fonksiyonunu etkilediği düşünülmüştür (79,80).

Fizyolojik olarak vücutta bir çok ROR bulunur ve hepsinin spesifik fonksiyonları vardır. Bunlar süperoksit (O₂-), hidrojen peroksit, nitrik oksit (NO) ve esansiyel aminoasitlerdir. Ancak üretimleri arttığında yaşlanmayı hızlandırarak hücrel dejenerasyona neden olurlar (71,75).

Sıkı kontrol altında olan hücrel O₂- düzeyi vasküler fonksiyonun düzenlenmesi, hücre bölünmesi, inflamasyon, apoptozis ve nötrofillerin

bakterisidal aktivitelerinde rol oynar (81). Fizyolojik olarak artmış O₂- düzeyi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafında suya dönüştürülerek ortadan kaldırılır. Ancak DM'ta hücrel metabolizma hiperglisemi ile uyarıldığında komplikasyona duyarlı dokularda oksijen üretimi artar. ATP sentetaz inhibe olur ve elektron transferi yavaşlar. Elektron transferi NAD⁺ rejenere etmediği için NADH oksidaz aktive olur ve süperoksit üretilir (2).

Hidrojen peroksit oksijenin SOD tarafından katalize edilmiş dismutasyonu ve diğer enzimatik olaylarla üretilir. Oksijenin tersine membrandan sitozole geçerek bakteriye karşı lökositin düzenlediği defansta rol alır. Aynı zamanda artmış hidroksil radikaller vazodilatasyon kaybına, endotelyal hasara ve hücre hipoksisine neden olurlar (68).

Nitrik oksit (NO) nitrik oksit sentetazın (NOS) aktivitesi ile üretilir. İki formu vardır. 1. Kalsiyuma bağı 2. İndüklenmiş formu. NO iyon kanallarını düzenleyen guanilat siklaz aktivasyonu ile vaskuler tonu düzenler. Sitokrom oksidazı direk inhibe ederek hücrel solunumu engeller. Diyabetik farelerin arterlerinde indüklenmiş NO formu artmıştır. NO varlığında hasar görmüş nöronlar yavaş iyileşirler. Tersine NOS inhibitörleri iyileşmeyi hızlandırır. NO nörotransmitter gibi hareket eder. İskemik durumda endotelyal NO vazodilatasyon yapar, kan akımı düzelir fakat nöral NO mitokondride enerji üretimi engel olup kalsiyum akışını bozar (81).

DM'ta süperoksit ve NO birleştiğinde reaktif peroksinitrit oluşarak ve protein ve lipitlere hasar verir. Mitokondri ve endoplazmik retikulum membranı lipit içerdiği için ROR ve peroksidasyon için asıl hedeflerdir. Son ürün olan lipit peroksitler toksiktir ve ortadan kaldırılabilmesi için GSH'ye ihtiyaç vardır. Benzer şekilde liproteinlerde peroksidasyon ve nitrozilasyon için hedeftir (75).

Oksidatif strese bağı bu son ürünler direk toksik değildir ancak inaktif proteinlerin birikimi ile birlikte hücre döngüsünü bozar ve deoksiribonükleik asit (DNA) hasar görür. Apoptozis mekanizması aktive olur. Nöronlarda aksonal transportu ve sinyalizasyonu sağlayan lipitler ve proteinlerde hasar gördüğü için periferik sinirde aksonal transport yavaşlar. Büyüme faktörlerinin ulaşması gecikir. Hücrelerde sinaps ilişiği bozular ve apoptozis başlar. (82). Ayrıca oksidatif streste gen ekspresyonu, büyüme faktörü, strese cevap elementleri ve apoptozis yolağı aktive olur. Buna cevap olarak sitokinler, sitokrom C oksidaz, oksidatif fosforilasyonda rol alan enzimleri ve antioksidanlar devreye girer (1-4). Fazla

miktarda ROR üretimi antioksidanların tüketimine neden olur. Antioksidanlar ROR'nin başına veya sonuna hidrojen atomu ekleyerek etkisini önlerler. Antioksidanın tipi bağladığı metal iyonuna bağlıdır. Hücre antioksidan potansiyelini diyetle veya de novo sentezi ile devam ettirir (75). GSH suda eriyebilen bir antioksidan olup gama-glutamilsistein-sentetaz tarafından sentezlenir. Lipit peroksidasyonunu kontrol altında tutar. Aminoasit transportunda ve deoksiribonükleotid sentezinde rol alır. Oksidatif strese uğrayan hücrelerde hızla tüketilir. Glutasyon-s-transferazın enzimi (GSSE) yardımıyla hücrede GSH toksik bileşimlere bağlanır. Bu bileşimlerin hücreden eliminasyonunu sağlar. Mitokondride GSH iskemiye bağlı olarak ortaya çıkan nöral apoptozis ve eksitotoksiteyi önler. Nöroblastoma hücrelerindeki glutasyon-s-transferazın artmış ekspresyonunun oksidatif strese direnci artırdığı gösterilmiştir (1-4,83).

Antioksidant enzimlerden SOD'un üç formu var. Sitozolik Cu-Zn-SOD (SOD1), mitokondrial SOD (SOD2) ekstraselüler SOD (SOD3). 2'nin H₂O₂ dönüşümünü katalize eder. Azalmış SOD2 ekspresyonu SOD O mitokondriyal GSH 'nin azalmasına ve oksidatif stresin artmasına neden olur. Katalaz H₂O₂ ve suya dönüşümünü katalize eder. Myeloperoksidaz H₂O₂'nin hücresel antibakteriyel etkisi olan singlet oksijene dönüşümünü katalize eder (75).

2.4. Mitokondri

Mitokondriyumlar, çok sayıda enzim içeren oksitlenme sürecinde gerekli enerjinin dönüşümü ve korunmasında rol alan hücre organelleridir. Sayıları, boyutları ve durumları, çeşitli fizyolojik ve patolojik uyarılarla ilişkili olarak hücreden hücreye veya aynı tip hücre içinde farklılık gösterir. Mitokondriyum zarı iç ve dış olmak üzere iki bölümdür. İç zarda protein yapısındaki matriksi içeren kılıfa mitokondriyal krista denir. Kristaların sayısı ve yapısı farklı hücre tiplerine ve mitokondriyumun metabolik dengesinin farklı devrelerinde göre değişir. Kristada bulunan enzim zincirleri matriksde glikoz ve diğer yanıcı moleküllerin metabolizmasından sorumlu solunum enzimlerini içerir. Dış zar ise, hidrojenin protonlar ve sonra elektronlara oksijene transferlerini gerçekleştiren enzim zincirini içerir (84). Mitokondri solunum ve serbest yağ asiti metabolizmasında santral rol oynar. Ayrıca DNA replikasyonu, transkripsiyonu ve translasyonunu yapar. Mitokondrinin iç membranında 35 taşıyıcı protein vardır. Bunların aminoasitlerinin %30'u benzerdir (10,11).

2.4.1. Mitokondrial taşıyıcı ailesi ve uncoupling proteinler (UCPs)

2.4.1.1. Tanımı

Mitokondride inorganik fosfat (P) ve ADP'ın yüksek enerjili P bağı içeren ATP üretmek için oksijen tüketmesine oksidatif fosforilasyon denir. Fosforilasyon işleminde oksidasyonun tamamen eşleştirilmesi (coupling) asla başarılmaz çünkü protonlar mitokondriyal iç membran boyunca sızarlar. Bu sızıntı sonucunda protonun motive gücü ATP sentezi için kullanılmaz böylece oksijen elektron transport zincirinde tüketilir ve enerji ısı olarak dağılır. Bu proton sızıntısı tüm mitokondrilerde olur. Fazla proton geçişi olanlarda solunum yani oksijen tüketimi fazla olur. Proton sızıntı hızı oksijen tüketimi olarak ölçülür (10-12).

UCPs ilk defa 1978 yılında memelilerin termojenik kahverengi yağ dokusunun mitokondrisinde yaygın şekilde bulunmuştur (85). UCPs mitokondriyal iç membranda protonu mitokondri dışına çıkarırlar. Taşıma sırasında oksijen elektron transport zincirinde tüketilir ve enerji ısı olarak dağılır. Oksidatif fosforilasyonda tüketilen oksijen karşılığında ATP üretimi eşleşmez yani birebir olmaz (complete coupling). UCPs oksidasyon ile ATP üretimi denilen eşleşme (coupling) oluşumuna engel olduğu için eşleşmemiş (uncoupling) proteinler adını almıştır. UCPs'ler uyarılmış proton sızıntısını katalize eder yani bazal proton sızıntısına ek olarak ortaya çıkar (10).

2.4.1.2. UCPs'lerin düzenlenmesi

2.4.1.3. Endojen UCPs'in rolü

Mitokondri ROR üretiminin esas bölgesidir. Üretim solunum zincirindeki komponentlerin (hidrojen peroksit ve hidroksil radikal) redüksiyon derecesine bağlıdır. Kompleks IV (Sitokrom C oksidaz) oksijenin redüksiyonunu kontrol eder. Solunum zincirinde redükte NADH'den elektron oksijene akarken mitokondride enerji açığa çıkar. (87).

Ortamda artmış ROR varlığında UCPs proton sızıntısını katalize ederler. Bu durum süperoksit anyon tarafından dramatik olarak artırılır, guanesin difosfat tarafından da önlenir (86). Süperoksit tarafında uyarılmış UCPs aracılığıyla mitokondri dışına artmış proton iletiminin antioksidan defans olduğu kabul edilmiştir (87).

Ayrıca tüm hücreler antioksidan koruyucu enzimlere sahiptir. Süperoksit dismutaz ve katalaz oksidatif hasarı sınırlayıcı enzimlerdir. Süperoksitlerden oksijen ve su oluşumuna neden olurlar. Böylece süperoksit oluşumu azalır. Bazal proton sızıntısının mitokondriyal membran potansiyeli ile doğrusal olmayan

ilişkinine bağlı olarak proton sızıntısının koruyucu etkisi proton motive edici güç düzeylerindeki artışa bağlıdır. Bu da süperoksitler tarafından güçlendirilir (10,11).

2.4.1.4. Tipleri

UCP1

UCP1 kahverengi yağ dokusunda bulunur. Hızlı oksijen tüketiminde, ısı üretiminde ve enerji harcanmasında rol oynar. Bu fonksiyonu sempatik sistem özellikle norepinefrin tarafından düzenlenir (10,88).

UCP2 ve UCP3

UCP2 ve UCP3'de bulunan aminoasitlerin %59'su benzerdir ve herikisi de 11. kromozomda yer alır. UCP2 dalak, timus, pankreas beta hücresi, kalp, akciğer, beyaz ve kahverengi yağ dokusu, mide, testis, ve makrofajda fazla miktarda bulunurken; beyin, nöronlar, arka kök gangliyonları, böbrek, karaciğer ve kaslarda az miktardadır. UCP2 makrofajlarda ve dokuların parankiminde eksprese edilir. UCP3 mRNA ve proteini kas ve kalp hücresinde bulunurken UCP3 mRNA kahverengi yağ dokuda bulunur (10,11). Bir hücrede m RNA varlığı o dokudaki UCPs miktarını öngörmeye yeterli değildir. ROR deriveleri veya süperoksitler tarafından UCP2 ve UCP3 direk veya indirek uyarıldığında aktivite olur ve mitokondrinin iç membranından dışarıya proton iletimini artırır. UCP aktivasyonunu serbest yağ asitleri artırırken purinler inhibe eder (89).

2.4.1.5. Fizyolojik Fonksiyonları

2.4.1.5.1. Termogenezis

UCPs termogeneziste rol oynar. Özellikle artmış UCP1 varlığı obeziteyi önler. Diğer taraftan UCP2 ve UCP3 gen ekspresyonu açlıkta artar. UCP2 ve UCP3 gen delesyonu olan fareler nonobez bulunmuştur. Aslında termogenik etkide obez olmalarını beklenir. Artmış UCP2 ekspresyonu olan transgenik farelerde zayıftır. Bazı özel nonfizyolojik durumlarda UCP2 ve UCP3'ün termojenik fonksiyon gösterebileceği düşünülmektedir (10,90).

