

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

**TİP II DİABETES MELLİTUS'LU HASTALARDA
MATRİKS Gl α PROTEİNİNİN G-7A VE T-138C GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Referans no: 391378

Fulya YÜKÇÜ

EDİRNE-2011

**T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ

**TİP II DİABETES MELLİTUS'LU HASTALARDA
MATRİKS Gl α PROTEİNİNİN G-7A VE T-138C GEN
POLİMORFİZMLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

(Yüksek Lisans Tezi)

Fulya YÜKÇÜ

Destekleyen Kurum: TÜBAP – 2009 - 114

Tez No:

EDİRNE-2011

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Fulya YÜKÇÜ tarafından tez başlığı "Tip II Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Matriks Gla Proteininin G-7A ve T-138C Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması" olarak Teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı ^{19.01.2011} tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

İmza
Prof. Dr. Seralp ŞENER
JÜRİ BAŞKANI

İmza
Doç. Dr. Sibel GÜLDİKEN
ÜYE

İmza
Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ
ÜYE

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

Prof. Dr. Levent ÖZTÜRK
Enstitü Müdürü

TEŐEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinden tezimin bitim aŐamasına kadar bana kendileri ile çalışma olanağı sağlayan, bu çalıŐmamın gerçekleŐmesinde yardımlarını ve rehberliklerini esirgemeyen değerli hocalarım Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'ye ve Doç. Dr. Sibel GÜLDİKEN'e, bana daima yardımcı olan değerli hocalarım Prof. Dr. Seralp ŞENER'e ve Yrd. Doç. Dr. Tevfik GÜLYAŐAR'a, hasta materyalini sağlamada yardımcı olan Uzm. Dr. Betül EKİZ BİLİR'e, istatistik yönünden bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Necdet SÜT'e ve her zaman her konuda yardımlarını benden esirgemeyen Kimyager Orkide PALABIYIK'a, Doktora Öğrencisi Nevra ALKANLI'ya, AraŐ. Gör. Arzu AY BAŞAK'a, manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
DİABETES MELLİTUSU TANIMLAMA	3
TARİHÇE	3
EPİDEMİYOLOJİ VE PREVALANS	3
DİABETES MELLİTUSUN TANI KRİTERLERİ	4
SINIFLANDIRMA	6
TİP 2 DİABETES MELLİTUS	8
TİP 2 DİABETES MELLİTUSUN PATOGENEZİ	8
KOMPLİKASYONLAR	10
DİABET VE KORONER ARTER HASTALIĞI	13
MATRİKS Glα PROTEİNİ GEN POLİMORFİZMİ	14
GEREÇ VE YÖNTEMLER	16
BULGULAR	25
TARTIŞMA	30
SONUÇLAR	33
ÖZET	35
SUMMARY	36
KAYNAKLAR	38
ŞEKİLLER LİSTESİ	42
ÖZGEÇMİŞ	43
EK	

SİMGE VE KISALTMALAR

ADA	: American Diabetes Association (Amerikan diabet birliği)
AKŞ	: Açlık kan şekeri
bç	: Baz çifti
BGT	: Bozulmuş glukoz toleransı
DKB	: Diyastolik Kan Basıncı
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksi Ribonükleik Asit
dNTP	: Deoksi Nükleotid Trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	: Etilen Diammin Tetra Asetik Asit
HDL	: High density lipoprotein (Yüksek dansiteli lipoprotein)
İKH	: İskemik kalp hastalığı
Kb	: Kilobaz
LDL	: Low density lipoprotein (Düşük dansiteli lipoprotein)
MGP	: Matriks Gla Proteini
MM	: Mixed meal (Karışık yemek)
MODY	: Maturity onset diabetes of young (Gençlerde, erişkin başlangıçlı diabet)
OD	: Optik dansisite
OGTT	: Oral glukoz tolerans testi
PAH	: Periferik arter hastalığı
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAAS	: Renin anjiyotensin aldosteron sistemi

RFLP : Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi
SKB : Sistolik kan basıncı
TG : Trigliserid
TURDEP : Türkiye Diyabet Epidemiyolojisi Araştırması
UV : Ultraviyole
VKI : Vücut kitle indeksi

GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya sağlık örgütünün (DSÖ) tahminlerine göre 2025 yılında dünyada yaklaşık 300 milyon kişiyi etkileyecek olan Tip 2 Diabetes Mellitus hastalığı, pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun sekresyonunun, normal hatta normalden yüksek olması ve/veya periferik insülin kullanımında direncin varlığı sonucu oluşan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır (1). Diabetes mellitus nedeni olduğu mikrovasküler ve makrovasküler hastalıklar ile önemli mortalite ve morbidite nedenidir. Patojenezinde çevresel etkilerin ve genetik faktörlerin birlikte rol oynadığı multifaktöriyel bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Kişilerin genetik yapılarındaki küçük farklılıklar (polimorfizmler) aynı çevresel faktörler için, bireylerde değişik sonuçlar doğmasına yol açtığı gözlenmektedir. Bunlar fizyolojik fonksiyonlara etki ederek bireyler arasında hastalıklara karşı değişik yatkınlık düzeyleri oluşturmaktadır (2).

Tip 2 Diabetes Mellitus hastalığı vasküler dokuda, endotel hasarından ateroskleroza dek gelişen damar duvar hasarı önemli kardiyovasküler hastalıklar için zemin hazırlamaktadır. Aterosklerozun önemli patojenetik basamaklarından birisi de doku kalsifikasyonudur. Çeşitli dokularda ekstrasellüler sıvıda kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonları yeterince yüksek olması nedeniyle doku kalsifikasyonunun yüksek olması beklenir. Ancak mineralize dokuların organik matriksinde yer alan, K vitaminine bağımlı bir kalsiyum/fosfat bağlayıcı non-kollagen bir protein olan ve insan vücudunda en yüksek oranda bulunan matriks γ -carboxyglutamic acid (matriks Gla) proteininin olması, bu kalsifikasyon işlemini kontrol altına alır. Matrix Gla proteininin (MGP) değişik varyantları (polimorfizimler) kalsifikasyon kontrol işlemini değiştirebilir ve dolayısıyla değişik hastalıklara neden olabilir. MGP gen polimorfizimlerinin Diabetes Mellitus'lu olgularda gelişen aterosklerozda rol oynayabileceği

düşünülmektedir (3, 4). Tip 2 Diabetes Mellitus'un neden olduğu komplikasyonlarda rol alan genlerin bilinmesi, bunların rol oynadığı fonksiyon bozukluklarının düzeltilmesine yönelik yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayacaktır. Kişisel genetik yatkınlığın belirlenmesi, zamanında ve etkin koruyucu tedbirlerin alınabilmesini sağlayacak, son olarak da ilaçlara olan kişisel duyarlılığın bilinmesi en doğru ilaç ve dozla tedaviyi mümkün kılacaktır. Bu nedenlerle, bu çalışmada Tip II Diabetes Mellitus tanısı alan hastalarda matriks Gla geninin G-7A ve T-138C gen polimorfizimlerinin Diabetes Mellitus'lu olgulardaki etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

DİABETES MELLİTUSUN TANIMI

Diabetes Mellitus (DM) β -hücrelerinden sekrete edilen insülin miktarında eksiklik (veya yokluğu), ya da periferik dokuda insülin direnci ile ortaya çıkan hiperglisemi ile karakterize metabolik bir hastalıktır. Başta karbonhidrat metabolizması olmakla beraber protein ve yağ metabolizmasında da birtakım kusurlar olmakta, ağır komplikasyonlar seyredabilmektedir. DM tüm dünyada önemli bir sağlık sorunudur (1-5).

TARİHÇE

Diabetes Mellitus hakkındaki ilk bilgiler M.Ö 1500 yıllarında Mısır papirüslerinde yer almaktadır. O dönemde aşırı idrar çıkarma ile seyreden bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Hastalığa diabet ismini M.S. 130-200 yılları arasında yaşayan Kapadokya'lı hekim Aretheus vermiştir. Aretheus hastalığı "bu illete tutulan hasta su içmeye asla kanmaz, idrar etmekten kendini alı koyamaz, çünkü sıvılar vücudundan süzülerek dışarı akar (diabetes: süzme, süzülme)" şeklinde tarif etmiştir (6).

Yüzyıllarca diabetlilerin idrarının tatlı olduğu bilinmekle birlikte, 1674 yılında Willes hastalığa "diabetes mellitus" (mellitus: bal) adını vermiştir. Langerhans 1860 yılında pankreas adacıklarını, 1875 yılında Claude Bernard diabetin nörohormonal mekanizmasını, 1889'da V. Mering ve Minkowski pankreatektomi ile diabet oluşumunu gerçekleştirmiştir. 1922'de Best ve Banting pankreas ekstresi insülin ile hastalığın tedavisine yeni boyutlar getirmiştir (6).

EPİDEMİYOLOJİ VE PREVALANS

Tip-1 DM çoğunlukla otoimmün nedenlere (% 90) bağlı olarak pankreas β hücrelerinde harbiyet sonucu gelişir ve genellikle çocuk ve genç yaşlılarda ortaya çıkar. Tüm

diabet vakalarının yaklaşık % 10'unu oluşturur. Tanı konulduğunda hastaların % 90'ı 30 yaş altındadır (5).

Tip-2 DM, genellikle 40 yaş üzerinde ortaya çıkar, kısmi insülin eksikliği ve periferik dokularda insülin direnci ile seyreder (5, 7).

Tip-1 DM'nin insidans ve prevalansı coğrafi ve etnik özellikler gösterir, kuzey ülkelerinde insidans ve prevalans daha yüksektir. Güney ülkelerinde ise daha düşüktür (8).

Tip-2 DM prevalans açısından etnik gruplar arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır. ABD'de beyazlarda açlık kan glukozu değeri tanı kriteri olarak kullanıldığında prevalans % 3.1 bulunurken, siyah ırkta ve İspanyol kökenli Amerikalı'larda daha yüksek değerler dikkati çekmektedir. Arizona'da yaşayan Pima yerlileri arasında şişmanlık ile birlikte çok yüksek Tip-2 DM prevalansı gözlenmektedir (5).

Ülkemizde yapılan TURDEP çalışmasında Tip-2 diabet prevalansının 20-60 yaş arasındaki bireylerde % 7.2 olduğu, 60 yaş üzerindeki bireylerde ise bu oranın >% 20 olduğu ve 2000 yılı nüfus sayımına göre 4.9 milyon diabetli hasta bulunduğu tespit edilmiştir (9).

DIABETES MELLİTUSUN TANI KRİTERLERİ

Amerikan Diabet Birliği (ADA) 1997 ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) ise 1999 yılında diabetes mellitusun tanı kriterlerini yeniden gözden geçirmişlerdir. DM tanısı için kan glukoz ölçümü, idrarda glukoz ölçümü (bu gün için tanı değeri yoktur), Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) en sık kullanılan testlerdir. A1c ve fruktozamin henüz tanıda yer almamaktadır (5, 10, 11).

