

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Aynur ACAR

METİLTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ GENİNDEKİ
SIK RASTLANAN POLİMORFİZMLERİN
DİYABETİK NÖROPATİ ETİYOPATOGENEZİNDEKİ ROLÜNÜN
BÖLGESEL DİZİ ANALİZİ TEKNİĞİ İLE TESPİTİ

Dr. Mine BALASAR

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mahmut Selman YILDIRIM

KONYA

2012

İÇİNDEKİLER

1. KISALTMALAR	III
2. TABLO DİZİNİ	V
3. ŞEKİL DİZİNİ.....	VII
4. GİRİŞ	1
5. GENEL BİLGİLER	3
5.1. DİABETES MELLİTUS	3
5.1.1. Tanım	3
5.1.2. Tarihçe	3
5.1.3. DM sınıflandırılması.....	4
5.1.4. Tanı.....	5
5.1.5. Epidemiyoloji.....	6
5.1.6. DM komplikasyonları	6
5.1.7. Tip 2 DM etiyolojisi.....	9
5.2. METİLTETRAHİDROFOLAT REDÜKTAZ (MTHFR).....	15
5.2.1. MTHFR enziminin yapısı ve görevi.....	15
5.2.2. Homosistein yapı ve özellikleri.....	19
5.2.3. MTHFR geninin yapı ve özellikleri.....	23
5.2.3.1. MTHFR geninin allelik varyantları.....	25
5.3. MTHFR ve DM	28
6. GEREÇ VE YÖNTEM	30
6.1. Araştırmanın tipi	30
6.2. Araştırma bölgesi ve zamanı	30
6.3. Araştırma evreni ve yeri	30

6.4. Örneklem seçme kriterleri	30
6.5. Çalışma gruplarının randomizasyonu	30
6.6. Araştırma öncesi bilgilendirme.....	31
6.7. Araştırmanın izni ve etik durum	31
6.8. MTHFR Polimorfizmi Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	31
6.9. DNA izolasyonu	34
6.10. DNA amplifikasyonu	36
6.11. Minidizileme (Pyrosequencing).....	37
6.12. İstatistiksel Analiz	43
7. BULGULAR.....	44
7.1. Yaş ve cinsiyet.....	44
7.2. Genotip ve allel frekanslarının karşılaştırılması.....	44
7.3. Genotip ve ENMG sonuçlarının karşılaştırılması.....	53
8. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	55
9. ÖZET.....	65
10. ABSTRACT	66
11. KAYNAKLAR	67
12. TEŞEKKÜR.....	78
13. EKLER.....	79

1. KISALTMALAR

A	: Adenin
Aa	: Aminoasit
ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
AdoHcy	: S-adenozil homosistein
APG	: Açlık Kan Plazma Glikozu
APS	: Adenozin 5' fosfosülfat
Ark.	: Arkadaşları
BHMT	: Betain homosistein metiltransferaz
bp	: Baz çifti
C	: Sitozin
°C	: Derece Celsius
CBS	: Sistasyonin beta sentaz
CCD	: Charge Couple Device
CL	: Systationin gamma liyaz
CpG	: Sitozin-fosfat-Guanin
dATP	: Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin trifosfat
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DPN	: Diyabetik Polinöropati
dTMP	: Deoksitimidin monofosfat, timidilat
dTTP	: Deoksitimidin trifosfat
dUMP	: Deoksiürüdin monofosfat
ENMG	: Elektronöromyografi
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit
FFA	: Serbest Yağ Asidi
G	: Guanin
HbA1C	: Hemoglobin A1C
Hcy	: Homosistein

HDL	: Yüksek Dansiteli Lipoprotein
kDa	: Kilodalton
ml	: Mililitre
μ l	: Mikrolitre
MODY	: Maturity Onset Diabetes of the Young
MT	: Metil transferaz
MTHFR	: Metiltetrahidrofolat Redüktaz
NMDA	: N-metil-D-Aspartat
NTD	: Nöral Tüp Defekti
OGTT	: Oral Glikoz Tolerans Testi
p	: Pearson X-squared istatistik testinin anlamlılık değeri
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLP	: Piridoksal fosfat
PPI	: Pirofosfat
RFLP	: Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Revolutions per minute; rotasyon frekansı
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rs	: Reference SNP Cluster Identifier
SAH	: S-Adenozil Homosistein
SAM	: S- Adenozil Metiyonin
SHMT	: Serin hidroksimetil transferaz
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmleri
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
SSS	: Santral Sinir Sistemi
T	: Timin
THF	: Tetra Hidro Folat
TURDEP	: Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması
USB	: Universal Serial Bus
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

2. TABLO DİZİNİ

Tablo 1. DM 'nin Etiyolojik Sınıflandırılması.....	4
Tablo 2. Polimorfizmleri Tip 2 DM gelişiminden sorumlu olduğu tutulan aday genler.....	13
Tablo 3. Polimorfizmleri Tip 2 DM'nin komplikasyonlarının gelişiminden sorumlu tutulan aday genler.....	14
Tablo 4. MTHFR geninde C677T ve A1298C lokuslarını içeren DNA bölgelerinin amplifikasyonu için oluşturulan PCR düzeneğinde her bir birey için hazırlanan reaksiyon karışım oranları.....	36
Tablo 5. MTHFR geninin C677T ve A1298C bölgeleri için düzenlenen PCR programı.....	37
Tablo 6. Hasta ve kontrol grubunda kadın-erkek olguların veri dağılımı.....	44
Tablo 7. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR C677T allel sayı ve frekanslarının karşılaştırılması.....	45
Tablo 8. MTHFR C677T polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması.....	45
Tablo 9. Hasta ve kontrol gruplarında homozigot mutant genotip ile normal ve heterozigot genotip verilerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 10. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR A1298C allel sayı ve frekanslarının karşılaştırılması.....	47
Tablo 11. MTHFR A1298C polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 12. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR geni A1298C polimorfizmi için homozigot mutant genotipi ile normal ve heterozigot genotip sıklığının karşılaştırılması	48
Tablo 13. Hasta ve kontrol grubunda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin birleşik genotip analizinin değerlendirilmesi.....	49
Tablo 14. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal (CC/AA) ve en az 1 mutant allel) taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması	50
Tablo 15. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C	

polimorfizmleri için normal ve birleşik heterozigot genotip verilerinin karşılaştırılması.....	50
Tablo 16. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve 3 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması.....	51
Tablo 17. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve en az 2 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması	52
Tablo 18. Hasta ve kontrol gruplarında 1 ve daha az mutant allel ile 2'den fazla mutant alleli olanların karşılaştırılması.....	52
Tablo 19. Hasta grubunda ENMG sonuçları ile MTHFR C677T polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması.....	53
Tablo 20. Hasta grubunun ENMG sonuçları ile MTHFR A1298C polimorfizmi arasında ilişkinin araştırılması.....	54

3. ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Tip 2 DM oluşumunda etkili olan patogenetik mekanizmalar.....	9
Şekil 2. Tip 2 DM gelişiminin intrauterin çevre ile ilişkisi.....	10
Şekil 3. Tip 2 DM’de metabolik çevre ve ilişkili gen polimorfizmleri.....	13
Şekil 4. MTHFR ve homosistein metabolik yolağı.....	18
Şekil 5. Folat yetmezliğine bağlı meydana gelebilen genetik değişiklikler.....	19
Şekil 6. Homosisteinin organizmada oluşan metabolitleri.....	21
Şekil 7. Homosisteinin olası ateroskleroz oluşturma mekanizması.....	21
Şekil 8. Homosistein ve metaboliti olan homosistein tiolaktonun koagülasyon ve fibrinolitik sistem üzerine olan etkileri.....	22
Şekil 9. MTHFR geninin 1 nolu kromozom üzerindeki lokalizasyonu.....	23
Şekil 10. MTHFR geninin 1p36.3’teki intron ve ekzonlarının yerleşimi.....	24
Şekil 11. Bölgesel dizileme sisteminin şematik gösterimi.....	33
Şekil 12. DNA izolasyon kiti gösterimi.....	34
Şekil 13. Bölümümüzde bulunan otomatik DNA izolasyon cihazı Bio Robot EZ1 (Qiagen, Almanya) ile olguların DNA izolasyonu.....	35
Şekil 14. Bölümümüzde bulunan Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo scientific, USA) cihazı.....	36
Şekil 15. Olgularda MTHFR genindeki C677T ve A1298C bölgelerinin bulunduğu DNA segmentlerinin çoğaltılması için kullanılan ısı-döngü cihazı (Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Almanya).....	36
Şekil 16. Pyrosequence için kullanılan Pyromark Q24 minidizileme cihazı.....	38
Şekil 17. Vakum ve yıkama işlemlerinin yapıldığı Pyromark vakum istasyonunun bölümleri.....	39
Şekil 18. Pyromark vakum filtresi.....	39

Şekil 19-a. MTHFR C677T'nin programa yüklenen dNTP dağılımını gösteren histogramı.....	40
Şekil 19-b. MTHFR 677 bölgesi için 19 nolu hastanın NORMAL (CC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	41
Şekil 19-c. MTHFR 677 bölgesi için 35 nolu hastanın HETEROZİGOT (CT) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	41
Şekil 19-d. MTHFR 677 bölgesi için 79 nolu hastanın HOMOZİGOT MUTANT (TT) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	41
Şekil 20-a. MTHFR A1298C'nin programa yüklenen dNTP dağılımını gösteren histogramı.....	42
Şekil 20-b. MTHFR 1298 bölgesi için 16 nolu hastanın NORMAL (AA) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	42
Şekil 20-c. MTHFR 1298 bölgesi için 21 nolu hastanın HETEROZİGOT (AC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	43
Şekil 20-d. MTHFR 1298 bölgesi için 32 nolu hastanın HOMOZİGOT MUTANT (CC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi.....	43

4.GİRİŞ

Şeker hastalığı olarak adlandırılan Diabetes Mellitus (DM), plazma glukoz oranının yüksekliği (hiperglisemi) ile seyreden bir endokrin metabolizma hastalığıdır. DM hastalığı antik çağlardan beri bilinmekte ve günümüzde metabolizma hastalıkları içinde dünyada en sık görülen sağlık problemi olarak tanımlanmaktadır.

DM, yalnızca hasta bireyi değil, ailesini ve tüm toplumu yakından ilgilendiren bir halk sağlığı sorunudur. Genel olarak DM hastalığı Tip 1 ve tip 2 olarak 2 gruba ayrılmaktadır. DM olgularının yaklaşık %90-95'ini tip 2 DM oluşturmaktadır. Tip 2 DM, çevresel ve genetik faktörlerin etkili olduğu multifaktöriyel bir hastalıktır. Tip 2 DM'nin genetik temeli henüz kesin olarak bilinmese de genetik yatkınlığın, hastalık gelişiminde çok önemli olduğunu gösteren bir çok araştırma mevcuttur.

Özellikle Tip 2 DM hastalığı, kronik hiperglisemi sonucu gelişen birçok komplikasyonla karşımıza çıkabilmektedir. Tip 2 DM hastalığında sıkça görülen akut ve kronik komplikasyonlar mortalite ve morbiditeyi etkilemekte, toplumlara sadece tıbbi değil önemli oranda psikososyal ve ekonomik yükler de getirebilmektedir. Örneğin ABD'de yapılan araştırmalarda Tip 2 DM'nin akut ve kronik komplikasyonları, son dönem böbrek yetmezliğinin, travmaya bağlı olmayan alt ekstremitte amputasyonlarının ve erişkin yaş grubundaki körlüğün en sık nedenleri arasında olduğu bildirilmektedir. Tip 2 DM'nin kronik komplikasyonlarından olan diyabetik nöropati ise diyabet hastalarının önemli bir kısmında görülebilen, hastanın yaşam kalitesini düşüren önemli komplikasyonlardan biridir. Diyabetik nöropati gelişiminin özellikle vasa nervorum denilen sinir damarlarının tıkanıklığı sonucu oluştuğu bilinmektedir. Periferik nöropati gelişimi sonucu hastalarda, amputasyonlara kadar gidebilen iyileşmeyen ayak ülserasyonları görülmekte, otonomik nöropati ise kalp tutulumu ile ani ölümlere dahi yol açabilmektedir. Uzun dönem tedaviler hastalara hem psikolojik hem de ekonomik yük getirmektedir.

MTHFR, folik asit, B12 vitamini metionin ve homosistein aminoasidinin metabolizmasında yer alan bir enzimin genidir. MTHFR genindeki polimorfizmler gen aktivitesinin azalmasına, plazma homosistein düzeyinin yükselmesine neden olabilmektedir. Literatürde, plazma homosistein yüksekliği retina, böbrek ve nöronal dokuların yanı sıra diyabetik nöropatinin de etiyolojisinde önem arzeden mikrovasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmektedir. Ayrıca MTHFR genindeki

polimorfizmler sonucu oluşan folat düzeylerindeki düşmenin, genomda DNA metilasyon düzeylerinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bu durumun birçok kanser ve nörolojik hastalıklarla da ilişkili olabileceği birçok yayınlarda desteklenmektedir.

Araştırmamızda, periferik nöropati gelişen diyabet hastalarında ve sağlıklı gönüllülerde, Metiltetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR) enzim genindeki C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırılarak, diyabetik periferik nöropatinin etiyopatogenezinde bu polimorfizmlerin bir rolünün olup olmadığının istatistiksel olarak belirlenmesi amaçlandı.

5. GENEL BİLGİLER

5.1. DİABETES MELLİTUS

5.1.1. Tanım

Diabetes Mellitus (DM) olarak tanımlanan şeker hastalığı, aşırı yeme, çok su içme, sık idrara çıkma ve kilo kaybı gibi belirtilerle kendini gösteren, plazma glikoz düzeyinin yüksekliği (hiperglisemi) ile karakterize olan metabolik bir hastalıktır. Hipergliseminin pankreas beta hücrelerinden insülin hormonunun salınımında yetersizlik, insülin etkinliğinin bozulması veya her iki faktörün de birlikte etkileşimi sonucu geliştiği bilinmektedir (1). İnsülin hormonunun yetmezliği yalnız karbonhidrat metabolizmasında değil, aynı zamanda yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklara yol açmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda ortaya çıkan komplikasyonlar ise ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilmektedir (2).

5.1.2. Tarihçe

Antik çağlardan beri bilinen şeker hastalığına ilişkin tarihte ilk yazılı kaynaklara M.Ö. 1550'li yıllarda Mısır'da yazılmış olan Ebers papirüsünde rastlanmıştır. Hastalığa Diabetes ismini ise ilk kez M.S. 2. yüzyılda Kapadokyalı hekim Aretheaus vermiştir. Aretheaus, şeker hastalarında sık idrara çıkma, aşırı susama ve kilo kaybı gibi belirtilerin olduğunu tanımlamıştır (3). Aynı yüzyılda yaşayan bir diğer hekim Galen, diyabeti susuzluk hastalığı olarak tarif etmiştir. M.S. 5.- 6. yüzyılda Hintli hekimler bu hastaların idrarlarının tatlı olduğunu fark etmişlerdir. Ünlü tıp bilim adamı İbn-i Sina ise 11. yüzyılda El-Kanun fi't-Tıbb isimli eserinde şeker hastalığının klinik bulgularını tanımlamış, gangren ve cinsel işlevlerin azalması gibi komplikasyonlarından da bahsetmiştir (4). XIV. yüzyılın büyük hekimlerinden Konya'lı Hekim Hacı Paşa, Müntehab-ı Şifâ adlı eserinde şeker hastalığının özelliklerini ve çeşitli bitkisel tedavi yöntemlerini yazmıştır (5). Osmanlı devletinde ise DM konusunda tıbbi yaklaşımlar 19. yy.'da Mekteb-i Tıbbiye ile başlayabilmektedir. Faik Paşa tarafından 1860 yılından itibaren idrarda şeker bakıldığı birçok yazılı kaynakta belirtilmektedir (6).

Diabetes Mellitus terimi ise ilk kez 1674 yılında Dr. Thomas Willis tarafından kullanılmıştır. Özellikle 19. ve 20. yüzyılda tüm dünyada yapılan bilimsel çalışmalarda, DM'nin tanı ve tedavisine yönelik çok önemli ilerlemeler

kaydedilmiştir. Kanadalı bilim adamları olan Banting ve Macleod, 1921 yılında pankreastan insülini başarıyla izole etmişler ve 1923 yılında da Nobel ödülünü almışlardır. Bu keşif, diyabet hastalığında dönüm noktası olmuştur (4). 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde ilk rekombinant insan insülini ilaç pazarında yerini almıştır. Günümüzde ise bilim adamları insülin enjeksiyonu dışı uygulama yöntemleri ve pankreas adacık hücre transplantasyonu üzerinde çalışmaktadırlar. Son yıllarda DM'nin iyi tanınması, hastalığın komplikasyonları üzerinde yoğunlaşılmasına neden olmuş, bu konuda da birçok yeni tedavi yöntemleri geliştirmek için araştırmalar devam etmektedir.

5.1.3. DM Sınıflandırması

DM hastalarının çoğu etiyopatogenetik olarak Tip 1 ve Tip 2 DM olmak üzere temelde 2 ana sınıfa ayrılmaktadır. Ancak toplumda daha nadir görülen birçok etiyolojik nedene bağlı DM hastaları da olabilmektedir. Amerikan Diyabet Birliğinin (ADA) etiyopatogeneze yönelik oluşturduğu en son sınıflandırma Tablo 1'de verilmiştir (1).

Tablo 1: DM 'nin Etiyolojik Sınıflandırılması

I- Tip 1 DM
A. İmmunolojik sebeplerle olan
B. İdiopatik
II- Tip 2 DM
III- Diğer Spesifik Alt Tipler
A. Pankreas beta hücresi fonksiyon bozukluğuna neden olan genetik bozukluklar (Maturity Onset Diabetes of the Young =MODY 1-6)
B. İnsülin aktivitesindeki genetik bozukluklar
C. Ekzokrin pankreas hastalıkları
D. Endokrinopatiler
E. İlaç veya kimyasal maruziyeti
F. Enfeksiyonlar
G. İmmun aracılı DM'nin yaygın olmayan formları
H. DM ile birlikte görülebilen diğer genetik sendromlar
IV- Gestasyonel DM

Tip 1 DM hastalığı çoğunlukla çocukluk ve gençlik çağlarında ortaya çıkan, ileri derecede insülin hormonu yetmezliği nedeniyle hastaların ömür boyu insülin hormonunu enjeksiyon yoluyla dışarıdan almak zorunda oldukları kronik bir hastalıktır. Tip 1 DM hastalığı literatürde kronik otoimmün hastalıklar grubu içinde incelenmektedir. Pankreas beta hücrelerinin otoimmün harabiyeti sonucu insülin hormonu üretilmemekte ve hastalar insüline bağımlı hale gelmektedir. Tip 1 DM hastaları tüm DM hastalarının yaklaşık %5-10'unu oluşturmaktadır (7).

Tip 2 DM hastalığı ise genellikle ileri yaşlarda ortaya çıkan, insülin salınımında kısmi yetersizlik veya periferik dokularda insülin direnci sonucu gelişen kronik metabolik bir hastalıktır. Tüm DM hastalarının yaklaşık %90-95'ini oluşturmaktadır. Tip 2 DM hastalığı, görülme sıklığının her geçen yıl süratle artması ve olguların çoğunda gelişen ağır komplikasyonları nedeni ile tüm dünyada önemli bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (2).

Literatürde Tip 1 ve Tip 2 DM grubuna dahil edilmeyen diğer grupların ise DM hastalarının yaklaşık %5'ini oluşturduğu belirtilmektedir. Bu gruplardaki hastalıklar tek gen bozukluğuna (MODY 1-6) bağlı olabildikleri gibi, Down sendromu, Turner sendromu, Klinefelter sendromu gibi kromozomal hastalıklarla birlikte de görülebilmektedir (1).

5.1.4. Tanı

WHO (Dünya Sağlık Örgütü) ve Amerikan Diabet Birliği (ADA)'nin ortaklaşa önerdikleri DM tanı kriterleri (8);

- 1- HbA1C \geq %6.5 olması
- 2- Açlık kan glikozu (APG) \geq 126 mg/dl olması (Ölçüm gece boyunca, en az 8 saatlik açlıktan sonra sabah yapılmalıdır.)
- 3- OGTT'de (Oral Glikoz Tolerans Testi) 75 g glukoz yüklendikten sonra 2. saat sonrasında kan glikozu \geq 200 mg/dl olması
- 4- Klasik hiperglisemi belirtileri gösteren hastada rastgele ölçülen kan glukozu \geq 200 mg/dl olması şeklindedir.

Bu kriterlerden herhangi birisinin mevcudiyeti, DM tanısı için yeterlidir.

Ayrıca, bozulmuş açlık glikozu (100mg/dl> Açlık Kan Glukozu \geq 125 mg/dl), bozulmuş glikoz toleransı(140mg/dl> OGTT 2.saat \geq 199mg/dl) ve HbA1C'nin % 5.7- 6.4 değerlerinde olması da DM için artmış risk faktörü olarak düşünülmektedir.

5.1.5. Epidemiyoloji

WHO'ya göre DM, 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunudur (9). 2025 yılında tüm dünyada yaklaşık 300 milyon DM hastası olacağı tahmin edilmektedir (2). Özellikle Tip 2 DM, her ne kadar orta ve ileri yaş hastalığı olarak bilirse de epidemiyolojik veriler, gençlerde de Tip 2 DM'nin giderek arttığını göstermektedir (10). 2009 yılında yapılan bir prevalans çalışmasında, önümüzdeki 20 yıl içinde, tüm dünyada diabetli kişi sayısının % 50 artacağı öngörülmektedir. 2009 yılında 216 ülkenin DM epidemiyolojik verileri kullanılarak yapılan bu çalışmada tüm dünyada 2010 yılında erişkin yaş grubunda DM prevalansının 285 milyon (% 6.4), 2030 yılında ise 439 milyon (%7.7) olacağı bildirilmiştir. Ülkeler arası DM prevalansının oldukça farklılık gösterdiği de ifade edilmektedir. Örneğin 2010 yılında DM prevalansı Uganda'da %2.2, Çin'de %4.2, Malezya'da %11.6, ABD'de %10.3, İngiltere'de %3.6, Suudi Arabistan'da %16.8, Türkiye'de ise %8 olacağı ifade edilmiştir (11). Yapılan birçok çalışmada özellikle bazı etnik topluluklarda, örneğin Afrikalı Amerikalılar, Asyalılar ve Pasifik adaları kökenli bireylerde 20 yaş altı Tip 2 DM insidansının gittikçe artan bir ivme kazandığı belirtilmektedir (12,13).

Türkiye'de ise diyabet prevalansına ilişkin ilk çalışma 1997-1998 yıllarında yürütülen Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması'dır (TURDEP-I). Bu çalışmada DM prevalansı %7.2 olarak bulunmuştur. 2010 yılında biten TURDEP-II çalışmasının ön sonuçlarına göre ise ülkemizde DM prevalansı son 12 yılda %90 artarak % 13.7'ye ulaştığı tespit edilmiştir (14,15). Bu durum kaygı verici boyutlara doğru ilerlemektedir. WHO diyabet konusunda halkın bilinçlendirilmesi ve toplumsal önlemler alınması konusunda ülkeleri uyarmaktadır.

5.1.6. DM komplikasyonları

DM hastalarında gelişen komplikasyonlar hastalığın ciddi mortalite ve morbiditesinden sorumludur. Özellikle Tip 2 DM hastalarında tanı konmadan önce uzun bir asemptomatik hiperglisemik döneminin olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu grup hastaların çoğunda tanı aldıkları dönemde komplikasyonlar da gelişmiş olabilmektedir (16).

DM'nin komplikasyonları akut ve kronik olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Akut komplikasyonlar; diyabetik ketoasidoz ve hiperglisemik hiperosmolar komadır. DM'nin akut komplikasyonları ciddi yaşamsal tehdit oluşturabilmektedir.

DM'nin kronik komplikasyonları ise makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Gerek makrovasküler gerekse de mikrovasküler komplikasyonlarda ortak noktanın endotel hasarı olduğu bir çok yayında ifade edilmektedir (17,18,19). DM'de endotel hasarına neden olabilecek birçok farklı metabolik olay da suçlanmıştır. Hiperglisemi, dislipidemi, hipertansiyon, hiperinsülinemi gibi metabolik olaylar, DM hastalarındaki endotel hasarı ve vasküler problemlerden sorumlu tutulmaktadır. Ayrıca DM hastalarında gelişen tromboza yatkınlık, kanda FFA (serbest yağ asidi) yüksekliği, oksidatif stres, kanda leptin yüksekliği, sempato-adrenal sistem aktivasyonu, sitokin-aracılı enflamasyon, protein kinaz C aktivasyonu gibi olayların da vasküler hasarla ilişkili olabileceği literatürde belirtilmektedir (16).

DM'nin kronik komplikasyonlarından olan makrovasküler komplikasyonlara, aterosklerotik kalp hastalığı, periferik vasküler hastalık ve serebrovasküler hastalıklar örnek olarak verilebilir. DM'in bu komplikasyonu, ağır organ hasarına neden olduğundan, ölüme sonuçlanabilecek kadar ciddi durumlara da yol açabilmektedir (20).

DM'nin kronik hasarlarından ikinci grubunu ise mikrovasküler komplikasyonlar oluşturur. Mikrovasküler komplikasyonlar sonucu böbrek hasarı yapan nefropati, göz hasarı oluşturan retinopati ve sinir hasarına neden olan nöropatiler meydana gelmektedir.

Tip 2 DM'nin mikrovasküler komplikasyonlarının en önemli sonuçlarından olan diyabetik nöropati, tüm dünyada DM hastalarında artmış mortalite, morbiditenin sıklıkla nedenidir. Diyabetik nöropati genellikle ayak ülserleri ile başlayıp, gangren ve kayıplara kadar giderek hastanın yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen nontravmatik ekstremitte amputasyonlarının % 50-75'inden de sorumlu tutulmaktadır (21).

Diyabetik nöropati geniş bir grup hastalığı kapsamaktadır. Bu nedenle Amerikan Diyabet Birliği (ADA), diyabetik nöropatiyi etiyopatogenezine göre sınıflandırmıştır.

ADA'nın Diyabetik Nöropati Sınıflandırması:

1-Hızlı ve geri dönüşlü olan tip (Hiperglisemik nöropati)

2-Yaygın simetrik polinöropati

- Akut sensöriyel nöropati

- Kronik sensörimotor nöropati (Diyabetik polinöropati= DPN)

- Otonomik nöropati

3-Fokal ve multifokal nöropatiler

- Fokal ekstremitte nöropatisi (mononöropati ve tuzak nöropatileri)

- Kraniyal nöropati

- Proksimal motor nöropati (amyotrofi)

- Trunkal radikülönöropati

- Kronik enflamasyonun eşlik ettiği demyelinizan nöropati

Diyabetik nöropatiler içinde yaygın simetrik polinöropati grubunda bulunan kronik sensorimotor nöropati (DPN, diyabetik polinöropati) en yaygın görülen tiptir. Fakat diyabetik polinöropati hastalarının neredeyse yarısı asemptomatiktir. DPN ancak semptomatik olduğunda, dikkatli bir fizik muayene ile tanısı konulabilir. Bu komplikasyonun duyuşsal belirtileri, özellikle alt ekstremitelerde ağrı, duyu kaybı, hiperestezi, derin ağrı, uyuşukluk, yanma ve keskin batma hissidir (21). Fizik muayenede simetrik eldiven-çorap tarzı duyu kusurları, vibrasyon, dokunma ve pozisyon algısında kayıp, anormal sıcak-soğuk algısı olabilmektedir. DPN'in motor bulguları ise diz ve ayak bileği reflekslerinde azalma veya yok olma şeklinde görülebilmektedir.