2.4.1.5.2. Oksidatif hasardan koruma

Mitokondriyal membran potansiyeli ROR'ne çok duyarlıdır. Solunum zincirinde elektron akımı arttığında elektronlar oksijen ile reaksiyona girip ROR üretirler. Artmış oksidatif strese UCP2 ve UCP3 hızlı elektron akımına izin vererek membran potansiyelini azaltırlar. Böylece ROR üretiminde azalma ile sonuçlanır. Süperoksit deriveleri tarafından katalize olan UCP2 ve UCP3 proton iletimini artırır. UCP2 ve UCP3 artışı ROR üretiminin kontrolünde negatif feedback

döngü oluşturur (15). Superoksit ile aktive olmuş UCP2 pankreatik beta hücre disfonksiyonuna neden olur (91). UCPs'in dokuyu oksidatif hasardan ve ROR üretiminden koruduğu düşünülmektedir (92).

2.4.1.5.3. İnsülin sekresyonunun düzenlenmesi

Pankreas beta hücresi plazma membranı çok sayıda ATP duyarlı potasyum kanalı (K-ATP) içerir. Bu kanallar sitozoldeki ATP ve ADP konsantrasyonuna duyarlıdır. Yemeği takiben hücrede metabolize olan glukoz ATP/ADP oranına duyarlılığı artırır. Plazma membranı depolarize olur kalsiyum içeri girer insülin dışarı salınır. Beta hücresinin mitokondrisinde bulunan UCP2 nin insülin sekresyonunda potansiyel düzenleyici olabileceği düşünülmektedir (93). Artmış UCP2 aktivitesi glukozla stimüle edilmiş insülin sekresyonunu azaltır (94-96).

2.4.1.5.4. Metabolik sendrom

Kafkas kökenli Avrupalılarda UCP2 -866 gen polimorfizmi olanlar genellikle nonobezdir. Diğer çalışmalarda obezite ile UCP2 ve UCP3 arasında ilişki görülmezken kadınlarda UCP3 ile VKİ arasında ilişki saptanmıştır(97,98).

2.4.1. 5.5. Serbest yağ asitlerinin mitokondrinin dışına çıkarılması

Açlıkta ve yağ asitlerinden zengin diyetle UCP2 ve UCP3 artar. Yüksek yağlı ketojenik diyet beyinde ROR üretimini azaltır. Buna karşın UCP2 ve protein sentezini artırır. Ketojenik diyetin nöroprotektif olduğu düşünülmüştür (99).

2.4.1.5.6. Sinir sistemini koruma

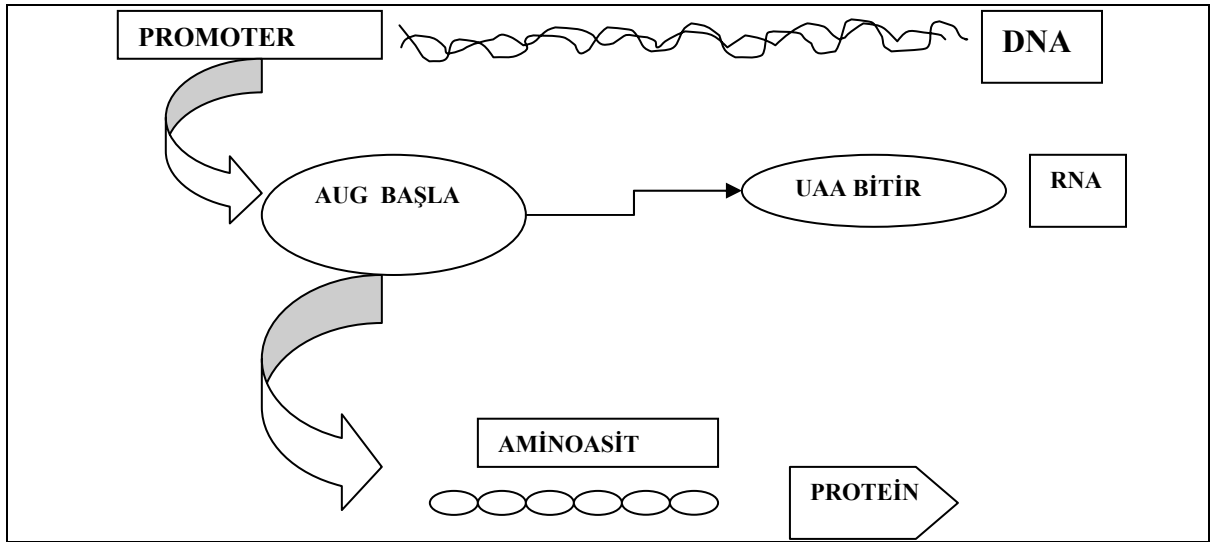
UCPs beyinde mitokondrinin iç membranında bazı nöropeptidlerle beraber eksprese edilir. Aralıklı olarak iskemik periodlara maruz kalan nöronlarda subletal iskemik durum meydana gelir ancak nöral hücreler yaşamaya devam eder. Bu yeni durumun devamı protein sentezine bağlıdır. İskemik durumu takiben hipokampusta UCP2 artışı olmuştur (100). Nöronlarda oksidatif stres ve iskemiye cevap olarak UCP2'nin fonksiyonu kısmen artmıştır (101). UCP2'nin parkinson ve inmenin önlenmesinde serebral iskemi ve travmatik hasarı takiben siniri korumada etkisi olduğu bulunmuştur (102).

Oksidatif stres ile uyarılmış UCP2 aktivasyonunun DPN gelişim hızını yavaşlatacağı ya da iskemik sinirde enerji eksikliğini artırarak hızlandıracağı öne sürülmüştür (6,25). Sinir hücresinin aksonuna uyarı geldiğinde hücre içi ve dışında ki sıvı arasında membran potansiyel farkı oluşur. Akson zarı sodyum Na/K-ATP-az pompası aracılığı ile dengelenir. Açığa çıkan aksiyon potansiyeli sinir lifi boyunca yayılım gösterir. Artmış UCP2 aktivasyonu mitokondride enerji (ATP) üretimini

azaltarak DPN gelişmesini hızlandırabileceği düşünülmüştür (6). Nöron kültürlerinde UCP2 ve UCP3'ün artmış ekspresyonunun glukozla uyarılmış ROR oluşumunu ve mitokondriyal hiperpolarizasyonu önleyerek programlı hücre ölümünü bloke ettiği gözlenmiştir (4).

2.5. Polimorfizm ve Hardy Weinberg Yasası

Canlılarda fenotipik farklılıkların başlıca nedelerinden biriside genetik polimorfizmdir. Polimorfizm, her hangi bir lokusta birden fazla allel bulunması ve söz konusu allellerin %1'den fazla görülme sıklığına sahip olmasına denir. Ortalama polimorfizm yüzdesi insanlarda %10-15 olarak düşünülmektedir. Kalıtsal bilgiyi taşıyan deoksiribonükleik asit (DNA) üzerinde bulunan gen bölgelerinin transkripsiyonu (kopyalama) ile mRNA meydana gelir. DNA kalıbı üzerindeki transkripsiyon promoter adı verilen bölgeden başlar. Bu bölge 40 baz çiftlik bir DNA parçasıdır (Şekil 7) (106).



Şekil 7. DNA üzerinde bulunan gen bölgelerinin transkripsiyonun başladığı promoter bölgesi

Genlerin ifadenmesi, RNA polimerazın ve transkripsiyon faktörlerinin bağlandığı promoter ve enhancer gibi etkinleştirici, ya da sessizleştirici özgün hedef bölgelerden denetlenir (Şekil 7). Bu özgün hedef bölgelerin dizilimini değiştiren mutasyonlar, proteinin yapı ve işlevini değiştirmezler ancak, belirli dokularda, belirli zamanda oluşacak ürün miktarını azaltabilir ya da tümüyle ortadan kaldıracırlar. Ayrıca diğer tanıma ya da sinyal moleküllerine verilen yanıtın değişmesine neden olabilirler (106).

UCP2 artış mekanizmalarından birisi de genin artmış ekspresyonu ile karakterize polimorfizmdir (17). İnsanlarda –866G/A polimorfizmi en sık görülenidir (6,16-25). İnsan yağ hücrelerinde polimorfizme bağlı A allelin artmış transkripsiyonal aktivitesi UCP2 m-RNA düzeylerindeki artışla birlikte dir. Orta yaş insanlarda UCP2 –866G/A gen polimorfizmi olanlarda obezite daha az görülmüştür (18).

Tip 1 DM'ta A allel azalmış nöropati prevalansı ile birlikte bulunmuştur(25). UCP2 -866G/A polimorfizmi olan diyabetik nöropatili farelerin periferik sinirinin arka kök ganglionlarında UCP2 m-RNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Artmış A alleli aktivitesinin sinir ileti hızı ve vazomotor aktivitede azalma ile birlikteliği belirlenmiştir. Artmış UCP2'nin enerji tüketimine neden olduğu öne sürülmüştür (6).

Hardy-Weinberg yasası gen frekanslarının hesaplanması için geliştirilen bir formüldür. Değişmeyen populasyonlar için geçerlidir. Böyle populasyonlarda bir karakterden sorumlu allellerin toplamı populasyon içindeki o genin tamamına yani %100'üne eşittir. 100'ün 100'e bölümü bir olacağından, bir karakterden sorumlu allellerin toplamı bire eşittir. p dominant karakteri, q resesif karakteri temsil eder. $(p+q)=1$ populasyonu oluşturan bireylerin frekansı p ve q allellerini taşıyan sperm ile yine aynı allelleri taşıyan yumurtanın birleşmesi sonucu bulunur. Yani $AA+(Aa+Aa)+aa=1$ olduğu gibi $p^2+2pq+q^2=1$ olur. (106).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın tanımı

Bu kesitsel klinik çalışmamızda amacımız DPN tanısı alan tip 2 diabetes mellituslu hastalarda UCP2 geni promoter bölgesinde 866G/A polimorfizm oranının belirlenerek sinir ileti hızları ve klinik özelliklerle ilişkisini araştırmaktır. Gaziantep Üniversitesinin Medikal etik komitesinin onayladığı bu çalışma hakkında tüm hastalar bilgilendirilerek olurları alındı.

3.2. Hastaların seçimi ve çalışmaya alınma kriterleri

Çalışmaya Ocak 2006 ve Nisan 2007 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Şahinbey Hastanesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniğine başvuran 38-58 yaşları arasında ve diyabet süresi 0-15 yıl olan tip 2 DM'lu hastalardan 370 kişi seçildi. Tip 2 DM tanısı ADA kriterlerine göre koyuldu (27).

Çalışma dışı bırakılma nedeni olarak aşağıdaki kriterler kabul edildi.

1. Nöropatinin diğer formları (kronik inflamatuvar demyelinizan polinöropati, alkol tüketimi, B12 eksikliği, hipotiroidizm)
2. Periferik sinir fonksiyonunu etkileyecek ilaç kullanımı
3. Periferik arter hastalığı varlığı (ayak nabızlarının palpe edilememesi veya kladikasyo intermittent bulgularının varlığı)
4. Nörolojik hastalık öyküsü olanlar
5. Serum kreatinin, aspartat transaminaz (AST), ve alanin transaminaz (ALT) yüksekliği olanlar
6. Testlerin değerlendirilmesi sırasında hipoglisemi veya hiperglisemisi olanlar (kan glukozu ≥ 400 mg/dl)

Diyabetik hastalarda UCP2 geni polimorfizm oranını karşılaştırmak için benzer yaş, cinsiyet dağılımı ve vücut kütle indeksi (VKİ) olan 110 sağlıklı kişi kontrol grubu (55 erkek, 55 kadın) olarak seçildi. Tüm hastaların fizik muayeneleri aynı doktor tarafından yapıldı. Hastaların boyları, ağırlıkları, diyabetin başlama yaşı ve süresi, tedavi biçimi, diyabetik mikrovasküler komplikasyonların varlığı,

hipertansiyon öyküsü ve kullandığı ilaçlar değerlendirildi. VKİ (ağırlık kg/ boy m²) hesaplandı. EMG ölçümleri sadece diyabetik hastalarda yapıldı.