ADA'nın 1997 ve DSÖ'nün 1999 yılı raporlarındaki kriterlere göre (10, 11):

1- Günün herhangi bir saatinde, aç veya tok olunmasına bakılmaksızın ölçülen plazma glukoz değerlerinin 200 mg/dl veya üzerinde olması ve eşlik eden diabet semptomlarının (polidipsi, polifaji, poliüri ve izah edilemeyen kilo kaybı) bulunması,

2- En az 8 saatlik tam açlık sonrası, açlık plazma glukoz düzeyinin 2 kez 126 mg/dl veya üzerinde olması (DSÖ'ya göre 140 mg/dl veya üzerinde olması).

3- Diabetes Mellitus tanısı için 75 gr OGTT sırasında 2. saat plazma glukoz düzeyinin 200 mg/dl veya üzerinde olması yeterli bulunmaktadır.

Bozulmuş Glukoz Toleransı

Bozulmuş glukoz toleransı (Impaired glucose tolerance = BGT) tanısı açlık plazma glukozu 126 mg/dl'nin altında tespit edilen hastalarda OGTT ile konulmaktadır. OGTT ile 2. saat plazma glukoz değerinin \geq 140 mg/dl, fakat 200 mg/dl'den düşük olması ile tanı koyulur.

BGT tanısı koyulan hastalarda 10 yıl içinde % 30 oranında Tip-2 DM gelişme riski mevcuttur (5, 10, 11).

Bozulmuş Açlık Glukozu

Bozulmuş açlık glukozu (Impaired fasting glucose = IFG) tanısı açlık plazma glukozunun 126 mg/dl'den düşük fakat ≥ 110 mg/dl olması ile konulur. İnsülin salınımının ilk fazı bozulmuştur ve diabetin makro ve mikro komplikasyonlarının gelişme riski yüksektir (5, 10, 11).

Standart OGTT Protokolü (10, 11)

- 1- Testten en az 3 gün önce > 200 gr/gün karbonhidat içeren diyet alınmalı,
- 2- İnfeksiyon, ağır stres, uzun sürmüş inaktivite, aşırı fizik aktivite yapılmamalı,
- 3- Kortikosteroidler, diüretikler, oral kontraseptifler, difenilhidantoin, psikotrop ajanlar, tiroksin, beta blokerler, nikotik asid gibi ilaçlar testten en az 1 hafta önce kesilmeli,
- 4- Malabsorbsiyonlarda, ağır karaciğer ve böbrek yetersizliklerinde, hipopotasemi durumlarında, Addison hastalığı, Cushing sendromu, Hipertiroidi, Akromegali ve Feokromasitoma gibi hastalıkların aktif dönemlerinde test ertelenmelidir.

OGTT' nin Uygulanması (5)

- 1- 9-16 saatlik açlık sonrası sabah 08:00'de teste başlanır,
- 2- 300 ml suda eritilmiş 75 gr glukoz 5 dakikada içilir,
- 3- 0.60 ve 120. dakikalarda glukoz ölçümü için kan alınır. Plazma glukoz ölçümü glukoz oksidaz metodu ile çalışılır,
- 4- OGTT sırasında idrarda glukoz bakmaya gerek yoktur,
- 5- Test sırasında dolaşılmamalı, sigara içilmemeli tam bir inaktivite sağlanmalıdır. görülür.

Standart OGTT Endikasyonları (12, 13)

- 1- Diyabet ve gestasyonel diabet araştırılması,
- 2- Obez ve ailesinde diabet bulunan bireyler,
- 3- Reaktif hipoglisemi düşünülen vakalar,
- 4- İri bebek doğuran kadınlar (≥ 4000 gr),
- 5- Açıklanamayan nöropati, retinopati, erken ateroskleroz, koroner damar hastalığı veya periferik damar hastalığı bulunan kişiler,

- 6- Operasyon, stres, travma, infarktüs, diabetojenik ilaç kullanımı veya gebelik esnasında hiperglisemi yada glukozüri saptanan vakalarda,
- 7- Metabolik Sendrom düşünülen vakalarda uygulanmalıdır.

Mixed Meal

Mixed Meal (MM) karbonhidrat, protein ve yağ içeren gıda ile yapılan bir tolerans testidir. Yapılan çalışmalarda 500 kcal - 919 kcal arasında MM kullanılmış, ancak henüz standardize edilememiştir, etkinliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Oral glukozu göre pankreas β hücrelerini daha fizyolojik şartlarda uyararak insülin sekresyonuna neden olur. Henüz OGTT gibi Tip-2 DM, BGT veya insülin direnci için geliştirilmiş tanı kriterleri yoktur.

SINIFLANDIRMA

Amerikan Diabet Birliği (ADA) 2004 yılında diyabetin tanı ve sınıflandırmasını güncellemiştir.

1. Tip 1 DM (β hücre harabiyeti, genelde mutlak insülin eksikliği vardır).
 - a) Otoimmün
 - b) İdiyopatik
2. Tip 2 DM (İnsülin direnci ve rölatif insülin eksikliği ile birlikte olan diabet)
3. Diğer spesifik tipler
 - a) β hücre fonksiyonlarında genetik defekt
 - i. Kromozom 12, HNF-1 α (MODY 3)
 - ii. Kromozom 7, glukokinaz (MODY 2)
 - iii. Kromozom 20, HNF-4 α (MODY 1)
 - iv. Mitokondriyal DNA
 - v. Diğerleri
 - b) İnsülin eksikliğinde genetik defekt
 - i. Tip A insülin direnci
 - ii. Leprechaunism
 - iii. Rabson-Mendenhal Sendromu
 - iv. Lipoatrofik diabet
 - v. Diğerleri
 - c) Egzokrin pankreas hastalıkları
 - i. Pankreatitis
 - ii. Travma, pankreatektomi

- iii. Neoplazi
 - iv. Kistik fibroz
 - v. Hemokramotozis
 - vi. Fibrokalküloz pankreatopati
 - vii. Diğerleri
- d) Endokrinopatiler
- i. Akromegali
 - ii. Cushing Sendromu
 - iii. Glukagonoma
 - iv. Feokromositoma
 - v. Hipertiroidizm
 - vi. Somatostatinoma
 - vii. Aldosteronoma
 - viii. Diğerleri
- e) İlaç veya kimyasal maddeler
- i. Vacor
 - ii. Pentamidine
 - iii. Nikotik asid
 - iv. Glukokortikoidler
 - v. Tiroid hormonları
 - vi. Diazoksid
 - vii. β adrenerjik agonistler
 - viii. Tiazidler
 - ix. Fenitoin
 - x. α interferon
 - xi. Diğerleri
- f) İnfeksiyonlar
- i. Konjenital rubella
 - ii. Sitomegalovirüs
 - iii. Diğerleri
- g) İmmün aracılı diabetin yaygın olmayan formu
- i. Stiffman Sendromu
 - ii. Anti insülin reseptör antikoru
 - iii. Diğerleri

h) Diabetle birlikte olabilen diğerk genetik sendromlar

- i. Down Sendromu
- ii. Klinifelter Sendromu
- iii. Turner Sendromu
- iv. Wolfram Sendromu
- v. Friedreich Sendromu
- vi. Huntington koreası
- vii. Laurence-Moon-Biedl Sendromu
- viii. Miyotonik distrofi
- ix. Porfiria
- x. Prader Willi Sendromu
- xi. Diğerkleri

4. Gestasyonel diabetes mellitus

TİP 2 DİABETES MELLİTUS

Tip 2 DM gerek yaygınlığı gerekse neden olduğu akut ve kronik komplikasyonlardan dolayı günümüzde hala en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir. Tip 2 diabetliler, tüm diabetiklerin ortalama % 85'ini oluşturmaktadır (14). Yakınmalar genellikle 45 yaş civarında başlar. İlk tanı konulduğunda kronik komplikasyonlar çoğu zaman vardır (12, 15).

TİP 2 DİABETES MELLİTUSUN PATOGENEZİ

Her ne kadar Tip 2 Diabetin klinik belirtileri çoğunlukla 40 yaşın üzerinde ortaya çıksa da ve artan vücut ağırlığı ile ilişkili olsa da, genetik faktörlerin patofizyolojisinde baskın rol oynadığı görülmektedir. İkizlerde çok yüksek bulunan uyum oranı, farklı sosyal çevrelerde büyütölseler bile, ikizlerden birinde Tip 2 Diabet görüldüğünde diğerkinde de sonraki yıllarda klinik olarak belirgin Tip 2 Diabet gelişme olasılığının çok yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, yaşam tarzı ve diğerk sosyal değışikliklerin oldukça büyük bir klinik önemi vardır. Bu faktörlerin hastalığın başlangıcı ve olası koruyucu stratejilerin uygulanma şansı üzerinde güçlü etkileri vardır (16, 17).

Tip 2 DM'ye patogenetik yaklaşımında genetik ağırlığın çok belirgin olduğu görülür. Basit bir gözlem bile Tip 2 DM'ların 1. derece kan akrabalarında DM tip 2 oranının, genel popölasyondan daha fazla olduğunu gösterecektir; Ondan öteye bu erçek birçok araştırmada vurgulanmıştır. Tek ve çift yumurta ikizlerinde yapılan insidans araştırmaları da genetik

ağırlığı doğrulamıştır. 1. Derecede akraba araştırmalarında, kardeşler en sık araştırma yaklaşımıdır. (λ_s) olarak belirleyeceğimiz hastalık riski, kardeşlerdeki insidansın, genel popölasyondakine oranıdır. Tip 2 DM için λ_s 3.5 bulunmuştur, bunun anlamı kardeşlerde % 35, genel popölasyonda % 10'dur, Tip 1 DM ise bu λ_s 1.5 civarındadır (18).

Tip 2 Diabet üç patofizyolojik anormallikle karakterizedir: Bozulmuş insülin sekresyonu, periferik insülin direnci ve karaciğerde glikozun aşırı üretimi (19, 20, 21).

İnsülin Direnci

Tip 2 Diabetli hastalarda genetik hassasiyet ve obezite nedeniyle perifer dokularda özellikle karaciğer ve kas dokusunda insülin direnci gelişmesi hastalığın karakteristiğidir. İnsülin direnci insülin duyarlı dokularda glikoz kullanımını azaltırken karaciğer dokusunda glikoz üretimini arttırır (20). Artmış karaciğer glikoz üretimi temel olarak açlık kan şeker düzeyini yükseltirken perifer dokularda azalmış glikoz kullanımı postprandiyal kan şekerinin yükselmesine neden olur. İnsüline bağımlı olmayan dokulardaki glikoz metabolizmasında herhangi bir değişiklik olmaz.

İnsülin direncinin moleküler mekanizmaları henüz tam açıklığa kavuşmuş değildir. Kas dokularında insülin reseptör düzeyleri ve tirozin kinaz aktivitesi azalmıştır ama bunun hiperglisemiye sekonder olduğu düşünölmektedir. Dolayısıyla postreseptör defektlerin insülin direncinde ana rol oynadıklarına inanılmaktadır.

