

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREDİYABET VE TİP 2 DİYABET
HASTALARINDA
OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖR 7 BENZERİ 2
GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

Melis KANT

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ
İZMİR-2016**

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970005

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PREDİYABET VE TİP 2 DİYABET
HASTALARINDA
OKSİDATİF MAKROMOLEKÜL HASARININ VE
TRANSKRİPSİYON FAKTÖR 7 BENZERİ 2
GEN POLİMORFİZMİNİN İNCELENMESİ**

**BİYOKİMYA
DOKTORA TEZİ**

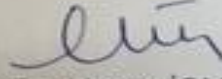
Melis KANT

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2013.KB.SAG.094 sayılı proje ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970005

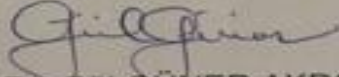
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, Biyokimya Doktora programı öğrencisi Melis KANT 'Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 Gen Polimorfizminin İncelenmesi' konulu Doktora tezini 08.06.2016 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Hüray İŞLEKEL

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

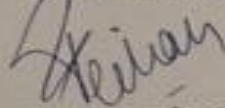


Prof. Dr. Gül GÜNER AKDOĞAN

ÜYE

İzmir Ekonomi Üniversitesi

Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Ferhan GİRGIN SAĞIN

ÜYE

Ege Üniversitesi

Tıp Fakültesi

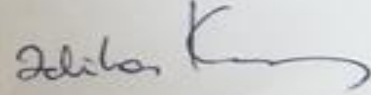


Prof. Dr. Canan ÇOKER

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Zeliha KERRY

ÜYE

Ege Üniversitesi

Eczacılık Fakültesi

Prof. Dr. Gülgün OKTAY

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Ebru SEZER

YEDEK ÜYE

Ege Üniversitesi

Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
TABLolar DİZİNİ	vi
KISALTMALAR.....	vii
TEŞEKKÜR.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT	4
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
2. GENEL BİLGİLER	10
2.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi	10
2.2. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması	11
2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus ve Prediyabet Tanımı ve Tanı Kriterleri	12
2.4. T2DM'un Etiyolojisi	13
2.5. T2DM Komplikasyonları	14
2.6. T2DM Epidemiyolojisi	15
2.7. T2DM'da Genetik Faktörler	16
2.7.1. <i>TCF7L2</i>	17
2.8. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Makromolekül Hasarı	21
2.8.1. <i>Oksidatif DNA Hasarı</i>	26
2.8.1.1. <i>8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG)</i>	30
2.8.1.2. <i>8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (R-cdA ve S-cdA)</i>	32
2.8.1.3. <i>Oksidatif DNA Nükleozid Hasarının Ölçülmesi</i>	33
2.8.2. <i>Lipid Peroksidasyonu</i>	34
2.8.2.1. <i>8-izoprostan (8-iso-PGF_{2α})</i>	37
2.8.2.2. <i>8-İzoprostanın Ölçülmesi</i>	39
2.9. Oksidatif Stresin T2DM ile İlişkisi	39
2.10. Oksidatif Makromolekül Hasarı ile <i>TCF7L2</i> Arasındaki İlişki	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Araştırmanın Tipi	45

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	45
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örnekleme/Çalışma Grupları	45
3.4. Çalışma Materyali	47
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	47
3.6. Veri Toplama Araçları	47
3.6.1. <i>Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler</i>	47
3.6.2. <i>İdrarda Hasarlı DNA Nükleozidlerinin ve İzoprostanın Kantitasyon Yöntemi</i>	50
3.6.2.1. <i>Hasarlı DNA Nükleozidlerinin Ekstraksiyon Basamakları</i>	50
3.6.2.2. <i>İzoprostanın Ekstraksiyon Basamakları</i>	50
3.6.2.3. <i>LC-MS/MS SID-MRM</i>	51
3.6.2.4. <i>Yöntem Geçerlilik Çalışmaları</i>	57
3.6.2.4.1. <i>Seçicilik (Selectivity)</i>	58
3.6.2.4.2. <i>Analitik Duyarlılık (Analytical Sensitivity)</i>	58
3.6.2.4.3. <i>Doğrusallık (Linearity)</i>	58
3.6.2.4.4. <i>Doğruluk (Accuracy)</i>	58
3.6.2.4.5. <i>Keskinlik (Precision)</i>	59
3.6.2.4.6. <i>Tespit ve Kantitasyon Limiti (LOD – LOQ)</i>	59
3.6.3. <i>TCF7L2 rs7903146 Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi</i>	59
3.6.3.1. <i>SNP Analizleri için Kan Örneklerinin Toplanması</i>	59
3.6.3.2. <i>Genomik DNA İzolasyonu</i>	60
3.6.3.3. <i>DNA'nın Spektrofotometrik Analizi</i>	60
3.6.3.4. <i>TCF7L2 SNP Analizleri</i>	60
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	62
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	63
3.8.1. <i>İstatistiksel Analizler</i>	63
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	63
3.10. Etik Kurul Onayı	63
4. BULGULAR	64
4.1. LC-MS/MS SID-MRM Yönteminin Optimizasyonu	64
4.2. Yöntem Geçerlilik Çalışmalarının Bulguları.....	69
4.2.1. <i>Analitik Duyarlılık</i>	69
4.2.2. <i>Doğrusallık</i>	69