3.3. Diyabetik mikrovasküler komplikasyonların değerlendirilmesi

3.3.1. Nefropati ve retinopati

Mikrovasküler komplikasyonlardan diyabetik nefropati ve retinopati varlığı araştırıldı ve evresi belirlendi (40,41).

3.3.2. DN

Diyabetik hastalarda subjektif nöropati semptomları, nörolojik muayene ve EMG ölçümleri değerlendirildi.

3.3.2.1. Fizik muayene

3.3.2.1.1. Subjektif semptomlar ve skorlanması

Subjektif semptomlar olarak kollarda ve bacaklarda kas güçsüzlüğü, dengesiz yürüme, uyuşma, keçelenme, iğnelenme, ağrı, yanma, ortostatik baş dönmesi ve diğer duyuşsal (dokunma, ağrı, ısı) bozukluklar sorgulandı. DN'nin semptomlarının şiddeti NSS ve NIS ile belirlendi (Tablo 7 ve 8) (68).

3.3.2.1.2. Nörolojik muayene

Nöropatinin diğer nedenleri ekarte edildikten sonra çalışmaya alınan hastaların nörolojik sistem muayenelerinde kranial sinirler, derin tendon refleksleri (DTR) ve motor ve duyuşsal fonksiyonlar değerlendirildi. Periferik nöropati varlığı hafif dokunma, basınç, pozisyon, ısı ve vibrasyon algılama eşiği ve iğne batırma testi ile araştırıldı. Vibrasyon algılama testi (VPT) lateral maleol kemik üzerinden 128 Hz vibrasyon aleti ile yapıldı. Basınç duyusu muayenesi distal halluces bölgesinde 10-g monofilament ile değerlendirildi. Diz ve aşılda derin tendon reflekslerine bakıldı. Ayaklarda nabızlar, ülserler, kalluslar ve deformitelerin varlığı muayene edildi.

3.3.2.2. Sinir ileti hızı ölçümü/EMG

Sinir ileti hızları EMG cihazı ile (Keypoint Medtronic Machine) ölçüldü. Hastaların klinik verileri hakkında bilgi verilmedi. Sinir ileti çalışmaları standart kayıt teknikleri ile yapıldı. Testte standart ısı, test edilecek bölge, stimülasyon protokolü, latens ve amplitüd göstergeleri kullanıldı. Kol ve bacakta standart sinir ileti ölçümleri yapıldı (63). Standart tekniklerle yapılan motor sinir ileti çalışmalarında median, ulnar, peroneal ve tibial sinirler, sensoriyal sinir ileti çalışmalarında ise sural, median, ve ulnar sinirler değerlendirildi. Bilateral motor sinir ileti hızı (MCV) ve birleşik motor kas aksiyon potansiyeli (CMAP)

değerlendirildi. Bilateral duyusal sinirlerde duyusal sinir ileti hızı (SCV) ve sensoriyal kas aksiyon potansiyeli (SNAP) ölçüldü. İstatistiksel değerlendirmede sağ taraf ölçümleri kullanıldı (56). CMAP median, tibial ve peroneal sinirde motor sinir amplitüdlerinin toplamı ile belirlendi. Median ulnar sensoriyal sinir amplitüdüleri toplanarak SNAP ölçüldü (63). MCV veya SCV yavaşlaması normal sınırdan (ortalama - 2S.D.) az, veya CMAP ve/veya SNAP amplitüdünün normal sınırdan (ortalama - 2S.D.) az olması anormal değer olarak kabul edildi. Benzer yaş grubundaki kontrol grubuna göre eğer iki veya daha çok sinirde bir veya daha çok anormallik varsa elektrofizyolojik olarak DN olarak kabul edildi (62). Normal referans değerleri olarak nöropatisi olmayan sağlıklı kişilerden oluşan benzer yaş ve cinsiyetteki kontrol grubu alındı.

3.3.2.3. DN tanısı

DN tanısı 2005 yılında ADA tarafından aşağıdaki kriterlerden birinin varlığına dayanılarak yapıldı (62).

1. Distal sensoriyal kayıp ile birlikte tipik semptomların varlığı ve reflekslerin yokluğu
2. Nöropatik semptomlar olmadan sensoriyal kaybın varlığı (Sensoriyal defekt)
3. Nöropatinin bilinen diğer bir nedeni olmaksızın DSPN'ye ithaf edilebilecek bozulmuş refleks. Periferal nöropatinin diğer bulguları hastanın hikayesi, fizik muayenesi ve laboratuvar bulguları ile ekarte edildi.

3.4. Kan örneklerinin alınması ve saklanması

3.4.1. Biyokimyasal analiz

Bütün kan örnekleri bir gecelik açlığı takiben sabah saat 08:00-10:00 arasında antekübital venden alındı. Kanın pıhtılaşmaması için 30 dakika bekletildi. Tüpler 3000 rpm'de 10 dakika 10-18 derecede santrifüj edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplerine konularak -80 C'de saklandı.

3.4.2. UCP2 genotipi analizi

Araştırmanın moleküler analizleri Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında çalışıldı. Kontrol gurubu olarak sağlıklı yaşları 28-67 arasında değişen 110 birey araştırma kapsamına alındı. Bu araştırmanın yapılabilmesi için Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul onayı alındı. Hasta ve kontrol gruplarından elde edilen periferal kan örneklerinden tuzla çöktürme yöntemi ile DNA izolasyonu yapıldı (103). Hasta grubundan 171, kontrol grubundan ise 110 DNA örneği UCP2 geni promoter bölgesi -866G/A polimorfizmi

için PCR-RFLP (polimeraz zincir reaksiyonu restriksiyon enzimi parça uzunluk polimorfizmi) yöntemi ile analiz edildi. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), DNA üzerinde incelenmek istenen bölgenin, o bölgeye özgül oligonükleotid primerler kullanılarak çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem; denatürasyon ile DNA çift zincirinin birbirinden ayrılması, primerlerin ayrılmış olan DNA zincirlerine bağlanması ve DNA polimeraz enzimi tarafından hedef bölgenin sentezlenmesi olarak üç aşamadan oluşur. Bu aşamaların 35-40 döngü halinde tekrarlanması sonucunda, incelenmek istenen DNA bölgesi çoğaltılmış olur (104). UCP2 geni promoter bölgesi diziye özgül oligonükleotidler (UCP2F 5'-CAC GCT GCT TCT GCC AGG AC-3' , UCP2R 5'-AGG CGT CAG GAG ATG GAC CG-3') kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı (105). PCR ürünleri MluI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak RFLP yöntemi ile analiz edildi. Restriksiyon endonükleaz enzimleri, bakterilerin kendi genomunu korumak için sentezlediği enzimlerdir. Bakterilerden elde edilen bu restriksiyon endonükleaz enzimlerini kullanarak DNA baz dizisinde meydana gelen baz değişimlerini saptamak mümkündür. Bu tür değişimler bir restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi oluşmasına veya ortadan kalkmasına neden olabilir (106). Çalışmamızda kullanılan bu yöntemde 365 baz çifti uzunluğunda PCR ürünleri Mlu I restriksiyon endonükleaz enzimi ile 37 °C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı ve ürünlere %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemi uygulandı. Mlu I enzimi; -866. nükleotid A olduğunda PCR ürününü kesmekte, 296 ve 67 baz çifti uzunluğunda ürünler oluşturmaktadır ve A alleli yabancı tip olarak kabul edilmektedir. -866.nükleotid G olduğunda MluI enzimi için var olan kesim bölgesi ortadan kalkmakta ve G alleli varyasyon olarak kabul edilmektedir (105). Genotiplerin Hardy-Weinberg dengesi De-finetti programı ile analiz edildi (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>)

3.5. Verilerin değerlendirilmesi

Diyabetik hastalarda ve kontrol grubunda UCP2 geni promoter bölgesinde – 866G/A polimorfizminin sıklığı belirlendi. ADA kriterlerine göre DN'si olan hastalar UCP-2 genotipine göre üç gruba (A/A, G/G, G/A) ayrıldı (28,62). UCP2 polimorfizmine bağlı A allelin artmış transkripsiyonel aktivitesi UCP2-mesenger RNA (m-RNA) düzeylerindeki artışla birlikte bulunmuştur (18,20,22). Bu nedenle istatistiksel analiz için heterozigot genotiplerle (G/A) daha önce önerildiği biçimde homozigot genotipler (A/A) birleştirildi (31). Hastalar genotipe göre iki gruba Grup

1 (G/G) ve Grup 2 (G/A+A/A) ayrıldı. Gruplar yaş, cinsiyet, VKİ, HbA1c, diyabetin başlama yaşı ve süresi, diyabetik komplikasyonlar, hiperlipidemi ve hipertansiyon açısından karşılaştırıldı. Ayrıca sinir ileti hızları ile UCP2 genotipinin, klinik özelliklerin ve nörolojik değerlendirmenin (subjektif nöropatik semptomlar, nörolojik muayene bulguları, elektronörografik ölçümler) ilişkisi araştırıldı.

3.6. İstatistiksel analizler

Verilerin kaydı ve istatistiksel analizlerde SPSS software (version 10.1, SPSS, Chicago, IL) programı kullanıldı. Sonuçlarda sürekli sayısal değişkenler için ortalama±standart deviasyon (SD) ve aralık değerleri verildi. Karakter değişkenler için değişkenlerin yüzdeleri belirtildi. %95 güvenirlilik intervali kullanıldı. UCP2 genotip frekans dağılımı Hardy–Weinberg deviasyonu ile kıkare (χ^2) testi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizde parametrik test için uygun olmayan şartlarda nonparametrik testler uygulandı. İki bağımsız grup arasındaki karşılaştırmalar sayısal değişkenlerde student-t test veya Mann–Whitney *U*-testi ile yapıldı. Karakter değişkenler için Kikare testi veya Fisher Kesin kıkare test ile değerlendirildi. Sinir ileti hızları ile UCP2 genotipi ve klinik faktörler arasındaki ilişki multiple regresyon analizi ve ANOVA ile belirlendi. Sinir fonksiyon testleri bağımlı değişken olarak kabul edildi. UCP2 genotipi, yaş, cins, HbA1C, diyabet süresi, diyabet başlama yaşı bağımsız değişken olarak alındı. Değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve düzeyi Pearson korelasyon katsayısı hesaplanarak belirlendi. Değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi olarak $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

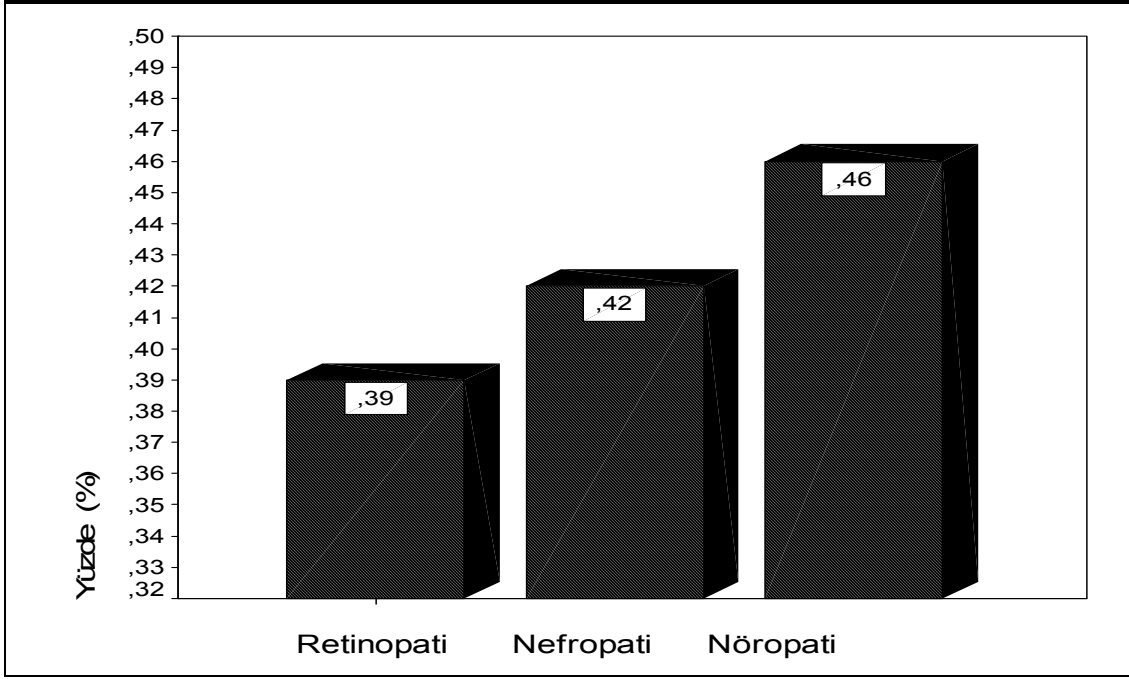
Bu çalışmaya tip 2 DM tanısıyla izlenen 38-58 yaş arasında (yaş ortalaması 49.3±5.75) 187 kadın ve 183 erkek olmak üzere toplam 370 hasta alındı. DM tanısı ADA kriterlerine göre koyuldu (27). Olgulara ait demografik ve klinik veriler görülmektedir (Tablo 12).