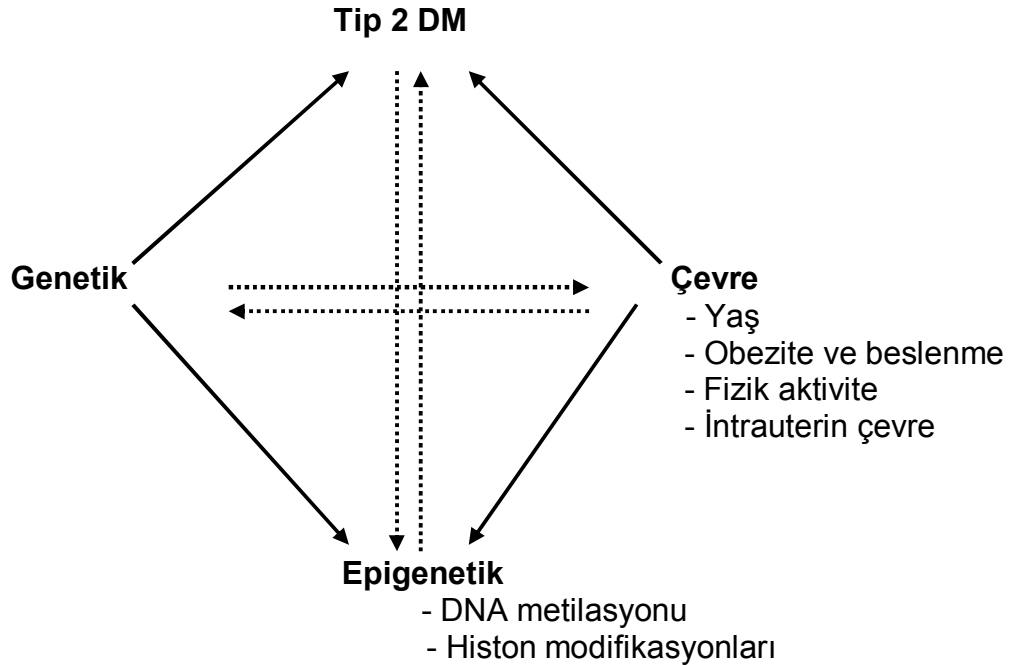
Diyabetik polinöropatiden korunmanın bilinen en etkin yolu hipergliseminin kontrol altına alınmasıdır. Diyabetik polinöropati gelişmesinde en önemli faktörün uzun süredir var olan hiperglisemik durum olduğu düşünülmektedir. Ancak aynı şekilde uzun süredir hiperglisemisi olan hastaların bir kısmında diyabetik polinöropati gelişip, diğerlerinde neden gelişmediği halen bilinmemektedir. Son yıllarda kişilerin genetik yapısındaki farklılıkların bu durumdan sorumlu olabileceği üzerine düşünceler giderek yaygınlaşmaktadır. Bu farklılıkların insanların polimorfik yapılarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (22).

Yapılan çalışmalarda DM hastalarındaki nöropatilerin %10'unun DM dışı nedenlerle gelişebildiği belirlenmiştir (23). Bu DM dışı gelişen nöropati nedenleri arasında kronik inflamatuvar demyelinizan nöropati, B12 vitamin yetmezliği, hipotiroidizm ve üremi sayılabilir. Diğer nedenlerle gelişen bu nöropatiler, diyabetik nöropatilerin dışında tutulmaktadır. Nöropati gelişen DM hastasında nöropatinin DM'den dolayı olup olmadığının belirlenmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle DPN tanısı koyarken elektrofizyolojik yöntemlere başvurulurken hem diğer nöropati nedenleri dışlanmakta hem de nörolojik bozukluğun tek odaklı veya çok odaklı olup olmadığının ayrımını yapabilmek mümkün olabilmektedir (21).

Nöropati komplikasyonunu önleyebilmek için DM hastalarında DPN tanısını erken dönemde koymak, hem uygun tedavi başlamak hem de hastaların artmış morbidite, mortalite ve psiko-sosyo-ekonomik problemlerden korunması açısından yarar sağlayabilir.

5.1.7. Tip 2 DM Etiyolojisi

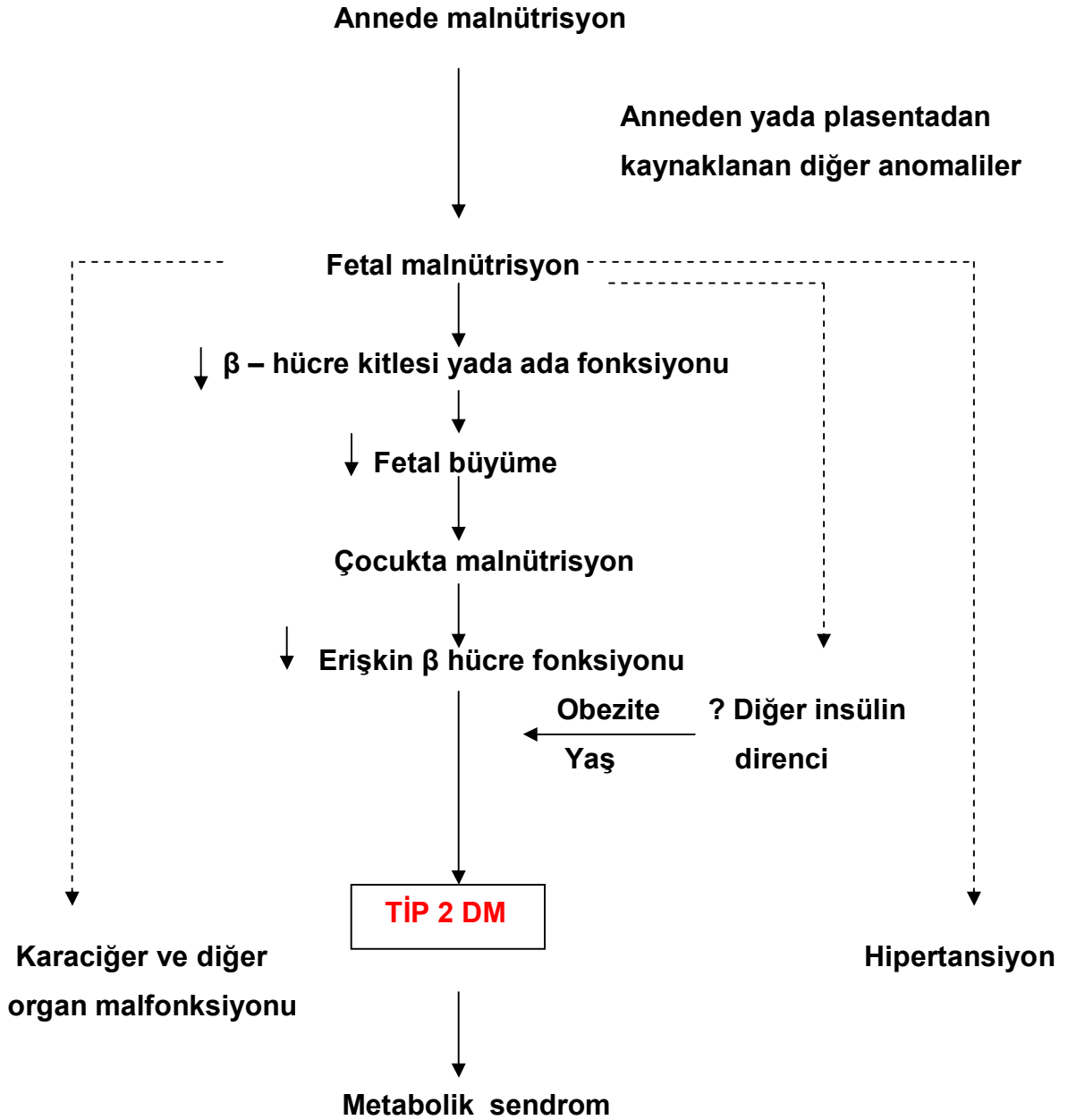
Tip 2 DM, multifaktöryel kalıtım özelliği gösteren sistemik ve metabolik bir hastalıktır. Tip 2 DM gelişiminde şekil 1'de gösterildiği üzere birçok gen ve çevresel faktörün birbiriyle etkileşim halinde olduğu yapılan araştırmalarda ortaya konmuştur. Bu poligenik ve çevresel faktörler hem Tip 2 DM gelişimi hem de komplikasyonların gelişiminden sorumlu tutulmaktadır (24).



Şekil 1: Tip 2 DM oluşumunda etkili olan patogenetik mekanizmalar

Tip 2 DM gelişiminde çevresel faktörler arasında başta obezite olmak üzere sedanter yaşam biçimi ve kentsel beslenme şekli sayılabilir (11). Tip 2 DM'nin tüm dünyada epidemik bir sorun haline gelmesinde toplumların sosyal, kültürel, ekonomik yapısı ve davranışsal eğilimlerinin büyük katkısı olduğu bildirilmektedir (25). Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda fetusun intrauterin dönemde içinde bulunduğu çevre koşullarının da yaşam süresi boyunca Tip 2 DM gelişimine etkisi olduğu ifade edilmektedir.

Sadece doğum sonrası değil anne karnında da büyüme ve gelişme, kompleks ve dinamik bir süreçtir. İntrauterin dönemde karşılaşılan olumsuz çevre koşulları fetusun erişkin yaşamda sahip olacağı hastalıkları belirlemektedir. Fetusun genetik yapısının yanı sıra annenin beslenme şekli ve plasental fonksiyonların yeterliliği, intrauterin büyüme ve gelişmeye çok önemli katkılar sağlamaktadır. Gelişimsel programlanma olarak ifade edilen bu durum özellikle tip 2 DM, obezite, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi kronik hastalıkların oluşum süreciyle yakından ilişkilendirilmiştir (26). Şekil 2’de Tip 2 DM gelişiminin intrauterin çevre ile ilişkisinden bahsedilmektedir.



Şekil 2: Tip 2 DM gelişiminin intrauterin çevre ile ilişkisi (Hales CN ve ark, 2001’den uyarlanmıştır.)

İntrauterin hayatta yalnız kötü beslenmenin değil aynı zamanda fazla beslenmenin de ileri yaşlarda obezite ve DM gelişimini kolaylaştırdığı yapılan bazı çalışmalarda ortaya konmuştur. Özellikle diyabetik anne bebeklerinde bu riskin yüksek olduğu belirtilmektedir. Diyabetik annenin gebeliği sırasında oluşan hiperglisemik ortam, fetüste insülin salınımını sürekli arttırarak, bebeğin makrozomik doğmasına neden olmaktadır. Makrozomik doğan diyabetik anne bebeklerinde 10-16 yaşlarında glikoz tolerans bozuklukları, daha ileri yaşlarda ise obezite ve Tip 2 DM gelişim risklerinin diğer bebeklerden daha yüksek olduğu ifade edilmektedir. Ancak diyabetik anne bebeklerinde ileri yaşlarda Tip 2 DM gelişim riskinin yüksek olmasından sadece intrauterin olumsuz koşullar değil aynı zamanda anneden aktarılan ve DM gelişimine yatkınlık oluşturan gen polimorfizmleri de sorumlu tutulmaktadır (28).

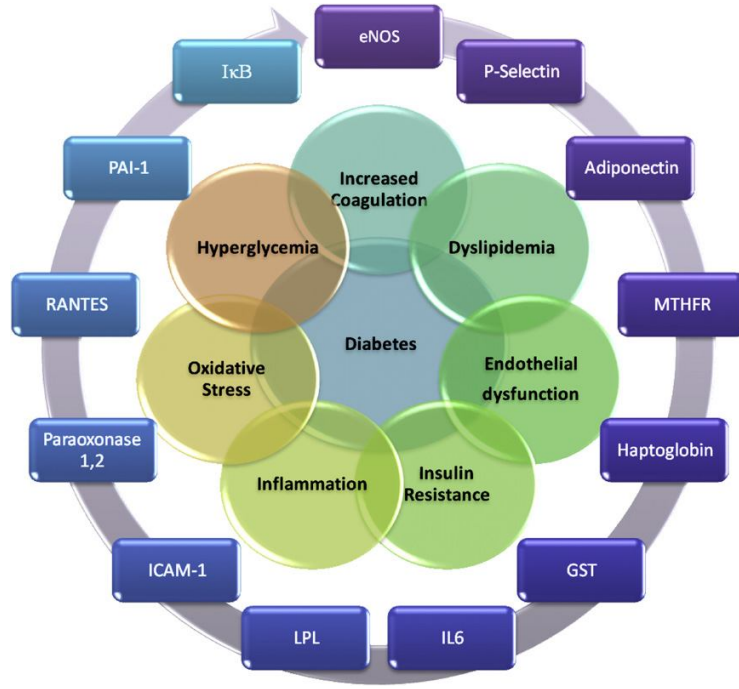
Tip 2 DM'nin genetik etiolojisi bilim adamları için halen önemli bir araştırma konusudur. Yapılan çalışmalar sonucu elde edilen birtakım bulgular, genetik yapının Tip 2 DM gelişimindeki önemli etkisini ortaya koymaktadır. Bu bulgulardan biri, küçük etnik topluluklar üzerinde yapılan çalışmalardan elde edilmiştir. Pima yerlileri, Mikronezyalı, Avusturalyalı Aborjinler ve Meksikalı Amerikalılar gibi etnik yapısı bozulmamış küçük toplumlarda Tip 2 DM prevalansının çok yüksek olduğu tespit edilmiştir (29). Etnik yapısı bozulmamış küçük toplumlarda, atalarından gelen mutant veya polimorfik allel frekansının diğer toplumlardan daha yüksek olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı hastalıkların görülme insidansı bu topluluklarda yüksek oranda görülebilmektedir. Bu durum belirli bir hastalığın genetik yatkınlığına neden olan polimorfizmlerinin araştırılmasında büyük kolaylık sağlamaktadır. Tip 2 DM'nin etnik yapısı bozulmamış bazı küçük topluluklarda daha yüksek insidansta gözlenmesi, hastalığın genetik yatkınlık ile ilişkili olduğunu akla getirmektedir.

Tip 2 DM'nin genetik faktörlerle ilişkili olduğunu ortaya koyan diğer bulgular ise aile çalışmaları ile ortaya konmuştur. Bireyler arasında akrabalık derecesi ne kadar yakınsa ortak atalardan kalıtılan ortak gen sayısı artmakta, akrabalık derecesi uzaklaştıkça ortak paylaşılan allel sayısı gittikçe azalmaktadır. Multifaktöryel hastalıklarda, genlerin hastalığa katkısı araştırılırken, etkilenen bireylerin akrabalık dereceleri önemli bir faktördür. Hasta bireyler arasında akrabalığın yakınlık derecesi arttıkça ortak atasal genlerin hastalıkla ilişkili olma ihtimali, çevresel etkilerin katkısından daha yüksek olabilmektedir. Bu yönde

yapılan birçok çalışmada Tip 2 DM hastalığının çok gözlemlendiği ailelerde ve 1. derece akrabalarında Tip 2 DM olan kişilerde DM gelişme riskinin, normal popülasyona göre 3.5 kat arttığı tespit edilmiştir (24). Bunun yanı sıra bir bireyin sadece bir ebeveyninde Tip 2 DM varsa, o bireyin ömür boyu DM olma riski %40 iken, her iki ebeveyninde varsa bu riskin % 70'e yükseldiği literatürde belirtilmektedir (30). Yukarıdaki çalışmalar ışığında Tip 2 DM'nin yüksek oranda ailesel özelliğe sahip olması, hastalığın genetik yatkınlıkla ilişkili olduğu hipotezini güçlendirmektedir.

Tip 2 DM hastalığının genetik kökenini araştırmak için ikiz çalışmaları da yapılmıştır. İkiz çalışmaları, genlerin ve çevrenin bir hastalığa katkısını değerlendirmede oldukça önemli çalışmalardır. Monozigotik ikizlerin genotipleri her lokusta ortaktır ve aynı intrauterin ortamı paylaşırlar. Dizigotik ikizler ise aynı intrauterin ortamı paylaşmalarına rağmen genotipleri % 50 oranında ortaklık taşır. Bu nedenle bir hastalık için monozigotik ikizlerde dizigotik ikizlere oranla daha yüksek konkordans mevcut ise bu durum mevcut hastalığın genetik kökeninin güçlü bir göstergesidir. Yapılan ikiz çalışmalarında monozigotik ikizlerde dizigotiklere göre daha yüksek oranda Tip 2 DM için birliktelik gözlenmiştir. Monozigotik ikizlerde her iki kardeşin Tip 2 DM olma olasılığı %70 iken, dizigotik ikizlerde bu oran %10 olarak tespit edilmiştir (30). Bu sonuç Tip 2 DM gelişiminde genetik yapının önemine işaret etmektedir.

DM'in genetik yatkınlığının belirlenmesine rağmen bilinen mendeliyen kurallara uymadığı tespit edilmiştir. Çevresel faktörlerin de hastalığındaki öneminden dolayı Tip 2 DM genetik olarak multifaktöryel kalıtım kalıbına uymaktadır. Şekil 3'te metabolik çevre ve bazı gen polimorfizmlerinin diyabet hastalığı ile yakın ilişkisi gösterilmiştir (31).



Şekil 3: Tip 2 DM'de metabolik çevre ve ilişkili gen polimorfizmleri (Farbstein D ve ark, 2010)

Ayrıca günümüze kadar 40'dan fazla gen hastalıkla ilişkilendirilmesine rağmen Tip 2 DM'nin genetik içeriğinin çok az bir kısmı açıklanabilmiştir (Tablo 2)(30).

Tablo 2: Polimorfizmleri Tip 2 DM gelişiminden sorumlu tutulan aday genler

ADAMTS9	ARAP1 (CENTD2)	BCL11A	CAPN10
CDC123/CAMK1D	CDKAL1	CDKN2A/2B	TLE4
DUSP9	HHEX	HMGA2	HNF1A
HNF1B	HCCA2	IGF2BP2	IRS1
JAZF1	KCNJ11	KCNQ1	KLF14
NOTCH2/ADAM30	PPARG	PRC1	PTPRD
RBMS1	SLC30A8	SRR	TCF7L2
THADA	TP53INP1	TSPAN8-LGR5	WFS1
ZBED3	ZFAND6	ADCY5	DGKB/TMEM195
GCK	GCKR	MTNR1B	PROX1
BCDIN3D/FAIM2	AIF1/NCR3	FTO	GNPDA2
MC4R	NEGR1	SFRS10/ETV5/DGKG	SH2B1
TMEM18			

DM hastalığının yalnız gelişimi değil komplikasyonlarının oluşumunda da genetik yatkınlık olabileceği tahmin edilmektedir. Bu komplikasyonların

gelişiminden sorumlu olabilecek genleri bulmak için birçok araştırma yapılmaktadır. Tip 2 DM komplikasyonlarından sorumlu olabilecek birçok gende polimorfik değişikliklerin olabileceği tahmin edilmekte ve bu yönde araştırmalar devam etmektedir (Tablo 3)(31).

Tablo 3: Polimorfizmleri Tip 2 DM'in komplikasyonlarının gelişiminden sorumlu tutulan aday genler

ACE	ADIPOQ/ACDC	ADIPOR1	AGT
AGTR1	CD40	CTP	COX2
CX3CR1	ENPP1	EPHX2	HL
HSP70-2	GCH1	GSTT1	GSTM1
APOA4	APOE	aP2	GSTP1
IL6	LPL	MT1A	MCP-1
NFKB1	PAI-1	PTPN1	RANTES
VEGF	PPAR-A	MTHFR	PON-2

Genel kabul gören bir hipotezde Tip 2 DM gibi kompleks hastalıkların, birçok gende bulunan yaygın varyasyonların birleşiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu grup hastalıklarda polimorfik olan minör allel frekansı %5'in üzerindedir. Bu polimorfizmlerin birleşimi aynı zamanda olumsuz çevresel faktörlerin de etkilemesi sonucu kompleks hastalık oluşma yatkınlığını da arttırmaktadır (32).

İnsan genomunda oluşan tek nükleotid değişikliklerine, popülasyonun %1'inden azını etkiliyorsa mutasyon, %1'inden fazlasını etkiliyorsa polimorfizm adı verilmektedir. Toplumun %1'inden fazlasını etkileyen tek nükleotid polimorfizmleri (SNP), insanda en önemli genetik varyasyon nedenidir. SNP'ler, bilinen tüm genetik değişikliklerin %90'ını oluşturmaktadır. Genomda her 100-300 baz çiftinde bir SNP olduğu tahmin edilmektedir. Yapılan çalışmalarda insan genomunda 11 milyondan fazla SNP olduğu bildirilmiştir. İnsan genomunun yaklaşık %1.5'i protein kodlayan genlerden oluşmaktadır. Bilinen 20-25.000 gen içinde de yaklaşık 165.000 SNP olduğu tahmin edilmektedir (33). SNP'ler bireyler ve toplumlar arasında protein ekspresyon farklılıklarına yol açabilmektedir. Bu ekspresyon farklılıkları kalıtılabilmektedir. SNP'ler yalnızca üzerinde buldukları geni değil, yakınında bulunan diğer genlerin ekspresyonunu da etkileyebilmektedir. Bu nedenlerle SNP'ler, mendelien kalıtıma uymayan kompleks geçişli multifaktöryel

hastalıklar ve komplikasyonlarının etiyopatogenezinden sorumlu tutulmaktadır (34).

Tip 2 DM'in vasküler komplikasyonlarına neden olabilecek genler arasında MTHFR geni de yer almaktadır. MTHFR geninin en yaygın polimorfik bölgeleri olan C677T ve A1298C bölgelerindeki değişiklikler de mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkilendirilmiştir (31). Ancak tek başına MTHFR gen polimorfizmleri ile diyabetik nöropati arasında ilişki olup olmadığına dair yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

DM hastalığının etiyopatogenezinde rol alan genetik faktörler arasında sadece genomdaki tek baz değişiklikleri değil, aynı zamanda epigenetik faktörlerin de rol aldığı literatürde belirtilmektedir. Epigenetik faktörler, nükleotid dizisinde değişiklik olmaksızın gen fonksiyonunu etkileyen ve kalıtılabilen faktörlerdir. Epigenetik faktörler arasında yer alan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gen ifadesini değiştirerek, yaşam boyu çevresel uyarılara karşı genomun cevabını etkileyebilmektedir. Aileden kalıtılarak aktarılan bu epigenetik faktörler, olumsuz çevre koşulları ile karşılaştıklarında bireyde Tip 2 DM gibi çeşitli multifaktöryel hastalıklara yatkınlık şeklinde karşımıza çıkabilmektedir. Özellikle MTHFR genindeki C677T ve A1298C bölgelerindeki polimorfizmler, genlerin metilasyon paternini değiştirmekte ve organizmanın çevreye vereceği yanıtı etkileyebilmektedir (30).

5.2. Metiltetrahidrofolat Redüktaz (MTHFR)

5.2.1. MTHFR enziminin yapısı ve görevi

MTHFR enzimi ilk olarak Frosst ve arkadaşları tarafından 1995 yılında insan dokularından elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada MTHFR enziminin moleküler ağırlığının yaklaşık 77 kDa olduğu; homodimer olarak tanımlanan 2 alt birimden oluştuğu ve bu alt birimlerin 40 kDa ağırlığında N- terminal katalitik dizi ile 37 kDa ağırlığında C – terminal düzenleyici dizi içerdiği tespit edilmiştir. Katalitik dizi olan N-terminal bölgenin FAD ve 5,10- metilen THF'a, C- terminal düzenleyici dizinin ise S- Adenozil Metionin (SAM)'e bağlandığı bulunmuştur (35,36).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla günümüzde insan dokularında farklı MTHFR polipeptidlerinin olduğu da bilinmektedir (37). MTHFR enzimi insanda tüm dokulardan izole edilebilmiş ve aktivite gösterdiği de tespit edilmiştir. Moleküler

düzyeyde bu aktivitenin gösterilmesi için farelerde yapılan ekspresyon çalışmalarında en düşük enzim aktivitesinin karaciğerde olduğu; enzimin beyin ve böbrekte, karaciğerde olduğundan 2-3 kat, testiste ise 10 kat daha fazla aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (38). İnsanda da aynı aktivitenin olduğu düşünölmektedir.

Fonksiyonel olarak MTHFR enzimi incelendiğinde ise en önemli görevinin folik asit metabolizmasında düzenleyici bir role sahip olduğu görölmektedir (39). Bilindiği üzere folik asit, esansiyel bir vitamin olup insan organizması için dışarıdan alınması gerekmektedir. Diyetle alınan folik asit barsaklarda bakteriler tarafından okside olarak tetrahidrofolat (THF)'a indirgenmektedir. Barsaktan geçen folat plazmada 5-metil tetrahidrofolat (5-metil THF)'in monoglutamat deriveleri olarak dolaşmaktadır (40). Buradan hücre sitoplazmasına reseptör aracılı endositoz ile alınan folat, hücre içerisinde THF kofaktörleri olarak timidin, pürin, metionin sentezi gibi birçok biyosentetik reaksiyonda, tek karbon metabolizmasında, DNA sentez ve tamirinde önemli rol oynamaktadır. Enzimin sitoplazma dışında mitokondride de önemli görevleri mevcuttur (41).