4.2.3. Doğruluk.....	72
4.2.4. Kesinlik.....	74
4.2.5. Tespit ve Kantitasyon Limiti.....	74
4.3. Prediyabet, T2DM Hastalarında ve Sağlıklı Kontrol Grubunda Tanımlayıcı Bulgular	76
4.4. Hasarlı DNA Nükleozidlerinin ve İzoprostanın Kantitatif Analizleri.....	79
4.5. TCF7L2 SNP Analizlerinin Bulguları	84
4.6. Oksidatif Hasarın TCF7L2 Polimorfizmine Göre Değerlendirilmesi	89
4.6.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Eşik Değerlerinin Belirlenmesi ve Tanısal Performansı.....	89
4.7. Korelasyon Analizleri	96
5. TARTIŞMA.....	100
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	111
7. REFERANSLAR	113
8. EKLER	126

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Diyabetik komplikasyonlar.....	15
Şekil 2. TCF7L2'nin bilinen fonksiyonları	18
Şekil 3. Wnt sinyal yolağı	18
Şekil 4. TCF7L2 gen bölgesinde belirlenmiş tek nükleotid polimorfizmleri.....	20
Şekil 5. O ₂ 'in dört elektron ile H ₂ O'ya indirgenmesi	21
Şekil 6. Fenton reaksiyonu.....	23
Şekil 7. Haber-Weiss reaksiyonu	23
Şekil 8. Serbest radikallerin neden olduğu makromolekül hasarları.....	25
Şekil 9. DNA'da ROT ataklarına duyarlı bölgeler	27
Şekil 10. DNA'da oksidatif hasar ürünleri.....	29
Şekil 11. 8-OH-dG oluşum mekanizması	31
Şekil 12. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin oluşum mekanizması	33
Şekil 13. Lipid peroksidasyon basamakları	35
Şekil 14. Lipid peroksidasyon ürünleri	36
Şekil 15. Non-enzimatik yolla oluşan lipid peroksidasyon ürünleri	37
Şekil 16. 8-iso-PGF _{2α} oluşum mekanizması.....	38
Şekil 17. Oksidatif stres ile ilişkili olan patolojik durumlar	40
Şekil 18. Prediyabet ve T2DM'da oksidatif stresin olası nedenleri.....	42
Şekil 19. Kütle spektrometresinin bileşenleri.....	52
Şekil 20. Triple quadrupole iyon trap MS/MS.....	53
Şekil 21. Çoklu reaksiyon izleme	54
Şekil 22. İnternal standart ve analitin kütle spektrumu	55
Şekil 23 a. 8-OH-dG ürün iyon spektrumu	64
Şekil 23 b. R-cdA ve S-cdA ürün iyon spektrumu	65
Şekil 23 c. 8-iso-PGF _{2α} ürün iyon spektrumu	65
Şekil 24. 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA'ya ait ana iyon/ürün iyon çiftleri	66
Şekil 25. 8-iso-PGF _{2α} 'a ait ana iyon/ürün iyon çiftleri	66
Şekil 26. 8-OH-dG'nin idrarda total iyon kromatogramı	67
Şekil 27. R-cdA ve S-cdA'nın idrarda total iyon kromatogramı	68
Şekil 28. 8-iso-PGF _{2α} 'ın idrarda total iyon kromatogramı.....	68