Tablo 12. Diyabetli hastalara ve kontrol grubuna ait demografik ve klinik veriler

	DM	Kontrol	p
Sayı	370	110	
Yaş (yıl)	50.1±5.75	49.7±8.1	0.05
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	187/183	55/55	0.05
VKI (kg/m ²)	27.7±3.6	25.7±5.3	0.05
Diyabet başlama yaşı (yıl)	42.2±4.3	-	
Diyabet süresi (yıl)	7.1±4.9	-	
HbA1C (%)	7.9±3.4		
Kreatinin (mg/dl)	0.9±0.18	0.7±0.11	0.05
Açlık plazma glukozu (mg/dl)	134.9±27.7	88±11,9	*0.0001
LDL (mg/dl)	129±31	102±21.6	*0.02
Trigliserid (mg/dl)	151±43	128±19.7	*0.01
HDL(mg/dl)	39.8±7.1	43±5.7	*0.03
Kan basıncı (mmHg)			
Sistol	132.3±22.1	128±1.7	*0.03
Diastol	83.2±1.1	81.1±0.6	*0.02
Retinopati (sayı,%)	146(39.7)		
NPDR	94(65.2)		
PDR	52(34.8)		
Nefropati (sayı,%)	155(42)		
Mikroalbuminüri	98(63.2)		
Makroalbuminüri	57(36.8)		
Nöropati	171(46.2)		

Veriler ortalama±SD veya % olarak verildi. Güvenlik aralığı olarak %95 kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda sayısal değişkenlerde Student-t test ve Mann Whitney U testi, (karakter değişkenler) Ki-kare testi ve Fisher kesin Ki-kare testi kullanıldı p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Diyabetiklerde 171 hastada (%46.2) DPN, 146 hastada (%39.7) retinopati, 155 hasta (%42) nefropati tesbit edildi (Şekil 1). DPN ile HbA1c, diyabet süresi, diyabet başlama yaşı, retinopati ve nefropati arasında pozitif korelasyon mevcuttu (Tablo 13).



Şekil 8. Tip 2 diabetes mellituslu hastalarda mikrovasküler komplikasyonların oranı

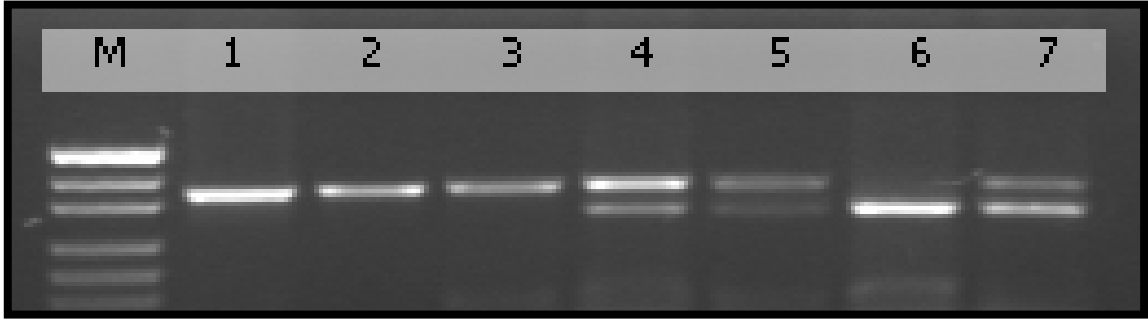
Tablo 13. DN ile ilişkili faktörler

	r	p
HbA1C düzeyi (%)	0.82	0.0001
Yaş (yıl)	0.77	0.001
Diyabet süresi (yıl)	0.58	0.01
Diyabet başlama yaşı (yıl)	0.53	0.02
Nefropati (%)	0.58	0.01
Retinopati (%)	0.51	0.02

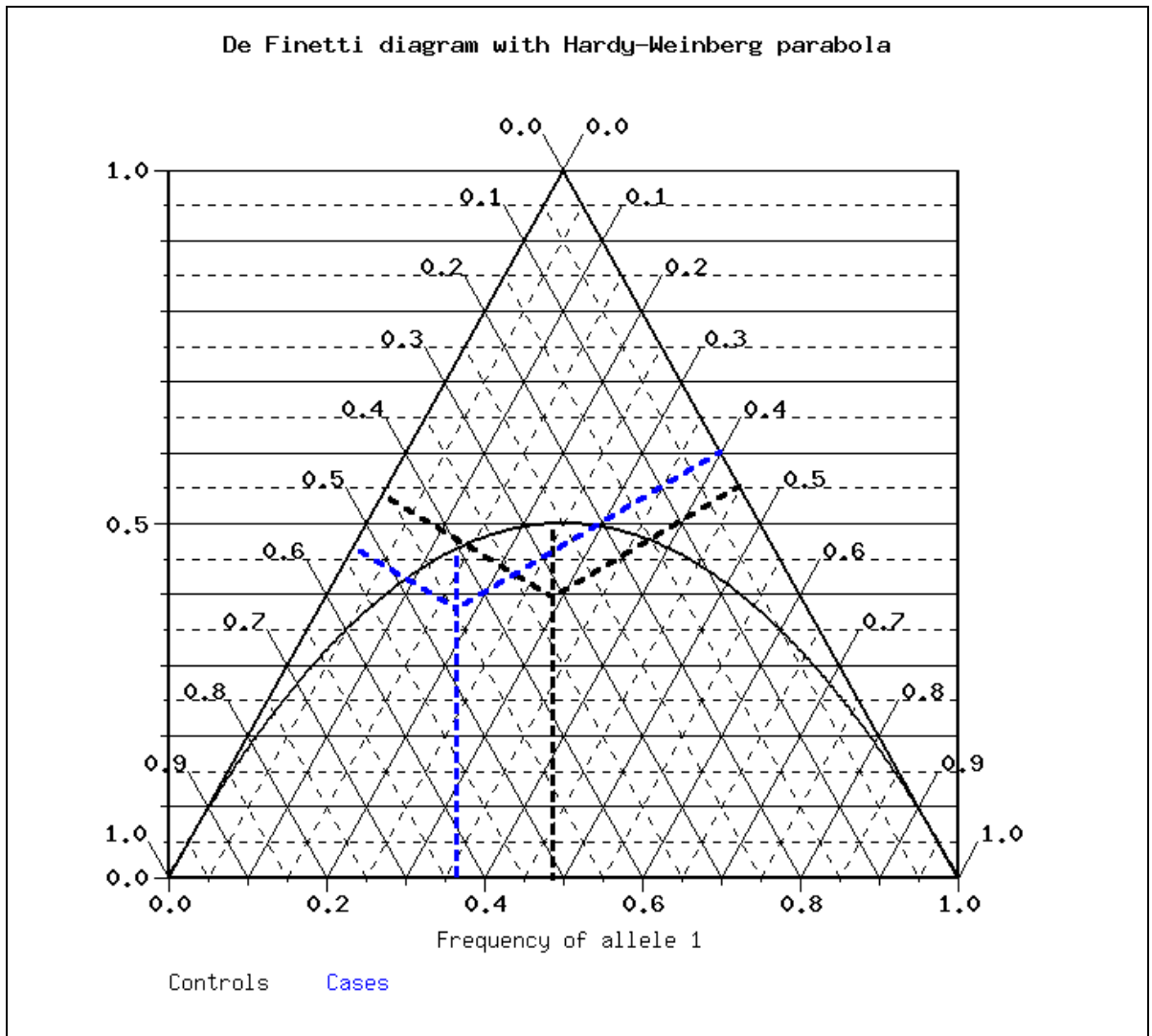
Değişkenler arasındaki ilişkinin yönü ve düzeyi Pearson korelasyon katsayısı (r) hesaplanarak belirlendi. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

DPN tanısı alan 171 hasta ve kontrol grubunda UCP2 geni promoter bölgesinde bulunan -866G/A polimorfizmi araştırıldı (Resim 2). DPN'li hastalar ile kontrol grubu arasında bu polimorfizm açısından farklılık saptandı. Diyabetiklerde 30 hasta (%17.6) G allel için homozigot (GG); 65 hasta (%38) GA heterozigot ve 76 hasta (%44.4) A allel (AA) için homozigottu (Tablo 14) (Şekil 9).

Allel sıklığı yabanıl tip (wild type) A alleli için % 63.5, değişik tip (variant type) G alleli için % 36.5 olarak bulundu (Şekil 9). DPN'li hastalarda A alleli sıklığı kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.009$). Erkek ve kadınlar arasında allel ve genotip sıklığı farksızdı ($p > 0.05$)(Tablo 14).



Resim 2. UCP2 geni promoter bölgesi -866G/A polimorfizminin %2'lik agaroz jelde elektroforez sonrası görüntüsü (M: moleküler belirleyici pUC18/ MspI, 1: PCR ürünü, 2,3: GG, 4,5,7: GA, 6: AA)

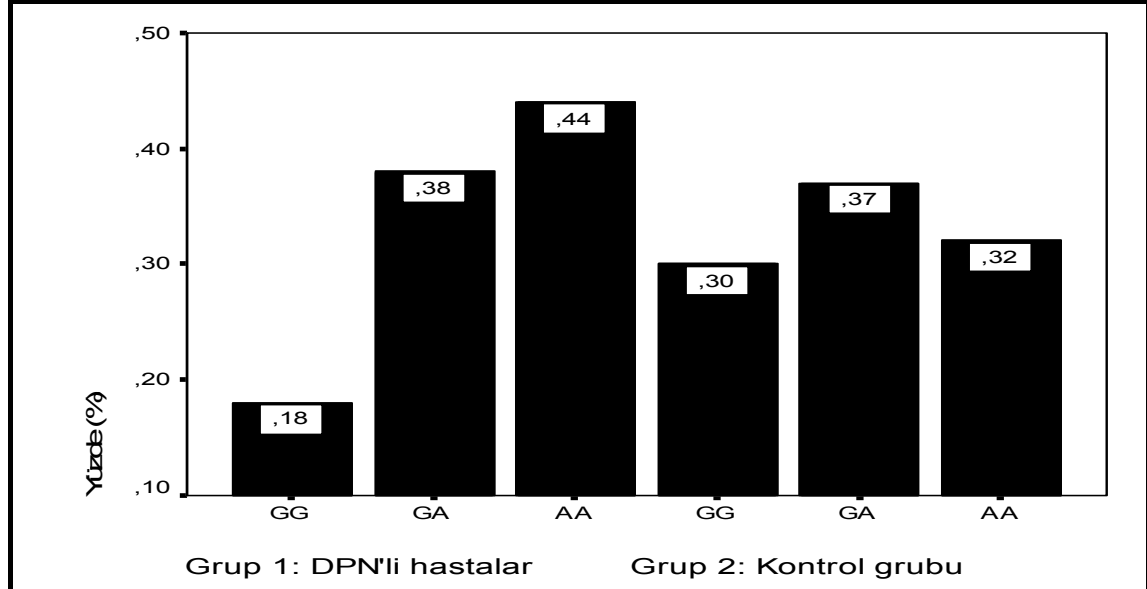


Şekil 9. UCP2 geni promoter bölgesi -866G/A polimorfizmi allel sıklığının diyabetik ve kontrol gruplarına göre dağılımı (HWE hasta $p=0.018$, HWE kontrol $p=0.029$ (df=1). (C.I: %95)