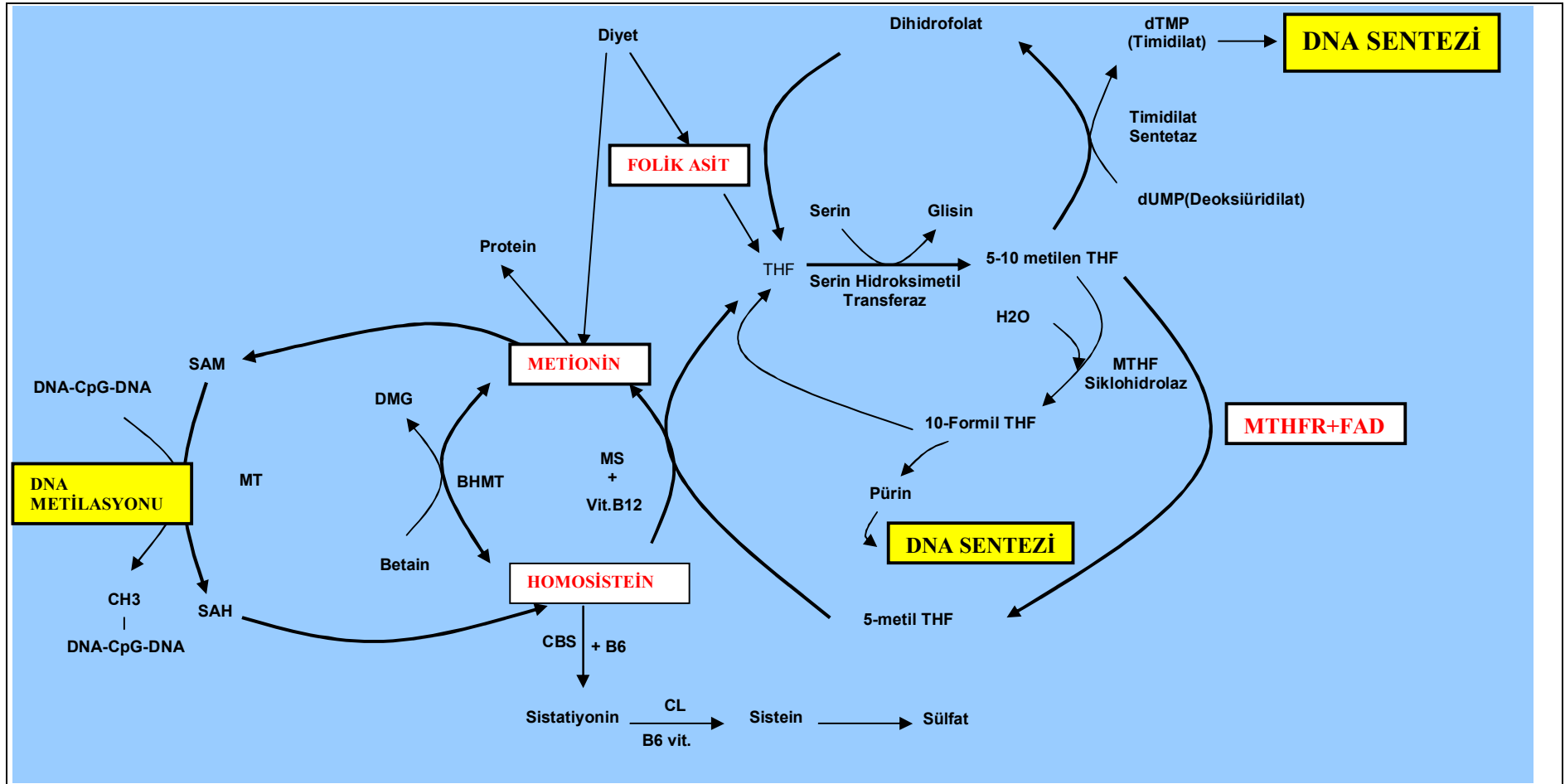
Folat kofaktörleri sitoplazmada başlıca 3 biyosentetik yolda yer almaktadır. Şekil 4'te gösterildiği üzere bu biyosentetik yollar; denovo pürin sentezi, denovo timidilat (dTMP) sentezi ve homosistein remetilasyonudur. Bütün bu önemli biyosentetik yollardaki folat kofaktörlerinin etkisi, sitoplazmada bulunan MTHFR enziminin aktivitesi ile yakından ilişkilidir. Toplumda sık görölen MTHFR gen polimorfizmleri, enzimatik aktiviteyi azaltmakta ve bu biyokimyasal reaksiyonları olumsuz yönde etkilemektedir (42).

Bunun yanı sıra folatın en önemli etkilerinden biri dTMP sentezine katılmasıdır. Folatın ana metaboliti olan THF, sitoplazmada piridoksal fosfat (PLP) bağımlı serin hidroksimetil transferaz (SHMT) enzimi aracılığı ile 5,10-metil THF'a dönüşmektedir. Bu reaksiyonda serin aa'i tek karbon vericisi olarak kullanılmaktadır. 5,10 –metil THF, timidilat sentaz enzimi aracılığı ile tek karbonunu üridilat (dUMP)'a vererek dTMP oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu sırada oluşan dihidrofolat, tekrar THF'a dönüşerek folatın yeniden kullanılabilmesini sağlamaktadır. Bu reaksiyon DNA sentezinde önemli bir basamaktır. Bu reaksiyon gerçekleşemez ise timin yerine urasil DNA'ya entegre olmaktadır. DNA sentezi sırasında timin yerine urasilin geçmesi, DNA'da nokta

mutasyonlarına, tek ve çift zincir DNA kırıklarına, kromozom kırıklarına, mikronükleus oluşumuna ve DNA tamir kusurlarına da yol açabilmektedir (43).

Ayrıca folik asitin aktif metaboliti olan 5,10-metil THF ayrıca denovo pürin sentezine de katılmaktadır. Bu metabolit, metiltetrahidrofolat siklohidrolaz enzimi aracılığı ile 10-formil THF'a dönüşmektedir. 6 adet enzimin oluşturduğu pürinozom adı verilen pürin sentezinde etkili olan bir komplekste 10-formil THF'da kofaktör görevini üstlenmektedir (Şekil 4) (44).

Bunun yanı sıra folat kofaktörleri, MTHFR enzimi aracılığı ile homosistein ve metionin aminoasidlerinin metabolizmasını da etkilemektedir. 5,10-metil THF, sitoplazmik bir enzim olan MTHFR aracılığı ile geri dönüşümsüz olarak 5-metil THF'a indirgenmekte ve oluşan 5-metil THF, homosisteini metilleyerek metionine dönüştürmektedir. Metionin, hücre proliferasyon ve gen ekspresyon olaylarında önemli görevleri olan bir aminoasittir. Homosisteinden transmetilasyon reaksiyonu ile oluşan metionin aminoasidi, ya protein sentezine girer, yada S-adenozil metionin (SAM) 'e dönüşür. Organizmada SAM, önemli bir metil grubu vericisi olarak görev yapmaktadır (45). Bu nedenle SAM metabolizmasındaki bozukluklar, hücresel büyüme, farklılaşma ve fonksiyonu üzerinde önemli etkilere yol açabilmektedir (46). Ayrıca SAM'in bu metilasyon etkisi, DNA metilasyon mekanizmasında da önemli bir role sahiptir. DNA metilasyon bozuklukları, bir çok genin ekspresyonunu etkilemekte, kromozomlarda yapısal ve sayısal problemlere yol açabilmektedir (43). Şekil 5'te folat yetmezliğine bağlı meydana gelebilen genetik değişikliklerden bahsedilmiştir.

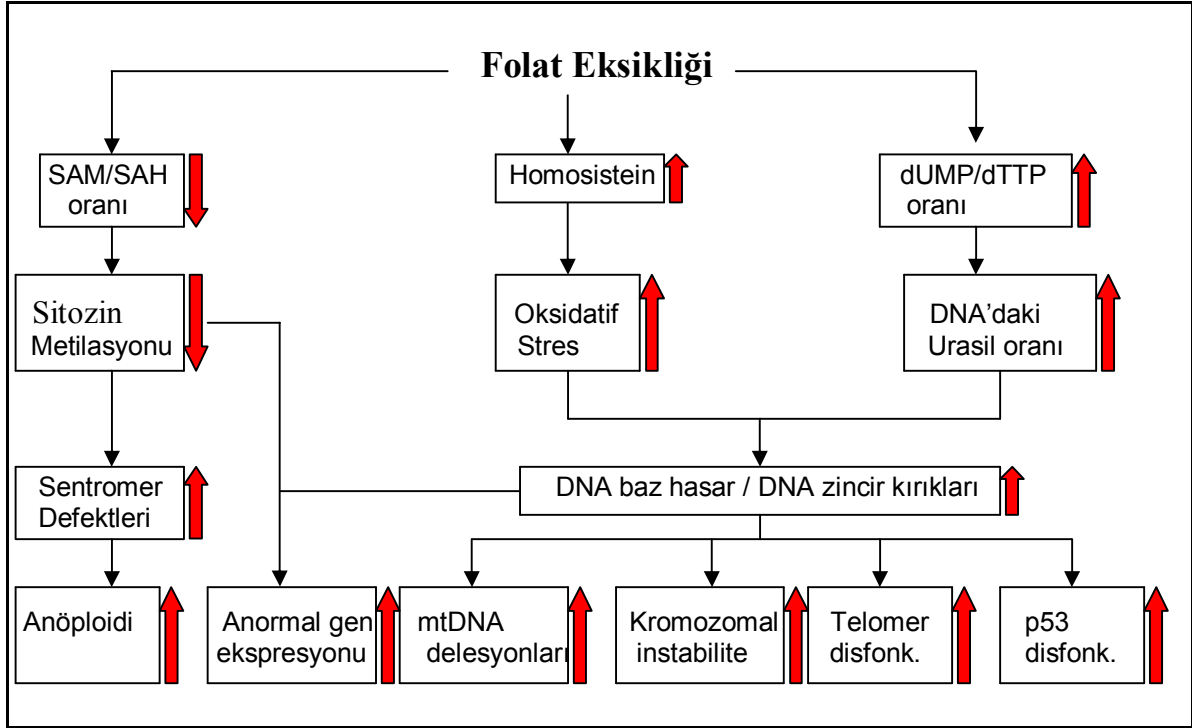


Şekil 4: MTHFR ve homosistein metabolik yolağı

- SAM: S-adenozilmetiyonin
- CL: Sistatyonin gamma liyaz
- THF: Tetrahidrofolat

- BHMT: Betain homosistein metiltransferaz
- MT: Metil transferaz
- SAH: S-adenozilhomosistein

- MTHFR: Metiltetrahidrofolat redüktaz
- CBS: Sistatyonin beta sentaz



Şekil 5: Folat yetmezliğine bağlı meydana gelebilen genetik değişiklikler

(Stover PJ ve ark, 2011'den uyarlanmıştır.)

SAM oluşumu organizmada MTHFR enzimi aracılığı ile homosistein transmetilasyonu sonucunda gerçekleşir. Bu durum organizma için önemli bir homosisteinin detoksifikasyon mekanizmasıdır. MTHFR geninde bulunan polimorfik değişiklikler, vücutta homosistein birikimine yol açmaktadır. Homosisteinin yüksek düzeyleri ise hücreler için toksik etki oluşturduğu ve başta kardiyovasküler hastalıklar olmak üzere birçok vasküler olayda risk faktörü olduğu literatürde bildirilmektedir (47). Sonuç olarak MTHFR enzimi; DNA sentezi ve metilasyonu arasındaki dengeyi düzenlemekte ayrıca homosisteinin metabolizmasını da etkileyerek çeşitli vasküler olayların etiyopatogenezine katkıda bulunmaktadır.

5.2.2. Homosistein yapı ve özellikleri

Homosistein, kükürt içerikli bir aminoasit olmasına rağmen proteinlerin yapısına girmemektedir. Kimyasal olarak sistein aminoasidine çok benzer. Sistein aminoasidinden farklı olarak fazladan bir metil grubu taşımaktadır.

Homosistein, diyetle dışarıdan alınamamakta, organizmada tek karbon metabolizmasında bir ara ürün olarak metioninden sentezlenmektedir. Homosistein, vücutta hemen her dokuda sentezlenebilmektedir. MTHFR enziminin

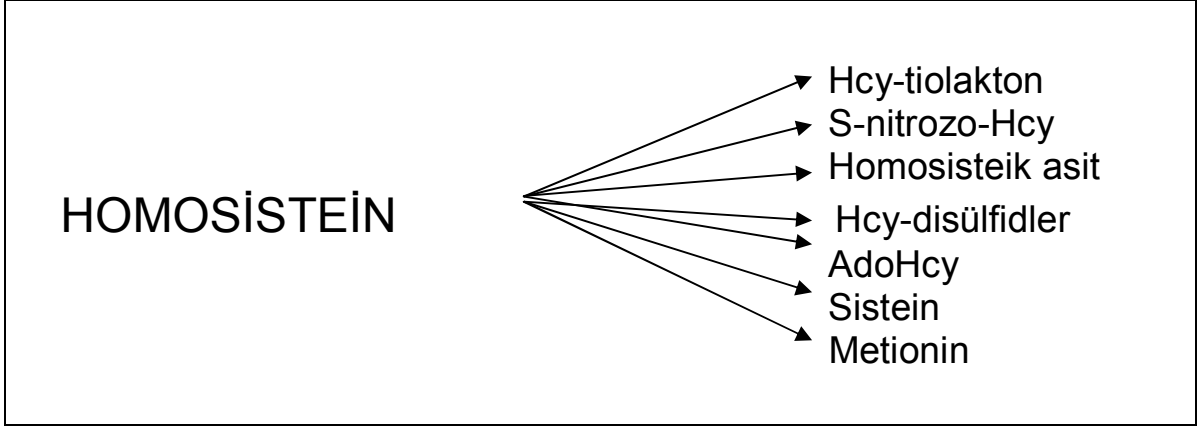
rol aldığı bir reaksiyon ile de metillenerek tekrar metionine dönüşmektedir. Homosisteinden sentezlenen metionin ise hücrede protein sentezine girmekte veya SAM'e dönüşerek DNA, protein, fosfolipid ve nörotransmitterlerin metilasyonunda önemli rol oynamaktadır (48).

Homosistein eksikliğine literatürde rastlanmazken, homosisteinin plazmada yüksekliğinin hücrelerde toksisiteye yol açabildiği bilinmektedir. Homosisteinin organizmada birikimi, remetilasyon ve transsülfürasyon reaksiyonları ile engellenmektedir. Transsülfürasyon reaksiyonunda sistatyonin beta sentaz enzimi aracılığı ile homosistein, özellikle karaciğer ve böbrekte, sisteine dönüşmektedir. Homosistein, vasküler doku ve deride ise sadece MTHFR aracılı remetilasyon reaksiyonu ile detoksifiye olabilmektedir. Çünkü bu dokularda transsülfürasyon enzimleri bulunmamaktadır (49). Ayrıca yalnızca karaciğer dokusunda ortamda betain varsa kısa bir yol olarak, betain homosistein metiltransferaz enzimi aracılığı ile de metillenerek homosistein, metionine dönüşebilmektedir (50).

Homosistein sentez ve detoksifikasyon reaksiyonlarında görev alan enzim veya enzimi kodlayan genlerdeki mutasyonlar, homosistein yüksekliğine neden olabilmektedir. Homosisteinin orta derecedeki yüksekliği bile pıhtılaşma sistemini aktifleyerek arteriosklerozis ve trombozis gelişimine de yol açabilmektedir (51). Bu durum zaman içerisinde kardiyovasküler hastalıklar, inme, demans ve Alzheimer hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar için bir risk faktörü olduğu da literatürde bildirilmektedir (49).

Homosisteinin plazmada yükseldiğinin hem vasküler endotelial hücreler hem de nöronlar üzerinde toksik etkileri olduğu bilinmektedir. Homosistein, endotelial hücre proliferasyonunu inhibe etmekte ve endotelial hücre yaşlanmasını hızlandırdığı yapılan araştırmalarda belirtilmektedir (52). Bu etkisi, gerek oksidatif hasar oluşturması gerekse de hücrede metilasyon olaylarını inhibe ederek gen ekspresyon değişiklikleri oluşturması ile açıklanmaktadır. Ayrıca vasküler düz kas hücrelerinde kollajen sentezini arttırıp hücre büyümesini tetikleyerek aterosklerozis gelişimine katkıda bulunmaktadır.

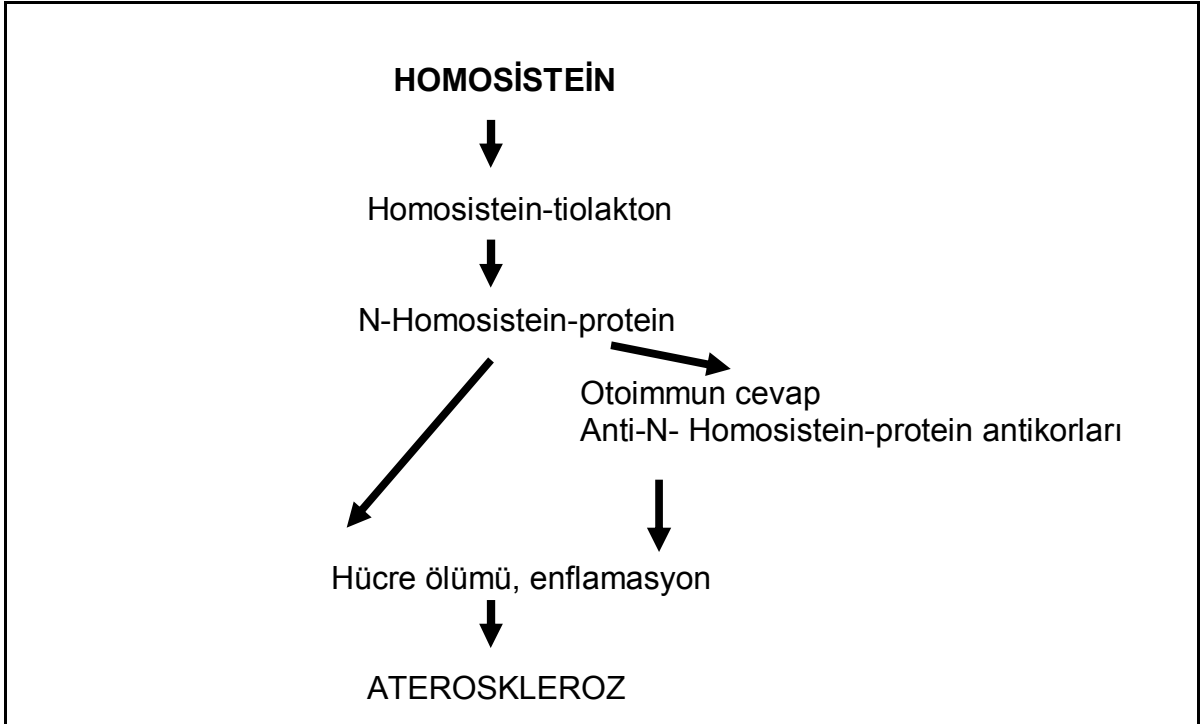
Homosistein toksisitesinden, hücrede dönüştüğü sistein ve metionin dışındaki diğer metabolitleri sorumlu tutulmaktadır. Bu metabolitler, homosistein tiolaktone (Hcy-thiolactone), S-nitroso homosistein, homosisteik asit, homosistein disülfidler, S-adenozil homosistein (AdoHcy)'dir (Şekil 6).



Şekil 6: Homosisteinin organizmada oluşan metabolitleri (Jakubowski H, 2004)

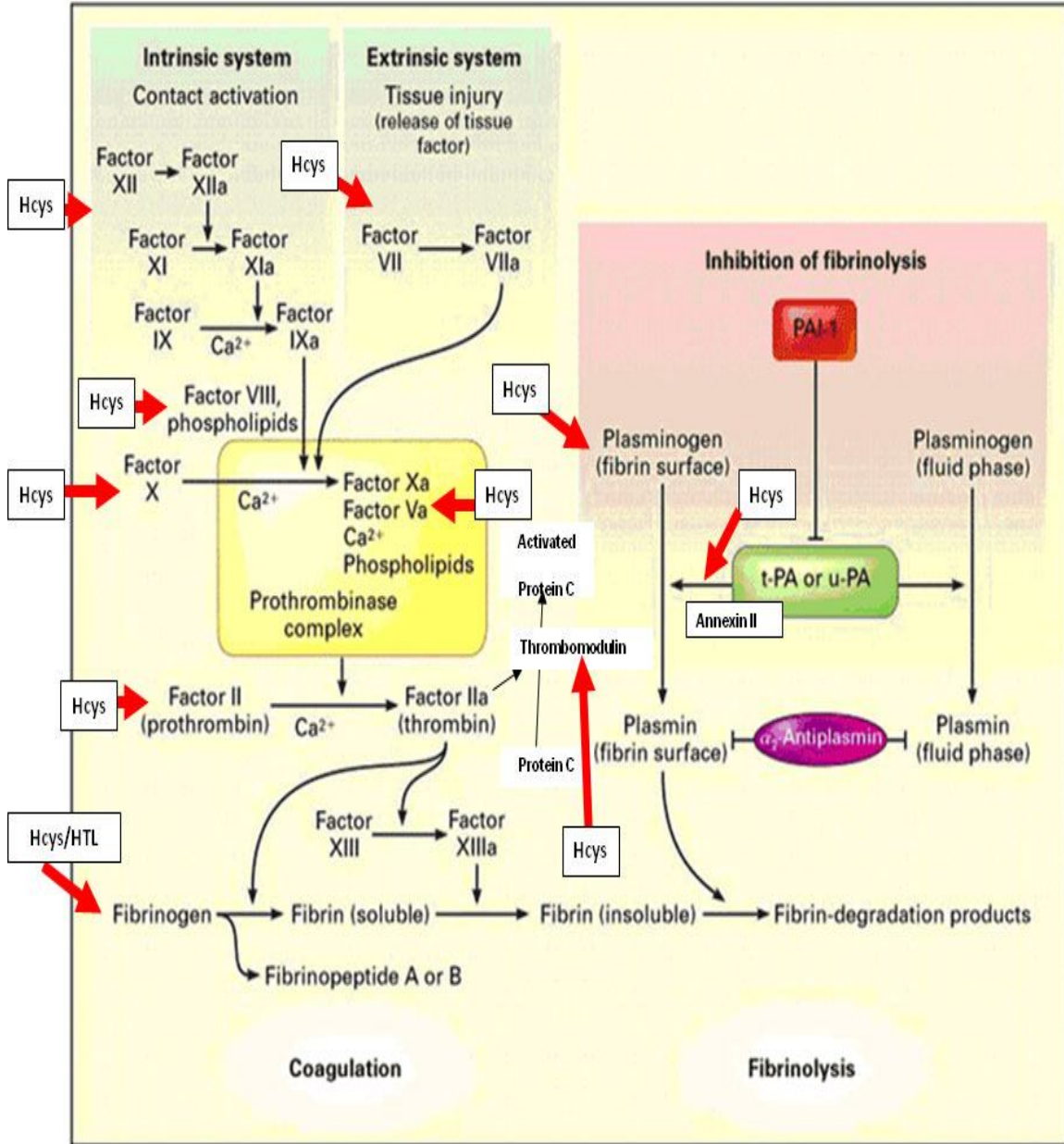
- Hcy: Homosistein - AdoHcy: S-adenozil homosistein

Homosistein tiolakton, proteinlerdeki lizin aminoasidi ile reaksiyona girmektedir. S-nitroso homosistein ise metionin, lösin ve izolösin aminoasitlerine çok benzediği için proteinlerde bu aminoasitlerin yerine geçebilmektedir. Böylece artmış homosistein proteinlerin yapı ve fonksiyonunu bozabilmektedir. Ayrıca homosisteinlenmiş proteinler oksidatif strese daha duyarlı hale gelmektedirler. Homosistein metabolitleri immün yanıtı da tetiklemekte, homosisteinlenmiş proteinlere karşı oluşan otoantikorların, plazma homosistein düzeyi ile orantılı olarak artışı, doku hasarına yol açabilmektedir (Şekil 7) (49).



Şekil 7: Homosisteinin olası ateroskleroz oluşturma mekanizması (Jakubowski H, 2006)

Literatürde hiperhomosisteineminin vasküler endotelde nitrik oksit üretimini azalttığı ve reaktif oksijen ürünlerini arttırdığına ilişkin bulgular mevcuttur (54). Ayrıca başta fibrinojen olmak üzere pıhtılaşma yolunda bulunan diğer proteinlerin aktivitesini değiştirerek aterotrombotik hastalıklara yatkınlık oluşturabilmektedir (Şekil 8) (55). Bu çalışmalar homosistein yüksekliğinin ateroskleroz ve vaskülopatiyeye yatkınlık oluşturabildiğini göstermektedir.



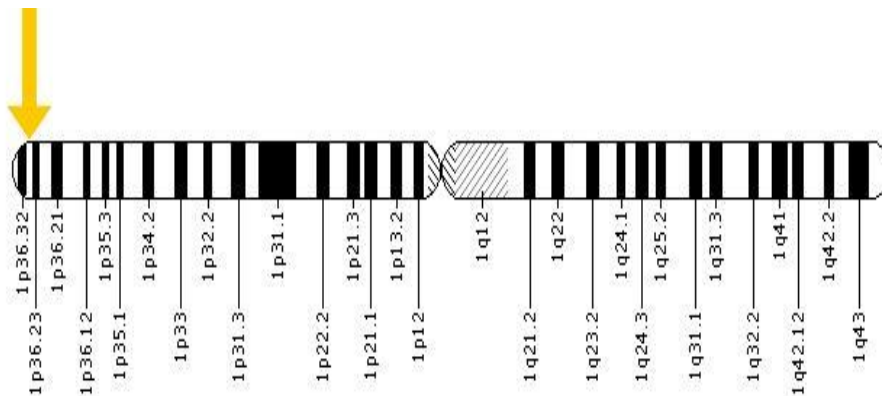
Şekil 8: Homosistein ve onun metaboliti olan homosistein tiolaktonun koagulasyon ve fibrinolitik sistem üzerine olan etkileri (Karolczak K ve ark, 2009)

Ayrıca homosistein metabolitlerinin nöronlar için sitotoksik olduğu çeşitli hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir. Yüksek homosistein düzeyleri amiloid beta peptid toksisitesini potansiyelize ederek Alzheimer hastalığında nöronal hasardan sorumlu tutulmaktadır (56). Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarında hiperhomosisteineminin beyinde dopaminerjik hücrelerde oksidatif hasara yol açarak Parkinson hastalığının etiyolojisine katkıda bulunduğu bildirilmiştir (57). Homosisteinin nörotoksitesini, nöronlarda DNA hasarını, oksidatif stresi arttırması, N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerini aşırı uyarması ve glutamat nörotoksitesini potansiyelize ederek hücreleri apoptozise yönlendirmesi şeklinde açıklayan yayınlar da literatürde mevcuttur (58).

Hiperhomosisteinemi, sitotoksik özelliği ve vasküler hasara yol açması nedeniyle birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Özellikle aterosklerotik kalp hastalığı için bağımsız bir risk faktörüdür. Bunun yanında nöral tüp defektleri (59), sendromik olmayan yarık dudak-damak (60), doğumsal kalp hastalığı (61), depresyon (62), Alzheimer hastalığı ve vasküler demanslar (63), migren, meme kanseri ve diabetik nefropati ile hiperhomosisteinemi ilişkilendirilmektedir. Bütün bu hastalıklarda hiperhomosisteinemiye neden olan en sık nedenin ise MTHFR gen polimorfizmleri olduğu belirtilmektedir (48).