Şekil 29. 8-OH-dG kalibrasyon eğrisi.....	70
Şekil 30. S-cdA kalibrasyon eğrisi.....	71
Şekil 31. 8-iso-PGF _{2α} 'ın kalibrasyon eğrisi.....	72
Şekil 32. Olgu ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı	76
Şekil 33. Olgu ve kontrol grubunda 8-OH-dG düzeyleri	80
Şekil 34. Olgu ve kontrol grubunda R-cdA düzeyleri.....	81
Şekil 35. Olgu ve kontrol grubunda S-cdA düzeyleri.....	82
Şekil 36. Olgu ve kontrol grubunda izoprostan düzeyleri	83
Şekil 37. DNA dizi analizi bulgularının değerlendirilmesi ve genotiplerin belirlenmesi	85
Şekil 38. Blast2sequence programında TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin değerlendirilmesi	86
Şekil 39. TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin gruplara göre dağılımı	88
Şekil 40. 8-OH-dG'nin ROC eğrisi	90
Şekil 41. R-cdA'nın ROC eğrisi.....	91
Şekil 42. S-cdA'nın ROC eğrisi	92
Şekil 43. 8-iso-PGF _{2α} 'ın ROC eğrisi.....	93

TABLolar DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. ADA'nın 2011 yılında belirlediği DM tanı kriterleri.....	13
Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan etmenler.....	22
Tablo 3. Serbest radikal olan ve radikal olmayan türler	22
Tablo 4. DNA hasarına neden olan endojen ve ekzojen faktörler	26
Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler.....	48
Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar	49
Tablo 7. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın iyon çiftleri ve alıkonma zamanları.....	57
Tablo 8. 8-OH-dG kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu	73
Tablo 9. S-cdA kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu.....	73
Tablo 10. 8-iso-PGF _{2α} kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu	74
Tablo 11. Hasarlı DNA nükleozidlerinin yöntem geçerlilik bulguları	75
Tablo 12. İzoprostanın yöntem geçerlilik bulguları.....	75
Tablo 13. Olgu ve kontrol grubunun demografik ve antropometrik özellikleri.....	77
Tablo 14. Olgu ve kontrol grubunun rutin laboratuvar verileri	78
Tablo 15. Olgu ve kontrol grubu idrar örneklerinde 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF _{2α} düzeyleri	79
Tablo 16. Olgu ve kontrol grubunda TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin genotipleri.....	87
Tablo 17. Oksidatif stres parametrelerinin eşik değerlerinin belirlenmesi	94
Tablo 18. TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi olan ve olmayan kişilerde oksidatif hasar düzeyleri.....	95
Tablo 19. Kontrol grubunda korelasyon analizlerinin sonuçları.....	97
Tablo 20. Prediyabet grubunda korelasyon analizlerinin sonuçları	98
Tablo 21. T2DM hastalarında korelasyon analizlerinin sonuçları.....	99

KISALTMALAR

4-HNE	:4-hidroksinonenal
8-iso-PGF_{2α}	:8-İzoprostan
8-OH-dG	:8-hidroksi-deoksiguanozin
ADA	:Amerikan Diyabet Birliği
AKŞ	:Açlık Kan Glukozu
ALT	:Alanin Aminotransferaz
AST	:Aspartat Aminotransferaz
AUC	:ROC Eğrisinde Eğri Altında Kalan Alan
BOSS	:Oksidatif Stres Biyobelirteçleri Çalışması
BUN	:Kan Üre Nitrojeni
CGMS	:Sürekli Glukoz İzleme Sistemi
CRP	:C-Reaktif Protein
CV	:Varyasyon Katsayısı
DM	:Diabetes Mellitus
ELISA	:Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESCODD	:Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi
ESI	:Elektrospray İyonizasyon
FDA	:Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GC-MS	:Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
GIP	:Glukoza Bağımlı İnsülinotropik Peptid
GLP-1	:Glukagon Benzeri Peptid 1
HbA1c	:Hemoglobin A1c
HDL	:Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HOMA-IR	:Homeostasis Model Assesment-İnsülin Direnci
HPLC	:Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IDDM	:İnsülin Bağımlı Diabetes Mellitus
IDF	:Uluslararası Diyabet Federasyonu