Bozulmuş İnsülin Sekresyonu

Tip 2 diyabetli hastalarda insülin rezistansından dolayı normoglisemiyi sağlamak için başlangıçta insülin sekresyonu artar. İnsülin sekresyon defekti başlangıçta çok hafiftir ancak ilerleyen dönemlerde sekresyon defekti artar ve yetersiz insülin salınmasıyla sonuçlanır (22). Tip 2 diyabetli hastalardaki insülin sekresyonundaki bu azalmanın nedeni henüz bilinmemektedir. İnsülin rezistansının üzerine eklenen genetik defektin beta hücre yetersizliğine neden olduğu öne sürölmüşse de genetik çalışmalar böyle bir gen defekti saptayamamıştır. Beta hücrelerinden insülinle beraber salınan amilinin uzun süreli diyabetik hastalarda beta hücrelerinde amiloid depoziti oluşturduğu bilinmektedir (23). Bunun dışında diyabetin neden olduğu metabolik bozukluklar (glikoz toksisitesi ve lipotoksosite) da β hücre fonksiyonlarını olumsuz etkilemektedir.

Artmış Hepatik Glukoz Üretimi

Tip 2 diyabette karaciğerdeki insülin rezistansı hiperinsülineminin glikoneogenezi baskılamasında yetersizlik olduğunu düşündürür ki bu da hiperglisemiye ve karaciğerde azalmış glikojen depolarına neden olur. Diyabetin erken dönemlerinde karaciğerin glikoz üretiminde artış olur.

KOMPLİKASYONLAR

Diabet kronik bir hastalık olduğu için akut yada kronik dönemde gelişebilecek komplikasyonlar hastalığın seyri, tedavisi ve prognozu açısından önem taşımaktadır.

Diabetes Mellitus'un komplikasyonları (13, 24)

- 1- Akut komplikasyonlar;
 - a. Diabetik ketoasidoz,
 - b. Hiperosmolar nonketotik koma,
 - c. Hipoglisemi,
 - d. Laktik asidoz.
- 2- Kronik komplikasyonlar;
 - a. Diabetik makroanjiopati,
 - i. Koroner kalp hastalığı,
 - ii. Serebrovasküler hastalık,
 - iii. Periferik damar hastalığı.
 - b. Diabetik mikroanjiopati;
 - a. Diabetik nöropati,
 - b. Diabetik retinopati,
 - c. Diabetik nefropati.

Diabetin Akut Komplikasyonları

Diabetik ketoasidoz: Diabetik ketoasidoz insülin ile insülin karşıtı hormonlar arasındaki dengenin insülin aleyhine bozulması sonucu oluşan ve ketoasidoz, hipovolemi, dehidratasyon semptom ve bulguları ile kendini gösteren, normalden tam komaya kadar varabilen şuur değişikliklerine sebep olabilen diabetin ağır bir metabolik komplikasyonudur. Öncelikle Tip-1 DM'li hastalarda ortaya çıkarsa da bazı özel durumlarda (enfeksiyon, travma, ameliyat vs.) Tip-2 diabetiklerde de görülmektedir. Diabetik hastaların yoğun bakım ünitesine yatış nedenlerinin % 5.4'ünü oluşturmaktadır. Diabetik ketoasidoz vakarlarının % 10'u diabet tanısı yeni konulan vakalardır. Diabetik ketoasidoz tablosunun mortalite oranı % 5-10 civarındadır.

Bu nedenle dikkatli tedavi ve takip yapılması önemlidir. (5-12). İnsülin yokluğuna cevap olarak glukagon düzeyleri yükselir ve fruktaz 2,6 bifosfaz düzeylerini azaltarak glikolizi inhibe eder ve glikoneogenezi artırır. Oluşan hiperglisemi ozöotik diürece neden olarak, volüm azalması ve dehidratasyon gelişimine yol açar. İnsülin yetersizliği nedeniyle yağ dokularından açığa çıkan serbest yağ asitleri keton cisimlerinin oluşması için primer substrat görevi görürler (13).

Diabetik hiperosmolar nonketotik koma: DM'nin ketoasidoz olmaksızın ileri derecede hiperglisemi, plazma hiperosmolaritesi, dehidratasyon ve mental değişikliklerle karakterize, mortalite oranı yüksek (% 40-70) ve genellikle ileri yaş grubunda görülen komplikasyondur. Bu hastalıklarda az da olsa bir insülin varlığı lipolizi engeller ve ketoasidoz gelişmez. Ancak bu seviyedeki insülin miktarı hepatik glukoz üretiminin inhibisyonuna veya glukoz kullanımının stimülasyonuna yeterli değildir (13).

Hipoglisemi: Diabetin en sık görülen akut komplikasyondur. Daha çok insülin ve sulfonilüre kullanan hastalarda yan etki olarak karşımıza çıkar. Hipoglisemi masum bir komplikasyon olmayıp kalıcı nörolojik sekellere neden olabilir. Ayrıca trombosit agregasyonunu artırarak diabetin vasküler komplikasyonlarını daha da ağırlaştırabilir. Tekrarlayan ağır hipoglisemiler birçok organ ve doku üzerinde olumsuz etkilere neden olabileceği gibi bazen fetal olarak sonlanabilir (13).

Laktik asidoz: Diabetik ketoasidoz komalarının % 15'inde laktik asidin aşırı yükselmesi ile seyreden bir sendromdur. Genellikle ağır doku hipoksisi olan vakalarda ortaya çıkar (13).

Diabetin Kronik Komplikasyonları

Yapılan çalışmalara göre diabet tanısını izleyen ilk yıllarda komplikasyonlar gözlenmeye başlanmakta veya tanı konulduğunda hastalar komplikasyonlardan etkilenmiş olmaktadır. Diabetin kronik komplikasyonlarının gelişmesinde hiperglisemi, obezite, dislipidemi, endotel ve intima değişiklikleri, hiperinsülinemi ve insülin direnci gibi faktörler rol oynamaktadır. Ayrıca kronik komplikasyonların gelişiminde genetik faktörlerin de rol oynadığı ileri sürülmektedir (13, 25).

Diabetik Makroanjyopatik Komplikasyonlar

Koroner Arter Hastalığı: Diabetik hastalarda morbidite ve mortaliteyi asıl etkileyen kardiyovasküler hastalıklardır. Diabetik hastalar sağlıklı bireylere göre kardiyovasküler hastalık açısından 2-3 kat artmış riske sahiptirler (13, 24, 25).

Tip-2 DM için yüksek risk grubundaki popülasyonlarda (Meksika kökenli Amerikalılar gibi), Tip2 DM gelişmeden önce kardiyavasküler risk faktörlerinin görüldüğü belirlenmiştir. Bu risk faktörleri, HDL kolesterolün düşük oluşu, LDL, trigliserid, total kolesterol, insülin, açlık glukozu, VKİ ve kan basıncının diabeti olmayan kişilere göre daha yüksek olmasıdır (26, 27).

Yapılan çalışmalar bize göstermiştir ki diabete bağlı kardiyavasküler hastalıkların patogenezinde temel faktör insülin direncinin gelişmesidir (7, 26, 28).

Diabetik ayak: Patogenezinde nöropati, vasküler faktörler ve infeksiyonların neden olduğu hafif ülserden ampütasyonlara neden olabilecek gagrenlere gidebilen önemli bir morbidite nedenidir. Wagner sınıflaması ile değerlendirilirler; 0- Yüksek riskli hasta ayakta ülser yok. 1- Yüzeysel ülser gelişmesi. 2- Tendon yada kemiğe penetre ülser. 3- Derinabse ve osteomyelit. 4- Lokalize gangren. 5- Büyük ampütasyon gerektiren geniş gangren (25).

Diabetik Mikroanjiyopatik Komplikasyonlar

Diabet süresi uzadıkça büyük, küçük bütün kan damarları etkilenir. Kapiller ve arteriollerini oluşturan vasküler hücreler ile onların bazı membranları etkilenir. Klinik olarak bütün mikrovasküler yapılar etkilenmekle birlikte en fazla retina, renal glomerul ve kısmen büyük sinirlerde önemli patolojik değişiklikler oluşur. Tüm bu tutulumları tek bir hipotezle açıklamak henüz mümkün değildir (5-12, 29).

Diabetik retinopati: Tüm görme kaybı nedenleri arasında ilk sırayı almaktadır. İnsülin kullanan 15 yıllık diabet hastalarında görülme sıklığı %98, insülin kullanan 30 yaş üzerindeki diabetiklerde %82, insüline bağımlı olmayan diabette %58 civarındadır (5, 7). Diabetik retinopati klinik olarak nonproliferatif ve proliferatif olarak sınıflandırılır (5, 7, 29).

Diabetik nefropati: Terminal dönem böbrek hastalarının yaklaşık yarısını diabetik nefropatili hastalar oluşturur. Diabetik nefropatinin klinik evreleri 5 döneme ayrılır (5, 7, 29).

Evre-1: Hipertrofi ve hiperfiltrasyon dönemi.

Evre-2: Sessiz dönem.

Evre-3: Mikroalbuminüri başlangıç dönemi.

Evre-4: Aşık nefropati dönemi.

Evre-5: Son dönem böbrek yetersizliği.

Diabetik nöropati: Diabetik nöropatinin gelişmesinde özellikle diabet yaşının önemli olduğu bilinmektedir ve klinik olarak 3 tipte sınıflandırılır (5, 7, 29).

1- Simetrik polinöropatiler;

- Duysal veya sensorimotor polinöropati,

- Simetrik proksimal alt ekstremite motor nöropatisi,
 - Otonomik nöropati.
- 2- Fokal ve Multifokal Nöropatiler;
- Kranial nöropati,
 - Gövde ve ekstremite mononöropatisi,
 - Asimetrik alt ekstremite motor nöropatisi.
- 3- Karışık formlar

DIABET VE KORONER ARTER HASTALIĞI

Diabet; ateroskleroz adı da verilen damar sertliği gelişmesini hızlandırmakta ve koroner arter hastalığının ortaya çıkma sıklığını arttırmaktadır. Diabet, koroner arter hastalığı ve ateroskleroza bağlı olarak ortaya çıkabilecek diğer büyük damar hastalıklarının (beyin damarlarındaki tıkanmalar, bacak damarlarındaki tıkanmalar) oluşma riskini de arttırmaktadır (30). Hiç kuşkusuz DM ile birlikte bulunan hipertansiyon, dislipidemi gibi risk faktörlerinin aterosklerotik kalp hastalığının gelişmesine katkısı yadsınamaz. Ancak büyük olasılıkla hiperglisemi de başlı başına patofizyolojiye önemli katkıda bulunmaktadır. Hiperglisemi doğrudan ve serbest yağ asidi yükünü artırarak dolaylı olarak serbest oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Bu da birçok olumsuz metabolik yolu tetikler. Diğer taraftan diyabetik hastalarda renin anjiyotensin aldosteron sisteminin (RAAS) aktivitesinin arttığını gösteren kanıtlar da bulunmaktadır. Bu kanıtlar RAAS blokörlerinin tedavide ve kardiyovasküler komplikasyonların önlenmesinde kullanılmasına yönlendirmiş ve RAAS bir tedavi hedefi haline gelmiştir. Bu nedenle bugün artık diyabetik hastalarda ACE inhibitörleri ve/veya anjiyotensin reseptör blokörleri güncel tedavinin vazgeçilmez unsurları olarak kabul edilmektedir (31).