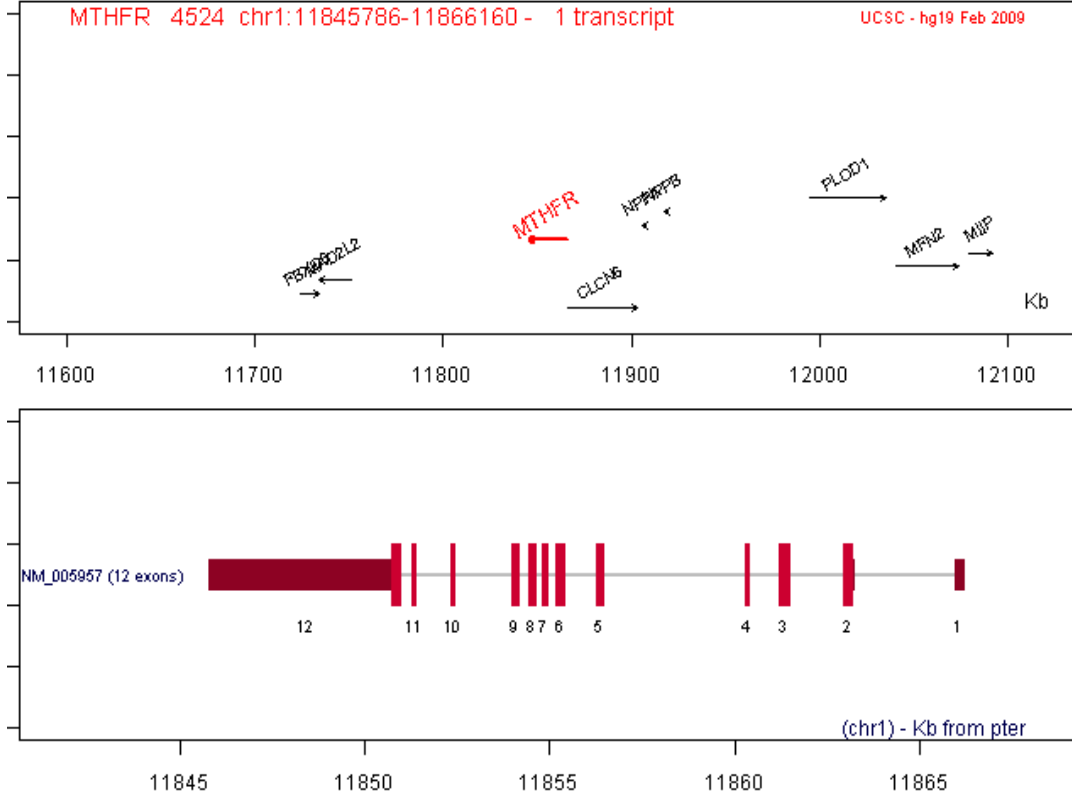
5.2.3. MTHFR geninin yapısı ve görevleri

MTHFR geni, vücutta MTHFR enzimini kodlayan, 1 no'lu kromozomun telomer bölgesine (1p36.3) yerleşmiş fonksiyonel bir gendir (Şekil 9).



Şekil 9: MTHFR geninin 1 nolu kromozom üzerindeki lokalizasyonu (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MTHFR>)

MTHFR geni, 27.374 baz çifti (27.37 kb) büyüklüğünde ve 12 ekzondan oluşmaktadır (Şekil 10). 1 nolu kromozom üzerinde 11845786- 11866159 arasındaki baz dizisinde yer almaktadır.



Şekil 10: MTHFR geninin 1p36.3'teki intron ve ekzonlarının yerleşimi
(<http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/png/MTHFR.png>)

MTHFR geni uzun yıllardır bilinmesine rağmen ilk olarak 2000 yılında genin 3 farklı mRNA ürününün olduğu dokularda tespit edilmiştir. Özellikle 2.8 ve 7.2 kb uzunluğundaki MTHFR geninin mRNA ürünleri, tüm dokularda gözlenirken, 9.8 kb'lık ürünü yapılan çalışmalarda sadece beyin, kas, plasenta ve mide dokusunda gözlenebilmiştir. Bu genin tüm mRNA ürünlerine bakıldığında ise en yüksek olarak kalp, akciğer ve testis dokusunda bulunduğu gözlenmiştir. DNA metilasyonunu da etkileyen MTHFR geninin testis dokusundaki yüksekliği, bu dokuda gerçekleşen normal germ hücre maturasyonu, genomik damgalanma ve DNA onarım sürecine de önemli bir etkisinin olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda MTHFR geninin 3 mRNA ürününün dokulara göre farklılık göstermesi nedeniyle bu genin ekspresyonunun dokuya özgü kalitatif ve kantitatif fonksiyonel olarak farklılıklar gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (64).

MTHFR geninin genomik yapısını araştıran bir çalışmada genin promotor bölgesinin TATA dizisi içermediği tespit edilmiştir. Promotor bölgesinde TATA dizisi olmayan genlerin dış uyarılardan, çevresel faktörlerden daha çok etkilendiği bilinmektedir. Ayrıca MTHFR geninin promotor bölgesinde GC bazlarından zengin bölgeler bulunmuştur. Bu bölgelerin varlığı, Sp1 gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır. Sp1 transkripsiyon faktörünün çekirdekteki seviyeleri hücre tipine ve organizmanın gelişiminin farklı dönemlerine göre değişiklik göstermektedir. Ayrıca Sp1, promotor bölgesinde TATA dizisi olmayan MTHFR gibi genlerin bazal transkripsiyonunu da düzenlemektedir (37).

Yapılan birçok çalışmada MTHFR geninde alternatif kesme bölgelerinin olduğu da tespit edilmiştir. Ayrıca bu genin 5' ucunda çeşitli transkripsiyonel ve translasyonel başlangıç bölgelerinin, 3' ucunda ise çeşitli poliadenilasyon bölgelerinin olduğu 2002 yılında yapılan bir çalışmada belirlenmiştir (38 C). Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada ise MTHFR geninin 7.2 ve 9.8 kb'lık mRNA transkriptlerinin 3' UTR bölgelerinin beklenenden çok daha uzun olduğu gözlenmiştir. Bu durumun çeşitli protein izoformlarına neden olabileceği dşnlmektedir (64).

5.2.3.1. MTHFR geninin allelik varyantları

MTHFR geninde meydana gelen tek nükleotid değişiklikleri, mutasyon ve polimorfizmler, genin fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir. Bu durum MTHFR enziminin aktivitesini orta veya şiddetli derecede bozabilir. Sonuçta hiperhomosisteinemi, homosistinüri ve folat metabolizma bozuklukları gibi metabolik problemlere yol açabilir. MTHFR enzim aktivitesini bozan allelik varyantların en sık olanları C677T ve A1298C polimorfizmleridir.

5.2.3.1a. MTHFR termolabil polimorfizm, 677C >T (rs1801133)

Kang ve arkadaşları 1991 yılında yaptıkları bir çalışmada MTHFR geninde 4. ekzonda yer alan 677. nkleotiddeki sitozin yerine timin nükleotidinin girmiş olduğu termolabil bir polimorfizmi keşfetmişlerdir. Bu polimorfizmde allellerden birindeki sitozin-timin değişimi sonucu oluşan heterozigot (C/T) genotip durumunda normalin %65'i, allellerin her ikisindeki homozigot (T/T) genotip durumunda ise normalin %30'u düzeyinde aktivite gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca

bu değişikliğin enzim termolabilitesini arttırdığı ve bunun sonucu olarak da monomerlerinde flavin kaybına neden olarak enzimatik aktivitenin azaldığı tespit edilmiştir (65).

Frosst ve arkadaşları 1995 yılında bu nükleotid değişimindeki homozigot mutasyonun orta derecede hiperhomosisteinemiye neden olduğunu bulmuşlardır (35). Homosistein düzeyinin yüksek olduğunun tespiti, bu polimorfizmin vasküler hastalıklar için bir risk faktörü olabileceğini akla getirmiştir. Çünkü plazmada artan homosistein, vasküler endotel hücrelerinde doku hasarına neden olarak, aterom plağı gelişimine neden olabilen akut faz reaktanlarını tetiklemektedir (66). Günümüzde ise MTHFR 677T/T homozigot polimorfizminin bireylerde, orta düzeyde homosistein artışına neden olduğu, artan homosisteinin ise iskemik kalp hastalığı, inme, derin ven trombozu ve periferik arter hastalığına yol açabildiği bilinmektedir (67). Kluijtmans ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptığı bir çalışmada, T/T homozigotlarda kardiyovasküler hastalıklar açısından 3 kat artan riskten bahsedilmektedir (68). 2002 yılında yapılan bir metaanalizde ise 677T/T genotipinin, yüksek homosistein ve düşük folik asit düzeyleri ile birlikte koroner kalp hastalığı için yüksek risk oluşturduğu tespit edilmiştir (69). Ayrıca 2009 yılında yapılan bir diğer çalışmada, 677T/T homozigot genotipin, 677C/C genotipine göre periferik arter hastalığı açısından artmış riske sahip olduğu bildirilmiştir (70).

Vasküler hastalıkların yanısıra, MTHFR gen polimorfizmlerinin folat metabolizmasında bozukluklara yol açarak, bebeklerde nöral tüp defektlerine (NTD) neden olabileceği yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. NTD, tüm dünyada en sık görülen 2. doğumsal yapısal anomalidir ve 500 doğumda bir görülmektedir (71). Birçok çalışma göstermiştir ki, konsepsiyon öncesi ve sonrası folik asit desteği NTD görülme ve tekrarlama riskini düşürmektedir. Günümüzde artık NTD gelişiminin genetik ve çevresel etkileşimin sonucunda oluştuğu bilinmektedir. Sorumlu genetik faktörlerden birinin ise MTHFR genindeki C677T polimorfizmi olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (72).

NTD'li bebeklerin fibroblast kültürlerinden yapılan bir çalışmada, homozigot MTHFR 677T/T genotipinin NTD riskini 7.2 kat arttırdığı tespit edilmiştir (73). Yine başka bir çalışmada, annedeki folik asit eksikliği ile anne ve bebekteki 677 T/T genotipinin NTD riskini arttırdığı tespit edilmiştir. T/T homozigot anne ve NTD'li bebeklerinde serum ve eritrosit folat düzeyleri düşük bulunmuştur (74). Yapılan bu çalışmalarla anne ve bebekteki MTHFR polimorfizmi ile annedeki düşük folat

düzeylerinin, bebekte NTD riskini arttırdığı tespit edilerek, insanlarda hastalık gelişiminde genetik ve çevre (beslenme) etkileşiminin önemi vurgulanmıştır. İstalo ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise, fetüste MTHFR C677T ve A1298C genotiplerine bakılmış, 3 ve daha fazla mutant alleli olan fetuse rastlanmamıştır. MTHFR 677CT/1298CC ve 677TT/1298CC genotiplerinin yaşama bağdaşmadığı, fetüsün yaşama ve doğma olasılığını düşürdüğü bu çalışmada ifade edilmektedir (75).

MTHFR 677 T/T genotipi, izole yarı dudak-damak (76), hipertansiyon (77), preeklampsi (78), venöz tromboemboli (79), depresyon (80), auralı migren (81), primer açık açılı glokom (82), şizofreni (83) ile ilişkilendirilmiştir. Şizofrenide düşük folat düzeyleri ile birlikte MTHFR 677T/T genotipi, özellikle negatif semptomlara yatkınlık oluşturmada ve hastalığı daha da ağırlaştırmaktadır (84). MTHFR 677T/T genotipinde meydana gelen yüksek homosistein düzeyleri, dopaminerjik nöronlar için toksik olabilir ve striatumdaki dopamin döngüsünü hastalık yönünde etkiliyor olabilir (85). Ayrıca homosistein yüksekliği beyinde eksitotoksik etki oluşturmaktadır. Bu etki sonucu homosistein, beyinde glutamat ve benzeri maddelerin aşırı salınımına neden olarak nöronal hasara yol açabilmektedir (80). Yine MTHFR C677T polimorfizminin nöronlar üzerindeki olumsuz etkileri, folat metabolizması üzerindeki olumsuz etkileri ile ilişkili olabilir. Folat, tek karbon metabolizması üzerinden serotonin ve diğer nörotransmitterlerin sentezinde çok önemli rol oynamakta ve antidepresan özelliği olan SAM sentezinde esansiyel bir görevi bulunmaktadır Aynı zamanda MTHFR genindeki bu polimorfizm, DNA metilasyonunda ve hücre içi yaşamsal metilasyon süreçlerinde bozukluklara yol açarak santral sinir sistemini (SSS) etkiliyor olabilir. Şizofreni gelişiminde çevre etkileşimini tanımlarken, SSS gelişimi sırasında DNA metilasyon değişikliklerinin önemli rol oynayabileceği ifade edilmektedir (86). Tüm bu etkiler nedeniyle MTHFR C677T polimorfizminin sinir sistemi ile ilgili hastalıklara yol açabileceği düşünülmektedir.

5.2.3.1b. MTHFR termolabil polimorfizm, 1298 A>C (rs1801131)

MTHFR geninde C677T polimorfizmi dışında genin başka bir bölgesindeki polimorfik değişikliğin de çeşitli hastalıklarla ilişkili olduğu günümüzde bilinmektedir. Van der Put ve arkadaşları 1998 yılında MTHFR genine ait yeni bir polimorfizm tespit etmişlerdir. Genin 7. ekzon ve regülatör dizisinde bulunan 1298.

nükleotidinde A→C değişimi sonucunda, glutamin aa'nin alanine dđnüştüęü belirlenmiştir (87). Bu çalışmada tek başına MTHFR 1298 C/C veya A/C mutasyonları, 677 T/T kadar yüksek homosistein ve düşük folat düzeyleri ile ilişkili bulunmamıştır. Ancak, MTHFR geninde 677C/T heterozigotluğu ile birlikte olduğu zaman ise ciddi anlamda enzimin aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise MTHFR A1298C polimorfizminin şizofreni (88), inme (89), hipertansiyon (90), oklüziv arter hastalığı ve derin ven trombozu (91), primer açık açılı glokom (92), renal ven trombozu (93), romatoid artrit (94) ve son dönem böbrek hastalarında (95) kardiyovasküler hastalık riski ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur. Vasküler hastalıklarla ilişkisi genellikle homosistein yüksekliğine neden olması ile açıklanmıştır. Yapılan başka bir çalışmada ise MTHFR genindeki birleşik heterozigotluk durumunun (677C/T ve 1298A/C), 677T/T homozigotluğu gibi değerlendirilebileceği ve NTD gibi hastalıklarla ilişkilendirilebileceği ifade edilmektedir. 677. ve 1298. bölgelerindeki 3 veya daha fazla mutasyon yaşamla bağdaşmazken (75), en az bir mutasyonun, folat ihtiyacının yüksek olduğu embriogenez döneminde, embriyoya zararlı etkileri olabileceği, düşük materyellerinden yapılan bir çalışmayla gösterilmiştir (96).

Ayrıca MTHFR geninin 677T/T veya 1298C/C mutasyonlarının genomda DNA metilasyonunu anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (97). Bu epigenetik mekanizma sonucunda MTHFR polimorfizmleri hücrede genomun hipometilasyonuna yol açarak kolorektal, gastrik, akciğer, endometrial kanserler ve lösemilerle ilişkili olduğu birçok yayında ifade edilmektedir (98 -102).

5.3. MTHFR ve DM

DM hastalığının ve komplikasyonlarının gelişimine yönelik etiyolojik araştırmalar, halen sürmektedir. Bu konuyla ilgili olarak plazma homosistein yüksekliği ve MTHFR gen polimorfizmleri de suçlanmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda Tip 2 DM hastalarında hiperglisemi ile hiperhomosisteinemi arasında sıkı bir ilişki olduğu tespit edilmiştir. Ancak hipergliseminin mi homosistein yüksekliğine neden olduğu yoksa hiperhomosisteinin mi hiperglisemiye yol açtığı halen araştırma konusudur (103). Yapılan diğer çalışmalarda ise kronik hiperinsülineminin ve insülin tedavisinin plazma homosistein yüksekliğine yol açtığı tespit edilmiştir (104). Ayrıca Tip 2 DM

hastalarında zaman içinde gelişen böbrek fonksiyon bozukluğunun da plazma homosistein düzeyinin yükselmesine neden olabileceği bildirilmiştir (105).

Tip 2 DM hastalarında yükselen homosistein düzeyleri bu hasta grubunda vasküler komplikasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Hiperhomosisteinemi organizmada özellikle vasküler endotel hücreleri için toksik etki oluşturmaktadır. Sonuçta homosistein yükseldiği zaman HDL'nin antiaterojenik aktivitesini azaltmakta, oksidatif stresi arttırmaktadır. Bunun yanı sıra doku faktörü ve faktör 5 gibi pıhtılaşma faktörlerinin sentez ve aktivasyonunu artırıp, fibrinolizisi, protein C, nitrik oksit, prostasiklin gibi antikoagülan etkisi olan moleküllerin sentez ve aktivasyonunu azaltarak prokoagülan etki de oluşturmaktadır. Bu olumsuz etkileri sonucunda hiperhomosisteineminin Tip 2 DM hastalarında kardiyovasküler hastalıklar (106), periferik arteriopati, nefropati (107), nöropati (108) gibi makro ve mikrovasküler komplikasyonlar için artmış bir risk faktörü olduğu literatürde bildirilmektedir.

Tip 2 DM hastalarında zaman içinde yükselen homosisteinin, aynı zamanda MTHFR geninin 677 ve 1298 bölgelerindeki en yaygın polimorfizmlerinde de yükseldiği bilinmektedir. Tip 2 DM hastalarında diğer faktörlerin yanı sıra MTHFR 677 ve 1298 bölgelerindeki polimorfizmlerin de homosistein yüksekliğine neden olarak, bu grup hastalarda vasküler komplikasyonlar için risk oluşturduğu düşünülmektedir. MTHFR polimorfizmlerinin diyabetik retinopati gelişimi açısından da önemli bir risk faktörü olduğu, Japonya'da yapılan bir araştırmada tespit edilmiştir (109). Başka bir çalışmada ise MTHFR gen polimorfizminin, DM hastalarında, periferik arter hastalığı açısından normal populasyona göre 3.5 kat risk artışına neden olduğu bildirilmektedir (110). Ayrıca diyabetik nefropati (111), diyabetik hastalarda inme risk artışıyla (112) ve Tip 2 DM hastalarında artmış koroner kalp hastalığı riski (113) ile ilişkili olduğunu ifade eden yayınlar da mevcuttur. Ancak literatürde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin diyabetik nöropati ile ilişkisini gösteren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan diyabetik nöropatinin oluşum patogenezinde MTHFR genindeki C677T ve A1298C polimorfizmlerin muhtemel etkilerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

6. Gereç ve Yöntem

6.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma retrospektif vaka-kontrol klinik çalışmadır.

6.2. Araştırma Bölgesi ve Zamanı

Hasta grubu, 2010 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilimdalı Endokrinoloji Polikliniğine başvuran, en az 10 yıldır Tip 2 DM tanısı nedeniyle takip edilen ve elektronöromiyografi (ENMG) tetkiklerinde Diabetik Periferik Polinöropatisi olan hastalardan oluşmaktadır.

Kontrol grubu ise 2010 yılında Konya ilinde yaşayan rastgele seçilmiş sağlıklı gönüllülerden oluşmaktadır.

6.3. Araştırma Evreni ve Yeri

Bu araştırmada Konya ilinde yaşayan ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilimdalı Endokrinoloji Polikliniğine başvuran Tip 2 DM hastaları araştırma evrenini oluşturmaktadır. Araştırma uygulaması, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilimdalı bünyesindeki Genetik Hastalıklar Tanı Merkezinin Moleküler Genetik laboratuvarında yapılmıştır.

6.4. Örneklem Seçme Kriterleri

Hasta grubunda;

- En az 10 yıldır Tip 2 DM hastası olmak,
- Herhangi bir otoimmün hastalığı bulunmamak,
- Diyabetik Periferik Nöropati haricinde herhangi bir nörolojik hastalığı bulunmamak,
- Diyabetik Periferik Nöropati tanısı ENMG raporu ile kanıtlanmış olmak.

Kontrol grubunda;

- Halen veya özgeçmişinde otoimmün, kardiyovasküler, nörolojik veya diğer sistemleri tutan kronik bir hastalığı bulunmamak.

6.5. Çalışma Gruplarının Randomizasyonu

Araştırmanın yapıldığı bölgede örneklem seçme kriterlerine uygun ilk belirlenen 103 Diabetik Periferik Polinöropati hastası ve kontrol grubu olarak da 100 sağlıklı birey araştırma kapsamına alınmıştır. Araştırmaya ilk dahil edilenlerle

birlikte araştırmanın uygulama aşaması başlatılmış ve yeni dahil edilenlerle sürdürülmüştür. Bu aşama toplam olarak 12 ay sürmüştür.

6.6. Araştırma Öncesi Bilgilendirme

Hasta ve kontrol gruplarına öncelikle araştırmaya dahil olma kriterleri anlatılmıştır. Kriterlere uygun bireylerden sadece bir kerelik kolun antekübital bölgesinden özel bir tüpe 1cc kadar venöz kan alınacağı ardından DNA'larının izole edilerek toplumda sık görülen bir gen polimorfizminin çalışılacağı belirtilmiştir. Çalışmanın tamamen gönüllülük esasına dayandığı ve kan verseler dahi istedikleri zaman çalışmadan çıkabilecekleri özellikle ifade edilmiştir. Gerekli bilgiler verildikten sonra çalışmaya katılmak isteyen ve kriterlere uyan bireylere gönüllü onam formları okutulup imzalatılmıştır (Ek-1 ve Ek-2).

6.7. Araştırmanın İzni ve Etik Durum

Araştırmaya başlamadan önce Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'ne bağlı Etik Kurul komisyonuna yapılacak tüm işlemleri bildiren detaylı bir çalışma protokolü sunulmuştur. Etik kurul onayı 24.11.2010 tarih ve 2010/162 sayılı kararı ile alınmıştır (Ek-3)

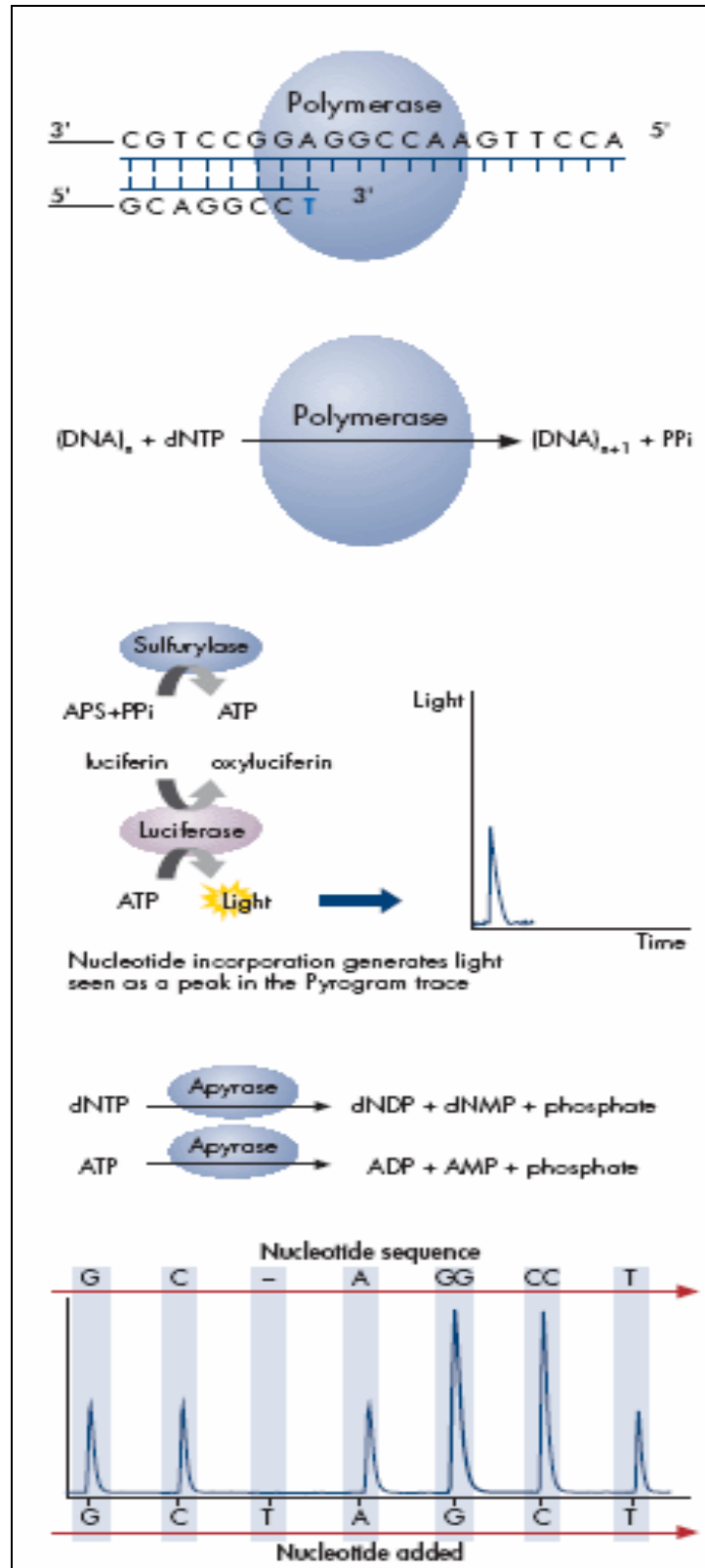
6.8. MTHFR Polimorfizmi Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde MTHFR gen polimorfizmini belirlemek için Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (PCR/RFLP), Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve bölgesel DNA dizileme (Pyrosequencing) gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu/ Restriksiyon Enzimi Uzunluk Polimorfizmi (PCR/RFLP) yöntemi, ilk kullanılan yöntemdir. PCR yöntemi ile hedef diziyeye spesifik oligonükleotid dizisi (primer) kullanılarak gerekli DNA dizisi çoğaltılır. Çoğaltılan DNA dizisi bölgeye özgü bir enzim ile kesilir. Elektroforez cihazında etidium bromid ilave edilmiş agaroz jelde DNA yürütülerek, UV ışık altında sonuçlar değerlendirilir. PCR/ RFLP yöntemi jele dayalı ve çok zaman alıcı bir yöntemdir. Geniş epidemiyolojik çalışmalarda uzun zaman aldığından bu yöntemin kullanımı sınırlıdır. Ayrıca etidium bromid gibi kullanıcının sağlığını riske atabilecek kimyasallar da kullanıldığından tercih edilmemektedir. Bu yöntemde yeni yöntemlere göre daha yüksek oranda yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlar görülebilmektedir.

Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi bir diğer MTHFR polimorfizm analiz yöntemidir. Bu yöntemde farklı floresan boya ile işaretlenmiş 2 prob (işaretli primer) kullanılır. Normal ve polimorfik allel için ayrı ayrı düzenlenmiş bu problar, PCR cihazında her döngüde sentez sırasında ışığa verir. Oluşan ışığın miktarı bilgisayarda grafik haline dönüştürülür ve bu grafiklere göre değerlendirme yapılır. RT-PCR yöntemi kantitatif ve güvenilir bir yöntem olmakla birlikte sistemin optimizasyonunda sıkıntı yaşanabilmektedir. Her uygulamada amplifikasyonun doğru yapıldığına ve yapılmadığına belirlemek için internal kontrol dizi ve probuna ihtiyaç vardır. Ayrıca primer setinin çalıştığını gözlemlemek için ise nükleotid dizisi bilinen pozitif kontrole bu sistemde gereksinim duyulmaktadır. Prob dizaynı ve Tm değerlerini önceden optimize etmek oldukça hassas bir çalışmayı gerektirir ve sadece bilgisayardan çıkan grafiksel sonuçlara göre yorum yapılır.