Tablo 14. DN'li hastalarda ve kontrol grubu arasında genotip ve allel sıklıklarının karşılaştırılması

	Diyabetikler	Kontrol	p
Genotipler(sayı;%)			*0.009
866 G/G	30 (17.6)	34(30.9)	
866 G/A	65 (38)	41(37.2)	
866 A/A	76(44.4)	35(31.9)	
Allel sıklığı			**0.004
G Allel	125 (36.5)	109 (49.5)	
A allel	217 (63.5)	111 (50.5)	

*Genotip dağılımlarının iki grup arasında karşılaştırılması($\chi^2=6.76$, $df=2$, $p=0.009$)
**Allele sıklıklarının iki grup arasında karşılaştırılması ($\chi^2=8.13$, $df=1$, $p=0.004$)
aHWE $p=p=0.018$, bHWE $p=0.029$ ($df=1$). (C.I: %95)



Şekil 10. DPN'li hastalarda ve kontrol grubunda genotip oranlarının karşılaştırılması

DPN'li hastalar genotiplerine göre Grup 1(G/G) ve Grup 2 (G/A+A/A) olarak iki gruba ayrıldı. Gruplar arasında yaş, VKİ, diyabet süresi, HbA1C, dislipidemi, hipertansiyon ve diyabetik nefropati açısından farklılık yoktu ($p>0.05$). Buna karşın (GA ve AA) genotipinde diyabet başlama yaşı erkendi ($p=0.0001$). Ayrıca retinopati oranıda yüksekti ($p=0.03$) (Tablo 15). DPN'li hastalarda subjektif semptomlar (NSS) ve muayene bulguları (NIS) değerlendirildiğinde (GA+AA) grubunda NIS ve VPT kaybı anlamlı derecede yüksekti. Ancak diğer nörolojik muayene bulgularında (basınç duyusu kaybı ve DTR kaybı) farklılık göstermiyordu (Tablo 16).

Tablo 15 UCP2 genotipine göre diyabetik hastalarda klinik özellikler

	G/G	G/A+A/A	p
Sayı(%)	30(17.6)	141(82,4)	
Yaş(yıl)	52.4±6.6	51.8±7.1	0.05
Cinsiyet(Kadın/Erkek)	16/14	74/67	0.3
VKİ (kg/m2)	27.9±5.7	26.7±5.3	0.6
Diyabet başlama yaşı	45.6±4.5	41.9±4.1	*0.0001
Diyabet süresi (yıl)	7.1±3.9	6.6±3.8	0.6
HbA1C (%)	7.7±3.3	8.2±2.9	0.3
Kreatinin (mg/dl)	0.8±0.12	0.9±0.17	0.2
LDL (mg/dl)	123±32	131±37	0.6
Trigliserid (mg/dl)	148±41	137±43	0.7
HDL(mg/dl)	41±12.7	43±16.5	0.5
Kan basıncı (mmHg)			0.05
Sistol	137±1.8	139±2.1	
Diastol	8.2±1.2	8.4±0.9	
Nefropati (sayı,%)	20(67)	96(68.1)	0.07
Mikroalbumimüri	13(65)	58(60.4)	
Makroalbuminüri	7(35)	38(39.6)	
Retinopati (sayı,%)	19(63.3)	92(65.2)	*0.03
NPDR	11(57.9)	54(58.7)	
PDR	8(42.1)	38(41.3)	

Veriler ortalama±SD veya % olarak verildi. Güvenlik aralığı olarak %95 kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda sayısal değişkenlerde Student-t test ve Mann Whitney U testi, (karakter değişkenler) Ki-kare testi ve Fisher kesin Ki-iKare testi kullanıldı p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 16. UCP-2 genotipine göre diyabetik hastalarda nörolojik muayene verileri

	G/G	G/A+A/A	P
Subjektif semptomlar			
NSS(sayı,%)			0,4
Hafif DN	3(10)	12(8.5)	
Orta DN	12(40)	54(38.3)	
Şiddetli DN	15(50)	75(53.2)	
NIS(sayı,%)			*0.03
Hafif DN	3(10.1)	9(6.4)	
Orta DN	16 (53.3)	80(56.7)	
Şiddetli DN	11 (36.7)	52(36.9)	
VPT kaybı (sayı,%)	10(46.6)	71(50.4)	*0.007
DTR kaybı(sayı)	12(40.3)	58(41.3)	0.2

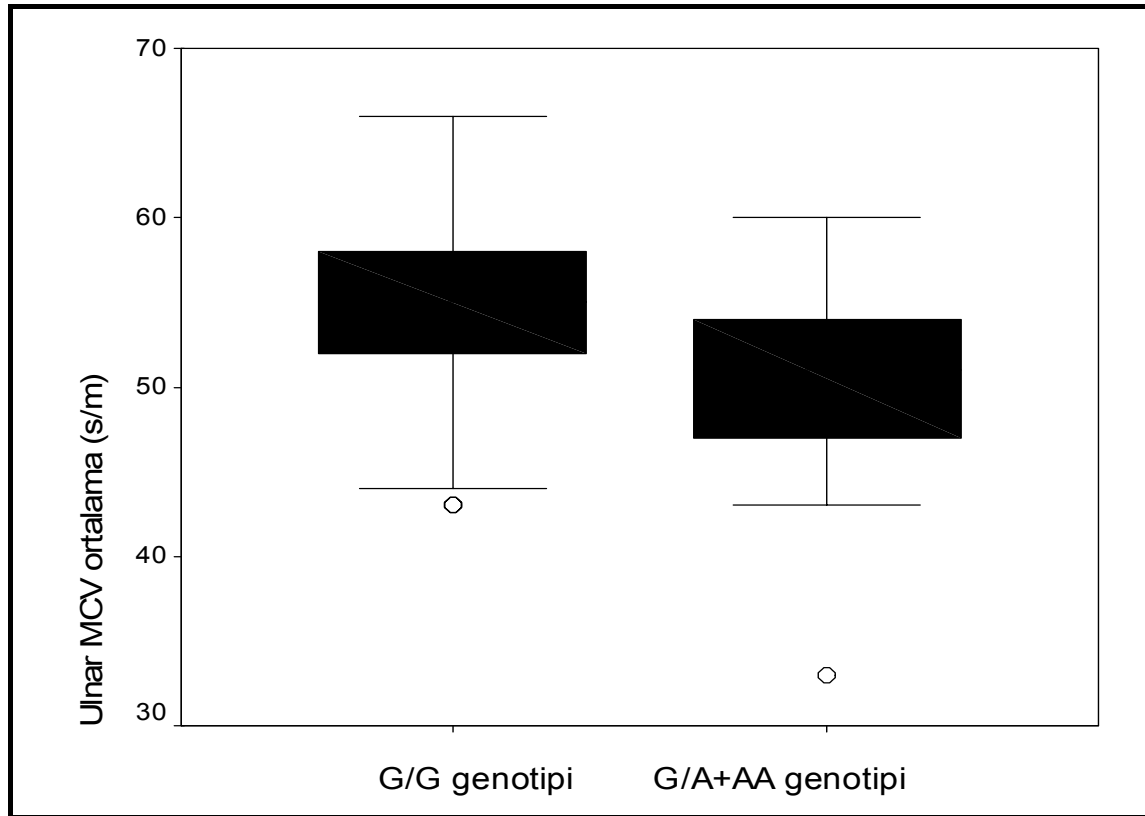
Veriler ortalama±SD veya % olarak verildi. Güvenlik aralığı olarak %95 kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda sayısal değişkenlerde Student-t test ve Mann Whitney U testi, (karakter değişkenler) Ki-kare testi ve Fisher kesin Ki-iKare testi kullanıldı p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

EMG ile yapılan sinir ileti ölçümlerinde (GA+AA) genotipinde MCV ve SCV GG genotipine göre belirgin derecede düşüktü (Tablo 17 ve 18).

Tablo 17. UCP2 genotipine göre gruplandırılmış DPN'li hastalarda motor sinir ileti parametrelerinin karşılaştırılması

	GG	GA+AA	p
Peroneal sinir			
MCV(m/sn)	49.3 ± 3.2 39-54	47.1 ± 4.8 37-53	*0.02
CMAP(mV)	5.4 ± 1.8 2-8	4.9 ± 2.7 2-9	0.3
Posterior Tibial sinir			
MCV(m/sn)	45.2 ± 4.9 35-47	43.9 ± 4.7 33-49	0.028
CMAP(mV)	7.5 ± 2.9 2-12	7.1 ± 3.9 3-11	0.41
Median motor sinir			
MCV(m/sn)	51 ± 5.2 38-63	49.4 ± 4.0 37 ± 59	*0.03
CMAP(mV))	11.8 ± 3.9 3-22	11.9±5.6 3-21	0.8
Ulnar motor sinir			
MCV(m/sn)	54.5 ± 6.1 43-66	52.4 ± 6.2 33-68	*0.03
CMAP(mV)	10.5± 2.6 7-15	10.2±3.1 3-18	0.2

Veriler ortalama±SD veya % olarak verildi. Güvenlik aralığı olarak %95 kullanıldı. Karşılaştırmalarda Mann-Whitney U-testi kullanıldı. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. MCV: motor nerve conduction velocity, CMAP: compound muscle action potential

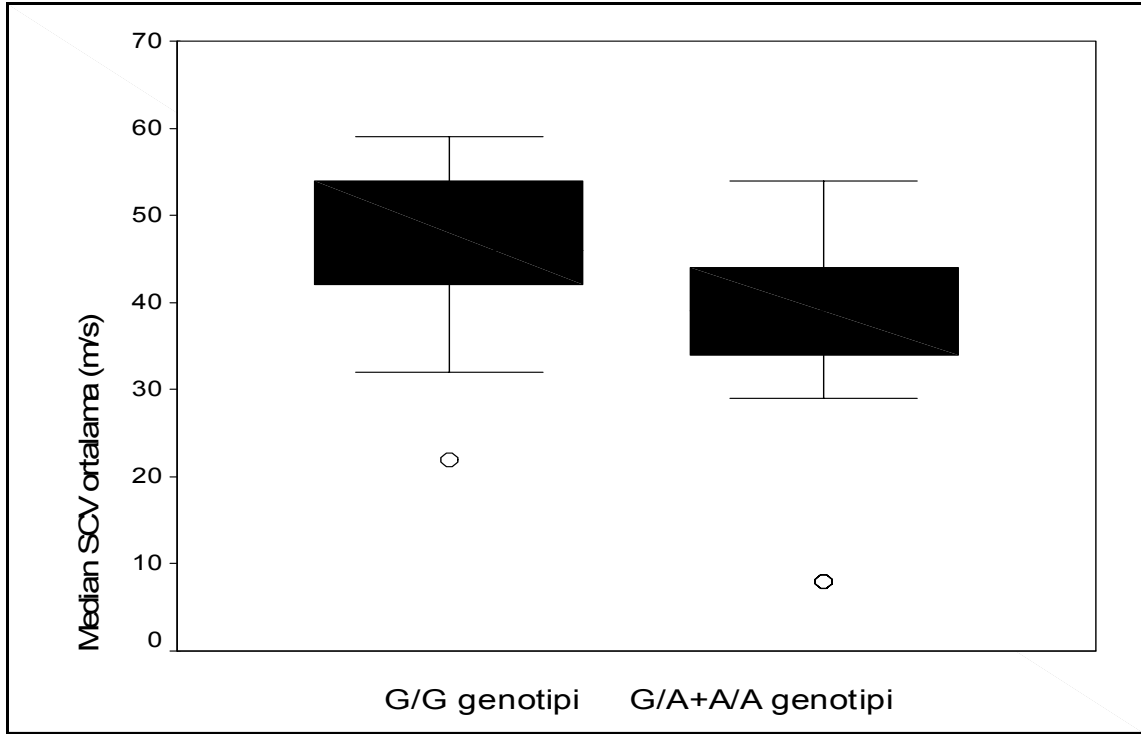


Şekil 11. Genotip grupları arasında ulnar MCV farkı

Tablo 18. UCP2 genotipine göre gruplandırılmış diyabetik nöropatisi olan hastalarda sensoriyal sinir ileti parametrelerinin karşılaştırılması

	GG	GA+AA	P
Median sinir SCV(m/sn)	46.5 ± 8.7 22-59	42.5 ± 8.9 8-59	*0.018
SNAP(µmV)	11.8±5.9 2-22	10.2 ± 6.1 1-32	*0.04
Ulnar sinir SCV(m/sn)	54.5 ± 4.9 36-58	53.6 ± 5.9 37-61	*0.0001
SNAP(mV)	31.2 ± 9.4 27-39	29.2 ± 12 26-40	*0.04

Veriler ortalama±SD veya % olarak verildi. Güvenlik aralığı olarak %95 kullanıldı. Karşılaştırmalar Mann-Whitney U-testi ile yapıldı. p<0.05 anlamlı kabul edildi. SCV: sensory nerve conduction velocity, SNAP: sensory nerve action potential amplitude



Şekil 12. Genotip grupları arasında median SCV farkı

Diyabetiklerde sinir ileti hızları ile genotip ve klinik faktörlerin ilişkisini belirlemek için multiple regresyon analizi (Stepwise metodu ile) yapıldı. MCV ve SCV bağımlı değişkenler olarak alındı. UCP2 genotipi ve HbA1C sinir ileti hızı ile diğer klinik faktörlerden (yaş, cins, diyabet süresi, diyabet başlama yaşı, nefropati, retinopati) bağımsız olarak ilişkili bulundu (Tablo 19). Ayrıca sinir ileti

yavaşlamasında MCV için ilerlemiş yaş, retinopati ve nefropati, SCV için retinopati diğer risk faktörleriydi.