IFG	:Bozulmuş Açlık Kan Glukozu
IGT	:Bozulmuş Glukoz Toleransı
IS	:İnternal Standart
LC-MS/MS	:Sıvı Kromatografisi-Tandem Kütle Spektrometresi
LDL	:Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LOD	:Tespit Limiti
LOQ	:Kantitasyon Limiti
MDA	:Malondialdehit
MRM	:Çoklu Reaksiyon İzleme (Multiple Reaction Monitoring)
MS/MS	:Tandem Kütle Spektrometresi
NFG	:Normal Açlık Plazma Glukozu
NIDDM	:İnsülin Bağımsız Diabetes Mellitus
NIEHS	:National Institute of Environmental Health Sciences
NIH	:National Institutes of Health
OGTT	:Oral Glukoz Tolerans Testi
PARP-1	:Poli (ADP-riboz) Polimeraz-1
QQQ	:Triple Quadrupole
R-cdA ve S-cdA	:8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler
RIA	:Radioimmunoassay
ROC	:İşlem Karakteristiği Eğrisi
S/N	:Sinyal Gürültü Oranı
SH	:Standart Hata
SID	:Stabil İzotop Dilüsyon
SNP	:Tek Nükleotid Polimorfizmi
SS	:Standart Sapma
TBARS	:Tiyobarbitürik Asit Reaktif Bileşikleri
TG	:Trigliserid
TURDEP	:Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
VKI	:Vücut Kütle İndeksi
VLDL	:Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
WHO	:Dünya Sağlık Örgütü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden her zaman yararlandığım, hoşgörölü ve sevecen yaklaşımı ile desteğini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum çok değerli danışmanım **Sayın Prof. Dr. Hüray İşlekel'e**,

Doktora tez çalışmalarım sırasında öneri ve katkıları ile her zaman yanımda olarak desteğini esirgemeyen tez izleme komitesindeki değerli hocalarım **Sayın Prof. Dr. Gül Güner Akdoğan** ve **Sayın Prof. Dr. Zeliha Kerry'e**,

Desteğini her zaman hissettiğim, engin bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Güldal Kırkalı'ya**,

Bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam **Sayın Prof. Dr. Miral Dizdaroğlu'na**,

DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü **Sayın Prof. Dr. İbrahim Astarçioğlu** ve **tüm DEÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına**,

DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda almış olduğum eğitimde emeği geçen, güler yüzlerini ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanı **Sayın Prof. Dr. Canan Çoker**, **tüm değerli öğretim üyeleri** ve **çalışanlarına**,

Doktora tez çalışmalarımın istatistiksel analizlerinde bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan **Sayın Prof. Dr. Pembe Keskinöğlu'na**,

Çalışmamızın klinik yönünün gerçekleşmesinde katkılarını ve veri toplanması aşamasında desteklerini esirgemeyen **Sayın Prof. Dr. Fırat Bayraktar'a**, **Dr. Mehmet Çalan** ve **Dr. Tuğba Arkan'a**,

Tez çalışmam boyunca bana her konuda destek ve yardımcı olan, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli çalışma arkadaşlarım **Merve Akış** ve **Yard. Doç. Dr. Gamze Tuna'ya**,

Manevi desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen **Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki tüm arkadaşlarıma** ve bölüm sekreterimiz sevgili **Eda Nesrin Olum'a**,

Eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni her konuda karşılıksız destekleyen ve bugünlere gelmemde gösterdikleri sabır ve fedakârlık için ailem; **Alev-Bahadır Dinç**, **Damla Dinç** ve **Bengü-Recep Kant'a**, eşim **Yalkın Kant** ve kızım **Nehir Kant'a** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 Gen Polimorfizminin İncelenmesi

Melis KANT

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 35340, Inciraltı/İzmir

Giriş ve amaç: Tip 2 diyabet (T2DM), dünyada yaygın olarak görülen hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. Prediyabet, T2DM'in orta derecede hiperglisemi ve kan glukoz dalgalanmalarının gözleendiği subklinik dönemidir. Hiperglisemi nedeniyle ortaya çıkan oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri, insülin direnci gelişimi, β -hücre disfonksiyonunun ortaya çıkışı ve diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının yanı sıra, DNA, lipid ve protein gibi makromolekül hasarında etkin bir rol oynamaktadır. Diğer yandan, insülin direnci gelişimi ve β -hücre disfonksiyonunda genetik faktörler de etkili olmaktadır. Transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2 (TCF7L2) polimorfizmleri T2DM gelişim riski ile ilişkilendirilmiş en önemli tek nükleotid polimorfizmleridir (SNP). TCF7L2'nin T2DM hastalarında ortaya çıkan oksidatif makromolekül hasarına bir etkisi olup olmadığı henüz bilinmemektedir. Tip 2 diyabetin klinik olarak ortaya çıkmasından önce vücutta oluşan hasarların ve metabolizmaya yansıyan etkilerinin erken tanımlanması ve oksidatif hasarın tam anlamıyla belirlenmesi için prediyabet döneminin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir. Bu bilgiler ışığında projemizin amacı prediyabet ve T2DM hastalarında sistemik oksidatif hasarın güvenilir biyobelirteçleri olarak; DNA nükleozid hasarının başlıca göstergeleri, 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG) ve 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (R-cdA, S-cdA) ve lipid peroksidasyon ürünü 8-izoprostan (8-iso-PGF_{2 α}) düzeylerinin araştırılması ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması; olgu ve sağlıklı kontrol grubunda TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi olan ve olmayan bireylerin oksidatif hasar yönünden incelenmesidir.