Bölgesel dizileme yöntemi, MTHFR polimorfizmini belirleyen en son geliştirilen ve bizim de kullandığımız yöntemdir. Bölgesel dizileme (Pyrosequencing), senteze dayalı yeni bir DNA dizileme yöntemidir. Öncelikle ilgilenilen DNA bölgesinin PCR ile çoğaltılması sağlanır. PCR sonucu elde edilen tek zincirli DNA dizisine bağlanan sekans primerinin 3' ucuna 4 farklı nükleotid (dATP, dCTP, dGTP, ve dTTP) tek tek eklenmektedir. Nükleotid ekleme işlemini DNA polimeraz enzimi yapmaktadır. Eklenen nükleotid, kalıp DNA'nın tamamlayıcısı değilse bağlanma olmamakta ve o nükleotid apiraz enzimi aracılığı ile ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Eklenen nükleotid, kalıp DNA'nın tamamlayıcısı ise açığa çıkan inorganik fosfat (PPi) ATP sülfürilaz enzimi aracılığı ile derhal ortamdaki adenosin 5' fosfosülfat (APS) ile birleşerek ATP'ye dönüşmektedir. ATP ise lusiferaz enzimi aracılığıyla, ortamda substrat olarak bulunan lusiferini oksilusiferine dönüştürmektedir. Bu sırada açığa çıkan ışığa CCD kamera ile algılanıp Pyrogram programı ile her nükleotide ait farklı renkte pikler oluşturmaktadır (114). Şekil 11'de bölgesel dizileme sisteminin çalışma prensipleri şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 11: Bölgesel dizileme sisteminin şematik gösterimi
 (<http://www.qiagen.com/literature/brochures/category.aspx?ID=3559>)

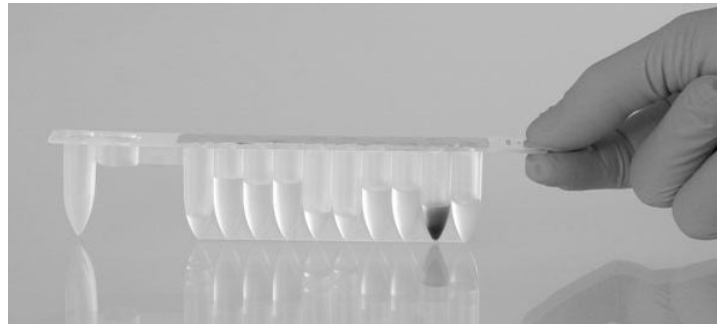
Bölgesel dizileme sistemi birçok genetik araştırma için oldukça hızlı, uygun ve güvenilir bir methoddur. Yöntemin bir dezavantajı, en fazla 60-100 nükleotide kadar dizileme yapabildiğinden tüm genomun dizilenmesi için uygun olmayışıdır. Ancak bölgesel dizileme sistemi her allel için kantitatif sonuç verdiği için SNP taramalarında, CpG metilasyon çalışmalarında, hemopoetik kimerizm analizlerinde, tümör ve normal hücre içeren karışık örneklerdeki heterojen genotipin ayrımında diğer analizlere göre oldukça avantajlı bir yöntemdir. Belirli bir bölgedeki nükleotid değişimini kısa sürede ve yüksek doğrulukla ortaya çıkarabilmektedir.

Sistem kendi içinde negatif ve pozitif kontrolleri barındırmakta ve bu da ayrı bir avantaj sağlamaktadır. Örneğin SNP taramalarında sisteme verilecek nükleotid sırası programlanırken SNP'den hemen önceki 1 veya 2 nükleotid negatif kontrol olarak kullanılmaktadır. SNP'den sonraki sisteme verilecek nükleotid sırası ise pozitif kontrol olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca bir kontrole gerek duyulmamaktadır.

Çalışmamızda MTHFR gen polimorfizmi çalışmasında bölgesel dizileme yöntemi, yukarıda belirtilen doğru, hızlı, güvenli sonuç verme avantajları nedeniyle tercih edilmiştir.

6.9. DNA izolasyonu

Her bir çalışma ve kontrol grubundaki bireyden DNA izolasyonu için çalışmaya alınacak kanlar, buzdolabında +4°C' de saklanmıştır. DNA izolasyonu EZ1 Blood 200µl Kit (Qiagen, Almanya) ile Bio Robot EZ1 (Qiagen, Almanya) cihazı kullanılarak otomatik olarak yapılmıştır (Şekil 12,13).



Şekil 12: DNA izolasyon kiti gösterimi



Şekil 13 :Bölümümüzde bulunan otomatik DNA izolasyon cihazı Bio Robot EZ1 (Qiagen, Almanya) ile olguların DNA izolasyonu

Bu otomatik DNA izolasyon yöntemi, magnetik partikül ve silika bazlı DNA saflaştırma teknolojisine dayanmaktadır. Lizatlarla izole edilen DNA, magnetik partiküllerin silika yüzeyine tutunmakta, daha sonra mıknatıs aracılığıyla lizatlardan ve diğer maddelerden arındırılmaktadır. Bu sistem, diğer yöntemlerden daha kullanışlı, pratik ve yüksek kalitede DNA eldesini mümkün kılmaktadır.

DNA izolasyonu uygulaması:

Çalışmamızda hasta ve sağlıklı bireylerden alınan ve +4 derecede buzdolabında saklanan kanlardan 200 µl alınarak 2 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Ardından;

- 1- Cihazın kapağı açılarak arka tarafındaki kartuş rafına 6'lı reaksiyon kartuşu yerleştirildi.
- 2- İçinde DNA izole edilecek kan içeren 2 ml'lik ependorf tüpleri yerleştirildi.
- 3- DNA elüsyon tüpleri sıralandı.
- 4- Tek kullanımlık uç taşıyıcı ve uçlar yerleştirildi.
- 5- Cihazın kapağı kapatılarak program çalıştırıldı. DNA elüsyon volümü 100µl'ye ayarlandı.

Elde edilen DNA 'ların miktarları bölümümüzde bulunan Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo scientific, USA) cihazı ile ölçüldü (Şekil 14). DNA konsantrasyonu ortalama 50 µl/ ml olacak şekilde ayarlandı ve daha sonra PCR 'da kullanılmak üzere -20 °C'de derin dondurucuda saklandı.



Şekil 14: Bölümümüzde bulunan Nanodrop 2000 spektrofotometre (Thermo scientific, USA) cihazı



Şekil 15 : Olgularda MTHFR genindeki C677T ve A1298C bölgelerinin bulunduğu DNA segmentlerinin çoğaltılması için kullanılan ısı-döngü cihazı (Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Almanya)

6.10. DNA amplifikasyonu

MTHFR geninin hedef bölgelerini çoğaltmak için PCR yöntemi kullanıldı. Uygulama sırasında daha önceden elde edilen ve -20 °C'de saklanan DNA'lar ve PCR kiti (PCR Master Mix, PCR primerleri ve RNaz içermeyen distile su) oda ısısında bekletilerek erimeleri sağlandı. PCR primerleri hariç diğer solusyonlar vortekslendi. PCR Primer tüpleri mikrosantrifüj cihazında (MiniSpeedy MicroCentrifuge, EuroClone, İtalya) 13.000 rpm'de 4-5 saniye döndürülüp ardından el ile hafifçe vurularak homojenize edildi. Ardından her birinden Tablo 4'te belirtilen miktarlarda alınarak reaksiyon karışımı hazırlandı.

Tablo 4 :MTHFR geninde C677T ve A1298C lokuslarını içeren DNA bölgelerinin amplifikasyonu için oluşturulan PCR düzeneğinde her bir birey için hazırlanan reaksiyon karışım oranları

PyroMark PCR Master Mix, 2x	12.5 µl
PCR Primeri	1 µl
RNaz içermeyen distile su	6.5 µl
Toplam	20µl

Reaksiyon karışımı mikrosantrifüjde 13.000 rpm'de 4-5 saniye döndürülüp, ardından el ile hafifçe vurularak homojenize edildi. Elde edilen reaksiyon

karışımından her birey için hazırlanmış olan 0,2 ml 'lik PCR tüplerine 20 µl kondu. Bu karışımın üzerine pipetajlanmış DNA'dan 5 µl eklendi. PCR tüpleri ısı-döngü cihazı (Thermal cycler) (Primus 96 plus, MWG AG Biotech, Almanya)'na konarak, MTHFR C677T ve A1298C için belirlenen protokole uygun program oluşturuldu (Şekil 15) (Tablo 5).

Tablo 5: MTHFR geninin C677T ve A1298C bölgeleri için düzenlenen PCR programı

Aktivasyon basamağı	95°C	15 dakika
3 Aşamalı Döngü		
Denatürasyon	94°C	30 saniye
Bağlanma	60°C	30 saniye
Uzama	72°C	30 saniye
Döngü sayısı: 45		
Son Uzama	72°C	10 dakika

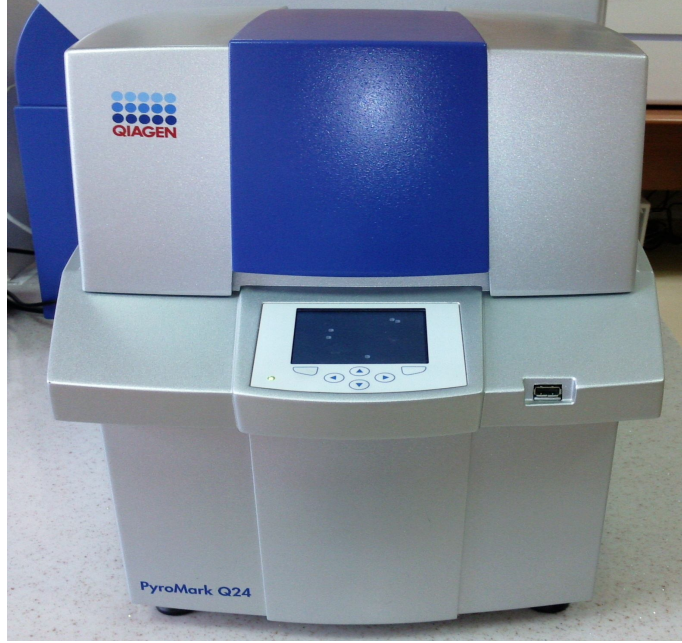
Her PCR yapılışında negatif kontrol olarak, DNA yerine 5µl distile su kullanıldı. PCR sonucu oluşan MTHFR C677T ürünü (amplikon) 127 baz çifti, A1298C ürünü ise 218 baz çifti uzunluğundaydı.

6.11. Minidizileme (Pyrosequencing)

Gerekli Malzemeler:

- 1- Pyromark Q24 minidizileme cihazı
- 2- Pyromark Q24 Vakum İstasyonu
- 3- Pyromark Q24 Plate Holder
- 4- Isı bloğu
- 5- Çalkalayıcı
- 6- Pyromark Q24 Plate
- 7- Streptavidin Sepharose
- 8- Bağlanma tamponu
- 9- Ultra saf su
- 10- Sekans primeri
- 11- Annealing tamponu
- 12- Etanol
- 13- Denaturasyon solüsyonu
- 14- Yıkama solüsyonu

Bölümümüzde kullanılan Pyromark Q24 minidizileme cihazı ve Pyromark vakum istasyonu Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 16 : Minidizileme için kullanılan Pyromark Q24 minidizileme cihazı

Elde edilen MTHFR genine ait ampikonların dizilemesini yapabilmek amacıyla Streptavidin içeren bir stok solüsyon oluşturuldu.

Stok solüsyon her bir örnek için;

Streptavidin2µl

Bağlanma tamponu.....40µl

Ultra saf su28µl

Toplam.....70 µl olacak şekilde hazırlandı.

+ 4°C'de saklanan streptavidin sefaroz, dolaptan çıkarıldığında nazikçe alt-üst edilerek homojenize hale getirildi. Oluşturulan stok solüsyondan 24'lük PCR kalıbında her kuyucuğa 70µl konuldu. Daha sonra her kuyucuğa, önceden elde edilen PCR ürünleri 10'ar µl olacak şekilde eklendi ve üzeri strip ile kapatıldı. Alt-üst edilerek 1400 rpm 'de , oda ısısında orbital çalkalayıcıya konuldu. Bu arada sekans primeri içeren ikinci bir solüsyon hazırlandı.

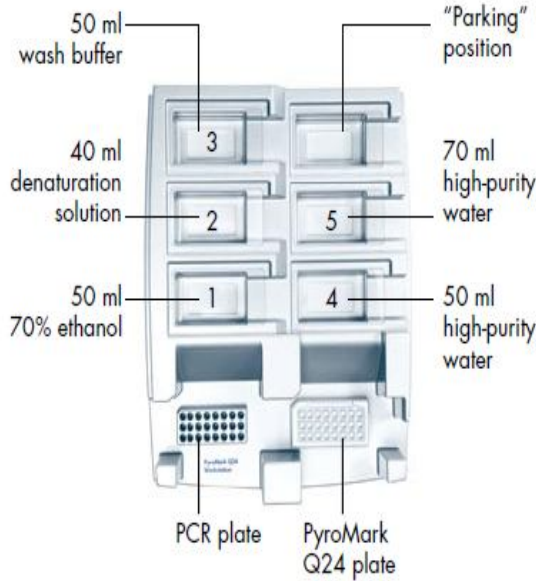
Her bir örnek için;

Sekans primeri.....2,5 µl

Anneling tamponu.....22,5 µl

Toplam.....25 µl

olacak şekilde ikinci stok solüsyon hazırlandı ve Pyromark Q24 kalıplarına (24'lük) her kuyucuğa 25 µl olarak dağıtıldı. Vakum istasyonundaki yerine metal rafı ile birlikte yerleştirildi.



Şekil 17: Vakum ve yıkama işlemlerinin yapıldığı Pyromark vakum istasyonunun bölümleri

Şekil 18: Pyromark vakum filtresi

(<http://www.pyrosequencing.com/DynPage.aspx?id=57898>)

Vakum istasyonunda 1. bölgeye %70 Etanol, 2. bölgeye 40 ml denatürasyon solüsyonu, 3. bölgeye yıkama solüsyonu, 4 ve 5. bölgeye ultra saf su kondu (Şekil 17). Isı bloğu 80°C 'ye ayarlandı. Orbital çalkalayıcıda bulunan PCR kalıbı, çalkalayıcıdan alınıp, vakum istasyonundaki yerine (PCR plate) bırakıldı ve üzerindeki strip kaldırıldı.

Vakum pompası çalıştırıldı ve 5. bölgedeki saf suyu çekerek temizlenmesi sağlandı. Her vakum işleminden sonra Pyromark vakum filtresi yukarı kaldırılarak, boruların içinde sıvı kalmadığı, vakumlandığı gözlemlendi (Şekil 18). Daha sonra vakum filtresi PCR kalıbı içindeki kuyucuklara daldırıldı ve 15 saniye kadar orada tutuldu. Böylelikle PCR ürünü içeren streptavidinli boncuklar, filtre uçlarında tutulmuş oldu. Ardından sırasıyla %70 etanol içeren kısımda 5 saniye, denatürasyon solüsyonunda 5 saniye ve yıkama solüsyonunda 10 saniye tutuldu.

Bu işlemin sonunda vakum filtresi 5 saniye kadar yukarıda ve vertikal pozisyonda tutulup, vakum pompası kapatıldı. Vakum filtresi Pyromark Q24 kalıbına konularak, nazıkçe çalkalandı. Böylelikle filtre uçlarında bulunan boncuklar, sekans primeri içeren kuyucuklara döküldüler.

Önceden 80°C'de ısıtılmış olan ısı bloğunun üzerindeki kalıp taşıyıcısına konarak, 2 dakika tutuldu ve daha sonra en az 5 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı. Böylece sekans primeri ile tek zincirli hale gelmiş olan biotinli PCR kalıbının birbirine bağlanması sağlandı.

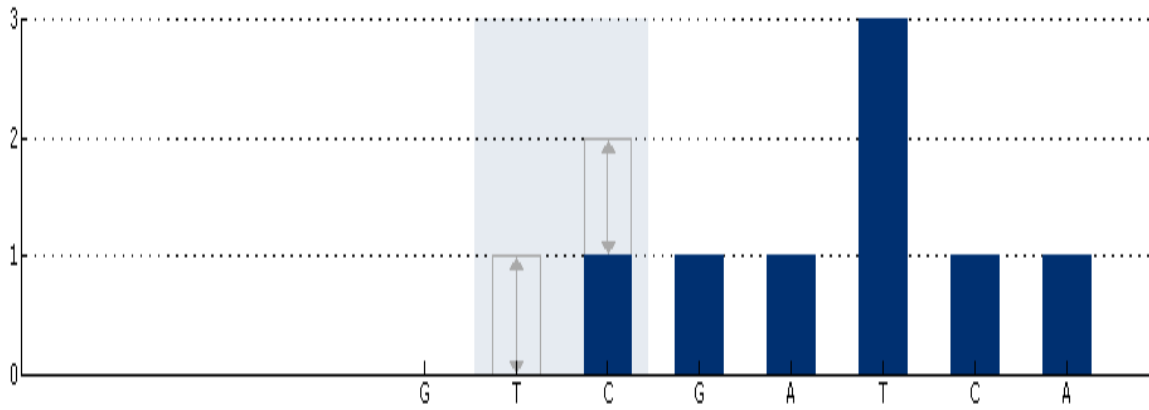
Bu işlemler yapılırken, sekans için önceden Pyromark Q24 Software ile düzenlenmiş olan bilgisayar programının (Pre Run Dosyası) olduğu USB , PyroMark Q24 cihazına takıldı. Kartuş hazırlandı. 9 kuyucuğu olan kartuşa, analiz yapılacak birey sayısına göre belirlenen, Pre Run dosyasında belirtilen enzim, substrat ve dNTP miktarları yüklendi. Hazırlanan kartuş cihazda ilgili bölüme yerleştirildi.

Sekans primeri içeren diğer kartuş ise yine ilgili bölüme yerleştirildi ve cihaz çalıştırıldı. Cihaz ortalama olarak dakikada 1 nükleotid okumaktadır. Yaklaşık 15-20 dakikada sekans işlemi tamamlandı. Pyrogram programı ile yapılan sekans analiz edildi.

Programda, dNTP'lerin hangi sırayla ortama verileceği önceden bilinmektedir. MTHFR C677T için düzenlenmiş nükleotid sırası Şekil 19-a'da histogram olarak verilmiştir. Histogramda ilk nükleotid olan G, negatif kontrol, GATCA dizisi ise pozitif kontrol olarak düzenlenmiştir.

MTHFR C677T normal genotip: CCGATTTCA

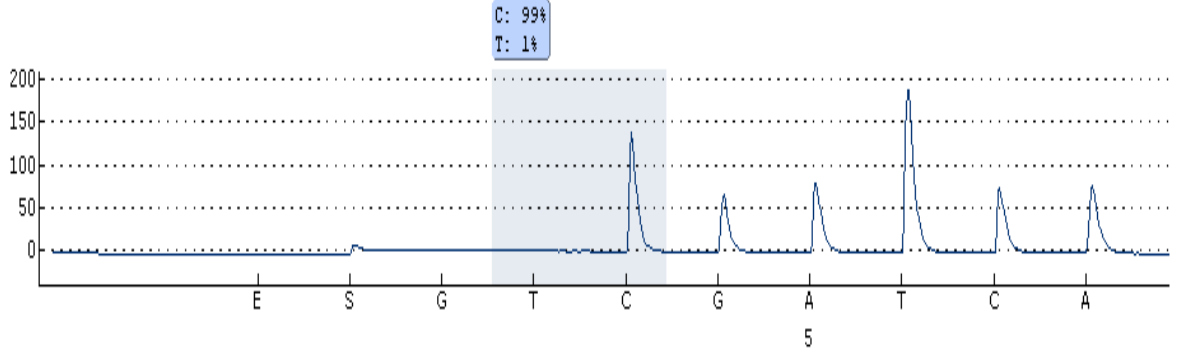
MTHFR C677T mutant genotip: TCGATTTCA



Şekil 19-a: MTHFR C677T'nin programa yüklenen dNTP dağılımını gösteren histogramı

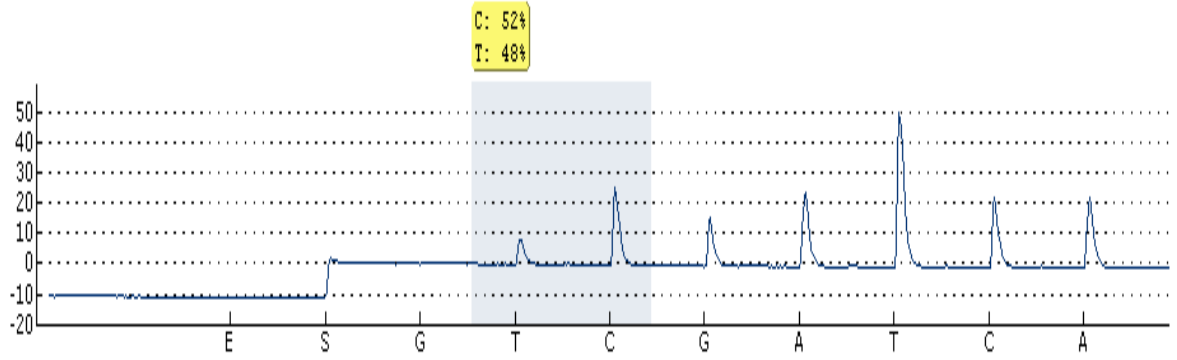
Şekil 19-b'de MTHFR 677. bölge için normal (CC) nükleotit dizilemesi, şekil 19-c'de MTHFR 677. bölge için heterozigot (CT) nükleotit dizilemesi ve şekil 19-d'de MTHFR 677. bölge için homozigot mutant (TT) nükleotit dizilemesi grafiksel olarak gösterilmiştir.

A8: C/TCGATTTCAT



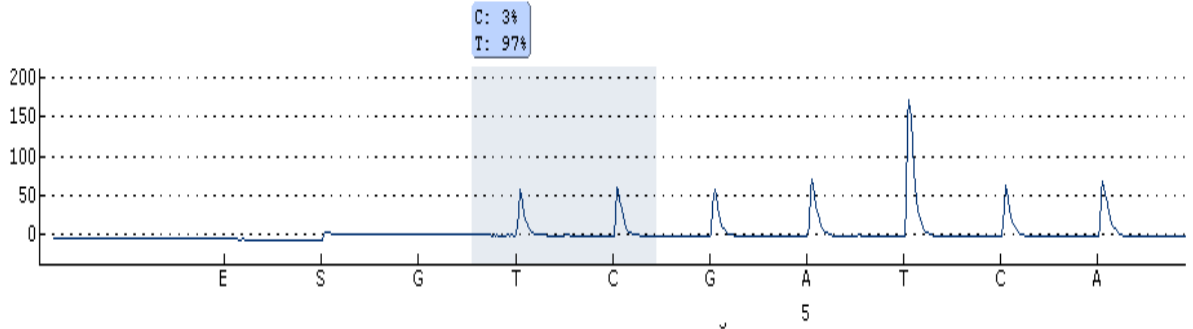
Şekil 19-b: MTHFR 677. bölge için NORMAL (CC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi

A2: C/TCGATTTCAT



Şekil 19-c: MTHFR 677. bölge için HETEROZİGOT (CT) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi

A2: C/TCGATTTCAT

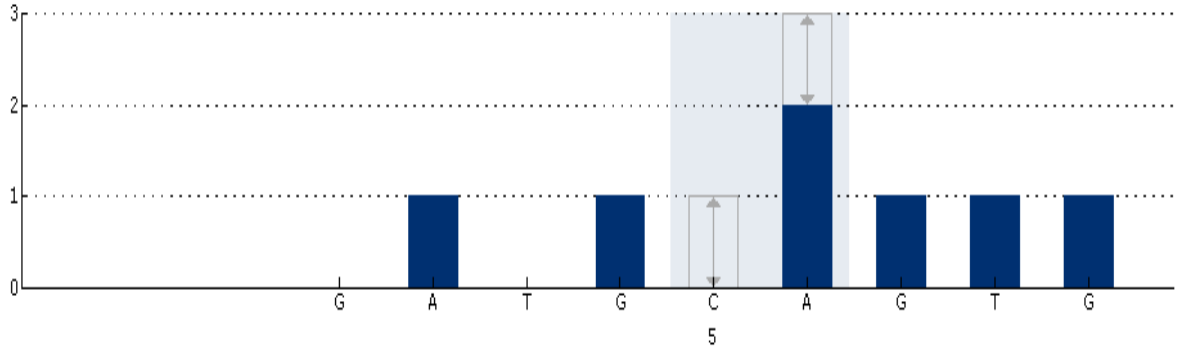


Şekil 19-d: MTHFR 677. bölge için HOMOZİGOT MUTANT (TT) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi

Şekil 20-a'da MTHFR A1298C için düzenlenmiş nükleotid sırası histogram olarak verilmiştir. Histogramda ilk nükleotid olan G ve 3. nükleotid olan T, negatif kontrol, GTG dizisi ise pozitif kontrol olarak düzenlenmiştir.

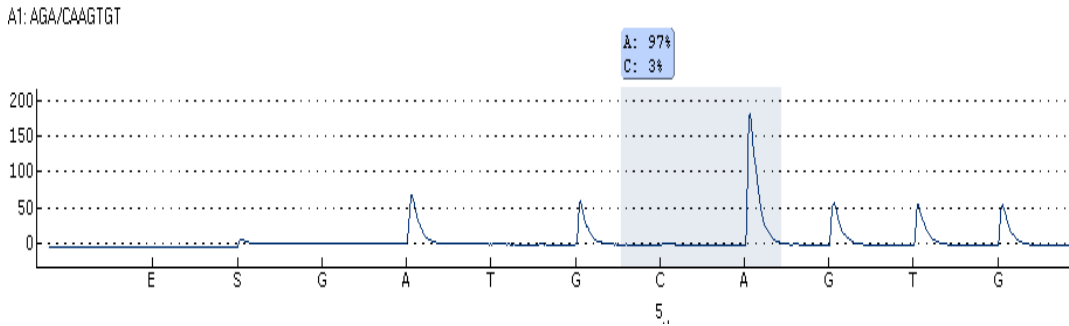
MTHFR A1298C normal genotip: AGAAAGTGTG

MTHFR A1298C mutant genotip: AGCAAGTGTG



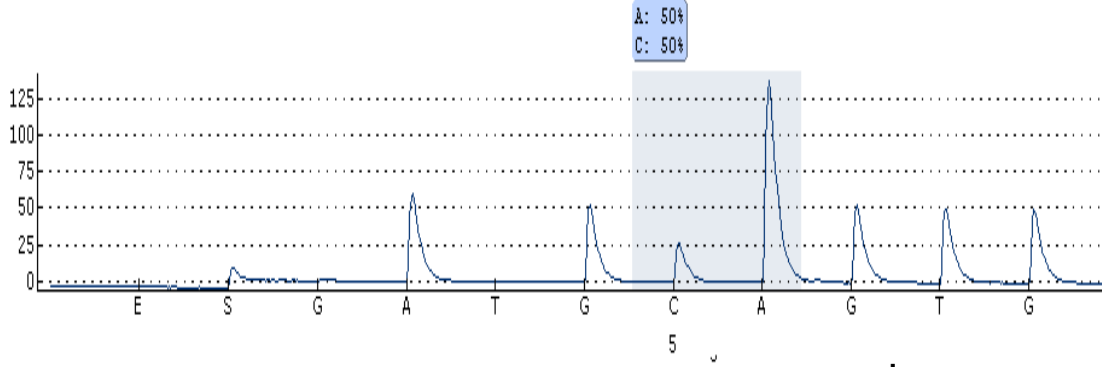
Şekil 20-a: MTHFR A1298C'nin programa yüklenen dNTP dağılımını gösteren histogramı

Şekil 20-b'de MTHFR 1298. bölge için normal (AA) nükleotid dizilemesi, şekil 20-c'de MTHFR 1298. bölge için heterozigot (AC) nükleotid dizilemesi ve şekil 20-d'de MTHFR 1298. bölge için homozigot mutant (TT) nükleotid dizilemesi grafiksel olarak gösterilmiştir.