Diyabetin kardiyovasküler sistem üzerine olumsuz etkileri aslında çok daha karmaşıktır. Şekil 1 de DM'un kardiyovasküler sistem üzerine olan olumsuz etkileri gösterilmiştir. İzlendiği gibi hiperglisemi ve RAAS aktivasyonu yanında birçok olumsuz etmen diyabetik hastalardaki hızlı ve yaygın ateroskleroz gelişimini hazırlamaktadır. Yeni araştırmalar diyabet, inflamasyon, aterosklerozun patogenetik ilişkileri üzerine yoğunlaşmıştır (31).



Şekil 1. DM'un kardiyovasküler sistem üzerine olan olumsuz etkileri (31).

MATRİKS GİA PROTEİNİ GEN POLİMORFİZMİ

Damar düz kasları tarafından sentezlenen, organize dokuların matriksinde bulunan, mineral bağlayıcı bir protein olan MGP'nin, vasküler dokuların doku kalsifikasyonunda önemli düzenleyici rol oynadığı bilinmektedir (32). MGP, γ -karboksiglutamikasit içeren 10 kDa' luk bir proteindir (33).

MGP sentezi vitamin D aracılığıyla olur. Vitamin D, gelişim, farklılaşma ve çeşitli uyaranlara karşı hızlı bir şekilde cevap vermekle görevlidir. Hücre içi reseptörleriyle etkileşerek gen ekspresyonunu düzenler. Kalsitriol (1,25 dihidroksivitamin D₃) vitamin D'nin aktif metabolitidir. Kalsitriole bağımlı gen transkripsiyonu, vitamin D reseptörü (VDR) ve hedef genin promotör bölgesindeki özel vitamin D cevap elementi (VDRE) aracılığıyla gerçekleşir. VDRE, hormonun DNA'ya bağlanma bölgesiyle ilişkiye girerek onun hetero veya homodimerizasyonunun oluşmasına yardımcı olur. Genellikle her gen için farklı bir VDRE görev alır. VDR, vitamin D'nin hormonal formu olan kalsitriolün bağlanmasıyla, hücre içinde bir transkripsiyon faktörü olarak rol oynar. Ayrıca VDR, ilgili genlerin transkripsiyonlarını aktif hale getirebilmek için Retinoik asit reseptörleri (RxR) ile heterodimer oluşturur.

D vitamini ve kalsiyum eksikliğinin özellikle tokluk kan şekerlerini ve insülin salınımını etkilediği ve D vitamini ile kalsiyum desteğinin bu süreçlerde olumlu etki yaptığı bilinmektedir. Bununla birlikte D vitamini ve kalsiyum desteğinin beta hücre işlevleri ya da

insülin duyarlılığını nasıl etkilediği konusu henüz açıklığa kavuşturulmuş değildir. D vitamini β hücresi insülin salınımında transkripsiyon faktörü olarak düzenleyici rol oynar (34).

DM sonucu büyük ve orta boy arterlerin intimasında düzensiz dağılımlı lipit depolanmalarıyla karakterize aterosklerozun patojenik basamaklarından birisi doku kalsifikasyonudur. Çeşitli dokularda ekstrasellüler sıvıda kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonlarının yüksek olması nedeniyle doku kalsifikasyonunun yüksek olması beklenir. Mineralize dokuların organik matriksinde yer alan, K vitaminine bağımlı bir kalsiyum/fosfat bağlayıcı non-collagen bir protein olan ve insan vücudunda en yüksek oranda bulunan Matriks Gla Proteininin (MGP) olması, bu kalsifikasyon işlemini kontrol altına alır. MGP'nin değişik varyantları (polimorfizmler) kalsifikasyon kontrol işlemini değiştirebilmesi ile birlikte insülin direncini de değiştirdiği düşünülmektedir (3, 4). Bu nedenle çalışmamızda Tip 2 DM'li hastalarda MGP'nin G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerini araştırmayı amaçladık.

84 aminoasitten oluşan MGP 12. kromozomda (12p12.3) lokalizedir (33). G-7A gen polimorfizmi MGP geninin 4. ekson bölgesinde yer alan guanine/adenine (G/A) yer değiştirmesiyle (alanin/treonin) karakterizedir. T-138C gen polimorfizmi ise, MGP geninin promotör bölgesinde yer alan timine/cytosine (T/C) yer değiştirmesiyle karakterizedir (4, 35).

GEREÇ VE YÖNTEM

GEREÇLER

Çalışmamız 120 hasta ve 134 kontrol grubu olmak üzere toplam 254 kişi ile gerçekleştirildi. Hasta grubunun yaş ortalaması ($62.758 \pm 11,1544$) ve kontrol grubunun yaş ortalaması ($51.098 \pm 10,7787$) olarak hesaplandı.

Hasta grubu oluşturulurken Tip 2 DM tanısı konan hastalar; kontrol grubu oluşturulurken ise Tip 2 DM tanısı almamış, İKH, PAH, felç ve herhangi bir kronik rahatsızlığı olmayan sağlıklı bireyler çalışmaya alındı. Çalışma için etik kurul onayı alındı (EK 1). Çalışmaya katılanlara ayrıntılı bilgi verildikten sonra onayları alındı.

Hasta ve kontrol gruplarından 2'şer ml periferik kan örnekleri EDTA'lı vakumlu tüplere alınıp, eZNA kiti kullanılarak DNA izole edildi. DNA kalitesi % 0.8'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek gözlemlendi. DNA izolasyonundan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile T-138C genindeki ürünler % 2'lik agaroz jellere yüklenip EtBr ile boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldü. Daha sonra PZR ürünleri T-138C geninin polimorfizm bölgesine özgü BsrSI restriksiyon enzimi kullanılarak Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile enzim, 65°C'de 3 saat inkübasyon yapılarak kesime bırakıldı. Kesim sonucu ürünler % 3'lük agaroz jelde EtBr ile boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında polimorfizmler saptandı. G-7A polimorfizmi için yine DNA'lar PZR ile istenen bölgelere özgün primerlerle çoğaltıldı. PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek ürün oluşup oluşmadığına bakıldı. Daha sonra PZR ürünleri G-7A geninin polimorfizm bölgesine özgü NcoI restriksiyon enzimi kullanılarak Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yöntemi ile enzim, 37°C'de 3 saat inkübasyon yapılarak kesime bırakıldı. Kesim sonucu ürünler % 3'lük agaroz jelde EtBr ile

boyanarak elektroforezde 110 voltta yürütüldükten sonra UV ışık altında polimorfizmler saptandı.

KULLANILAN KİMYASAL MALZEMELER

Agaroz (Sigma)

Borik Asit (Sigma)

DNA Marker seti, 50bç-100bç (Fermentas)

dNTP (deoksi Nükleotit Tri Fosfat; dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (MBI)

Etanol %100 (Riedel)

Etidyum Bromit (Sigma)

Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) (Sigma)

Magnezyum klorür (Fermentas)

BsrSI restriksiyon enzimi (Fermentas)

NcoI restriksiyon enzimi (Fermentas)

Primerler (Fermentas)

Proteinaz K (eZNA)

Taq DNA polimeraz seti (Fermentas)

Trisma (Base) (Bio Basic)

KULLANILAN CİHAZLAR

Agaroz elektroforez tankı (MINICELL PRIMO EC 320)

Derin dondurucu (AEG)

Dijital fotoğraf makinesi (Kodak Easy Share 2330)

Güç kaynağı (EC-105)

Manyetik karıştırıcı (Nüve)

Otoklav (Heraeus)

Otomatik mikro pipetler (ISOLAB)

pH metre (Hanna)

Santrifüj (Allegra X-22R)

Terazi (Sartorius)

Thermal Cyclers (Boeco TS-100)

Vorteks (VELP Scientifica)

ÇÖZELTİLER

10xTris Borat Elektroforez (TEB) Çözeltisi (1 litre) pH: 7.4

60.5 gr Tris

3.72 gr Na₂EDTA.2H₂O

30.85 gr borik asit

YÖNTEMLER

DNA İZOLASYONU

Hasta ve kontrol gruplarından EDTA'lı tüplere alınan 2ml kan örneklerinden Ezna DNA KİTİ ile DNA'lar izole edildi (Tablo 1). DNA miktarları aşağıdaki formül kullanılarak belirlendi:

$$\text{DNA } (\mu\text{g/ml}) = 260\text{nm'deki optik yoğunluğu (OD)} \times \text{Seyreltme faktörü (Dilution factor)} \times \text{Katsayı (DNA için 50)}$$

DNA'nın saflığı 260 nm ile 280 nm dalga boylarındaki optik yoğunluk değerlerinin oranıyla belirlendi. DNA'ların kalitesini belirlemek için DNA'lar agaroz jellere yüklendi.

Tablo 1. EZNA kiti ile DNA izolasyonu

0.5 ml EDTA'lı kan 2 ml'lik toplama tüpüne koyuldu.

4°C'de 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çözeltinin üst fazı atıldı.

Toplama tüpüne 0.8 ml TBP Buffer eklenip, vortekslendi.

3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Oluşan çözeltinin yine üst fazı atıldı.

Çözeltiye 0.5 ml TBM Buffer eklenip, hızlıca vortekslendi. 3 µl proteinaz K (20mg/ml) eklendi.

55 °C'de 30 dakika inkübe edildi.



Çözelti 5000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilip, üst sıvı 2 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı, üzerine 260 µl saf ethanol eklendi.



Toplama tüpündeki çözelti, kolona aktarılıp 10000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki atık sıvı atıldı.

Üst sıvı + 500 µl Yıkama Solüsyonu eklendi.



10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi, atık sıvı atıldı.

Yıkama solüsyonundan artı kalanı çıkarmak için 10000 rpm' de tekrar santrifüj edildi.



Kolon 1.5 ml'lik tüplere yerleştirilip, 50 µl Elution Buffer eklendi.



50 °C'de 2 dakika inkübe edilip, 1000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra DNA elde edildi.