Yöntem: Çalışmamız kapsamında prediyabet (n=47) ve T2DM (n=43) hastalarından ve sağlıklı kontrol grubundan (n=37) kan ve idrar örnekleri toplandı. İdrar örneklerinde 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2 α} 'ın mutlak kantitasyonu sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon

izleme yöntemi ile gerçekleştirildi. TCF7L2 geninde rs7903146 polimorfizmi otomatize DNA dizi analizi yöntemiyle belirlendi. Elde edilen bulgular, hastaların rutin laboratuvar verileri, klinik bulguları ve demografik parametreleri ile birlikte değerlendirildi. Prediyabet ve T2DM hastalarında 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'nın hiperglisemi için eşik değerleri belirlendi. İstatistiksel analizler SPSS 22.0 ve GraphPad Prism 5 programlarında gerçekleştirildi ve p<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Prediyabet hastalarının idrar örneklerinde 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Sırasıyla p<0.0001, p=0.011 ve p=0.006). T2DM hastalarında 8-OH-dG düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi (p=0.031). Prediyabet ve T2DM hastalarında incelenen hasarlı DNA nükleozidleri, 8-OH-dG ile R-cdA ve S-cdA arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon bulundu (Sırasıyla r=0.549, p<0.001 ve r=0.599, p<0.001, r=0.662, p<0.001 ve r=0.388, p=0.011). Prediyabet grubunda HbA1c'nin S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri ile negatif yönde anlamlı korelasyonu olduğu belirlendi (Sırasıyla r=-0.424, p=0.007 ve r=-0.373, p=0.018). Bulgularımız prediyabet, T2DM ve kontrol gruplarında TCF7L2 polimorfizmi açısından incelendiğinde, homozigot TT alelli taşıma oranı sırasıyla % 7, % 22 ve % 9; heterozigot CT alelli taşıma oranı ise sırasıyla % 50, % 50 ve % 52 olarak bulundu. Gruplar arasında homozigot alel görülme oranları karşılaştırıldığında T2DM grubundaki oranın diğer gruplara göre en az iki kat daha yüksek olduğu gözlemlendi. Sağlıklı kontrol grubunda TCF7L2 gen polimorfizminin hasarlı DNA nükleozidleri ile negatif yönde anlamlı korelasyonu belirlendi (Sırasıyla r=-0.468, p=0.024, r=-0.724, p<0.001 ve r=-0.663, p=0.001). Ayrıca T2DM hastalarında TCF7L2 gen polimorfizmi ile bel çevresi arasında pozitif korelasyon bulunmaktadır (r=0.479, p=0.007).

Sonuç: Çalışmamız prediyabet ve yeni tanı almış T2DM hastalarında oksidatif makromolekül hasarının güvenilir biyobelirteçlerle kapsamlı olarak incelendiği ve oksidatif DNA hasarının TCF7L2 polimorfizmi ile ilişkilendirildiği ilk çalışmadır. Prediyabet olgularında kontrol grubuna göre yüksek bulunan hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostan düzeylerinin, T2DM'un subklinik evresi olarak tanımlanan prediyabet döneminde ortaya çıkan sistemik oksidatif makromolekül hasarını

yansıttığı ve bu parametrelerin T2DM riskinin belirlenmesi için hastalığın erken biyobelirteçleri olabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar sözcükler: Oksidatif DNA hasarı, Lipid peroksidasyonu, Prediyabet, T2DM, Sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme, Tek nükleotid polimorfizmleri, TCF7L2



ABSTRACT
Evaluation of Oxidatively Induced Macromolecule Damage and
Transcription factor 7-like 2 Gene Polymorphism
in Patients with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus