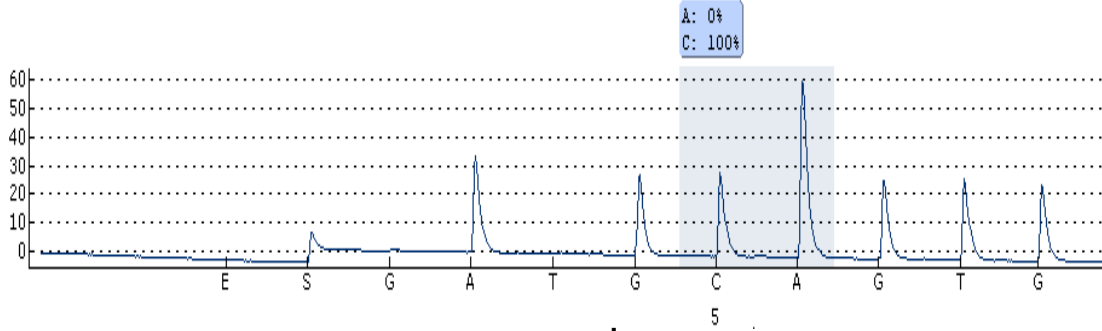
Şekil 20-b: MTHFR 1298. bölge için NORMAL (AA) nükleotid dizilemesinin grafiksel gösterimi

C3: AGA/CAAGTGT



Şekil 20-c: MTHFR 1298. bölge için 21 nolu hastanın HETEROZİGOT (AC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi

A2: AGA/CAAGTGT



Şekil 20-d: MTHFR 1298. bölge için HOMOZİGOT MUTANT (CC) nükleotit dizilemesinin grafiksel gösterimi

6.12. İstatistiksel Analiz

Araştırmadan elde edilen tüm veriler, bilgisayar ortamında SPSS 17.0 paket programı kullanılarak analiz edildi.

Çalışmamızda, genotip ve allel frekansları Hardy-Weinberg eşitliği esas alınarak hesaplandı. MTHFR C677T ve A1298C genotiplerinin hem diyabetik nöropati hemde kontrol gruplarındaki oranları tespit edildi ve bu genotiplerin hastalık gelişimine etkisi istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Kişideki genotip çeşidinin hastalık durumunu etkileyip etkilemediğini (kategorik veriler) belirlemek için ise Ki-kare bağımsızlık test istatistiği ve Fisher testi kullanıldı. Bütün test sonuçlarında, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

7. Bulgular

7.1. Yaş ve Cinsiyet

Bu çalışmaya yaş ortalaması 59.4 ± 8.6 (40-82) yıl olan toplam 103 diyabetik polinöropati hastası ile yaş ortalaması 49.8 ± 7.9 (37-84) yıl olan toplam 100 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Bu bireylerin hasta grubunda %58 ve kontrol grubunda %42'si kadın, yine hasta grubunda % 43.8 ve kontrol grubunda ise %56.2'si erkek cinsiyet idi (Tablo 6).

Tablo 6: Hasta ve kontrol grubunda kadın-erkek olguların veri dağılımı

	CİNSİYET				TOPLAM n
	KADIN		ERKEK		
	n	%	n	%	
HASTA	57	58.0	46	43.8	103
KONTROL	41	42.0	9	56.2	100
TOPLAM	98	100.0	105	100.0	203

7.2. Genotip ve Allel Frekanslarının Karşılaştırılması

Çalışmadaki MTHFR geni rs1801133 SNP (C677T) ve MTHFR geni rs1801131 SNP (A1298C) genotiplerinin allel sıklıkları Hardy Weinberg eşitliği yönünden değerlendirildi ve her iki genotipinde Hardy Weinberg eşitliğine uyduğu gözlemlendi.

7.2.1. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR C677T allel frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR geni C677T polimorfizmi için allel dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir. Buna göre hasta grubunda T allel sıklığı 72 (%35), C allel sıklığı 134 (%65), kontrol grubunda T allel sıklığı 63 (%31.5), C allel sıklığı 137 (%68.5) olarak bulunmuştur. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR C677T allel sayı ve frekansları karşılaştırmak için Ki-kare testi uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p > 0.05$) (Tablo 7).

Tablo 7: Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR C677T allel sayı ve frekanslarının karşılaştırılması

MTHFR C677T			HASTA n = 206	KONTROL n = 200	TOPLAM	P
ALLEL	C	n	134	137	271	0.264
		%	65.0	68.5	66.75	
	T	n	72	63	135	
		%	35.0	31.5	33.25	
	TOPLAM	n	206	200	406	
		%	100.0	100.0	100.0	

7.2.2. MTHFR C677T polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması:

Diyabetik polinöropati hastaları ile kontrol grubunda MTHFR genindeki C677T polimorfizminin CC (wild tip), CT (heterozigot), TT (mutant) genotip frekansları karşılaştırılmış , TT homozigot mutant genotipinin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 8).

Tablo 8: MTHFR C677T polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması

MTHFR C677T		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL CC	n	45	45	90	0.429
	%	43.7	45.0	44.3	
HETEROZİGOT CT	n	44	47	91	
	%	42.7	47.0	44.8	
HOMOZİGOT TT	n	14	8	22	
	%	13.6	8.0	10.8	
TOPLAM	n	103	100	203	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.3. MTHFR C677T polimorfizmi için hasta ve kontrol gruplarında homozigot mutant genotip ile normal ve heterozigot genotip verilerinin karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T polimorfizmi için homozigot mutant genotipi ile normal ve heterozigot genotip dağılımı karşılaştırılmış, homozigot mutant genotipinin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Tablo 9: Hasta ve kontrol gruplarında homozigot mutant genotip ile normal ve heterozigot genotip verilerinin karşılaştırılması

	GENOTİP	HASTA		KONTROL		TOPLAM		P
		n	%	n	%	n	%	
MTHFR C677T	HOMOZİGOT MUTANT	14	13.6	8	8.0	22	10.8	0.146
	NORMAL+ HETEROZİGOT	89	86.4	92	92.0	181	89.2	
	TOPLAM	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

7.2.4. Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR A1298C allel frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR geni A1298C polimorfizmi için allel dağılımı değerlendirilmiş, hasta grubunda C allel sıklığı 90 (%43.7), A allel sıklığı 116 (%56.3); kontrol grubunda C allel sıklığı 70 (%35), A allel sıklığı 130 (%65) olarak bulunmuştur. Hasta grubunda mutant C allel sıklığı kontrol grubuna göre daha fazla olmakla birlikte hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR A1298C allel sayı ve frekansları karşılaştırmak için Ki-kare testi uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 10).

Tablo 10: Hasta ve sağlıklı kişilerdeki MTHFR A1298C allel sayı ve frekanslarının karşılaştırılması

MTHFR A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P	
ALLEL	A	n	116	130	246	0.073
		%	56.3	65.0	60.6	
	C	n	90	70	160	
		%	43.7	35.0	39.4	
	TOPLAM	n	206	200	406	
		%	100.0	100.0	100.0	

7.2.5. MTHFR A1298C polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması:

Diyabetik polinöropati hastaları ile kontrol grubunda MTHFR genindeki A677C polimorfizminin AA (wild tip), AC (heterozigot), CC (mutant) genotip frekansları karşılaştırılmış , CC homozigot mutant genotipinin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 11).

Tablo11: MTHFR A1298C polimorfizmi için hasta ve kontrol grubunda normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerinin karşılaştırılması

MTHFR A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL AA	n	34	43	77	0.216
	%	33.0	43.0	37.9	
HETEROZİGOT AC	n	48	44	92	
	%	46.6	44.0	45.3	
HOMOZİGOT CC	n	21	13	34	
	%	20.4	13.0	16.7	
TOPLAM	n	103	100	203	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.6. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR geni A1298C polimorfizmi için homozigot mutant genotipi ile normal ve heterozigot genotip sıklığının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR A1298C polimorfizmi için homozigot mutant genotipi ile normal ve heterozigot genotip dağılımı karşılaştırması yapılmış olup homozigot mutant genotipinin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 12).

Tablo 12: Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR geni A1298C polimorfizmi için homozigot mutant genotipi ile normal ve heterozigot genotip sıklığının karşılaştırılması

	GENOTİP	HASTA		KONTROL		TOPLAM		P
		n	%	n	%	n	%	
MTHFR A1298C	HOMOZİGOT MUTANT	21	20.4	13	13.0	34	16.7	0.159
	NORMAL+ HETEROZİGOT	82	79.6	87	87.0	169	83.3	
	TOPLAM	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

7.2.7. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin birleşik genotip analizinin değerlendirilmesi:

Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin birleşik genotip analizi yapılarak genotip frekansları Ki-kare testi ile karşılaştırılmış ve istatistiksel analiz sonucunda hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir ilişki gözlenmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 13). Bu tabloda MTHFR geni C677T polimorfizmi için risk genotipi olan TT ile A1298C polimorfizmi için risk genotipi olan CC 'nin birlikte olma durumunun diyabetik polinöropati ile ilişkisi araştırılmış ve iki polimorfik bölge için homozigot mutant genotipler olan TT ve/veya CC genotiplerinin hasta grupta kontrol grubuna göre daha yüksek oranda görüldüğü tespit edilmiştir. İki polimorfik bölge için homozigot normal genotipler olan CC ve/veya AA genotipleri ise kontrol grubunda hasta grubuna göre daha yüksek oranda görülmektedir.

Tablo 13: Hasta ve kontrol grubunda MTHFR C677T ve MTHFR A1298C polimorfizmlerinin birleşik genotip analizinin değerlendirilmesi

MTHFR C677T / A1298C	HASTA		SAĞLIKLI		TOPLAM		P
	n	%	n	%	n	%	
TT/CC HOMOZİGOT/HOMOZİGOT	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0.258
CT/CC HETEROZİGOT/HOMOZİGOT	1	0.95	0	0.0	1	0.5	
CC/CC NORMAL/HOMOZİGOT	20	19.4	14	14.0	34	16.74	
TT/AC HOMOZİGOT/HETEROZİGOT	1	0.95	0	0.0	1	0.5	
CT/AC HETEROZİGOT/HETEROZİGOT	29	28.2	22	22.0	51	25.12	
CC/AC NORMAL/HETEROZİGOT	18	17.5	22	22.0	40	19.70	
TT/AA HOMOZİGOT/NORMAL	13	12.6	8	8.0	21	10.34	
CT/AA HETEROZİGOT/NORMAL	14	13.6	25	25.0	39	19.2	
CC/AA NORMAL/NORMAL	7	6.8	9	9.0	16	7.9	
TOPLAM	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

7.2.8. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal (CC/AA) ve en az 1 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal genotipe sahip bireyler ve en az 1 mutant allel taşıyan bireyler Ki-kare testi ile karşılaştırılmış olup hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 14).

Tablo 14 : Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal (CC/AA) ve en az 1 mutant allel) taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması

MTHFR C677T/A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL	n	7	9	16	0.560
	%	6.8	9.0	7.9	
En az 1 mutant alleli olanlar	n	96	91	187	
	%	93.2	91.0	92.1	
TOPLAM	n	103	100	203	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.9. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve birleşik heterozigot (CT/AC) genotip verilerinin karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal genotipe (CC/AA) sahip bireyler ile birleşik heterozigot (CT/AC) genotipe sahip bireyler karşılaştırılmış, birleşik heterozigot genotipin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 15).

Tablo 15 : Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve birleşik heterozigot genotip verilerinin karşılaştırılması

MTHFR C677T/A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL	n	7	9	16	0.359
	%	19.4	29.0	23.9	
BİRLEŞİK HETEROZİGOT	n	29	22	51	
	%	80.6	71.0	76.1	
TOPLAM	n	36	31	67	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.10. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve 3 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal genotipe (CC/AA) sahip bireyler ile 3 mutant allel (CT/CC- TT/AC) taşıyan bireylerin genotip frekansları karşılaştırılmış, 3 mutant allel taşıyan genotipin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Fischer testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 16)

Tablo 16 : Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve 3 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması

MTHFR C677T/A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL	n	7	9	16	0.471
	%	77.8	100.0	88.9	
3 MUTANT ALLEL	n	2	0	2	
	%	22.2	0.0	11.1	
TOPLAM	n	9	9	18	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.11. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve en az 2 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubu arasında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal genotipe sahip bireyler ile en az 2 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekansları karşılaştırılmış, en az 2 mutant allel taşıyan genotipin hasta grupta daha fazla olduğu görülmüştür. Ancak Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değerlere bulunamamıştır ($p>0.05$) (Tablo 17).

Tablo 17: Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmleri için normal ve en az 2 mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması

MTHFR C677T/A1298C		HASTA	KONTROL	TOPLAM	P
NORMAL	n	7	9	16	0.242
	%	9.9	17.0	12.9	
EN AZ 2 MUTANT ALLEL	n	64	44	108	
	%	90.1	83.0	87.1	
TOPLAM	n	71	53	124	
	%	100.0	100.0	100.0	

7.2.12. Hasta ve kontrol gruplarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri için 1 ve daha az mutant allel taşıyanlar ile 2 ve daha fazla mutant allel taşıyan bireylerin genotip frekanslarının karşılaştırılması:

Hasta ve kontrol grubunda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin 1 ve daha az mutant allel taşıyanlar ile 2 ve daha fazla mutant allel taşıyanlar karşılaştırılmış olup hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre 2 ve daha fazla mutant allel taşıma oranının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ki-kare testi uygulandığında hasta ve kontrol grubu arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$) (Tablo 18).

Tablo 18: Hasta ve kontrol gruplarında 1 ve daha az mutant allel ile 2'den fazla mutant alleli olanların karşılaştırılması

MTHFR C677T/A1298C	HASTA		KONTROL		TOPLAM		P
	n	%	n	%	n	%	
MUTANT $2 \geq$	64	62.0	44	44.0	108	53.0	0.010
MUTANT $1 \leq$	39	38.0	56	56.0	95	47.0	
TOPLAM	103	100.0	100	100.0	203	100.0	

7.3. Genotip ve ENMG sonuçlarının karşılaştırılması:

Çalışmamızda diyabetik polinöropati tanısı olan hasta grubunun ENMG sonuçlarında yer alan motor, duyuşal ve miks tutulum verileri, MTHFR geni C677T ve A1298C genotip verileriyle karşılaştırıldı.

7.3.1.Hasta grubunda EMG sonuçları ile MTHFR C677T polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması:

Hasta grubunda MTHFR geni C677T polimorfizminin normal, heterozigot ve homozigot mutant genotipleri ile ENMG sonucu tespit edilen motor, duyuşal veya miks tip polinöropatiler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını araştırmak için Ki-kare testi uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 19).

Tablo 19: Hasta grubunda ENMG sonuçları ile MTHFR C677T polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması

MTHFR C677T		ENMG								P
		MOTOR		DUYUSAL		MİKST		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
NORMAL CC	n	1	16.7	6	33.3	38	48.1	45	43.7	0.70
	%	2.2	-	13.3	-	84.4	-	100.0	-	
HETEROZİGOT CT	n	5	83.3	11	61.1	28	35.4	44	42.7	
	%	11.4	-	25.0	-	63.6	-	100.0	-	
HOMOZİGOT TT	n	0	0.0	1	5.6	13	16.5	14	13.6	
	%	0.0	-	7.1	-	92.9	-	100.0	-	
TOTAL	n	6	100.0	18	100.0	79	100.0	103	100.0	
	%	5.8	-	17.5	-	76.7	-	100.0	-	

7.3.2. Hasta grubunda ENMG sonuçları ile MTHFR A1298C polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması:

Hasta grubunda MTHFR geni A1298C polimorfizminin AA/AC/CC genotipleri ile ENMG sonucu tespit edilen motor, duyuşal veya miks tip polinöropatiler arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını araştırmak için Ki-kare testi uygulanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmemiştir ($p>0.05$) (Tablo 20).

Tablo 20: Hasta grubunun ENMG sonuçları ile MTHFR A1298C polimorfizmi arasında ilişkinin araştırılması

MTHFR A1298C		ENMG								P
		MOTOR		DUYUSAL		MİKST		TOTAL		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
NORMAL AA	n	2	33.3	4	22.2	28	35.4	34	33.0	0.730
	%	5.9	-	11.8	-	82.4	-	100.0	-	
HETEROZİGOT AC	n	3	50.0	11	61.1	34	43.0	48	46.6	
	%	6.3	-	22.9	-	70.8	-	100.0	-	
HOMOZİGOT CC	n	1	16.7	3	16.7	17	21.5	21	20.4	
	%	4.8	-	14.3	-	81.0	-	100.0	-	
TOPLAM	n	6	100.0	18	100.0	79	100.0	103	100.0	
	%	5.8	-	17.5	-	76.7	-	100.0	-	

8. Tartışma ve Sonuç

Diabetes Mellitus, hiperglisemi ile seyreden ve en sık görülen sistemik bir metabolizma hastalığıdır. DM hastalığının etiopatogeneze göre tanımlanmış birçok alt tipi olmasına rağmen tüm dünya toplumlarında %95 oranında Tip 2 DM görülmektedir. Tip 2 DM hastalığı, pankreas beta adacık hücrelerinden insülin hormonunun salınım yetersizliği veya plazmada yeterli miktarda var olan insülin hormonunun periferik dokularda yeterince aktivite gösterememesinden kaynaklanmaktadır. Organizmada meydana gelen bu gerçek veya rölatif insülin yetersizliği yalnız hiperglisemiye değil aynı zamanda yağ ve protein metabolizmasında da bozukluklara yol açmaktadır. Hastaların büyük çoğunluğunda ortaya çıkan akut ve kronik komplikasyonlar ise ciddi mortalite ve morbiditeye neden olabilmektedir (2).

Tip 2 DM ileri yaş hastalığı olmasına rağmen artık günümüzde genç yaş gruplarını da tutmaya başlamıştır. Kentsel yaşamın artışı, sedanter yaşam biçimi, sanayi ürünü gıdaların tüketimi, obezite gibi çevresel faktörlerin, DM hastalığının artık daha genç yaşlarda görülmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Yapılan ikiz çalışmaları, ailesel özellik göstermesi ve bazı etnik topluluklarda insidansının yüksek olması ise Tip 2 DM'in etiopatogenezinde genetik faktörlerin önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir. Tip 2 DM hastalığı, etiopatogenezde çevresel ve genetik birçok faktörün suçlanması nedeniyle multifaktöryel bir hastalık olarak tanımlanmaktadır (24).

Binlerce yıldır bilinen Tip 2 DM hastalığı, günümüzde çok yaygın görülmesi, sıklıkla gelişen komplikasyonlarının yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olması, toplumlara büyük ekonomik yükler getirmesi nedeniyle WHO tarafından 21. yüzyılın en önemli halk sağlığı sorunu olarak ilan edilmiştir. 2025 yılında tüm dünyada 300 milyon DM hastası olacağı tahmin edilmektedir (2). Bu nedenle DM hastalığını ve komplikasyonlarını gidermek amacıyla daha etkin tedavi seçenekleri araştırılırken diğer yandan hastalığın ve komplikasyonlarının oluşmasını önlemek için birçok bilimsel çalışma da yapılmaktadır.

Tip 2 DM'nin kronik komplikasyonları, makrovasküler ve mikrovasküler komplikasyonlar olarak iki grupta toplanmaktadır. Tip 2 DM'nin makrovasküler komplikasyonları olan aterosklerotik kalp hastalığı, periferik vasküler hastalık ve serebrovasküler hastalıklar, ölüme kadar gidebilen ağır organ hasarlarına yol açabilmektedir. Tip 2 DM'nin mikrovasküler komplikasyonları ise böbrek hasarı

yapan nefropati, göz hasarı oluşturan retinopati ve sinir hasarına neden olan nöropatilerdir (20).

Tip 2 DM hastalığının mikrovasküler komplikasyonlarından olan nöropatiler, DM hastalarının %50'sini etkilemekte ve tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Diyabetik polinöropatiler ise diyabet hastalarında en yaygın görülen nöropatik sendromdur. Hastalarda şiddetli ağrı, uyuşma, karıncalanma, his kaybı şikayetleri genellikle önce ayak parmaklarından başlamakta, daha sonra el ve ayaklarda eldiven-çorap tarzı bir dağılım gösterebilmektedir. Bu şikayetler geceleri şiddetlenip hastanın uyku kalitesini bozabilmekte, şiddetli ağrı hastada depresyon ve anksiyeteye yol açabilmektedir. İlerleyen dönemlerde kas güçsüzlüğü gibi motor problemler de hastalığa dahil olabilmektedir. His kaybı, daha sonra amputasyon ve ölüme kadar gidebilen ayak ülserasyonlarına yol açabilmektedir. Hastalarda var olan bu şikayetler, sinir hasarının şiddetini gösteren güvenilir belirteçler değildir. Şiddetli ağrı şikayeti olanlarda hafif bir duyu hasar olabilirken, ağrı şikayeti olmayanlarda şiddetli duyu kusuru olup ayak ülserasyonu için yüksek risk taşıyabilmektedir (115). Bu nedenle diyabetik nöropati hastalığının erken tanınması, altta yatan patogeneze yönelik uygun tedavilerin geliştirilmesi ile hastaların yaşam kalitesi ve yaşam süreleri arttırabilir. Bizim çalışmamızda yer alan diyabetik nöropati hastalarının çoğunda yukarıda bahsedilen eldiven-çorap tarzında duyu kusuru, şiddetli ağrı, kas güçsüzlüğü, iyileşmeyen ayak ülserasyonları mevcuttu. Hatta bazı hastalarımızda ekstremitte amputasyonu dahi sözkonusuydu. Biz hastalarımızda semptom ve klinik bulgular olmasına rağmen hem diyabetik polinöropati durumunu kantitatif ortaya koymak hem de diğer nöropati nedenlerini dışlamak için ENMG tetkiki yapılmış hasta grubunu çalışmamıza dahil ettik.

Diyabetik polinöropati patogenezinde metabolik ve vasküler faktörlerin ortaklaşa rol oynadığı bilinmektedir. Diyabetik polinöropati olgularında mikrovasküler problemler 1993 yılında yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Diyabetik polinöropati hastalarında mikrovasküler yataktan yapılan morfometrik incelemede, endonöral kapillerlerde bazal membran kalınlaşması, endotel hücre proliferasyon ve hipertrofisi tespit edilmiş, bu kapillerlerde oksijen basıncının da düşük olduğu gözlenmiştir. Polinöropatisi olmayan DM hastalarında ise bu bulguya rastlanılmamıştır (116). Yapılan başka bir çalışmada ise diyabetik polinöropati olgularında epinöral arter ve venlerde aterosklerozis ile birlikte azalmış kan akımı

mevcut iken polinöropati olmayan diyabetik hastalarda bu bulguya rastlanılmamıştır (117). Diyabetik polinöropati hastalarında santral sinir sistemi tutulumu da araştırılmakta olup 2008 yılında yapılan bir çalışmada beyinde talamik bölgede mikrovasküler yetersizlik olduğu ve bunun periferik nöropati gelişimi ile ilişkisi olduğu bildirilmiştir (118).

Literatürde diyabetik polinöropati patogenezinde vasküler hasara yol açan en önemli etkenin hiperglisemi ve kötü glisemik kontrol olduğu belirtilmekle birlikte her Tip 2 DM hastasında diyabetik polinöropati gelişmemekte yada iyi bir glisemik kontrol olsa dahi diyabetik polinöropati gibi mikrovasküler komplikasyonlar yine de gelişebilmektedir (115). Bu durum genetik polimorfizmlerle açıklanmaktadır.

Son 20 yılda yapılan çalışmalar, genomdaki belirli bölgelerdeki polimorfizmlerin Tip 2 DM hastalarında vasküler hasar gelişme riskini arttırdığını göstermiştir. Bu polimorfik genlerden birisi de MTHFR genidir. MTHFR geni polimorfizminin, DM hastaları dışında tüm popülasyonda homosistein düzeylerini yükselterek ateroskleroza yatkınlık oluşturduğu önceki yapılan çalışmalarda bilinmekteydi (51). Biz de çalışmamızda diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan diyabetik polinöropati etiyopatogenezini araştırmak için diyabetik polinöropati hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini çalıştık. Literatürde MTHFR polimorfizmlerinin neden olduğu homosistein yüksekliğinin immun yanıtı tetikleyerek ve pıhtılaşma yolağındaki proteinlerin aktivitesini değiştirerek ateroskleroza ve insülin direncine yol açabileceğine ilişkin yayınlar bulunmaktadır. Ancak MTHFR C677T polimorfizminin homosisteinden bağımsız olarak insülin sekresyon ve sensitivitesi üzerine karmaşık bir düzenleyici etkisi olabileceği de literatürde bildirilmektedir (119). MTHFR geni polimorfizmlerinin gerek homosistein düzeylerini artırarak vaskülopatiye yatkınlık oluşturması, gerekse de homosisteinden bağımsız olarak insülin sensitivitesi üzerine etkisinin olması, ayrıca promotor bölgesinde TATA dizisi içermediğinden dış faktörlerden etkilenebilen bir gen olması nedeniyle diyabetik polinöropati etiyopatogenezini araştırırken MTHFR geninin polimorfizmlerini çalıştık.

MTHFR geni polimorfizminin Tip 2 DM hastalarının vasküler komplikasyonlarından sorumlu olabileceğine ilişkin ilk yayınlar 1990'lı yıllarda ortaya çıkmıştır. 1995 yılında Brulhart ve arkadaşları, Tip 2 DM ve koroner kalp hastalığı olan 649 bireyde MTHFR C677T polimorfizmini çalışmışlardır. Çalışma sonucu elde edilen verileri daha önce sağlıklı kişilerde yapılan çeşitli çalışmalarla

karşılaştırmışlar ve anlamlı bir ilişki tespit edememişlerdir (120). Ancak sonraki yıllarda Tip 2 DM hastalarının vasküler komplikasyonlarının genetik etiyopatogenezinin MTHFR geni polimorfizmleri ile ilişkisi araştırılmış ve çeşitli sonuçlara ulaşılmıştır.