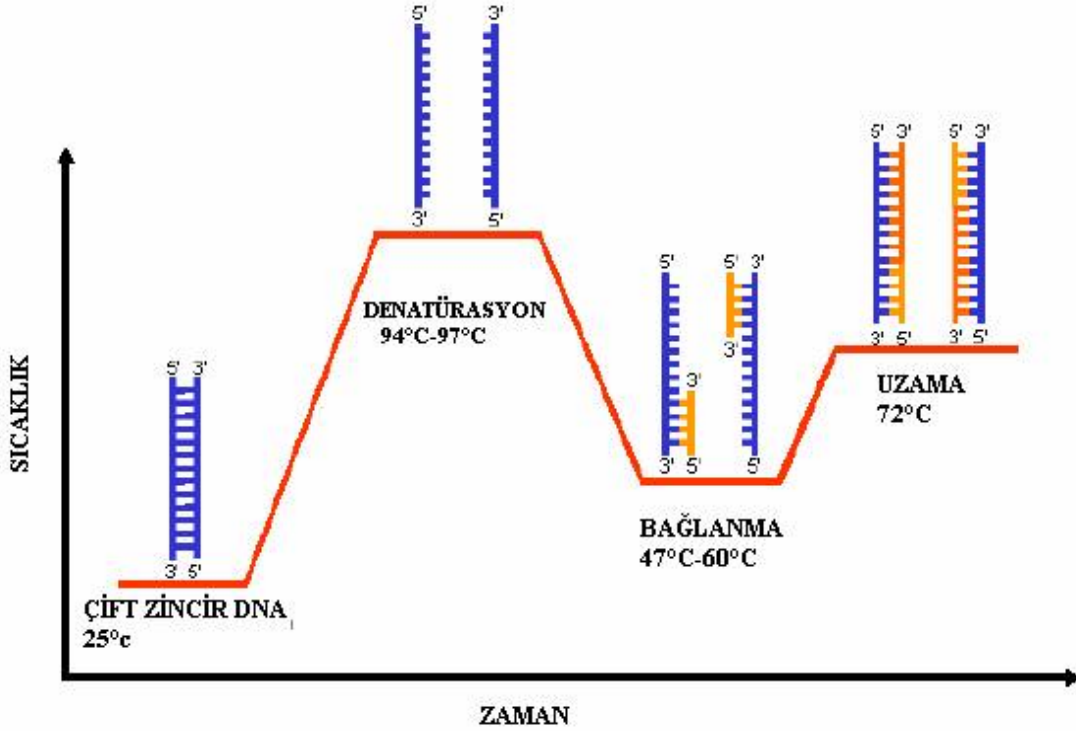
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, ilk kez 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan, Cetus şirketine bağlı olarak çalışan Henry A. Erlich, Kary Mullis ve Randall K. Saiki tarafından geliştirilen metodla bilim dünyasına sunulduğundan itibaren hem araştırmada hem de klinik laboratuvarlarında tanıda yeni bir çığır açmıştır. PZR invitro koşullarında DNA'nın çoğaltılması olarak tanımlanmıştır. PZR'de üç temel basamak vardır ve çoğaltılmış DNA miktarı, bu üç adımın tekrarına bağlıdır.

- 1) Denatürasyon (94-97°C)

- 2) Primer bağlanması (47-60°C)
- 3) DNA sentezi (72°C)

Bu üç adım bir PZR siklüsünü oluşturur. (Şekil 2). İlk adımda çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda primerlerin tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanması sağlanır. Son aşamada ise DNA sentezi gerçekleşir.



Şekil 2. PZR döngüsü (36)

PZR'nin temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), enzim tamponu, primerler, dNTP (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP) karışımı ve MgCl₂'dir.

İlgili gen bölgeleri verilen primer dizileri kullanılarak çoğaltıldı. Reaksiyon toplam 25µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Daha sonra PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek, ilgili hastaların T-138C ve G-7A genleri incelendi, ürünler EtBr ile boyandıktan sonra UV ışık altında incelendi.

PZR'de kullanılan Primer Dizileri:

MGP geninde G-7A polimorfizminin gözleendiği 4. ekson bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler:

F: 5'-CTAGTTCAGTGCCAACCCTTCCCCACC-3'
R: 5'-TAGCAGCAGTAGGGAGAGAGGCTCCCA-3'

MGP geninde T-138C polimorfizminin gözleendiği promotör bölgesini çoğaltmada kullanılan primerler:

F: 5'-AAGCATAACGATGGCCAAAACCTTCTGCA-3'
R: 5'-GAACTAGCATTGGAACCTTTCCCAACC-3'

PZR İçin Hazırlanan Karışımlar

G-7A için:

Bir hasta için kullanılan miktarlar:

2 mM MgCl ₂	2 µl MgCl ₂
1x PZR Tamponu	2.5 µl Buffer
95.2 nmol primer 1	0.35 µl primer 1
67.7 nmol primer 2	0.35 µl primer 2
0.2 mM dNTP	1 µl dNTP
1.25 U	0.25 µl Taq polimeraz
	15.55 µl dH ₂ O
	3 µl izole edilmiş DNA
Toplam hacim:	25µl

T-138C için:

Bir hasta için kullanılan miktarlar:

2.5 mM	2.5 µl MgCl ₂
1x PZR Tamponu	2.5 µl Buffer
89.7 nmol primer 1	0.3 µl primer 1
79.1 nmol primer 2	0.3 µl primer 2
0.2 mM dNTP	1 µl dNTP
1.25 U	0.25 µl Taq polimeraz
	15.15 µl dH ₂ O
	3.0 µl izole edilmiş DNA

Toplam hacim: 25 µl

PZR İçin Gerekli Koşullar

G-7A için:

Başlangıç: 94°C 3 dakika
94°C 30 saniye }
64°C 60 saniye } 30 Döngü
72°C 60 saniye }

Sonlanma: 72°C, 5 dakika

T-138C için:

Başlangıç: 94°C 3 dakika
94°C 30 saniye }
57°C 60 saniye } 30 Döngü
72°C 60 saniye }

Sonlanma: 72°C, 5 dakika

Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden çift yönlü simetrik olarak DNA'yı kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin büyük bir kısmı bakterilerde, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlarda bulunmaktadır (37, 38). Belli bir restriksiyon enzimi DNA'yı keseceği, 4-8 nükleotitlik (genelde 6) restriksiyon noktası tanır. DNA parçalarının büyüklüğü restriksiyon noktalarının dağılımına bağlıdır (39).

Hastaların G-7A polimorfizmi; PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin NcoI restriksiyon enzimi ile 3 saat 37°C'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi. T-138C polimorfizmi için ise, PZR aşamasından sonra PZR ürünlerinin BsrSI restriksiyon enzimi ile 3 saat 65°C'de kesime bırakılmaları, % 3'lük agaroz jelde yürütülmeleri ve UV ışık altında incelenmeleri sonucunda belirlendi.

G-7A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1xM (Enzim kesme) tamponu	1.0µl
5 U NcoI Restriksiyon enzimi	0.5µl NcoI Restriksiyon enzimi
	2.0µl PZR reaksiyon ürünü
	6.5µl dH ₂ O
Toplam hacim:	10 µl

ile karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 37°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 4.5µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar tablodaki enzim kesimi sonuçları ile karşılaştırıldı.

T-138C İçin Restriksiyon Enzim Kesimi Yöntemi

PZR sonucu elde edilen ürünler kullanılarak;

1xM (Enzim kesme) tamponu	1.0µl
5 U BsrSI Restriksiyon enzimi	0.5µl BsrSI Restriksiyon enzimi
	2.0µl PZR reaksiyon ürünü
	6.5µl dH ₂ O
Toplam hacim:	10 µl

ile karışım birkaç saniye yavaşça karıştırıldı. 65°C'de 3 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresinin sonunda ürünler 4.5µl EtBr ile hazırlanan % 3'lük agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında oluşan bantlar gözlemlendi. Elde edilen sonuçlar tablodaki enzim kesimi sonuçları ile karşılaştırıldı.

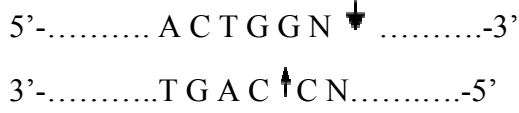
NcoI İçin Restriksiyon Enziminin Mekanizması

NcoI restriksiyon enzimi 5'-.....C ↓ C A T G G.....-3' baz dizisinin bulunduğu bölgeden kesim yapar.



BsrSI İçin Restriksiyon Enziminin Mekanizması

BsrSI restriksiyon enzimi 5'-.....A C T G G N ↓-3' baz dizisinin bulunduğu bölgeden kesim yapar.



Tablo 2. T-138C polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları

Polimorfizm Bölgesi	Kullanılan Primer Dizileri	Ürün Uzunluğu		
		PZR ürünleri	Enzim Kesimi Sonucu	
			C Alleli Normal Allel	T Alleli Mutant Allel
T-138C	T-138CF: 5'AAGCATAACGATGGCC AAAACTTCTGCA-3' T-138CR: 5'GAACTAGCATTGGAA CTTTCCCAACC-3'	142 bç	142 bç	118 bç 24 bç

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Sonuçlar sayı (yüzde) ya da ortalama ± std. sapma olarak ifade edildiler. Yaş, AKŞ, TG, Kolesterol, HDL-C, LDL-C, SKB, DKB değişkenlerinin gruplar arasında karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı. MGP genotiplerinin gruplar arası karşılaştırmalarında ki-kare testi kullanıldı. P<0.05 değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

BULGULAR

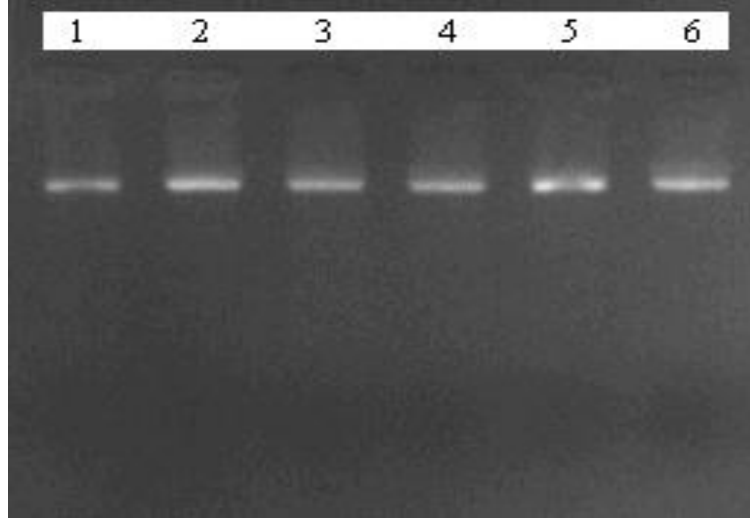
Çalışmaya alınan hasta ve kontrol gruplarının yaş, AKŞ, TG, Kolesterol, HDL-C, LDL-C, SKB ve DKB klinik bulguları T-testi sonucuna göre incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar (Tablo 3) gösterilmiştir.