Melis KANT

Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, 35340, İnciraltı/İzmir

Objective: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is an endemic chronic metabolic disease characterized by hyperglycemia. Prediabetes is the subclinical stage of T2DM with moderate hyperglycemia and blood glucose fluctuations. Oxidative stress and reactive oxygen species resulting from hyperglycemia play an important part in oxidatively induced damage to macromolecules such as DNA, lipids and protein and in development of insulin resistance, β -cell dysfunction and long-term complications of diabetes. Genetic factors are also involved in the development of insulin resistance and β -cell dysfunction. Transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) polymorphisms are the most important single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with T2DM. However, the effect of TCF7L2 polymorphism on oxidative macromolecule damage remains to be clarified. Prediabetes stage must be thoroughly investigated for early identification of oxidative macromolecule damage in the human body and for determination of its effects on metabolism. New biomarkers which can be used in risk stratification and therapy control as supplementary to current parameters are needed. Therefore, the aims of this study were to investigate the levels of DNA damage products 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OH-dG), 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosines (R-cdA and S-cdA) and lipid peroxidation product isoprostane (8-iso-PGF_{2 α}) as reliable oxidative stress markers in patients with prediabetes and T2DM in comparison with healthy volunteers, to detect TCF7L2 rs7903146 polymorphisms and compare these polymorphisms in terms of oxidative damage levels.

Method: Urine and blood samples were collected from prediabetes (n=47) and T2DM (n=43) patients, and control subjects (n=37). Absolute quantification of 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA and 8-iso-PGF_{2 α} was made with stable isotope dilution-multiple reaction monitoring liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods.

TCF7L2 rs7903146 SNPs were analyzed with DNA sequencing method. Obtained results were evaluated together with clinical and laboratory findings and demographic features. Cut off values of 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA and 8-iso-PGF_{2α} were determined for hyperglycemia in prediabetes and T2DM patients. Statistical analyses were performed by using SPSS 22.0 and GraphPad Prism 5, and $p < 0.05$ was considered significant.

Results: 8-OH-dG, S-cdA and 8-iso-PGF_{2α} levels were significantly higher in the prediabetes patients than those in the healthy control group ($p < 0.0001$, $p = 0.011$ and $p = 0.006$, respectively). T2DM patients had significantly higher levels of 8-OH-dG compared to the healthy control group ($p = 0.031$). 8-OH-dG were significantly positively correlated with R-cdA and S-cdA for prediabetes and T2DM ($r = 0.549$, $p < 0.001$ and $r = 0.599$, $p < 0.001$, $r = 0.662$, $p < 0.001$ and $r = 0.388$, $p = 0.011$, respectively). HbA1c was found significantly negatively correlated with S-cdA and 8-iso-PGF_{2α} in prediabetes group ($r = -0.424$, $p = 0.007$ and $r = -0.373$, $p = 0.018$, respectively). Concerning TCF7L2 rs7903146 SNPs, 7% of the prediabetes patients, 22% of the T2DM patients and 9% of the healthy control group had homozygote TT allele and 50% of the prediabetes patients, 50% of the T2DM patients and 52% of the control group had heterozygote CT allele. The T2DM patients had homozygote TT allele minimum two times as frequently as the prediabetes and healthy control groups. A significant negative correlation was found between TCF7L2 SNP and the damaged DNA nucleotides of 8-OH-dG, R-cdA and S-cdA in the healthy control group ($r = -0.468$, $p = 0.024$, $r = -0.724$, $p < 0.001$ and $r = -0.663$, $p = 0.001$ respectively). There was a significant positive correlation between TCF7L2 SNPs and waist circumference in the T2DM patients ($r = 0.479$, $p = 0.007$).

Conclusion: This is the first study which examined oxidative macromolecule damage thoroughly by using reliable markers of oxidative stress in patients with prediabetes and newly diagnosed T2DM in comparison with healthy volunteers, which compared these polymorphisms in terms of oxidative damage levels and which showed a relation between DNA damage and TCF7L2 polymorphism. These results indicate that oxidatively induced macromolecule damage in cells appears during prediabetes, the subclinical stage of T2DM. Therefore, oxidatively induced DNA

damage and lipid peroxidation products found to elevate in the prediabetic stage can be used as early disease markers in patients at risk of T2DM.