Tablo 19. Sinir ileti fonksiyon testlerinin klinik faktörler ve UCP2 genotipleri ile ilişkisi

Bağımlı Değişkenler	MCV				SCV			
	Katsayı		Anova		Katsayı		Anova	
Bağımsız Değişkenler	β	p	p	R^2	B	p	p	R^2
Sabit								
UCP genotipi	-.355	0.001	0.0001	0.176	-.224	0.021	0.001	0.126
HbA1C	-.202	0.031			-.260	0.007		
Retinopati	-.286	0.002	0.0001	0.303	-.721	0.012	0.002	0.132
Nefropati	-.219	0.016			-.210	0.721		
Yaş	-.186	0.027	0.0001	0.344	-.040	0.763	*	*
Cinsiyet	.017	0.158			-.035	0.396		
DM başlama yaşı	-.215	0.140			-.176	0.086		
DM süresi	-.358	0.041			-.094	0.324		

*Multiple regresyon analizi (stepwise metodu) kullanıldı.
B (Standart katsayı), R2 (regresyon katsayısının karesi)
P<0.05 anlamlı
p >0.05 olduğu için değerlendirme dışı kaldı.

5. TARTIŞMA

DN gelişmiş ülkelerdeki en sık rastlanan nöropati nedenidir. Nontravmatik amputasyonların %50-75'inden sorumludur. Makrovasküler komplikasyonlarla birleştiğinde yüksek oranda morbidite ve mortaliteye yol açar (1-4,35,70). Çalışmamızda %46.2 oranında görülen DPN en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur. Retinopati %39.7, nefropati ise %42 oranında bulundu.

DN prevalansının araştırıldığı çalışmalarda kullanılan tanı yöntemlerinin ve hasta grubunun klinik özelliklerinin farklı olması değişik sonuçların alınmasına neden olmaktadır. DN prevalansının hastanede yatan grupta %30, genel diyabet popülasyonunda ise %22 olduğu bildirilmiştir (47). UKPDS ve DCCT sonuçlarına göre DN'nin yıllık insidansının %2 olduğu bulunmuştur (48). DN insidansının yeni tanı almış tip 2 DM'li hastalarda % 7, 25 yıllık diyabet süresi olanlarda ise %50 olduğu tesbit edilmiştir (49). Avrupa ülkelerinde DSPN prevalansı klinik çalışmalarda %22.7-28.5 oranında, popülasyon çalışmalarında ise %41.6-47.6 arasındadır (53-58).

DPN'nin gelişmesinde hiperglisemi, ilerlemiş yaş, uzun süreli diyabet, alkol alımı, KAH ve sigara risk faktörlerindedir (47,51,52). Bu çalışmada DPN HbA1c düzeyi, diyabet süresi, ilerlemiş yaş, retinopati ve nefropati ile ilişkiliydi (Tablo 13). Türkiye'de yaşları 30-81 arasında olan 866 tip 2 diyabetli hastada yapılan bir çalışmada DPN %60 oranında bulunmuştur. Ayrıca ilerlemiş yaşın, uzun süreli diyabetin ve artmış HbA1c düzeyinin risk faktörü olduğu tesbit edilmiştir (102). Diğer çalışmalarda da glisemi kontrolünün iyi olmasının DPN'nin ilerlemesini yavaşlattığı gösterilmiştir (46,48,50).

Diyabet periferik sinir sisteminde sensoriyal, otonomik ve motor nöronları etkileyerek organ sistemlerinin fonksiyonu için gerekli innervasyonu bozar. DN etkilenen sinir liflerinin özelliklerine bağlı olarak ortaya çıkan sendrom tiplerine göre sınıflandırılmıştır (59). DSPN en sık görülen periferik nöropatidir. Yeni tanı tip 2 DM'ta ilk bulgu olabilir. Bazı olgularda ise uzun diyabet süresine rağmen DPN gelişmez. DPN'nin gelişim sürecinin bireysel olarak farklılık göstermesi genetik

yatkınlığında katkısı olduğunu düşündürmektedir. Ancak DPN ile ilgili genetik çalışmaların sayısı çok azdır.

DN patogenezinde metabolik, vasküler, otoimmün ve nörohormonal nedenlerin rolü olduğu düşünülmektedir. Üzerinde en çok durulan metabolik hipotez hiperglisemiye bağlı poliöl yolun aktivitesinin artmasıdır. Bu yolla glukoz aldoz redüktaz enzimi tarafından sorbitole dönüştürülür. Hücre içinde biriken sorbitol Na-K-ATPaz aktivitesi için gerekli olan myoinositol ve taurini azaltarak sinir ileti hızını yavaşlatır (70). Ayrıca sinirleri besleyen damar duvarları kalınlaşarak endonöral küçük damar lümenlerini daraltır ve endonöral hipoksiye neden olur. Sinir liflerinde kan akımının bozulması Na-K-ATPaz aktivitesini azaltır. Zamanla aksonal atrofi ve sekonder segmental demiyelinizasyon gelişir. Sinir ileti hızı yavaşlar (78,79).

Hiperglisemi ile uyarılmış oksidatif stresin DPN gelişiminde rol aldığı gösterilmiştir (1-4). Diyabetiklerde uzun süreli oksidatif stres komplikasyonlu dokularda ROR'ni artırır. Eğer hücresel antioksidanlar ROR'ni etkisiz hale getiremezlerse, hücrelerde bulunan proteinlerin, lipidlerin ve nükleik asitlerin yapıları bozulur. Hücrelerin biyolojik aktiviteleri ve metabolizma enerjileri tükenir. Zamanla hücrelerin sinyalizasyonları ve transportları bozulur. Protozom parçalanır. Hücre fonksiyonunu yitirir. Bu tür hasarın uzun sürmesi nekrotik veya apoptotik mekanizma aracılığı ile hücre ölümüne neden olur (1-4,47-49). Özellikle nöronlar ve glial hücreler fonksiyonları gereği fazla enerjiye ihtiyaçları vardır. Ayrıca yüksek lipid içerikleri nedeniyle oksidatif strese çok duyarlıdırlar. Hızla apoptozis gelişimi uyarılabilir (1-4).

DPN'nin gelişmesinde mitokondriyal oksidatif metabolizma hızının önemi bilinmektedir (1). Bu hız hücrenin ATP ihtiyacına ve elektronların mitokondri dışına taşınmasına bağlıdır (3). Mitokondrinin iç membranında eksprese edilen UCPs taşıyıcı proteinlerdir. Mitokondriyal membranın fonksiyonunda ve glukozu cevap olarak hücresel enerji düzenlenmesinde rol alırlar. UCPs protonu mitokondri dışına çıkararak oksidatif fosforilasyon aracılığı ile ATP üretimini engellerler. Böylece mitokondriyal proton gradiyentini azaltırlar.

UCP2 dalak, pankreas adacık hücreleri, akciğer, mide, beyaz yağ doku, beyin ve periferal nöronların arka kök gangliyonlarında eksprese edilirler (5,6,10-12). Hiperglisemi ile uyarılmış oksidatif streste süperoksit anyonu ve proton yükü artar. Bazal proton sızıntısına ek olarak proton yükünü azaltmak için süperoksit anyonu

UCPs ekspresyonunu uyarır. (10,86). Oksidatif streste artmış UCP2 ve UCP3 elektronları mitokondri dışına hızla taşıyarak membran potansiyelini azaltırlar. Taşıma sırasında oksijen elektron transport zincirinde tüketilir ve enerji ısı olarak dağılır. Superoksit tarafında uyarılan UCP2 ekspresyonunun antioksidan defans olduğu kabul edilmiştir (15,87). Mitokondride ROR'nin üretiminde UCP2 sensor görevindedir. Artmış oksidatif streste devreye girerek üretimini durdurur (10-12,87). UCP2 gen delesyonu olan farelerin makrofajlarında yüksek düzeyde ROR bulunmuştur (13).

UCPs merkezi sinir sisteminde beyinde mitokondrinin iç membranında bazı nöropeptidlerle beraber eksprese edilirler. Nöronlarda UCP2 ve UCP3'ün artmış ekspresyonunun glukozla uyarılmış ROR'nin oluşumunu ve mitokondriyal hiperpolarizasyonu önleyerek programlı hücre ölümünü bloke ettiği gözlenmiştir (4). Aralıklı olarak iskemik periodlara maruz kalan nöronlarda subletal iskemik durum oluşur. Nöral hücrelerin yaşamaya devam etmesi protein sentezine bağlıdır. Nöronlarda oksidatif stres ve iskemiye cevap olarak UCP2'nin artmıştır (100). UCP2 gen delesyonu olan fareler serebral arter oklüzyonuna bağlı iskemiye daha az duyarlı bulunmuştur (101). UCP2'nin parkinson ve inmenin önlenmesinde ve serebral iskemiye takiben siniri korumada etkisi olduğu görülmüştür (102).

UCP2'nin artış mekanizmalarından birisi de genin artmış ekspresyonu ile karakterize polimorfizmdir (17). İnsanlarda UCP2 genin promoter bölgesinde 866G/A polimorfizmi en sık görülenidir (6,16-25). UCP2 genin promoter bölgesinde -866G/A polimorfizminde veya AA genotipinde transkripsiyonun A ile başlaması UCP2'nin artmış ekspresyonuna neden olmuştur (14,16,17,21,94,96). Çalışmamızda DPN'li hastalarda kontrol grubuna göre UCP2 genin promoter bölgesinde -866G/A polimorfizmi ve A alleli sıklığı belirgin derecede yüksekti.

Avusturyalılarda yağ hücrelerinde polimorfizme bağlı A allelin artmış transkripsiyonel aktivitesi UCP2 mesenger RNA (m-RNA) düzeylerindeki artışla birlikte (18). İtalyanlar ve Japonlarda UCP2 -866G/A gen polimorfizminde A alleli sıklığı mRNA düzeylerinde artışla beraber olup insulin sekresyonunda azalma ve/veya tip 2 diyabetle birlikte görülmüştür (18,20,22). A allel sıklığı Kafkasya kökenli kişilerde obezite riskini azaltırken, Japonlarda fark görülmemiştir (19,20). Diğer çalışmalarda obezite ile UCP2 arasında ilişki görülmezken bir çalışmada sadece kadınlarda UCP3 ile VKİ arasında ilişki saptanmıştır (97,98).