Tablo 3. G-7A ve T-138C için kontrol ve hasta gruplarının klinik bulguları

Hasta ve kontrol bilgileri	Kontrol grubu (n=134)	Hasta grubu (n=120)	P
YAŞ	51.098 ± 10,7787	62.758 ± 11,1544	0.001
AKŞ (mg/dl)	98.534 ± 11,7920	169,417 ± 64,3268	0.001
TG (mg/dl)	147.403 ± 91,2015	148.172 ± 103,1273	0.937
Kolesterol (mg/dl)	210.930 ± 43,3889	179.817 ± 52,3788	0.001
HDL-C (mg/dl)	41.240 ± 10,8768	33.814 ± 17,9442	0.001
LDL-C (mg/dl)	130.428 ± 33,1940	115.705 ± 42,4384	0.002
SKB (mmHg)	123.45 ± 14,149	125.73 ± 23,183	0.556
DKB (mmHg)	76.55 ± 11,028	76.08 ± 12,967	0.934

AKŞ: Açlık kan şekeri, TG: Trigliserit, HDL-C: HDL kolesterol, LDL-C: LDL kolesterol, SKB: Sistolik kan basıncı, DKB: Diyastolik kan basıncı, Student t testi

Hasta ve kontrol gruplarından alınan kanlar eZNA DNA kiti ile izole edildi. DNA örnekleri PZR'den önce %0.8'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında izlendi (Şekil 3).



Şekil 3. Hasta ve kontrol DNA örneklerinin %0.8 lik agaroz jelde yürütülmesi ve UV ışık altında görüntülenmesi.

DNA'lar %0.8'lik agaroz jelde gözlemlendikten sonra G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri için PZR işlemi yapıldı ve PZR ürünleri de %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV ışık altında izlendi.

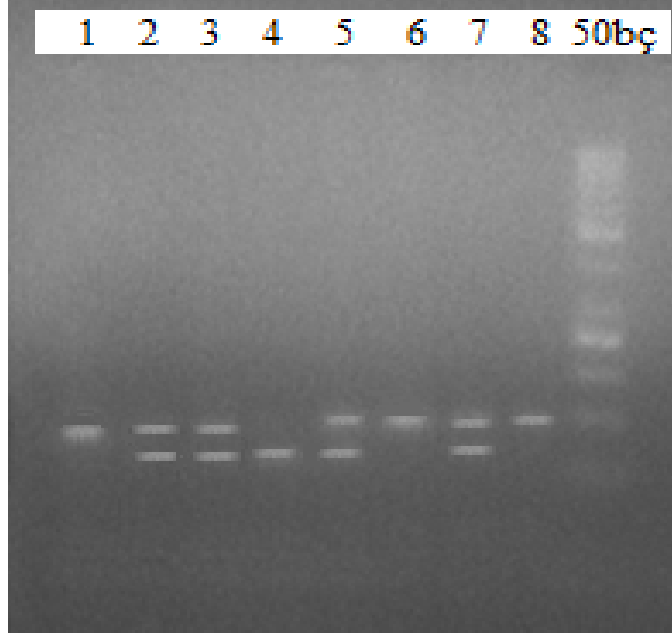
G-7A İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

G-7A bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle NcoI enzimi kullanılarak, yöntemde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Restriksiyon işlemi sonucunda MGP geninin 4. ekson bölgesindeki G→A polimorfizmin varlığında bant oluşumları gözlemlendi (Şekil 4).

GG genotipinde kesim görülmez ve 138 bp'lik tek bant oluşur.

AA genotipinde iki allelde kesim gerçekleşir (2 bant).

GA genotipinde ise bir allelde kesim gerçekleşir (üç bant).



Şekil 4. G-7A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü. GG; 1, 6 ve 8, GA; 2, 3, 5 ve 7, AA; 4 nolu hasta gen polimorfizmini gösterir. 50 bç; DNA markeridir.

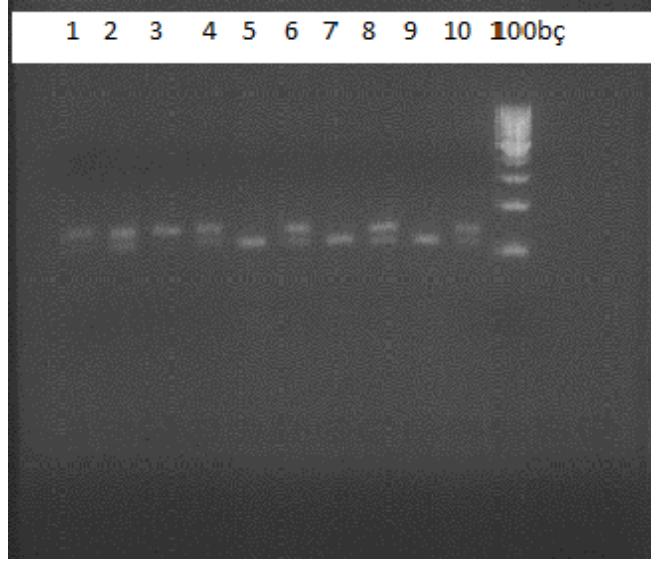
T-138C İçin Restriksiyon Enzim Kesimi

T-138C bölgesinin kesimi için PZR sonucu elde edilen ürünlerle BsrSI enzimi kullanılarak yöntemde gösterilen şekilde enzim kesimi gerçekleştirildi. Enzim kesimi işlemi sonucunda MGP geninin promotör bölgesindeki T→C polimorfizmin varlığında bant oluşumları gözlemlendi (Şekil 5).

CC genotipinde kesim görülmez ve 142 bç'lik tek bant oluşur.

TT genotipinde iki bölgede kesim gerçekleşir, 118 ve 24 bç'lik iki bant oluşur.

CT genotipinde ise her iki allel de görülür ve 142, 118, 24 bç'lik bölgelerde üç bant gözlenir.



Şekil 5. T-138C polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü. CC; 1 ve 3, CT; 2, 4, 6, 8 ve 10, AA; 5, 7 ve 9 nolu hasta gen polimorfizmini gösterir. 100 bç; DNA markeridir.

Çalışılan hasta ve kontrol gruplarının G-7A ve T-138C genotip dağılımları incelendiğinde;

G-7A için; Tip 2 DM'li grubun AA genotipi 13 hasta olup % 38.2, GA genotipi 50 hasta olup % 43.5 ve GG genotipi 57 hasta olup %54.3. Kontrol grubunun AA genotipi 21 hasta olup % 61.8, GA genotipi 65 hasta olup %56.5 ve GG genotipi 48 hasta olup %45.7'dir. Hasta grubunun GG genotipleri kontrole göre daha yüksek bulunmuşken, GA ve AA genotipleri daha düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel değerlendirildiğinde Tip 2 DM'lilerde G-7A genotipleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4)

Tablo 4. G-7A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

G-7A GENOTİP	GRUP		TOPLAM	P
	HASTA	KONTROL		
AA	13 (% 38.2)	21 (% 61.8)	34 (% 13.4)	0.146
GA	50 (% 43.5)	65 (% 56.5)	115 (% 45.3)	
GG	57 (% 54.3)	48 (% 45.7)	105 (% 41.3)	
TOPLAM	120 (% 47.2)	134 (% 52.8)	254 (%100.0)	

AA: Adenine-Adenine; GA: Guanine-Adenine; GG: Guanine-Guanine

Ki kare testi

T-138C için; Tip 2 DM’li grubun CC genotipi 10 hasta olup % 66.7, CT genotipi 49 hasta olup % 48.0 ve TT genotipi 61 hasta olup % 44.5’tür. Kontrol grubunun CC genotipi 5 hasta olup % 33.3, CT genotipi 53 hasta olup % 52.0 ve TT genotipi 76 hasta olup % 55.5’tur. Tip 2 DM’li grubun CC genotipi kontrole göre daha yüksek bulunmuşken CT ve TT genotipleri daha düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak değerlendirildiğinde Tip 2 DM’lerde T-138C’deki genotipler arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 5).

Tablo 5. T-138C genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı

T-138C GENOTİP	GRUP		TOPLAM	P
	HASTA	KONTROL		
CC	10 (% 66.7)	5 (% 33.3)	15 (% 5.9)	0.259
CT	49 (% 48.0)	53 (% 52.0)	102 (% 40.2)	
TT	61 (% 44.5)	76 (% 55.5)	137 (% 53.9)	
TOPLAM	121 (% 47.2)	134 (% 52.8)	254 (% 100.0)	

CC: Cytosine-Cytosine; CT: Cytosine-Timine; TT: Timin-Timin

Ki kare testi

G-7A ve T-138Cgen polimorfizmleri için 254 kişinin (hasta+kontrol) istatistiksel sonuçlarına göre Tip 2 DM’li hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

TARTIŞMA

DM; karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır (1). Tip 2 DM'in patogeneğinde hem insülin direnci, hem de bozulmuş insülin sekresyonu vardır. D vitamini, transkripsiyon faktörü olarak β hücrelerinin insülin sekresyonunda düzenleyici bir rol oynar (38). D vitamini eksikliği, Tip 2 DM prevalansını artırırken, D vitamini desteği insülin sekresyonunu artırabilir (38, 39). D vitamini reseptörü steroid / tiroid hormon reseptörüdür. Tip 1 DM'de D vitamini reseptörünün (VDR) pankreas β hücrelerindeki etkisi, çeşitli gen polimorfizmleri incelenmiştir (40, 41). Sağlıklı Asyalılar üzerinde yapılan bir çalışmada, VDR geninin β hücrelerinin insülin salgılama kapasitesini etkilediği ortaya konulmuştur (42).

7 yıl süren Finlandiya çalışmasına göre D vitamini düzeyi en yüksek olanlarda Tip 2 diabete yakalanma riski %40 azalmıştır. Çalışmaya katılan 4000'den fazla kişi arasında Tip 2 diabetes tanısı koyulan 187 bireyde yaş, cinsiyet ya da mevsime bağlı olmaksızın D vitamininin en düşük düzeylerde olduğu belirlenmiştir. Araştırmacılar eğitim, sigara kullanımı, kilo, yüksek tansiyon kontrolü ve egzersiz farklılıklarını göz önüne alarak incelediklerinde, D vitamininin etkisi hafif azalmakla birlikte anlamlı bulunmuştur (30).

D vitamini ile birlikte kalsiyum eksikliğinin de özellikle tokluk kan şekerlerini ve insülin salınımını etkilediği ve D vitamini ile kalsiyum desteğinin bu süreçlerde olumlu etki yaptığı bilinmektedir. Bununla birlikte D vitamini ve kalsiyum desteğinin beta hücre işlevleri ya da insülin duyarlılığını nasıl etkilediği konusu henüz açıklığa kavuşturulmuş değildir. Pitas ve arkadaşları erişkinlerde kan şekeri kontrolü ve D vitamini-kalsiyum durumuna ilişkin yayımlanmış gözlemsel çalışmalarla, klinik denemeleri gözden geçirdiklerinde gözlemsel çalışmaların kalsiyum-D vitamini ya da süt ürünlerinin alımındaki düşüklük ile tip 2 diyabet

arasında görece olarak sabit bir ilişki bulunduğunu ortaya çıkarmışlardır. Elde ettikleri veri incelenen kişilerde kalsiyum-D vitamini kullanımı ya da süt tüketimi en yüksek düzeyde olan kişilerin tip 2 diyabet gelişme oranının % 64 düşük olduğunu göstermekteydi (43).