Key Words: Oxidatively induced DNA damage, Lipid peroxidation, Prediabetes, T2DM, Stable isotope dilution-multiple reaction monitoring liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Single nucleotide polymorphism, TCF7L2



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM) erişkin toplumda en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Son yıllarda yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumlarda T2DM görülme sıklığı hızla artmaktadır. Dünyada 2015 yılında diyabetli birey sayısı 415 milyon iken bu sayının 2040 yılında 642 milyona ulaşacağı öngörülmektedir (1). Genellikle orta-ileri yaş hastalığı olarak kabul edilmekle birlikte, son yıllarda daha genç yaşlarda da görülmeye başlanmıştır. T2DM'da başlangıç döneminde pankreastan insülin salgısı yeterli olmakla birlikte, salgılanan insülin hücreler tarafından kullanılamaz ve giderek insüline karşı direnç gelişir. Hastalığın ilerleyen dönemlerinde insülin salgısı yetersiz hale gelir, insülin direnci ve yetersizliği sonucunda hiperglisemi ortaya çıkar. T2DM gelişimi, bozulmuş glukoz toleransı ile karakterize geri dönüşümlü ve uzun bir prediyabet aşamasını izler. T2DM için yüksek risk grubu olarak tanımlanan prediyabetiklerde, glisemik parametre düzeyleri normale göre yüksek, ancak tip 2 diyabet tanısı alacak kadar yüksek değildir (2). T2DM'de morbidite ve mortalitenin asıl nedeni, kronik hiperglisemi ve disglisemi sonucu ortaya çıkan mikro ve makrovasküler komplikasyonlardır (3). T2DM'un patogenezinde altta yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, hiperglisemi nedeniyle artan oksidatif stresin hastalığın ve mikro-, makrovasküler komplikasyonların gelişiminde anahtar rol oynadığı kabul edilmektedir (3). Bu komplikasyonların genellikle prediyabet aşamasında oluşmaya başladığı ileri sürülmektedir. Ancak, prediyabet tanısı için kullanılan hemoglobin A1c (HbA1c), açlık kan glukozu (AKŞ) ve oral glukoz tolerans testi (OGTT) gibi klasik glisemik biyobelirteçlerin birçok prediyabet olgusunda normal düzeylerde olduğu gözlenmektedir (4). Bu nedenle bu evrenin iyi tanımlanması ve izlenmesi için kullanılacak ve sistemik hücrel hasarı erkenden yansıtabilecek biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır (5,6).

Oksidatif stres reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi ve vücuttan uzaklaştırılması arasındaki dengenin bozulması olarak tanımlanmaktadır. Yüksek miktardaki ROT, DNA ve membran lipidleri başta olmak üzere hücrel moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasara neden olur. DNA yapısında oluşan serbest radikal aracılı hasar mutagenез, karsinogenез, yaşlanma, T2DM ve diğer birçok hastalık mekanizması ile ilişkili olması nedeniyle özel bir öneme sahiptir (7). Oksidatif stres

DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA protein çapraz bağlanması ve nükleozid hasarı gibi modifikasyonlara neden olmaktadır. Okside bir nükleozid türü olan 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OH-dG), nükleer ve mitokondriyal DNA'da en sık çalışılan ve tespit edilen hasar ürünü olup, duyarlı bir in-vivo oksidatif stres biyobelirtecidir (8,9). Son yıllarda, bir diğer nükleozid hasar parametresi olan 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinin (S-cdA ve R-cdA) fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde bulunması, kimyasal stabilitesi ve özgün yapısı nedeniyle birçok hastalığın belirlenmesinde iyi bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmektedir (10,11). DNA'da oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan ürünlerin vücut sıvılarında güvenilir analitik yöntemlerle doğru olarak değerlendirilmesi oksidatif DNA hasarının ve hastalıklardaki rolünün anlaşılması açısından son derece önemlidir (7). Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (ESCOOD) 8-OH-dG düzeylerinin farklı tekniklerle ölçümlerinin karşılaştırması sonucunda, en güvenilir yöntemin sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) olduğu yönünde görüş bildirmiştir (12). Son yıllarda, düşük konsantrasyonlardaki DNA hasar ürünlerinin ölçülmesine olanak sağlayan ve izotop işaretli internal standart (IS) kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometresi stabil izotop dilüsyon-çoklu reaksiyon izleme (LC-MS/MS SID-MRM) yöntemi, yüksek analitik duyarlılık ve özgüllüğü, aynı anda birçok analitin kantitasyonunu gerçekleştirebilme kapasitesi nedeniyle diğer yöntemlere tercih edilmektedir (12,13).