Çalışmamızda genotip grupları karşılaştırıldığında HbA1C, diyabet süresi, dislipidemi, VKİ, hipertansiyon, retinopati ve nefropati açısından farklılık gözlenmedi. Ancak (GA+AA) genotipinde olan grupta diyabet başlama yaşı erken bulundu ($p=0.0001$). UCP2 genotipinde A alleli varlığı DM gelişmesine katkıda bulunan genetik faktörlerden biri olabileceğini düşündürüyordu. Sonuçlarımız diğer çalışmalarla uyumluydu (14-16,20,91-96).

Pankreasın beta hücresi plazma membranı sitozolde bulunan ATP/ADP konsantrasyonuna duyarlı çok sayıda K-ATP kanalı içerir. Yemeği takiben hücrede metabolize olan glukoz ATP/ADP oranına duyarlılığı artırarak pankreas beta hücrelerinden insülin salgılatır. Beta hücresinin mitokondrisinde bulunan UCP2'nin insülin sekresyonunda potansiyel düzenleyici olduğu düşünülmektedir (91,93). Pankreasın adacık hücre mitokondrilerinde adenovirus aracılığı ile UCP2'nin ekspresyonu artırıldığında, ATP üretiminin ve dolayısıyla insülin salgısının azaldığı gözlenmiştir (15,94,95). Prediyabetik dönemde ise pankreas beta hücrelerinde bozulmuş insülin sekresyonu ile artmış UCP2 düzeyi ilişkili bulunmuştur (14). Diğer taraftan UCP2 gen delesyonu olan farelerde insülin salgısı artmış ve açlık kan glukozu azalmıştır (16,96). DN'li hastalarımızda genotip grupları arasında dislipidemi ve hipertansiyon açısından farklılık yoktu. Sonuçlarımız diğer çalışmalarla da uyumluydu (6,25).

Benzer diyabet süresine sahip DPN'li hasta grubumuzda genotip oranları %17.4 (GG) ve %82.6 (GA+AA) olarak bulundu. UCP2 gen polimorfizmi kontrol grubuna göre çok yüksek olmamakla birlikte DPN'li hastalarda A alleli sıklığı belirgin derecede yüksekti. Bu durum da artmış UCP2 DPN'li hastalarımızın hiperglisemiye bağlı uzun süreli oksidatif strese maruz kaldığını düşündürüyordu. Ancak diğer oksidatif stres parametrelerinde değerlendirildiği çalışmalarla desteklenmesinin yararlı olacağı düşünüldü. Oksidatif stres ile uyarılmış UCP2 aktivasyonunun ROR üretimini engelleyerek DPN gelişim hızını yavaşlatacağı bildirilmiştir (25). Diğer taraftan, iskemik sinirde enerji (ATP) eksikliğini artırarak da hızlandıracağı öne sürülmüştür (6). DM'ta hücre kültürlerinde ve deneysel hayvan modellerinde periferik sinirin arka kök ganglionlarındaki hasar hiperglisemi ile ilişkili bulunmuştur (1-7). Aynı zamanda oksidatif stres bloke edildiğinde DPN'nin ilerlemesi durmuştur (7-9)

Sinir ileti hızı düşük olan (GA+AA) grubunda NIS skorları ve vibrasyon algılama eşiği kaybı belirgindi. DPN'nin tanısında VPT ve NIS'un sinir ileti hızı ile ilişkisi muayenede VPT'nin erken tanıda önemini gösteriyordu (63).

Ayrıca A alleli taşıyan bu grupta MCV ve SCV GG genotipine göre belirgin derecede düşük olması dikkat çekiciydi. A alleli taşıyan UCP2 genotipi ve HbA1c sinir ileti hızı ile diğer klinik faktörlerden (yaş, cins, diyabet süresi, diyabet başlama yaşı, nefropati, retinopati) bağımsız olarak ilişkili bulundu (Tablo 19). Ayrıca sinir ileti hızı yavaşlamasında MCV için ilerlemiş yaş, retinopati ve nefropati, SCV için retinopati diğer risk faktörleriydi.

DM'ta hiperglisemiye bağlı oksidatif stresin mikrovasküler komplikasyonların gelişimini hızlandırdığı bilinmektedir. DPN'de sinir ileti hızı yavaşlaması ile birlikte nefropati ve/veya retinopatinin görülmesi beklenen bir bulgu olarak değerlendirildi. Artmış UCP2 ekspresyonu ile karakterize A alleli sıklığı olanlarda yüksek oranda görülen DPN gelişiminde bu hastaların uzun süreli oksidatif strese maruz kaldıklarını ve UCP2'nin antioksidan etkisinin yetersiz olduğu düşünüldü.

DPN gelişiminde nöronlarda oksidatif strese bağlı son ürünler ve inaktif proteinler birikir. Aksonal transport ve sinyalizasyonu sağlayan lipidler ve proteinler hasar görür. Periferik sinirde aksonal transport yavaşlar. Böylece büyüme faktörlerinin ulaşması gecikir. Hücrelerde sinaps ilişkisi bozulur. Apoptosis başlar (82).

Oksidatif streste UCP2 aktivasyonunun yararlı etkilerini gösteren in vitro çalışmalar bulunmakla birlikte sadece bir klinik çalışmada UCP2 -866G/A gen polimorfizmi ve A alleli sıklığının DN ile ilişkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada farelerin periferik sinirinin arka kök ganglionlarında UCP-2 m-RNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Artmış A alleli aktivitesi sinir ileti hızı ve vazomotor aktivitede azalma ile ilişkili bulunmuştur. Artmış oksidatif stresle uyarılmış UCP2 aktivasyonunun sinir hücresinin mitokondrisinde enerji (ATP) üretimini azaltarak Na/K-ATPaz pompasının aktivitesini yavaşlatığı ve DPN gelişimini hızlandırdığı düşünülmüştür (6).

DM'ta sinir ileti hızının azalması Ranvier nodundaki Na-K-ATPaz'ın hipofonksiyonuna bağlanmıştır (45,46). Sinir hücresinin aksonuna uyarı geldiğinde hücre içi ve dışında ki sıvı arasında membran potansiyel farkı oluşur. Akson zarı sodyum Na/K-ATP-az pompası aracılığı ile dengelenir. Açığa çıkan aksiyon potansiyeli sinir lifi boyunca yayılım gösterir (43,44). Fazla enerji gerektiren

fonksiyonları olan nöronlar çok sayıda oksidatif strese duyarlı mitokondri içerirler. Fizyolojik olarak artmış O₂- düzeyi süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından suya dönüştürülerek ortadan kaldırılır. Ancak DM'ta hücrel metabolizma hiperglisemi ile uyarıldığında komplikasyona duyarlı dokularda oksijen üretimi artar. Mitokondride ATP sentetaz inhibe olur ve elektron transferi yavaşlar. Elektron transferi NAD⁺ rejenere etmediği için NADH oksidaz aktive olur ve süperoksit üretilir (2).

Superoksitler oksidatif strese aşırı duyarlı olan sinir hücrelerinde UCP2 ekspresyonunu uyarırlar. Yapılan çalışmalarda arka kök gangliyonlarında artmış UCP2 aktivasyonunun oksidatif strese cevap olduğu gösterilmiştir (4,6).

Sonuç olarak A alleli sıklığının DPN ve DM başlama yaşının erken olması ile birlikteliği genetik yatkınlığa dikkati çekiyordu. Sinir ileti hızının yavaşlamasında bağımsız risk faktörü olan UCP2 artışı ile karakterize genotip mitokondriden enerji (ATP) üretimini azaltarak DPN gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca uzun süreli oksidatif streste UCP2'nin koruyucu antioksidan etkisinin DPN'nin ilerlemesinde yetersiz kaldığı düşünüldüğünde artmış UCP2 kronik oksidatif stresin ve periferik sinirlerde enerji depleksiyonun göstergesi olabilir. DPN'de genetik yatkınlığın araştırılmasının risk grubunu belirlemede ve tedavide yeni görüşlere yol açacağı kanısındayız.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1) DPN en sık görülen mikrovasküler komplikasyondur.
- 2) DPN gelişimi HbA1c düzeyi, yaş, diyabet süresi, nefropati ve retinopati ile ilişkili bulundu.
- 3) Tip 2 diyabetik hastalarda kontrol grubuna göre UCP2 geni promoter bölgesinde -866 GA polimorfizmi ve A alleli sıklığı yüksekti.
- 4) A alleli taşıyan genotipte diyabet başlama yaşının erken olması DM'un gelişiminde rolü olabileceğini düşündürüyordu.
- 5) A alleli taşıyan genotipte DPN oranı yüksekti.
- 6) UCP2 genotipi ve HbA1c MCV ve SCV yavaşlamasında diğer klinik faktörlerden bağımsız olarak ilişkili bulundu.
- 7) Sinir ileti hızının yavaşlamasında bağımsız risk faktörü olan UCP2 artışı ile karakterize genotip mitokondriden enerji (ATP) üretimin azaltarak DPN gelişimine katkıda bulunabilir.
- 8) DPN'nin ilerlemesinde rol alan uzun süreli oksidatif strese UCP2'nin koruyucu antoksidan etkisinin yetersiz kaldığı düşünüldüğünde artmış UCP2'nin kronik oksidatif stresin göstergesi olasılığı göz ardı edilmemelidir.
- 9) DPN'de genetik yatkınlığın araştırılmasının risk grubunu belirlemede ve tedavide yeni görüşlere yol açacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Russell JW, Golovoy D, Vincent AM, Mahendru P, Olzmann JA, Mentzer A, and et al. High glucose-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurons. *FASEB J* 2002;16:1738 –1748
2. Srinivasan S, Stevens MJ, Wiley JW. Diabetic peripheral neuropathy: evidence for apoptosis and associated mitochondrial dysfunction. *Diabetes* 2000;49:1932–1938
3. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003;52:165–171
4. Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:368–383
5. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:6161–6166
6. Yamasaki H, Sasaki H, Ogawa K, Shono T, Tamura S, Doi A et al. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects peripheral nerve dysfunction in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 2006;29(4):888-894
7. Low PA, Nickander KK, Trischler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997;46(2):38–42
8. Tomlinson DR. Future prevention and treatment of diabetic neuropathy. *Diabetes Metab* 1998;24(Suppl. 3):79–83
9. Stevens MJ, Obrosova I, Cao X, Van Huysen C, Greene DA. Effects of DL- α -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2000;49:1006–1015

10. Boss O, Muzzin P, Giacobino JP. The uncoupling proteins, a review. *Eur J Endocrinol* 1998;139:1–9
11. Kim-Han JS, Reichert SA, Quick KL, Dugan LL. BMCP1: a mitochondrial uncoupling protein in neurons which regulates mitochondrial function and oxidant production. *J Neurochem* 2001;79:658–668
12. Hong Y, Fink BD, Dillon JS, Sivitz WI. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology* 2001;142:249–256
13. Arsenijevic D, Onuma H, Pecqueur C, Raimbault S, Manning BS, Miroux B et al. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat Genet* 2000;26(4):435–439
14. Dalgaard LT, Pedersen O. Uncoupling proteins: functional characteristics and role in the pathogenesis of obesity and type II diabetes. *Diabetologia* 2001;44:946–965
15. Zhang CY, Baffy, G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, β -cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001;105:745–755
16. Chan CB, Saleh MC, Koshkin V, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 and islet function. *Diabetes* 2004;53 (Suppl. 1):S136–S142
17. Gable DR, Stephens JW, Dhamrait SS, Hawe E, Humphries SE. European differences in association between the UCP2–866GA common gene variant and markers of body mass and fasting plasma insulin. *Diabetes Obes Metab* 2007;9(1):130–131
18. Esterbauer H, Schneitler C, Oberkofler H, Ebenbichler C, Paulweber B, Sandhofer F et al. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans. *Nat Genet* 2001;28:178–183
19. Krempler F, Esterbauer H, Weitgasser R, Ebenbichler C, Patsch JR, Miller K et al. A functional polymorphism of the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes in obese middle-aged humans. *Diabetes* 2002;51:3331–3335