Mineralize dokuların organik matriksinde yer alan, K vitaminine bağımlı bir kalsiyum/fosfat bağlayıcı non-collagen bir protein olan ve insan vücudunda en yüksek oranda bulunan Matriks Gla Proteininin (MGP) olması, bu kalsifikasyon işlemi kontrol altına alır. MGP'nin değişik varyantları (polimorfizmler) kalsifikasyon kontrol işlemi değiştirebilmesi ile birlikte insülin direncini de değiştirdiği düşünülmektedir (3, 4).

Farzaneh-Far ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada matriks Gla proteininin ekspresyonunu ve serumdaki düzeyi MGP T-138C gen polimorfizmi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (2).

Herrmann ve arkadaşları yaptıkları çalışmada ise G-7A polimorfizminin miyokarttaki bir alanın, genellikle koroner arter tıkanması sonucu gelişen enfarktüsü ile ilişkili olduğu göstermişlerdir (44).

Bizim çalışmamızda Tip 2 DM şikayeti ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji Ana Bilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucu Tip 2 DM oldukları saptanan 120 hasta grubu ile 134 kontrol grubu olmak üzere toplam 254 kişide G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri incelendi.

İki grubun klinik parametreleri incelendiğinde açlık kan şekeri, HDL kolesterol, LDL kolesterol ve yaş için beklendiği gibi istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuşken ($p < 0.05$), G-7A polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı Tip 2 DM'li hasta grubunda sırasıyla 13 (% 38.2), 50 (% 43.5) ve 57 (% 54.3) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 21 (% 61.8), 65 (% 56.5) ve 48 (% 45.7) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında Tip 2 DM'li hasta grubu ile kontrol grubu arasında G-7A polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Yine T-138C polimorfizmi için CC, CT ve TT allellerinin sıklığı Tip 2 DM'li hasta grubunda sırasıyla 10 (% 66.7), 49 (% 48.0) ve 61 (% 44.5) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 5 (% 33.3), 53 (% 52.0) ve 76 (% 55.5) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında Tip 2 DM'li hasta grubu ile kontrol grubu arasında T-138C polimorfizmi açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çalışma sonucunda elde edilen bu değerler G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin Tip 2 DM üzerinde çalışılan gruplarımız için herhangi bir etkisinin olmadığı yönünde bilgi vermektedir.

Yaptığımız çalışma da dahil birtakım çalışmaların sonuçlarından görüldüğü gibi G-7A ve T-138C polimorfizmlerinin Tip 2 DM üzerindeki etkileri açısından çeşitli bilgiler bulunmuştur. Bu genetik çalışmalardaki çeşitliliğin etnik farklılıklardan veya hasta ve kontrol grupları için farklı seçim kriterlerinin olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

İleride çalışmanın geliştirilmesi ve çalışmaya devam edilmesi tasarlanmaktadır.

SONUÇLAR

Çalışmaya alınan Tip 2 DM'li hasta ve kontrol gruplarının yaş, AKŞ, TG, Kolesterol, HDL-C, LDL-C, SKB ve DKB klinik bulguları belirlendikten sonra çalışma Biyofizik Anabilim Dalında başlatılmıştır.

Bizim çalışmamızda Tip 2 DM şikayeti ile Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Endokrinoloji Ana Bilim Dalına başvuran ve yapılan tetkikler sonucu Tip 2 DM oldukları saptanan 120 hasta grubu ile 134 kontrol grubunun G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri incelendi.

Bu polimorfizmlerden G-7A polimorfizmi için AA, GA ve GG allellerinin sıklığı Tip 2 DM'li hasta grubunda sırasıyla 13 (% 38.2), 50 (% 43.5) ve 57 (% 54.3) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 21 (% 61.8), 65 (% 56.5) ve 48 (% 45.7) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında Tip 2 DM'li hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

T-138C polimorfizmi için ise CC, CT ve TT allellerinin sıklığı Tip 2 DM'li hasta grubunda sırasıyla 10 (% 66.7), 49 (% 48.0) ve 61 (% 44.5) bulunmuşken; kontrol grubunda sırasıyla 5 (% 33.3), 53 (% 52.0) ve 76 (% 55.5) bulunmuştur. Ki-kare Testi değerlerine bakıldığında Tip 2 DM'li hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

Çalışma sonucunda elde edilen bu değerler G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin Tip 2 DM üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı yönünde bilgi vermektedir.

Yaptığımız çalışma da dahil birtakım çalışmaların sonuçlarından görüldüğü gibi G-7A ve T-138C polimorfizmlerinin Tip 2 DM üzerindeki etkileri açısından çeşitli bilgiler

bulunmuştur. Bu genetik çalışmalardaki çeşitliliğin etnik farklılıklardan veya hasta ve kontrol grupları için farklı seçim kriterlerinin olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

İleride çalışmanın geliştirilmesi ve çalışmaya devam edilmesi tasarlanmaktadır.

ÖZET

Diabetes Mellitus gerek kendisi gerekse hayatı tehdit edici komplikasyonları nedeniyle önemli bir sağlık problemidir. Tip 2 Diabetes Mellitus hastalığı, pankreasın β hücrelerinden salgılanan insülin hormonunun sekresyonunun, normal hatta normalden yüksek olması ve/veya periferik insülin kullanımında direncin varlığı sonucu oluşan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır.

Tip 2 Diabetes Mellitus sonucu büyük ve orta boy arterlerin intimasında düzensiz dağılımlı lipit depolanmalarıyla karakterize aterosklerozun patojenik basamaklarından birisi doku kalsifikasyonudur. Çeşitli dokularda ekstrasellüler sıvıda kalsiyum ve fosfat iyonlarının konsantrasyonlarının yüksek olması nedeniyle doku kalsifikasyonunun yüksek olması beklenir. Mineralize dokuların organik matriksinde yer alan, K vitaminiye bağımlı bir kalsiyum/fosfat bağlayıcı non-collagen bir protein olan ve insan vücudunda en yüksek oranda bulunan Matriks Gla Proteininin olması, bu kalsifikasyon işlemi kontrol altına alır. MGP'nin değişik varyantları kalsifikasyon kontrol işlemi değiştirebilmesi ile birlikte insülin direncini de değiştirdiği düşünülmektedir.

Bu çalışmanın amacı Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hastalarda Matriks Gla Proteininin G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerini araştırmaktır.

Çalışma 120 Tip 2 Diabetes Mellitus'lu hasta ve 134 kontrol grubu içermektedir. G-7A ve T-138C gen polimorfizmleri polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda G-7A ve T-138C gen polimorfizmlerinin Tip 2 Diabetes Mellitus gelişmesinde genetik risk faktörlerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadıkları belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Diabetes Mellitus, Matriks Gla Proteini, polimorfizm

**STUDY OF GENE POLYMORPHISMS OF MATRIX GLA PROTEINS
G-7A AND T-138C IN PATIENTS WITH TYPE 2 DIABETES
MELLITUS**

SUMMARY

Diabetes Mellitus is an important health problem due to the illness itself and its life threatening complications. Type 2 Diabetes Mellitus is a disease characterized by carbohydrate, protein and fat metabolism disorders resulting from insulin hormone secreted by β cell of pancreas being normal or even higher than normal and/or the presence of peripheral insulin resistance.

One of the pathogenic stages of atherosclerosis, characterized by uneven distribution of lipid storage in intimas of large and medium-sized arteries, is calcification. In various tissues, tissue calcification is expected to be high due to extracellular fluid concentrations of calcium and phosphate ions being high.

Existing in the organic matrix of mineralized tissues Matrix Gla Protein, which is Vitamin K dependent calcium/ phosphate binder non-collagen protein and exists in the human body at the highest rate, takes control of the process of calcification.

The purpose of this study is to investigate gene polymorphisms of matrix gla proteins G-7A and T-138C in patients with Type 2 Diabetes Mellitus.

The study includes 120 patients with Type 2 Diabetes Mellitus and 134 control group. G-7A and T-138C gene polymorphisms were determined by using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism method.

In the study, it was determined that G-7A and T-138C genetic risk factors in the development of gene gene polymorphisms in Type 2 Diabetes Mellitus were not statistically significant.

Key Words: Diabetes Mellitus, Matrix Gla Protein, polymorphism

KAYNAKLAR

1. Michael M, Engelgau KM, Venkat N, William HH. Screening for Type 2 Diabetes. *Diabetes Care* 2000;23(10):1563-80.
2. Afshin Farzaneh-Far, John D. Davies, Levienja A. Braam, Henri M. Spronk, Diane Proudfoot, Shiu-Wan Chan, et al. A Polymorphism of the Human Matrix γ -Carboxyglutamic Acid Protein Promoter Alters Binding of an Activating Protein-1 Complex and Is Associated with Altered Transcription and Serum Levels. *The Journal Of Biological Chemistry* 2001;276(35):32466-32473.
3. Christopher J. O'Donnell, M. Kyla Shea, Paul A. Price, David R. Gagnon, Peter W.F. Wilson, Martin G. Larson, et al. Matrix Gla Protein Is Associated With Risk Factors for Atherosclerosis but not With Coronary Artery Calcification. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(12):2769–2774.
4. Michael D Crosier, Sarah L. Booth, Inga Peter, Bess Dawson-Hughes, Paul A. Price, Christopher J. O'donnell, et al. Matrix Gla protein polymorphisms are associated with coronary artery calcification in men. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* Vol. 2009;55, No.1 pp.59-65.
5. Ronald KC, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. Diabetes Mellitus. In: Peter H, Bennet and William C. Knowler. *Definition, diagnosis, and clasification of diabetes mellitüs and glucose homeostasis.* 4th ed. Boston: A Wolters Kluwer Co;2005.p329-31.
6. Hatemi H. Diyabet Tarihi Albümü. *Kuantum P.A.P İstanbul* 2003;1-82.
7. Strackowski M, Kowalska I, Stephen A, Dzlenis S. Insulin resistance in the first-degree relatives of persons with type 2 diabtes. *Med Sci Monit* 2003;9(5):238-242.
8. J-M Ekoe (ed). *Diabetes Mellitus.* New York: Elsevier Science;1988.