Tip 2 DM'in makrovasküler komplikasyonlarının MTHFR gen polimorfizmleri ile ilişkilendirildiği çeşitli çalışmalar literatürde bulunmaktadır. 2004 yılında Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 126'sında koroner kalp hastalığı da mevcut olan toplam 228 Tip 2 DM hastası ve 114 sağlıklı kontrol ile MTHFR C677T polimorfizminin koroner kalp hastalığı ile ilişkisi araştırılmış ve bu çalışmada Çin popülasyonu için MTHFR C677T polimorfizminin Tip 2 DM hastalarında koroner kalp hastalığı için belirleyici bir faktör olduğu sonucuna ulaşılmıştır (121). 2005 yılında Hermans ve arkadaşlarının Belçika'da yaptığı bir çalışmada ise 165 Tip 2 DM hastasında MTHFR C677T polimorfizminin inme ile ilişkisi araştırılmış olup çalışma sonunda Tip 2 DM hastalarında MTHFR geninin C677T polimorfizminde T allelinin inme için bir risk faktörü olduğu veya C allelinin Tip 2 DM hastalarında inme için koruyucu etkisi olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (122). 2009 yılında Çin'de Sun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Tip 2 DM ile MTHFR C677T polimorfizminin iskemik inme ile ilişkisi araştırılmıştır ve sonuçta Çinli Tip 2 DM hastalarında MTHFR C677T polimorfizminin, plazma homosistein düzeylerini yükselterek iskemik inme için belirleyici bir faktör olduğu kanaatine varılmıştır (123). Kanada'da yapılan bir çalışmada ise Tip 2 DM hastalarında MTHFR C677T polimorfizminin periferik arteriyel hastalık ile ilişkisi araştırılmak amacıyla Kanada'nın izole ve yerli popülasyonunu oluşturan Oji-Cree kabilesinden Tip 2 DM ve periferik arteriyel hastalığı olan 138 birey çalışma grubuna dahil edilmiştir. Çalışmanın sonunda bu etnik grupta Tip 2 DM hastalarında MTHFR 677 T alleli taşıyıcılarında periferik arteriyel hastalık gelişme riskinin 3.5 kat arttığı sonucuna ulaşılmıştır (124).

DM'nin makrovasküler komplikasyon gelişiminin MTHFR polimorfizmleri ile ilişkilendiren yayınlar olmakla birlikte ilişkili olmadığını belirten yayınlar da bulunmaktadır. Örneğin İtalya'da yapılan ve 2011 yılında yayınlanan prospektif bir çalışmada hiperhomosisteinemi ve MTHFR C677T polimorfizmi ile Tip 2 DM hastaları arasında makrovasküler komplikasyon gelişimi açısından anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (125). Yapılan başka bir çalışmada ise Tip 2 DM hastalarında homosistein düzeyleri ve MTHFR C677T genotipleri analiz edilerek makrovasküler

hastalık ile ilişkisi değerlendirilmiş olup, MTHFR genotipinin koroner arter hastalığı ve serebrovasküler hastalık ile ilişkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (126).

Biz diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan diyabetik nöropati etiyopatogenezinde MTHFR gen polimorfizminin etkisini araştırdık. Literatürde Tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile MTHFR polimorfizmlerinin ilişkisi üzerine yapılan bazı çalışmalar mevcuttur. Örneğin MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik nefropati ile ilişkisini araştıran bir çalışma Sun ve arkadaşları tarafından Çin'de yapılmıştır. 220 Tip 2 DM hastası ve 130 sağlıklı gönüllüde yapılan bu çalışmada Tip 2 DM hastaları, diyabetik nefropatisi olan ve nefropatisi olmayan şekilde 2 gruba ayrılmıştır. Çalışmada MTHFR geni C677T polimorfizmi için mutant T allel frekansı kontrol grubunda %30, nefropatisi olmayan DM grubunda % 28.6, nefropati olan DM grubunda ise % 42.3 olarak bulunmuştur. TT genotip frekansı ise kontrol grubunda %16.9, nefropatisi olmayan DM grubunda %16.7, nefropatisi olan DM grubunda ise % 21 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada MTHFR C677T polimorfizminin Tip 2 DM'li Çinli populasyonda diyabetik nefropati için genetik bir risk faktörü olduğu sonucuna ulaşılmıştır (127).

MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik nefropati ve retinopati ile ilişkisini araştıran, Maeda ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 190 Tip 2 DM hastası incelenmiştir. Diyabetik nefropati açısından istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmazken diyabetik retinopati olgularının %41.9'unda CC genotipi, %31.1'inde CT genotipi, %61.5'inde TT genotipi tespit edilmiştir. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş ve MTHFR polimorfizmini temel alan önleyici tedavilerin Tip 2 DM hastalarında retinopati gelişimini geciktirebileceği sonucuna ulaşılmıştır (109).

MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından olan retinopati ile ilişkisini de araştıran literatürde çeşitli yayınlar bulunmaktadır. 2003 yılında Çin'de yapılan bir araştırmada 208 Tip 2 DM hastası ve 57 sağlıklı kontrol grubu ile bir çalışma yapılmıştır. 208 DM hastası ise diyabetik retinopatisi olan ve olmayan şekilde 2 gruba ayrılmıştır. T allel frekansı kontrol grubunda %31.58, retinopatisi olmayan DM grubunda %33.16, retinopatisi olan DM grubunda ise %49.09 olarak tespit edilmiştir. TT genotip frekansı ise kontrol grubunda % 17.54, retinopatisi olmayan DM grubunda % 18.37, retinopatisi olan DM grubunda ise % 28.18 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada MTHFR geni

C677T polimorfizminin diyabetik retinopati gelişimi ile ilişkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır (128).

MTHFR gen polimorfizminin diyabetik retinopati ile ilişkisini araştıran bir başka çalışma Japonya'da yapılmış ve 156 Tip 2 DM hastası çalışma grubu olarak seçilmiştir. Tip 2 DM hastaları retinopatisi olmayan bireyler, non-proliferatif retinopatisi olan bireyler ve proliferatif retinopatisi olan bireyler olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. TT genotip frekansı retinopatisi olan grupta olmayanlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Retinopatisi olan grupta ise TT genotip frekansının non-proliferatif grupta, proliferatif gruptan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Retinopatisi olan grupta TT genotip frekansı % 60.9 ve non-proliferatif retinopatisi olan grupta TT genotip frekansı % 39.2 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik retinopati gelişimi için bağımsız bir risk faktörü olduğu sonucuna ulaşılmıştır (129).

2009 yılında Türkiye'de Ukinç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise MTHFR C677T polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkisi araştırılmış ve bu amaçla daha önce makrovasküler komplikasyon öyküsü olmayan Tip 2 DM hastası 52 birey çalışmaya dahil edilmiştir. Bu hastalarda retinopati, nefropati ve nöropati gelişimi ile birlikte MTHFR C677T genotipi araştırılmıştır. 37 bireyde mikrovasküler komplikasyon tespit edilmiş, 15 bireyde mikrovasküler komplikasyon tespit edilmemiştir. Grupların hiçbirinde MTHFR geni C677T polimorfizmi için TT homozigot mutant birey bulunmazken, CT genotipi mikrovasküler komplikasyonları olanlarda % 41, olmayanlarda % 60 olarak gözlenmiştir. CT genotipi nöropatisi olanlarda % 50, retinopatisi olanlarda % 44 ve nefropatisi olanlarda % 73 oranında tespit edilmiştir. Bu çalışmada MTHFR C677T polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonlarından nöropati ve retinopati ile ilişkisi bulunamazken, nefropati gelişimine katkıda bulunduğu sonucuna ulaşılmıştır (111).

Literatürde MTHFR geni C677T polimorfizmlerinin tip 2 DM'in mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkisiz olduğunu belirten bazı yayınlar da mevcuttur. Örneğin Japonya'da 1999 yılında yapılan bir çalışmada 274 Tip 2 DM hastası MTHFR geni C677T polimorfizmi açısından incelenmiştir. 274 Tip 2 DM hastası diyabetik nefropatisi olan 43 birey ve olmayan 131 birey olmak üzere 2 gruba ayrılmıştır. Gruplar arasında genotip frekansı ($p= 0.42 > 0.05$) ve allel frekansı ($p= 0.34 > 0.05$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiş ve Japonya'da Tip 2

DM hastalarında diyabetik nefropati gelişimi ile MTHFR geni C677T polimorfizmi arasında bir ilişki olmadığı kanatine varılmıştır (130). Brezilya'da yapılan bir başka çalışmada ise 107 sağlıklı birey ve 141 diyabetik retinopati (46 kişi tip 1 DM, 95 Tip 2 DM) hastası bireyde MTHFR gen polimorfizmi araştırılmıştır. Gruplar arasında allel ve genotip frekansları bakımından anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışmada Brezilya popülasyonunda MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik retinopati gelişimi ile ilişkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır (131). Ambrosch ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada hiperhomosisteinemi ve MTHFR C677T polimorfizminin diyabetik nöropati gelişimine etkisi araştırılmıştır. Diyabetik nöropati gelişmiş 43 hasta ve nöropatisi olmayan 22 Tip 2 DM hastasında yapılan çalışmada, MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik nöropati gelişimine etkisi olmadığı, artmış homosistein düzeylerinin ise ilişkili olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (108).

Biz çalışmamızda 103 diyabetik polinöropati hastası ve 100 sağlıklı bireyde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerini çalıştık. Tablo 7'de görüldüğü gibi MTHFR C677T polimorfizmi için diyabetik nöropati grubunda mutant T allel frekansı %35 iken kontrol grubunda %31.5, normal C allel frekansı hasta grubunda %65 iken kontrol grubunda %68.5 idi. Hasta ve sağlıklı bireylerde MTHFR C677T polimorfizmi için C ve T allel frekansları karşılaştırıldığında her iki grupta istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını tespit ettik. Ancak sağlıklı grupta C normal allelin daha yüksek oranda olduğunu, hasta grubunda ise T mutant allelin daha yüksek oranda olduğunu gözlemledik. MTHFR geni C677T polimorfizmi için normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerini karşılaştırdığımızda, tablo 8'de görüldüğü üzere diyabetik nöropati grubunda normal (CC) genotip oranı %%43.7, kontrol grubunda ise % 84.9 iken homozigot mutant (TT) oranı diyabetik nöropati grubunda % 23.7 iken kontrol grubunda %8 olduğunu gördük. Bu verilerin doğrultusunda diyabetik nöropati ve sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber hasta grubunda homozigot mutant genotipin (TT) sağlıklı gruba göre daha yüksek oranda olduğunu tespit ettik. Çalışmamızda MTHFR geni C677T polimorfizmi ile diyabetik nöropati arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını tespit ettik. Bu sonuç Ukinç ve arkadaşlarının ayrıca Ambrosch ve arkadaşlarının bulguları ile uyumluydu.

Literatürde sadece MTHFR geni A1298C polimorfizminin diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile ilişkisini araştıran bir yayın mevcut değildi.

Bizim çalışmamızda ise tablo 10'da görüldüğü üzere MTHFR geni A1298C polimorfizmi için diyabetik nöropati grubunda mutant C allel frekansı %35 iken kontrol grubunda %35, normal A allel frekansı hasta grubunda %56.3 iken kontrol grubunda %65 idi. A ve C allel frekansları karşılaştırıldığında diyabetik polinöropati hastası ve sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ancak hasta grubunda A normal allelin daha düşük oranda ve C mutant allelin sağlıklı gruptan daha yüksek oranda olduğunu tespit ettik. MTHFR geni A1298C polimorfizmi için normal, heterozigot ve homozigot genotip verilerini karşılaştırdığımızda, tablo 11'de görüldüğü üzere diyabetik polinöropati grubunda normal (AA) genotip oranı %33, kontrol grubunda ise % 43 iken homozigot mutant (CC) oranı diyabetik nöropati grubunda % 20.4 iken kontrol grubunda %13 olduğunu gördük. Bu verilerin doğrultusunda diyabetik nöropati ve sağlıklı bireylerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber hasta grubunda homozigot mutant genotipin (CC) sağlıklı gruba göre daha yüksek oranda olduğunu tespit ettik.

Literatürde Tip 2 DM'in mikrovasküler komplikasyonlarının MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin her ikisi ile ilişkisini araştıran yayınlar da mevcuttu. Örneğin Shpichinetsky ve arkadaşlarının 2000 yılında İsrail'de yaptıkları bir çalışmada diyabetik nefropati gelişiminde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya 55 nefropatisi olan ve 43 nefropatisi olmayan Tip 2 DM hastası dahil edilmiştir. MTHFR C677T ve A1298C allel frekansı ve genotip dağılımının her iki grupta da anlamlı bir farklılık göstermediği, ancak 677T mutasyonu olanlarda serum folat düzeyinin oldukça düşük olduğu folat tedavisinin koruyucu olabileceği sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca A1298C polimorfizminde CC homozigot mutasyonun diyabetik nefropati açısından koruyucu etkisi olabileceği de bildirilmektedir (132).

Polonya'da 2003 yılında yapılan bir çalışmada ise MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin diyabetik nefropati ile ilişkisi araştırılmıştır. Çalışmaya katılan 429 Tip 2 DM hastası, normoalbuminüri, mikroalbuminüri ve proteinürisi-kronik böbrek yetmezliği olmak üzere 3 gruba ayrılmış ve bu gruplarda MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırılmıştır. Bu çalışmada gruplar arası allel frekansları ve genotip oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamakla beraber erkek cinsiyette MTHFR geni C677T polimorfizminin diyabetik nefropati gelişimi için bir risk faktörü olabileceği bildirilmiştir (133)

Mtiraoui ve arkadaşlarının 2007 yılında Tunus'ta yaptıkları bir çalışmada diyabetik nefropati gelişiminde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya 93 diyabetik nefropati hastası, 267 nefropatisi olmayan tip 2 DM hastası ve 400 sağlıklı kontrol grubu dahil edilmiştir. MTHFR geni 677T ve 1298A allellerinin diyabetik nefropati grubunda diğer gruplara göre yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tunuslu diyabetik hastalarda MTHFR A1298C polimorfizmi değil ancak C677T polimorfizminin, homosistein düzeylerini yükselterek diyabetik nefropati gelişiminde risk faktörü olabileceği sonucuna ulaşılmış ve farklı etnik gruplarda çalışmanın genişletilmesi gerektiği vurgulanmıştır (134).

Rahimi ve arkadaşlarının 2010 yılında İran'da yaptıkları bir çalışmada diyabetik nefropati gelişiminde MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin etkisi araştırılmıştır. Çalışmaya 72 nefropatisi olan ve 72 nefropatisi olmayan Tip 2 DM hastası dahil edilmiştir. Diyabetik nefropatisi olan grupta MTHFR geni C677T polimorfizmi için heterozigot ve homozigot mutant genotip dağılımı, nefropatisi olmayanlara göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Diyabetik nefropatisi olan grupta MTHFR geni A1298C polimorfizmi için heterozigot ve homozigot mutant genotip dağılımı da nefropatisi olmayanlara göre yüksek olarak tespit edilmiştir. Birleşik heterozigotluk durumu ise yine nefropatisi olan grupta anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İranlı Tip 2 DM hastalarında MTHFR genindeki hem 677T ve hem de 1298C allellerinin nefropati gelişimini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (135).

Bizim çalışmamızda ise MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri için hasta ve sağlıklı bireylerdeki olası tüm genotip verileri tablo 13'de gösterilmiştir. Diyabetik nöropati ve kontrol grubunda her iki bölge için homozigot mutant birey tespit edilmedi. 3 mutant allele sahip birey kontrol grubunda bulunmazken diyabetik nöropati grubunda 2 birey mevcuttu. Birleşik heterozigotluk durumu hasta grubunda %28.2 ve kontrol grubunda %22 oranlarıyla hasta grubunda daha yüksekti. Tablo 18'de gösterildiği üzere gruplar arasında 1 ve daha az mutant allele sahip bireyler ile 2 ve daha fazla mutant allele sahip bireyler karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edildi. Diyabetik nöropati grubunda 2 ve daha fazla mutant allele sahip bireyler anlamlı bir şekilde yüksekti.

Hasta grubunda ENMG sonuçları ile MTHFR C677T polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması yapılmış olup tablo 19'da görüldüğü üzere MTHFR C677T genotipi ile motor, duyuşal ve miks tip diyabetik polinöropati arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Hasta grubunda ENMG sonuçları ile MTHFR A1298C polimorfizmi genotiplerinin karşılaştırılması yapılmış olup tablo 20'de görüldüğü üzere MTHFR A1298C genotipi ile motor, duysal ve miks tip diyabetik polinöropati arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Çalışmamızda Konya bölgesinde bulunan Tip 2 diyabet hastalarında MTHFR C677T ve A1298C polimorfizmlerinin diyabetik polinöropati gelişimi üzerine etkisi olup olmadığını araştırdık. Literatürde Tip 2 diyabetin mikrovasküler komplikasyonları ile MTHFR polimorfizmlerinin ilişkisi üzerine yapılan bazı çalışmalar olmakla birlikte özellikle diyabetik polinöropati gelişiminde MTHFR geninin hem C677T ve hem de A1298C polimorfizminin incelendiği bir çalışma literatürde mevcut değildir. Ayrıca ENMG sonuçları ile MTHFR polimorfizmleri arasında anlamlı bir ilişki olup olmadığını araştıran bir çalışma da yine literatürde bulunmamaktadır. Bu çalışma ile MTHFR geninde sık görülen 2 polimorfizmin birlikte olabildiği birleşik heterozigotluk durumunda diyabetik nöropatiye yatkınlık olup olmadığını da araştırdık. Birleşik heterozigotluk için istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç olmamakla birlikte birleşik heterozigotluğun da içinde bulunduğu 2 ve daha fazla mutant alleli olan bireylerin diyabetik nöropatisi olan grupta anlamlı bir şekilde yüksek olduğunu tespit ettik. Bu durum mutant allel sayısı arttıkça diyabetik nöropati gelişimine yatkınlık sağlayabileceği yönünde yorumlanmakla birlikte MTHFR polimorfizmlerinin diyabetik polinöropati etiyopatogenezine katkısı olup olmadığını kesin olarak açıklayamamaktadır.

Tip 2 diyabetin vasküler komplikasyonlarının gelişiminde başlıca etken olan endotel hasarına yol açabilecek olası birçok gen polimorfizmi tüm dünyada halen en önemli araştırma konusudur. Multifaktöryel bir hastalık olan Tip 2 diyabetin vasküler komplikasyonlarının poligenik doğası, çeşitli çevresel faktörlerle etkileşim halinde olması, MTHFR gen polimorfizmlerinin tek başına etkisini ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Hasta ve kontrol gruplarının daha fazla sayıda olduğu, farklı etnik grupları içeren, çok merkezli ve hatta tüm genomun SNP taramalarının yapılacağı daha geniş ölçekli araştırmalarla diyabetik polinöropatilerin poligenik doğası aydınlatılabilir. Böylece erken tanı koyarak hastalığın gelişmesini önlemek mümkün olabilir veya hedefe yönelik daha etkin tedaviler geliştirilebilir.

9. Özet.

Amaç: Bu çalışmada MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin diyabetik periferik polinöropati patogenezinin katkısı olup olmadığını araştırdık.

Gereç ve Yöntem: Hasta grubu, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilimdalı Endokrinoloji Polikliniğine başvuran, en az 10 yıldır Tip 2 DM tanısı nedeniyle takip edilen ve ENMG tetkiklerinde Diyabetik Periferik Polinöropatisi olan 103 hastadan oluşturuldu. Kontrol grubu ise 2010 yılında Konya ilinde yaşayan rastgele seçilmiş 100 sağlıklı gönüllüden seçildi. Hasta ve kontrol grubundan yazılı onay alındıktan sonra kanları alındı. Pyrosequencing tekniği ile MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri araştırıldı.

Bulgular: Araştırmamızda diyabetik nöropatili bireyler ile sağlıklı kontrol grubu karşılaştırıldığında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmlerinin genotip ve allel frekansları için istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. Bununla birlikte 2 ve daha fazla mutant alleli olan bireylerin, 1 ve daha az mutant alleli olan bireylerle karşılaştırıldığında diyabetik nöropati grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde ($p=0.010$) yüksek olduğu tespit edildi.

Sonuç: Tip 2 DM hastalarında MTHFR geni C677T ve A1298C polimorfizmleri, polimorfik allel sayısı arttıkça diyabetik periferik polinöropati gelişimine yakınlık sağlayabilir. Ancak diyabetik periferik polinöropatilerin poligenik doğası ve çevresel faktörlerden etkilenmesi, MTHFR gen polimorfizmlerinin tek başına etkisini ortaya koymayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle hasta ve kontrol gruplarının daha fazla sayıda olduğu, farklı etnik grupları içeren, çok merkezli daha geniş ölçekli araştırmalarla diyabetik periferik polinöropatilerin genetik nedenleri aydınlatılabilir.

Anahtar sözcükler: Diabetes Mellitus; diyabetik polinöropati; genetik polimorfizm; Pyrosequencing.

10. ABSTRACT

Investigation of the Role of Common Polymorphisms of Methyltetrahydrofolate Reductase Gene in the Etiopathogenesis of Diabetic Neuropathy by Pyrosequencing Technique

Purpose: In this study, we investigated whether MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms contribute to the etiopathogenesis of diabetic peripheral neuropathies.

Methods: The patients group was constituted 103 individuals with diabetic peripheral polyneuropathy diagnosed by electrophysiological techniques who were followed the diagnosis of type 2 DM at least 10 years at the Selçuk University Meram Medical School, Department of Internal Medicine. The control group was constituted 100 healthy volunteers randomly selected and living in Konya. Blood samples were collected after written consent from patients and control group. MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms was investigated using pyrosequencing technique.

Findings: In our study, there was not found any statistically significant differences allele and genotype frequencies of MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms when patient and control groups were compared. Nevertheless, the number of individuals who has got 2 or more the mutant allele in the patients group were significantly higher than the control group, compared with the number of individuals who has got 1 and less than the mutant allele ($p=0.01$).

Conclusion: As the number of polymorphic alleles of MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms in type 2 DM patients may predispose to the development of diabetic peripheral polyneuropathy. But, polygenic nature of diabetic peripheral polyneuropathy and influenced of environmental factors makes it difficult to reveal the effect of MTHFR gene polymorphisms in diabetic peripheral polyneuropathy. Thus the genetic causes of diabetic peripheral polyneuropathies may be elucidated by large-scale multi-center studies containing different ethnic groups and consisting of more individuals.

Key words: Diabetes Mellitus; diabetic polyneuropathy; genetic polymorphism; Pyrosequencing.

11. KAYNAKLAR:

- 1- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 2011;34:S62-69.
- 2- Hılyar K, Aubert RE, Herman WH. Global burden of diabetes, 1995-2025. Diabetes Care 1998;21:1414-31
- 3- Bağrıaık N. Diabetes Mellitus:Tanımı, tarihesi, sınıflaması ve sıklığı. İ.Ü.Cerrahpařa Tıp Fakóltesi S¼rekli Tıp Eđitimi Etkinlikleri, Diabetes Mellitus Sempozyumu. 18-19 Aralık 1997, İstanbul
- 4- Singh M, Kumar N, Sood S, Makkar B, Arora V. Historical milestones in diabetes. AMJ 2010;3:860-64
- 5- Erdemir A, Öncel Ö, Kü¼kdađ Y, Okka B, Erer S, editors. 1. uluslararası Türk tıp tarihi kongresi. 10.ulusal Türk tıp tarihi kongresi bildiri kitabı. 2008:1471-83
- 6- Diabet ve Diabet Cemiyeti'nin Tarihi
<http://www.diabetvakfi.org/inf.php?partid=3&catid=3&pid=15>
(Son erişim tarihi 12.01.2012)
- 7- Daneman D. Type 1 diabetes. Lancet 2006;367:847-58
- 8- Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. Lancet 2011;378:169-81
- 9- WHO- Diabetes programme
<http://www.who.int/features/factfiles/diabetes/en/index.html>
(Son erişim tarihi 12.01.2012)
- 10- Bloomgarden ZT. Type 2 diabetes in the young. Diabetes Care 2004;27:998-1010
- 11- Shaw JE, Scree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. Diabetes Res Clin Pract 2010;87:4-14
- 12- Liu LL, Yi JP, Beyer J, Mayer-Davis EJ, Dolan LM, Dabelea DM et al. Type 1 and type 2 diabetes in Asian and Pacific Islander U.S. youth. Diabetes Care (Suppl. 2) 2009;32:S133-S140
- 13- Mayer-Davis EJ, Beyer J, Bell RA, Dabelea D, D'Agostino R, Imperatore G et al. Diabetes in African American youth. Diabetes Care 2009;32(Suppl. 2):S112-S122
- 14- Satman İ, Yılmaz T, Seng¼l A, Salman S, Uygur S, Bastar İ ve ark. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey. Diabetes Care 2002;25:1551-56

- 15- Gedik A, Çömlekçi A. Tip 2 DM epidemiyolojisi ve tedavideki güncel sorunlar. *Diyabet Bilimi* 2011;9:3-9
- 16- Krentz AJ, Clough G, Byrne CD. Interactions between microvascular and macrovascular disease in diabetes: pathophysiology and therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab.* 2007;9:781-91
- 17- Balletshofer BM, Rittig R, Enderle MD, Volk A, Maerker E, Jacob S et al. Endothelial dysfunction is detectable in young normotensive first-degree relatives of subjects with type 2 diabetes in association with insulin resistance. *Circulation* 2000;101:1780-84
- 18- Van den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT, Simsek S. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators Inflamm.* 2010;2010: 792393
- 19- Bakker W, Eringa EC, Sipkema P, Van Hinsbergh VWM. Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell Tissue Res* 2009;335:165-89
- 20- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes—2008. *Diabetes Care* 2008;31(Suppl.1):S12-S54
- 21- Vinik A, Ullal J, Parson HK, Casellini CM. Diabetic neuropathies: clinical manifestations and current treatment options. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006;2:269-81
- 22- Tesfaye S, Boulton AJM, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz. M, Kempner P et al. Diabetic neuropathies: Update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity and treatments. *Diabetes Care* 2010;33:2285-93
- 23- 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. *Neurology* 1993;4:817-24
- 24- Gloyn AL, McCarthy MI. The genetics of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2001;15:293-308
- 25- Zimmet PZ. Diabetes epidemiology as a tool to trigger diabetes research and care. *Diabetologia* 1999;42:499-518
- 26- Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* 2010;427:333-47
- 27- Hales CN, Barker DJP. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 2001;60:5-20
- 28- Dabelea D. The predisposition to obesity and diabetes in offspring of diabetic mothers. *Diabetes Care* 2007;30(Suppl.2):S169-174