20. Le Fur S, Le Stunff C, Dos Santos C, Bougneres P. The common -866 G/A polymorphism in the promoter of uncoupling protein 2 is associated with increased carbohydrate and decreased lipid oxidation in juvenile obesity. *Diabetes* 2004;53(1):235-239
21. Sasahara M, Nishi M, Kawashima H, Ueda K, Sakagashira S, Furuta H et al. Uncoupling protein 2 promoter polymorphism-866G/A affects its expression in β -cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes* 2004;53:482–485
22. D’Adamo M, Perego L, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, Andreozzi F et al. The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes. *Diabetes* 2004;53:1905–1910
23. Dhamrait SS, Stephens JW, Cooper JA, Acharya J, Mani AR, Moore K et al. Cardiovascular risk in healthy men and markers of oxidative stress in diabetic men are associated with common variation in the gene for uncoupling protein 2. *Eur Heart J* 2004;25:468–475
24. Oberkofler H, Iglseider B, Klein K, Unger J, Haltmayer M, Krempler F et al. Associations of the UCP2 gene locus with asymptomatic carotid atherosclerosis in middle-aged women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:604–610
25. Rudofsky G, Schroedter A, Schlotterer A, Voron’ko OE, Schlimme M, Tafel J et al. A: Functional polymorphisms of UCP2 and UCP3 are associated with a reduced prevalence of diabetic neuropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:89–94
26. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005;28:37-42
27. Diagnosis and classification of diabetes mellitus *Diabetes Care* 2007 30(1):S42-7
28. National Diabetes Data Group. Classification and diagnosis of diabetes mellitus and other categories of glucose intolerance. *Diabetes* 1979;28:1039-1057
29. WHO Expert Committee on diabetes mellitus. Second report. Geneva: WHO, 1980 (Tec. Rep. Ser., no. 646) supp1: S5-S20.
30. World Health organization. Diabetes mellitus: Report of a WHO study group. Geneva: WHO, 1985 (Tec. Rep. Ser., no. 727)

31. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1997;20:1183–1197
32. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus: Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160–3167
33. American Diabetes Association. Evidence-based Nutrition Principles and Recommendations for the Treatment and Prevention of Diabetes and related Complications. *Diabetes Care* 2002; 26 :148-198
34. Danaei G, Lawes CM. Role of cardiovascular risk factor in prevention and treatment of macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1989;12:573-579
35. Jorgensen H, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Stroke in patients with diabetes: the Copenhagen Stroke Study. *Stroke* 1994;25:1977-1984
36. Younes NA, Ahmad AT. Diabetic foot disease. *Endocrine Practice* 2006;12(5):583-592
37. Colhoun HM, Lee ET, Bennett PH, Lu M, Keen H, Wang SL et al. Risk factors for renal failure: the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetologia* 2001;44 (Suppl. 2):S46–S53
38. Kramer H, Molitch ME. Screening for kidney disease in adults with diabetes. *Diabetes Care* 2005;28:1813-1816
39. Nelson RG, Knowler WC, Benett PH. Natural history of diabetic nephropathy in non insulin dependent diabetes mellitus. *J Diabetes Complication* 1991;5:76-78
40. Rossing K, Christensen PK, Hovind P, Tarnow L, Rossing P, Parving HH. Progression of nephropathy in type 2 diabetic patients. *Kidney Int* 2004;66:1596-1606
41. Gardner TW, Aiello LP. Pathogenesis of diabetic retinopathy, in Flynn HW and Smiddy WE, eds., *Diabetes and Ocular Disease: Past, Present and Future Therapies*. American Academy of Ophthalmology 2000;19-61

42. Girach A, Lund-Andersen H. Diabetic macular oedema: a clinic overview. *Int J Clin Pract* 2007;61(1):88-97
43. Goldstein B. Anatomy of the peripheral nervous system. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 2001;12(2):207-236
44. Periferik sinir sistemi anatomisi ve fizyolojisi. (2000). www.itfnoroloji.org/mertas/anatomofizy.htm
45. Sternini C. Organization of the peripheral nervous system: autonomic and sensory ganglia. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997;2(1):1-7
46. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB. Diabetic neuropathies. *Diabetologia* 2000;43:957-973
47. Shaw JE, Zimmet PZ. The epidemiology of diabetic neuropathy. *Diabetes Rev* 1999;7:245-52
48. Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986
49. Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabete Metab* 1977;3:97-107
50. UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes. *Lancet* 1998;352:837-853
51. Adler AI, Boyko EJ, Ahroni JH et al. Risk factors for diabetic peripheral sensory neuropathy. *Diabetes Care* 1997;20:1162-1167
52. Perkins BA, Greene DA, Bril VB. Glycemic control is related to the morphological severity of diabetic sensorimotor polyneuropathy. *Diabetes Care* 2001;24:748-752
53. Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to

glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1996;39(11):1377-1384

54. Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). *Diabetologia* 1998;41(11):1263-1269

55. Young MJ, Boulton AJ, MacLeod AF, Williams DR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993;36(2):150-154

56. Kumar S, Ashe HA, Parnell LN, Fernando DJ, Tsigos C, Young RJ et al. The prevalence of foot ulceration and its correlates in type 2 diabetic patients: a population-based study. *Diabet Med* 1994;11(5):480-484

57. Partanen J, Niskanen L, Lehtinen J, Mervaala E, Siitonen O, Uusitupa M. Natural history of peripheral neuropathy in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;333(2):89-94

58. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Litchy WJ, Klein R, Pach JM et al. The prevalence by staged severity of various types of diabetic neuropathy, retinopathy, and nephropathy in a population-based cohort: the Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1993;43(4):817-824

59. American Diabetes Association and American Academy of Neurology. Consensus statement report and recommendations of the San Antonio Conference on Diabetic Neuropathy. *Diabetes Care* 1988;11:592-595

60. Aring AM, Jones DE, Falko JM. Evaluation and prevention of diabetic neuropathy. *Am Fam Physician* 2005;71(11):2123-2128

61. Thomas PK. Clinical features and investigation of diabetic somatic peripheral neuropathy. *Clin Neurosci* 1997;4(6):341-345

62. Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC, Bril V, Feldman EL, Freeman R et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28(4):956-962

63. England JD, Gronseth GS, Franklin G, Miller RG, Asbury AK, Carter GT et al. Distal symmetric polyneuropathy: a definition for clinical research: report of the American Academy of Neurology, the American Association of Electrodiagnostic

Medicine, and the American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation
Neurology 2005;25;64(2):199-207

64. Perkins BA, Olaleye D, Zinman B, Bril V. Simple screening tests for peripheral neuropathy in the diabetes clinic. *Diabetes Care* 2001;24(2):250-256

65. Dyck PJ, Kratz KM, Karnes JL, Melton III JL, O'Brien PC, Litchy WJ, Windebank AJ et al. Design, criteria for types of neuropathy, selection bias, and reproducibility of neuropathic tests. The Rochester Diabetic Neuropathy Study. *Neurology* 1991;41:799-807

66. Vinik A, Ullal J, Parson HK, Casellini CM. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006;2(5):269-281

67. Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Circulation* 2007;23;115(3):387-397

68. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Third Edition, Oxford Science Publications, 2001;22-24

69. Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004;9(3):145-152

70. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metabolism Reviews* 1995;11(3):181-192

71. Kuyvenhoven JP, Meinders AE. Oxidative stress and diabetes mellitus, Pathogenesis of long-term complications. *European Journal of Internal Medicine* 1999;10(1):9-19

72. Tiedge M, Lortz S, Drinkgern J, Lenzen S. Relation between antioxidant enzyme gene expression and antioxidative defense status of insulin-producing cells. *Diabetes* 1997;46:1733-1740

73. Donath MY, Gross DJ, Cesari E, Kaiser N. Hyperglycemia induced β cell apoptosis in pancreatic islets of Psammoys oboesus during development of diabetes. *Diabetes* 1999;48(4):738-744

74. Du X, Stockklauser-Farber K, Rösen P. Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NFKappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase? *Free Radical Biology and Medicine*. 1999;27(7-8):752-763

75. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003;17(1):4-38
76. Green K, Brand MD, Murphy MP. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes* 2004;53:110-118
77. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1998;14(1):1114-1120
78. Korzon-Burakowska A, Edmonds M. Role of the microcirculation in diabetic foot ulceration. *Int J Low Extrem Wounds* 2006;5(3):144-108
79. Bansal V, Kalita J, Misra UK. Diabetic neuropathy. *Postgrad Med J* 2006;82(964):95-105
80. Pop-Busui R, Sima A, Stevens M. Diabetic neuropathy and oxidative stress. *Diabetes Metab Res Rev* 2006;22(4):257-273
81. Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003;5(6):473-480
82. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):1005-1028
83. Xie C, Lovell MA, Xiong S, Kindy MS, Guo J, Xie J et al. Expression of glutathione-S-transferase isozyme in the SY5Y neuroblastoma cell line increases resistance to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2001;31(1):73-81
84. Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006;125(7):1241-1252
85. Nicholls DG, Bernson VS, Heaton GM. The identification of the component in the inner membrane of brown adipose tissue mitochondria responsible for regulating energy dissipation. *Experientia Suppl* 1978;32:89-93
86. Monemdjou S, Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial proton leak in brown adipose tissue mitochondria of Ucp1-deficient mice is GDP insensitive. *Am J Physiol* 1999;276:1073-1082
87. Echtay KS, Murphy MP, Smith RA, Talbot DA, Brand MD. Superoxide activates mitochondrial uncoupling protein. *Nature* 2002;415:96-99
88. Astrup A, Bulow J, Christensen NJ, Madsen J, Quaade F. Facultative thermogenesis induced by carbohydrate: a skeletal muscle component mediated by epinephrine. *Am J Physiol* 1986;250:226-229

89. Sluse FE, Jarmuszkiewicz W, Navet R, Douette P, Mathy G, Sluse-Goffart CM. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta* 2006;1757(5-6):480-485
90. Fleury C, Neverova M, Collins S et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet* 1997;89: 50
91. Krauss S, Zhang CY, Scorrano L, Dalgaard LT, St-Pierre J, Grey ST et al. Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction. *Clin Invest* 2003;112(12):1831-1832
92. Vidal-Puig A, Solanes G, Grujic D, Flier JS, Lowell BB. UCP3 uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235:79-82
93. Chan CB, Kashemsant N. Regulation of insulin secretion by uncoupling protein. *Biochem Soc Trans* 2006;34;802-805
94. Hong Y, Fink BD, Dillon JS, Sivitz WI. Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells. *Endocrinology* 2001;142(1):249-256
95. Suh YH, Kim SY, Lee HY, Jang BC, Bae JH, Sohn JN, Bae JH,. Overexpression of short heterodimer partner recovers impaired glucose-stimulated insulin secretion of pancreatic beta-cells overexpressing UCP2. *J Endocrinol* 2004;183(1):133-144
96. Zhang CY, Baffy G, Perret P, Krauss S, Peroni O, Grujic D et al. Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes. *Cell* 2001;15;105(6):745-755
97. Wang H, Chu WS, Lu T, Hasstedt SJ, Kern PA, Elbein SC. Uncoupling protein-2 polymorphisms in type 2 diabetes, obesity, and insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;286(1):E1-7
98. Liu YJ, Liu PY, Long J, Lu Y, Elze L, Recker RR, Deng HW. Linkage and association analyses of the UCP3 gene with obesity phenotypes in Caucasian families. *Physiol Genomics* 2005;22(2):197-203
99. Maalouf M, Sullivan PG, Davis L, Kim DY, Rho JM. Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 2007;2;145(1):256-264
100. Mattiasson G, Shamloo M, Gido G, Mathi K, Tomasevic G, Yi S et al. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. *Nat Med* 2003;19(8):1062-1068
101. Mattiasson G, Sullivan PG. The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 2006;8(1-2):1-38

102. Boru UT, Alp R, Sargin H, Kocer A, Sargin M, Luleci A, Yayla A. Prevalence of peripheral neuropathy in type 2 diabetic patients attending a diabetes center in Turkey. *Endocr J* 2004;51(6):563-567
103. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nuc Acid Res* 1988;16: 1215-1216
104. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 1987;155:335-350
105. Sesti G, Cardellini M, Marini MA, Frontoni S, D'Adamo M, Del Guerra S et al. A common polymorphism in the promoter of UCP2 contributes to the variation in insulin secretion in glucose-tolerant subjects. *Diabetes* 2003;52: 1280-1283
106. Strachan T, Tead AP, *Human Molecular Genetics*, Bios Scientific Publishers, second edition, 1999;p.273