9. Satman I, Yılmaz MT, Şengül A, Salman S, Salman F, Uygur S ve ark. The TURDEP Group: Population based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: Result of the Turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). *Diabetes Care* 2002;25:1551-6.
10. Rodriguez BL, Abbott RD, Fujimoto W, Waitzfelder B, Chen R, Masaki K et al. American diabetes association and World health organization classifications for diabetes. *Diabetes Care* 2005;25(6):951-5.
11. Resnick HE, Harris MI, Brock DB, Harris TB. American diabetes association diabetes diagnostic criteria, advancing age, and cardiovascular disease Risk Profiles. *Diabetes Care* 2000;23(2):176-85.
12. Yenigün M. Her yönüyle diyabetes mellitus. Yenigün M, Ener N. *Diyabetes mellitusun fizyopatolojisi: Nobel Tıp Kitapevleri* 2001;85-129.
13. Becker K L. Principles and practise of endocrinology and metabolism. In: Krolewski AS, Warrma JH. *Natural history of diabetes mellitus* 3th ed. New York A Wolters Kluwer Co;2001;1320-7.
14. Laakso M. Tip 2 diyabetin epidemiyolojisi ve tanısı. In: Goldstein BJ, Müler-Wieland D. (eds), *Textbook of Type 2 Diabetes*. New York, Martin Dunitz Group 2003. Çeviri Ed: Akman AC. 1.Baskı. AND Yayıncılık, Düzey Matbaası İstanbul 2004;1-12.
15. Koloğlu S. *Diabetes Mellitus*. Koloğlu S. (ed), *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. Birinci Baskı. Ankara, Medical Network & Nobel 1996;368-85.
16. Yki-Jarvinen H. Pathogenesis of non-insülin dependent diabetes mellitus. *Lancet*. 1994;343:91-95.
17. Mitrakou A, Kelley D, Mokan M, Venemam T, Pangburn T, Reilly J, et al. Role of reduced suppression of glucose production and diminished early insülin release in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med*. 1992;326:22-29.
18. Gloyn AL, McCarthy MI. The genetics of type 2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2001;15:293-308.
19. Beck-Nielsen, H, Groop, LC. Metabolic and genetic characterization of prediabetic states. Sequence of events leading to non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1994;94:1714.
20. Kahn, CR. Banting Lecture: Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes* 1994;43:1066.
21. Robertson, RP. Antagonist: diabetes and insulin resistance - philosophy, science, and the multiplier hypothesis. *J Lab Clin Med* 1995;125:560.
22. Roder ME, Dinesen B, Hartling SG, Houssa P, Vestergaard H, Sodoyez-Goffaux F, et al. Intact proinsulin and beta-cell function in lean and obese subjects with and without type 2 diabetes. *Diabetes Care* 1999 Apr;22(4):609-14.

23. Makimattila S, Fineman MS, Yki-Jarvinen H. Deficiency of total and nonglycosylated amylin in plasma characterizes subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 Aug;85(8):2822-7.
24. Schellhase KG, Koepsell TD, Weiss NS. Glucose screening and the risk of complications in type 2 diabetes mellitus. *Journal of Clinical Epidemiology* 2003;56(1):75-80.
25. LJ. DeGroot, JL Jameson. *Endocrinology*. In: Jerrold MO, Yolanto TK (Eds.). *Type 2 Diabetes Mellitus: Etiology, pathogenesis and natural history* 4th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 2001;1(55):776-8.
26. Fontbonne A, Escwege E, Cambien F, Richadr JL, Ducimetiere P, Thibult N. et al. Hypertriglyceridemia as a risk factor of coronary heart disease mortality in subjects with impaired glucose tolerance or diabetes. *Diabetologia* 1989;32:300-4.
27. Axelsen M, Smith U, Jan W, Taskinen MR. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Int Med* 1999;131:27-31.
28. Barry JG. Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2002;90(Suppl):3-10.
29. Johanson EH, Jansson PA, Lönn L, Matsuzawa Y, Funahashi T, TaskinenMR, et al. Fat distribution, lipid accumulation in the liver, and exercise capacity do not explain in the insulin resistance in healthy males with a family history for type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4232-4238.
30. Özcan T, Acele A, Çiçek D, Çamsarı A, Akkuş N, Yaşa E, ve ark. Diabeti olmayan hastalarda insülin direnci ve akıma bağlı dilatasyonun koroner ateroskleroz şiddeti ile ilişkisi. *TGKD cilt 12,sayı 4,Kasım 2008:154-161.*
31. Ryden L, Standl E, Bartnik M, et. all. Guidelines ondiabetes, pre-diabetes and cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2007;28: 88-136.
32. Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix Gla protein. *Nature*. 1997;386:78–81.
33. Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*. 1989;5:874–879.
34. *Pediatrics* Vol. 124 No.2009, Pp.1395-1403.
35. Herrmann S, Whatling C, Brand E, Nicaud V, Garipey J, Simon A, et al. Polymorphisms of the Human Matrix Gla Protein (MGP) Gene, Vascular Calcification, and Myocardial Infarction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000;20:2386-2393.
36. Genetic Engineering: PCR, RFLP Analysis & Gene Therapy, <http://members.aol.com/BearFlag45/Biology1A/LectureNotes/LNPics/Recomb/pcr.gif>;2005.

37. Murray NE. Type I Restriction Systems: Sophisticated Molecular Machines. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:412-34.
38. Pingoud A, Jeltsch A. Recognition and Cleavage of DNA by Type II Restriction Endonucleases. *Eur J Biochem* 1997;246:1-22.
39. Ay A. Hipertansiyonlu Hastalarda Anjiyotensinogen M235T/T174M Gen Polimorfizminin Araştırılması (tez). Edirne: Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi;2007.
40. Lee S, Clark SA, Gill RK & Christakos S. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and pancreatic b-cell function: vitamin D receptors, gene expression, and insulin secretion. *Endocrinology* 1994;134:1602-1610.
41. Baynes KC, Boucher BJ, Feskens EJ & Kromhout D. Vitamin D, glucose tolerance and insulinaemia in elderly men. *Diabetologia*. 1997;40:344-347.
42. McDermott MF, Ramachandran A, Ogunkolade BW, Aganna E, Curtis D, Boucher BJ et al. Allelic variation on the vitamin D receptor influences susceptibility to insulin-dependent diabetes mellitus in Indian Asians. *Diabetologia* 1997;28:971-975.
43. Pani MA, Knapp M, Donner H, Braun J, Baur MP, Usadel KH et al. Vitamin D receptor allele combinations influence genetic susceptibility to type 1 diabetes in Germans. *Diabetes* 2000;49:504-507.
44. Herrmann, S. M., Whatling, C., Brand, E., Nicaud, V., Gariépy, J., Simon, A., Evans, A., Ruidavets, J. B., Arveiler, D., Luc, G., Tiret, L., Henney, A., and Cambien, F. (2000) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 2386–2393.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekiller:	Sayfa
Şekil 1: DM'un kardiyovasküler sistem üzerine olan olumsuz etkileri.....	14
Şekil 2: PZR Döngüsü.....	20
Şekil 3: Hasta ve kontrol DNA örneklerinin %0.8'lik agaroz jelde yürütülmesi ve UV ışık altında görüntülenmesi.....	26
Şekil 4: G-7A polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü.....	27
Şekil 5: T-138C polimorfizmini gösteren EtBr ile boyanan % 3'lük agaroz jel görüntüsü.....	28
Tablolar:	
Tablo 1: EZNA kiti ile DNA izolasyonu.....	18
Tablo 2: T-138C polimorfizmi için kullanılan primer tablosu ve restriksiyon enziminin kesim sonuçları.....	24
Tablo 3: G-7A ve T-138C için kontrol ve hasta gruplarının klinik bulguları.....	25
Tablo 4: G-7A genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı.....	28
Tablo 5: T-138C genotiplerinin hasta ve kontrol gruplarına göre dağılımı.....	29

ÖZGEÇMİŞ

Fulya YÜKÇÜ

Doğum Tarihi: 25.12.1983

EĞİTİM:

1990-1995 DENİZLİ, 24 Mayıs İlk Okulu

1995-1998 İstanbul, Bayrampaşa Hürriyet İlköğretim Okulu

1998-2002 İstanbul, Çemberlitaş Kız Lisesi

2003-2008 Edirne, Trakya Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü

2008- Edirne, Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Yüksek Lisansı

YAYINLAR:

Ulusal Kongre ve Sempozyum Bildirileri:

Yükçü F, Sipahi T, Ekiz Bilir B, Ay Başak A, Alkanlı N, Güldiken S. Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Matriks GLA Proteininin G-7A Gen Polimorfizminin Araştırılması. 22. Ulusal Biyofizik Kongresi 28 Eylül-1 Ekim 2010 Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aydın.

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
YEREL ETİK KURULU Edirne, Türkiye
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	TÜTFEK 2009 / 148		
	PROTOKOL ADI	Tip 2 Diabetes Mellitus'lu Hastalarda Matris Gla Proteininin G-7A ve T-138C Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması		
	SORUMLU ÜNVANI/ADI	ARAŞTIRICI	Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ	
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	TÜTF Biyofizik Anabilim Dalı		
	BAŞVURULAN ETİK KURUL	TÜTF Yerel Etik Kurulu		
	DESTEKLEYİCİ FIRMA	Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP)		
	FAZİ			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	<input checked="" type="checkbox"/> Tek Merkez	<input type="checkbox"/> Çok Merkez	<input checked="" type="checkbox"/> Ulusal

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Değişiklik No.su	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	12.06.2009		<input checked="" type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ			<input type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ	12.06.2009		<input checked="" type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce
	OLGU RAPOR FORMU			<input type="checkbox"/> Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 12 /01	Tarih: 25.06.2009
	Üniversitemiz Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Tammam SİPAHİ'nin sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Yüksek Lisans Öğrencisi Fulya YÜKÇÜ'nün tez çalışmasının araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeleri araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, araştırmaya ilişkin giderlerin Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (TÜBAP) tarafından karşılanması ve TÜBAP onay yazısının Kurulumuza gönderilmesinden sonra çalışmanın başlatılmasına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir. Ayrıca çalışma bir genetik araştırma olduğundan, Klinik Araştırmalar Yönetmeliği'ne göre sorumlu araştırmacı tarafından çalışma dosyasının bir örneğinin Sağlık Bakanlığı Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü'ne gönderilmesi gerekmektedir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Helsinki Bildirgesi, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamalar Kılavuzu
ÜYELER	

Ünvanı / Adı / Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Dikmen DÖKMECİ Başkan	Farmakoloji	T.Ü.T.F. Farmakoloji A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Ümit N. BAŞARAN Başkan Yardımcısı	Çocuk Cerrahisi	T.Ü.T.F. Çocuk Cerrahisi A.D.	E	E H	E H	
Prof. Dr. Betül Biner ORHANER Üye	Çocuk Sağ. ve Hst.	T.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hst. A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Dilek MEMİŞ Üye	Anesteziyoloji	T.Ü.T.F. Anesteziyoloji A.D.	K	E H	E H	
Doç. Dr. Ömer Nuri PAMUK Üye	Romatoloji	T.Ü.T.F. İç Hst. A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Hakan ERBAŞ Üye	Biyokimya	T.Ü.T.F. Biyokimya A.D.	E	E H	E H	İzinli
Yrd. Doç. Dr. Ufuk USTA Üye	Patoloji	T.Ü.T.F. Patoloji A.D.	E	E H	E H	
Yrd. Doç. Dr. Esin KARLIKAYA Üye	Deontoloji ve Tıp Tarihi	T.Ü.T.F. Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.	K	E H	E H	
Ecz. Emine SAKMAN Üye	Eczacı	T.Ü.T.F. Başhekimliği	K	E H	E H	İzinli
Avukat Barış DEMİREL Üye	Hukuk	T.Ü. Rektörlüğü	E	E H	E H	katılmadı

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Prof. Dr. Murat DİKMEN GİL
- Dekan