- 29- Zimmet PZ, McCarty DJ, Courten MP. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. *J Diab Comp* 1997;11:60-68
- 30- Ahlqvist E, Ahluwalia TS, Groop L. Genetics of type 2 diabetes. *Clin Chem* 2011;57:241-54
- 31- Farbstein D, Lewy AP. The Genetics of vascular complications in diabetes mellitus. *Cardiol Clin* 2010;28:477-96
- 32- Frazer KA, Murray SS, Schork NJ, Topol EJ. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet* 2009;10:241-51
- 33- Chorley BN, Wang X, Campbell MR, Pittman GS, Nouredine MA, Bell DA. Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing Technologies. *Mutat Res.* 2008;659:147-57
- 34- Ameer A, Rada-Iglesias A, Komorowski J, Wadelius C. Identification of candidate regulatory SNPs by combination of transcription-factor-binding site prediction, SNP genotyping and haploChIP. *Nucleic Acids Res.* 2009;37:e85
- 35- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995;10:111-13
- 36- Yamada K, Strahler JR, Andrews PC, Matthews RG. Regulation of human methylenetetrahydrofolate reductase by phosphorylation.
- 37- Homberger A, Linnebank M, Winter C, Willenbring H, Marquardt T, Harms E et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *Eur J Hum Genet* 2000;8:725-29
- 38- Tran P, Leclerc D, Chan M, Pai A, Hiou-Tim F, Wu K et al. Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome* 2002;13:483-92
- 39- Dikmen M. Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enziminin moleküler biyolojisi ve hastalıklarla ilişkisi. *Kocatepe Tıp Dergisi* 2004;2:9-16
- 40- Zhao R, Goldman D. Resistance to antifolates. *Oncogene* 2003;22:7431-57
- 41- Stover PJ, Field MS. Trafficking of intracellular folates. *Adv. Nutr.* 2011;2:325-31
- 42- Bailey LB, Gregory JF. Folate metabolism and requirements. *J.Nutr.* 1999;129:779-782

- 43- Fenech M. Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res* 2011; 11:1-13
- 44- An S, Kumar R, Sheets ED, Benkovic SJ. Reversible compartmentalization of de novo purine biosynthetic complexes in living cells. *Science* 2008;320:103-06
- 45- Lu SC. S-Adenosylmethionine. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:391-95
- 46- Moyers S, Bailey LB. Fetal malformations and folate metabolism: review of recent evidence. *Nutr Rev* 2001;9:215-35
- 47- Selhub J. The many facets of hyperhomocysteinemia: Studies from the Framingham cohorts. *J. Nutr.* 2006;136:S1726-30
- 48- Brustolin S, Giugliani R, Félix TM. Genetics of homocysteine metabolism and associated disorders. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43:1-7
- 49- Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;61:470-87
- 50- Ménézo Y, Mares P, Cohen M, Brack M, Viville S, Elder K. Autism, imprinting and epigenetic disorders: a metabolic syndrome linked to anomalies in homocysteine recycling starting in early life?? *J Assist Reprod Genet* 2011; 28:1143-45
- 51- Lentz SR. Homocysteine and vascular dysfunction. *Life Sci* 1997;61:1205-15
- 52- Xu D, Neville R, Finkel T. Homocysteine accelerates endothelial cell senescence. *FEBS Lett* 2000;470:20-24
- 53- Jakubowski H. Pathophysiological consequences of homocysteine excess. *J Nutr* 2006;136:1741S-49S
- 54- Signorello MG, Viviani GL, Armani U, Cerone R, Minniti G, Piana A et al. Homocysteine, reactive oxygen species and nitric oxide in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Res* 2007;120: 607–613
- 55- Karolczak K, Olas B. Mechanism of action of homocysteine and its thiolactone in hemostasis system. *Physiol. Res.* 2009;58:623-33
- 56- White AR, Huang X, Jobling MF, Barrow CJ, Beyreuther K, Masters CL et al. Homocysteine potentiates copper- and amyloid beta peptide-mediated toxicity in primary neuronal cultures: possible risk factors in the Alzheimer's-type neurodegenerative pathways. *J Neurochem* 2001;76:1509-20
- 57- Duan W, Ladenheim B, Cutler RG, Kruman I I, Cadet JL, Mattson MP. Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. *J Neurochem* 2002;80:101-10

- 58- Mattson MP, Shea TB. Folate and homocysteine metabolism in neural plasticity and neurodegenerative disorders. *Trends Neurosci* 2003;26:137-46
- 59- van der Put NMJ, van Straaten HWM, Trijbels FJM, Blom HJ. Folate, homocysteine and neural tube defects: An overview. *Exp Biol Med* 2001;226:243-70
- 60- Martinelli M, Scapoli L, Pezzetti F, Carinci F, Carinci P, Stabellini G et al. C677T variant form at the MTHFR gene and CL/P: A risk factor for mothers? *Am J Hum Genet* 2001;98:357-60
- 61- Verkleij-Hagoort A, Bliet J, Sayed-Tabatabaei F, Ursem N, Steegers E, Steegers-Theunissen R. Hyperhomocysteinemia and MTHFR polymorphisms in association with orofacial clefts and congenital heart defects: A meta-analysis. *Am J Hum Genet Part A* 2007;143A:952-60
- 62- Bjelland I, Tell GS, Vollset SE, Refsum H, Ueland PM. Folate, vitamin B12, homocysteine, and the MTHFR 677C→T polymorphism in anxiety and depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2003;60:618-26
- 63- Ravaglia G, Forti P, Maioli F, Martelli M, Servadei L, Brunetti N et al. Homocysteine and folate as risk factors for dementia and Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr* 2005;82:636-43
- 64- Gaughan DJ, Barbaux S, Kluijtmans LAJ, Whitehead AS. The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the *CLCN6* gene. *Gene* 2000;257:279-89
- 65- Kang SS, Wong PWK, Susmano A, Sora J, Norusis M, Ruggie N. Thermolabile methylenetetrahydrofolate reductase: An inherited risk factor for coronary artery disease. *Am J Hum Genet* 1991;48:536-45
- 66- Spark JI, Laws P, Fitridge R. The incidence of hyperhomocysteinemia in vascular patients. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2003;26:558-61
- 67- Wald DS, Law M, Morris JK. Homocysteine and cardiovascular disease: evidence on causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002;325:1-7
- 68- Kluijtmans LAJ, van den Heuvel WJ, Boers GHJ, Frosst P, Stevens EMB et al. Molecular genetic analysis in mild hyperhomocysteinemia: A common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for cardiovascular disease. *Am J Hum Genet* 1996;58:35-41
- 69- Klerk M, Verhoef P, Clarke R, Blom HJ, Kok F, Schouten EG. MTHFR 677C→T Polymorphism and Risk of Coronary Heart Disease. *JAMA* 2002;288:2024-31
- 70- Khandanpour N, Willis G, Meyer FC, Armon MP, Loke YK, Wright AJA et al. Peripheral arterial disease and methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

C677T mutations: A case-control study and meta-analysis. *J Vasc Surg* 2009;49:711-8

71- Harisha PN, Devi B, Christopher R, Kruthika-Vinod TP. Impact of 5,10 methylene-tetrahydrofolate reductase gene polymorphism on neural tube defects. *J Neurosurg Pediatr.* 2010; 6:364-67

72- Czeizel AE, Dudas I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med* 1992;327:1832-35.

73- Ou CY, Stevenson RE, Brown VK, Schwartz CE, Allen WP, Khoury MJ at al. 5,10 Methylene-tetrahydrofolate reductase genetic polymorphism as a risk factor for neural tube defects. *Am J Med Genet* 1996;63:610-14

74- Christensen B, Arbour L, Tran P, Leclerc D, Sabbaghian N, Platt R at al. Genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and methionine synthase, folate levels in red blood cells, and risk of neural tube defects. *Am J Med Genet* 1999;84:151–157

75- Isotalo PA, Wells GA, Donnelly JG. Neonatal and fetal methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms: An examination of C677T and A1298C mutations. *Am J Hum Genet* 2000;67:986-90

76- Gaspar DA, Matioli SR, Pavanello RC, Araujo BC, Alonso N, Wyszynski D at al. Maternal MTHFR interacts with the offspring's BCL3 genotypes, but not with TGFA, in increasing risk to nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Eur J Hum Genet* 2004;12:521-26

77- Qian X, Lu Z, Tan M, Liu H, Lu D. A meta-analysis of association between C677T polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene and hypertension. *Eur J Hum Genet* 2007;15:1239-45

78- Sohda S, Arinami T, Hamada H, Yamada N, Hamaguchi H, Kubo T. Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphism and pre-eclampsia. *J Med Genet* 1997;34:525-26

79- Quéré I, Perneger TV, Zittoun J, Bellet H, Gris JC, Daurès JP at al. Red blood cell methylfolate and plasma homocysteine as risk factors for venous thromboembolism: a matched case-control study. *Lancet* 2002;359:747–52

80- Lewis SC, Lawlor DA, Smith GD, Araya R, Timpson N, Day INM at al. The thermolabile variant of MTHFR is associated with depression in the British Women's Heart and Health Study and a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2006;11:352-60

81- Oterino A, Toriello M, Vale N, Castillo J, Alonso-Arranz A, Bravo Y at al. The relationship between homocysteine and genes of folate-related enzymes in migraine patients. *Headache* 2010;50:99-108 e
72 72ad_1484 99..108

- 82- Jünemann AGM, Ahsen N, Reulbach U, Roedl J, Bönsch D, Kornhuber J at al. C677T variant in the methylenetetrahydrofolate reductase gene is a genetic risk factor for primary open-angle glaucoma. *Am J Ophthalmol* 2005;139:721-23
- 83- Muntjewerff JW, Kahn RS, Blom HJ, Heijer M. Homocysteine, methylenetetrahydrofolate reductase and risk of schizophrenia: a meta-analysis. *Mol Psychiatry* 2006;11:143-49.
- 84- Roffman JL, Weiss AP, Purcell S, Caffalette CA, Freudenreich O, Henderson DC at al. Contribution of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms to negative symptoms in schizophrenia. *BIOL PSYCHIATRY* 2008;63:42-48
- 85- Lee ESY, Chen H, Soliman KFA, Charlton CG. Effects of homocysteine on the dopaminergic system and behavior in rodents. *Neurotoxicology* 2005;26:361-71
- 86- Abdolmaleky HM, Smith CL, Faraone SV, Shafa R, Stone W, Glatt SJ at al. Methylomics in psychiatry: Modulation of gene-environment interactions may be through DNA methylation. *Am J Med Genet Part B* 2004;127B:51-59
- 87- van der Put NMJ, Gabreels F, Stevens EMB, Smeitink JAM, Trijbels FJM, Eskes TKAB at al. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: An additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet* 1998;62:1044-51
- 88- Allen NC, Bagade S, McQueen MB, Ioannidis JPA, Kavvoura FK, Khoury MJ at al. Systematic meta-analyses and field synopsis of genetic association studies in schizophrenia: the SzGene database. *Nat Genet* 2008;40:827-34
- 89- Sazci A, Ergul E, Tuncer N, Akpinar G, Kara İ. Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms are associated with ischemic and hemorrhagic stroke: Dual effect of MTHFR polymorphisms C677T and A1298C. *Brain Res Bull* 2006;71:45-50
- 90- Markan S, Sachdeva M, Sehrawat BS, Kumari S, Jain S, Khullar M. MTHFR 677 CT/MTHFR 1298 CC genotypes are associated with increased risk of hypertension in Indians. *Mol Cell Biochem* 2007; 302:125-31
- 91- Spiroski İ, Kedev S, Antov S, Arsov T, Krstevska M, Dzhekova-Stojkova S at al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR-677 and MTHFR-1298) genotypes and haplotypes and plasma homocysteine levels in patients with occlusive artery disease and deep venous thrombosis. *Acta Biochim Pol* 2008;55: 587-94
- 92- Michael S, Qamar R, Akhtar F, Khan Mİ, Khan WA, Ahmed A. MTHFR gene C677T and A1298C polymorphisms and homocysteine levels in primary open angle and primary closed angle glaucoma. *Mol Vis* 2009; 15:2268-78
- 93- Cinemre H, Bilir C, Akdemir N. Isolated renal vein thrombosis associated with MTHFR-1298 and PAI-1 4G gene mutations. *Thromb Haemost* 2010;16:708-10

- 94- Palomino-Morales R, Gonzalez-Juanatey C, Vazquez-Rodriguez TR, Rodriguez L, Miranda-Fillooy JA, Fernandez-Gutierrez B. A1298C polymorphism in the MTHFR gene predisposes to cardiovascular risk in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2010;12:R71
- 95- Poduri A, Mukherjee D, Sud K, Kohli HS, Sakhuja V, Khullar M. MTHFR A1298C polymorphism is associated with cardiovascular risk in end stage renal disease in North Indians. *Mol Cell Biochem* 2008;308:43–50
- 96- Zetterberg H, Reglan B, Palmer M, Ricksten A, Palmqvist L, Rymo L at al. Increased frequency of combined methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C mutated alleles in spontaneously aborted embryos. *Eur J Hum Genet* 2002;10:113 -18
- 97- Castro R, Rivera I, Ravasco P, Camilo ME, Jakobs C, Blom HJ at al. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) 677C/T and 1298A/C mutations are associated with DNA hypomethylation. *J Med Genet* 2004;41:454–58
- 98- Paz MF, Avila S, Fraga MF at al. Susceptibility to DNA methylation in normal tissues and germ-line variants in methyl-group metabolism genes and human primary tumors. *Cancer Res* 2002;62:4519-24
- 99- Houlston RS, Tomlinson IP. Polymorphisms and colorectal tumor risk. *Gastroenterology* 2001;121:282-301
- 100- Shen H, Xu Y, Zheng Y, Qian Y, Yu R, Qin Y at al. Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: A case–control study. *Int. J. Cancer* 2001; 95:332-36.
- 101- Shi Q, Zhang Z, Li G, Pillow PC, Hernandez LM, Spitz MR. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1477-84
- 102- Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, Eden OB, Alexander FE, Greaves MF at al. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) polymorphisms and risk of 2001;98:4004-09
- 103- Masuda Y, Kubo A, Kokaze A, Yoshida M, Fukuhara N, Takashima Y. Factors associated with serum total homocysteine level in type 2 diabetes. *Environ Health Prev Med* 2008;13:148-55
- 104- Fonseca V, Dicker- Brown A, Ranganathan S, Song W, Barnard RJ, Fink L at al. Effect of a high fat-sucrose diet on enzymes in homocystein metabolism in the rat. *Metabolism* 2000;49:736-41
- 105- Davies L, Wilmshurst EG, McElduff A, Gunton J, Clifton-Bligh P, Fulcher GR. The relationship among homocysteine, creatinine clearance, and albuminuria in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2001; 24:1805–09

- 106- Hoogeveen E, Kostense PJ, Beks PJ, Mackaay AJC, Jakobs C, Bouter LM et al. Hyperhomocysteinemia is associated with an increased risk of cardiovascular disease, especially in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:133-38
- 107- de Luis DA, Fernandez N, Arranz ML, Aller R, Izaola O, Romero E. Total homocysteine levels relation with chronic complications of diabetes, body composition, and other cardiovascular risk factors in a population of patients with diabetes mellitus type 2. *J Diabetes Complications* 2005;19:42-46
- 108- Ambrosch A, Dierkes J, Lobmann R, Kühne W, König W, Luley C et al. Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet. Med.* 2000;18: 185-92
- 109- Maeda M, Yamamoto I, Fukuda M, Motomura T, Nishida M, Nonen S et al. MTHFR gene polymorphism is susceptible to diabetic retinopathy but not to diabetic nephropathy in Japanese type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications* 2008;22:119-25
- 110- Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Haris SB, Hanley AJG, Hegele RA. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;17:1-7
- 111- Ukinc K, Ersoz HO, Karahan C, Erem C, Eminagaoglu S, Hacıhasanoglu AB et al. Methyltetrahydrofolate reductase C677T gene mutation and hyperhomocysteinemia as a novel risk factor for diabetic nephropathy. *Endocr* 2009; 36:255–61
- 112- Hermans MP, Gala JL, Buysschaert M. The MTHFR C 677 T polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 2006; 23:529–36
- 113- Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005;229: 95–101
- 114- Mashayekhi F, Ronaghi M. Analysis of read-length limiting factors in pyrosequencing chemistry. *Anal Biochem.* 2007;363;275-87
- 115- Tesfaye S, Selvarajah D. Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev.* 2012; 28(Suppl 1): 8–14
- 116- Malik RA, Tesfaye S, Thompson SD, Veves A, Sharma AK, Boulton AJM et al. Endoneurial localisation of microvascular damage in human diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1993;36;454-59
- 117- Tesfaye S, Harris N, Jakubowski JJ, Mody C, Wilson RM, Rennie IG et al. Impaired blood flow and arterio-venous shunting in human diabetic neuropathy: a

novel technique of nerve photography and fluorescein angiography. *Diabetologia*. 1993;36;1266-74

118- Selvarajah D, Wilkinson ID, Emery CJ, Shaw PJ, Griffiths PD, Gandhi R et al. Thalamic neuronal dysfunction and chronic sensorimotor distal symmetrical polyneuropathy in patients with type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2008;51;2088-92

119- Araki A, Hosoi T, Orimo H, Ito H. Association of plasma homocysteine with serum interleukin-6 and C-peptide levels in patients with type 2 diabetes. *Metabolism Clinical and Experimental* 2005;54;809-14

120- Brulhart MC, Dussoix P, Ruiz J, Passa P, Furoguet PH, James RW. The (Ala-Val) Mutation of Methylene tetrahydrofolate Reductase as a Genetic Risk Factor for Vascular Disease in Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients. *Am J Hum Genet* 1997;60;228-29

121- Sun J, Xu Y, Xue J, Zhu Y, Lu H. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism associated with susceptibility to coronary heart disease in Chinese type 2 diabetic patients. *Mol Cell Endocrinol* 2005;229: 95–101

122- Hermans MP, Gala JL, Buyschaert M. The MTHFR C 677 T polymorphism confers a high risk for stroke in both homozygous and heterozygous T allele carriers with Type 2 diabetes. *Diabet. Med.* 2006; 23:529–36

123- Sun JS, Xu Y, Lu H, Zhu Y. Polymorphism of the methylene tetrahydrofolate reductase gene association with homocysteine and ischemic stroke in type 2 diabetes. *Neurology India* 2009;57;589-93

124- Pollex RL, Mamakeesick M, Zinman B, Haris SB, Hanley AJG, Hegele RA. Methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism 677C>T is associated with peripheral arterial disease in type 2 diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2005;17:1-7

125- Russo GT, Benedetto AD, Magazzu D, Giandalia A, Giorda CB, Ientile R et al. Mild hyperhomocysteinemia, C677T polymorphism on methylene tetrahydrofolate reductase gene and the risk of macroangiopathy in type 2 diabetes: a prospective study. *Acta Diabetol* 2011;48;95-101

126- Kaye JM, Stanton KG, McCann VJ, Vasikaran SD, Burkes V, Taylor RR et al. Homocysteine, folate, methylene tetrahydrofolate reductase genotype and vascular morbidity in diabetic subjects. *Clin Sci* 2002;102;631-37

127- Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H. Genetic polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase as a risk factor for diabetic nephropathy in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;64;185-90

128- Sun J, Xu Y, Zhu Y, Lu H, Deng H, Fan Y et al. The relationship between MTHFR gene polymorphisms, plasma homocysteine levels and diabetic retinopathy in type 2 diabetes mellitus. *Chin Med J* 2003;116;145-47

- 129- Maeda M, Yamamoto I, Fukuda M, Nisihida M, Fujitsu J, Nonen S et al. MTHFR gene polymorphism as a risk factor for diabetic retinopathy in type 2 diabetic patients without serum creatinine elevation. *Diabetes Care* 2003;26:547-48
- 130- Odawara M, Yamashita K, Yamada N. MTHFR gene variant is not associated with diabetic nephropathy in Japanese. *Nucleic Acids Symposium Series*. Oxford University Press 1999;42:85-86
- 131- Errera FIV, Silva MER, Yeh E, Maranduba CMC, Folco B, Takahashi W et al. Effect of polymorphisms of the MTHFR and APOE genes on susceptibility to diabetes and severity of diabetic retinopathy in Brazilian patients. *Braz J Med Biol Res* 2006;39:883-88
- 132- Shpichinetsky V, Raz I, Friedlander Y, Goldschmidt N, Wexler ID, Ben-Yehuda A et al. The association between two common mutations C677T and A1298C in human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene and the risk for diabetic nephropathy in type II diabetic patients. *J. Nutr.* 2000; 130: 2493–297
- 133- Moczulski D, Fojcik H, Zukowska-Szczechowska E, Szydłowska I, Grzeszczak W. Effects of the C677T and A1298C polymorphisms of the MTHFR gene on the genetic predisposition for diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:1535-40
- 134- Mtiraoui N, Ezzidi I, Chaieb M, Marmouche H, Aouni Z, Chaieb A et al. MTHFR C677T and A1298C gene polymorphisms and hyperhomocysteinemia as risk factors of diabetic nephropathy in type 2 diabetes patients. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;75:99-106
- 135- Rahimi M, Hasanvand A, Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Mozafari H, Rezaei M et al. Synergistic effects of the MTHFR C677T and A1298C polymorphisms on the increased risk of micro- and macro-albuminuria and progression of diabetic nephropathy among Iranians with type 2 diabetes mellitus *Clin Biochem.* 2010;43: 1333–39

12. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimin hazırlanması sürecinde bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan, değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Mahmut Selman Yıldırım'a, Tıbbi Genetik Ana Bilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Aynur Acar'a ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Zamani'ye, gerekli olan hasta grubunun temin edilmesinde yardımcı olan İç Hastalıkları Endokrinoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehtap Çakır'a, desteğinden dolayı Konya Numune Hastanesi Nöroloji Uzm. Dr. Aysun Büyükcebeci'ye, tezimin istatistik değerlendirmesini yapan Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. T. Kemal Şahin'e ve yetişmemde emeği geçen tüm değerli hocalarıma teşekkürlerimi borç bilirim.

Asistanlığım boyunca bilgi ve desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Özgür Balasar'a, tezimin deneysel aşamasında yardımları olan Bio. Tuba Akküloğlu'na, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi, biyolog, laboratuvar teknisyeni, sekreter ve personel arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Çalışma gruplarına ulaşmamda yardımlarını esirgemeyen değerli Konya ve Karaman Aile Hekimliği camiasına da sonsuz teşekkürler.

Ayrıca benim bu aşamalara gelmemde büyük emeği ve fedakarlığı olan annem Nermin Pamuk'a, sabır ve desteğini benden esirgemeyen eşim Dr. Ayhan Balasar'a, sevgileriyle bana güç veren canım kızım Bilge ve canım oğlum Baki Batuhan'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İyi ki varsınız.

Dr. Mine Balasar

Konya, Nisan 2012

13. EKLER

13.1. Hasta onam form örneği

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Şeker hastalığı damar yapısında bozukluklara neden olmaktadır. Damarsal bozukluklar ise sinir ucu harabiyetine yol açmaktadır. Bu çalışmada bu harabiyete yol açtığı düşünülen bir genin 2 (iki) bölgesi incelenecektir. Sizde şeker hastalığına bağlı bu sinirsel harabiyet olduğu için bu çalışmaya davet edildiniz. Bu amaçla sizden özel bir tüpte 1.5 cc kolunuzdan kan alınacaktır. Kan alma işlemi hastane ortamında ve hekim eşliğinde gerçekleştirilecektir. Başka bir doku örneği istenmeyecektir.

Bu çalışmaya 100 diyabetik nöropati hastası ve 100 sağlıklı birey dahil edilecektir.

Bu çalışma gönüllü için herhangi bir risk taşımamaktadır.

Araştırma süresi 15 aydır.

Çalışma sırasında hastadan herhangi bir mali destek talep edilmeyecektir.

Hastaların kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak tıbbi bilgiler ve araştırma sırasında elde edilen bulgular yayın olarak kullanılacaktır.

Araştırmada yer alacak gönüllü sayısı en az 200 olarak düşünülmektedir.

Çalışma ile ilgili S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr.Mine BALASAR'a 05053693770 numaralı telefondan ve minebalasar@hotmail.com internet adresinden ulaşılabilir.

Gönüllü istemediği durumda araştırmadan çıkarılacaktır.

Kullanılacak materyal bozulduğu ve yeniden materyal alımı mümkün olmadığı durumlarda hasta araştırma dışı bırakılacaktır.

Gönüllü araştırmaya katılmak istemediği durumda her hangi bir zamanda vazgeçip araştırmadan ayrılma hakkına sahiptir.

Gebeler bu çalışmaya dahil edilmeyecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih

...../...../.....

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.

Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı soyadı, İmzası:

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin. Adı soyadı, İmzası, Görevi.

13.2. Sağlıklı gönüllü onam form örneği

SAĞLIKLI GÖNÜLLÜLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Şeker hastalığı damar yapısında bozukluklara neden olmaktadır. Damarsal bozukluklar ise sinir ucu harabiyetine yol açmaktadır. Bu çalışmada bu harabiyete yol açtığı düşünölen bir genin 2 (iki) bölgesi incelenecektir. Siz bu çalışmaya Türk toplumunda sağlıklı kişiler arasında bu gendeki değişiklikler açısından fark olup olmadığını belirlemek için davet edildiniz. Bu amaçla sizden özel bir tüpte 1.5 cc kolunuzdan kan alınacaktır. Kan alma işlemi hastane ortamında ve hekim eşliğinde gerçekleştirilecektir. Başka bir doku örneği istenmeyecektir.

Bu çalışmaya 100 diyabetik nöropati hastası ve 100 sağlıklı birey dahil edilecektir.

Bu çalışma gönüllü için herhangi bir risk taşımamaktadır.

Araştırma süresi 15 aydır.

Çalışma sırasında hastadan herhangi bir mali destek talep edilmeyecektir.

Hastaların kimlik bilgileri gizli tutulacaktır. Ancak tıbbi bilgiler ve araştırma sırasında elde edilen bulgular yayın olarak kullanılacaktır.

Araştırmada yer alacak gönüllü sayısı en az 200 olarak düşünölmektedir.

Çalışma ile ilgili S.Ü. Meram Tıp Faköltei Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi Dr.Mine BALASAR'a 05053693770 numaralı telefonda ve minebalasar@hotmail.com internet adresinden ulaşılabilir.

Gönüllü istemediği durumda araştırmadan çıkarılacaktır.

Kullanılacak materyal bozulduğu ve yeniden materyal alımı mümkün olmadığı durumlarda hasta araştırma dışı bırakılacaktır.

Gönüllü araştırmaya katılmak istemediği durumda herhangi bir zamanda vazgeçip araştırmadan ayrılma hakkına sahiptir.

Gebeler bu çalışmaya dahil edilmeyecektir.

Yukarıda gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

Tarih

...../...../.....

Gönüllünün Adı soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon/faks no.)

Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin.

Adı soyadı, imzası (varsa telefon/faks no.)

Açıklamaları yapan araştıracının Adı soyadı, İmzası:

Herhangi bir nedenle başvurulacak doktorun Adı soyadı, İmzası (varsa telefon/faks no.)

Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kişinin. Adı soyadı, İmzası, Görevi.

13.3. Etik Kurul Kararı

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
MERAM TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME
KOMİSYON KARARI

Toplantı Sayısı:07

Toplantı Tarihi: 24.11.2010

Karar Sayısı:2010/162:Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. M.Selman YILDIRIM'ın “**Metiltetrahidrofolat Redüktaz Genindeki Sık Rastlanan Polimorfizmlerinin Diyabetik Nöropati Etyopatogenezindeki Rolünün Bölgesel Dizi Analiz Tekniği İle Tespiti**” başlıklı uzmanlık tez çalışması ile ilgili 22.11.2010 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, çalışmanın Fakültemiz Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr. M.Selman YILDIRIM'ın sorumluluğunda yürütülmesinin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

ASLI GİBİDİR
24.11.2010

Şazer BİLGİN
Fakülte Sekreteri