Lipid peroksidasyonu oksidatif stresin iyi bir göstergesidir (14). Çoklu doymamış yağ asitlerinin sekonder oksidasyon ürünü olan izoprostanlar, National Institutes of Health (NIH) tarafından onaylanmış in-vivo oksidatif stres biyobelirteçleri olup, endojen lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde 'altın standart' olarak kullanılmaktadırlar (13). İzoprostanların stabil kimyasal yapıları, biyolojik sıvı ve dokularda saptanabilir düzeyleri, oksidatif stres biyobelirteçleri olarak tercih edilme nedenleridir. En sık çalışılan izoprostan olan 8-iso-PGF_{2α}'ın biyolojik örneklerde ölçümü için en güvenilir yöntem LC-MS/MS'dir (15,16).

Literatürde farklı yöntemler kullanılarak ölçülen DNA hasarı ve lipid peroksidasyonunun tip 2 diyabet ile ilişkilendirildiği çeşitli çalışmalar yer almaktadır (17–24). Ancak, hastalığın başlangıç ve geri dönüşümlü aşamasını kapsayan prediyabet döneminde oksidatif stresin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu çalışmalarda oksidatif stres düzeyleri referans yöntemler kullanılmaksızın incelenmiş ve oksidatif DNA hasarı sadece 8-OH-dG ile belirlenmiştir (4,25). Ancak biyobelirteç olarak tek bir DNA hasar ürününün ölçümü, DNA yapısında dört bazda aynı anda oluşan serbest radikal kaynaklı geniş hasarın gözden kaçmasına yol açabilir (26). Diğer yandan, hem prediyabet hem de T2DM olgularını kapsayan bir örneklemede, DNA nükleozid hasarının ve lipid peroksidasyonunun altın standart parametreleri olan sırasıyla 8-OH-dG, S-cdA, R-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ın birlikte değerlendirildiği kapsamlı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

T2DM genetik ve çevresel faktörlerden etkilenen multifaktöriyel bir hastalıktır. TCF7L2 (Transkripsiyon faktör 7 benzeri 2) ilk kez 2006 yılında T2DM ile ilişkili gen olarak tanımlanmıştır (27). TCF7L2, beta hücre (β-hücre) proliferasyonu ve insülin sekresyonunda önemli rol oynayan wnt sinyal yolağı ile ilişkili olan bir transkripsiyon faktörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda TCF7L2'nin çeşitli DNA onarım proteinleri ile kompleks oluşturduğu ve DNA onarımında rol oynadığı ortaya koyulmuştur (28,29). Bu çalışmada prediyabet ve T2DM hastalarında TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) belirlenerek, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Bu yönüyle araştırmamız, prediyabet ve T2DM hastalarında TCF7L2 SNP'leri ile oksidatif stres ilişkisinin incelendiği ilk çalışmadır.

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı prediyabet ve T2DM hastalarında;

- Oksidatif DNA nükleozid hasarının başlıca göstergeleri, 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve lipid peroksidasyonu altın standardı 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrik olarak ölçülmesi ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırılması,
- DNA nükleozid hasarı ve lipid peroksidasyonu bulgularının hastaların rutin laboratuvar verileri, klinik bulguları ve demografik parametreleri ile ilişkilerini inceleyerek prediyabet evresinde erken birer biyobelirteç olup olamayacaklarının araştırılması,
- TCF7L2 polimorfizmi olan ve olmayan bireylerin oksidatif makromolekül hasarı açısından karşılaştırılmasıdır.

Çalışmanın hipotezi; prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında oksidatif DNA nükleozid hasarı ve lipid peroksidasyonunda artış görüleceği; oksidatif hasarın TCF7L2 polimorfizmi olan bireylerde olmayanlara göre daha farklı olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diabetes Mellitus'un Tarihi

Tarihte Diabetes Mellitus (DM) ile ilgili ilk tanımlamalar yaklaşık 3000 yıl önceye dayanmaktadır. Klinik olarak ilk tanımı Aulus Cornelius Celsus tarafından M.Ö. 50 yıllarında, ayrıntılı tanımı ise Kapadokyalı Yunan Hekim Aretaeus tarafından M.S. 2. yy. döneminde yapılmıştır. M.S 960 yıllarında İbni Sina diyabeti tanımlayarak çeşitli tedavi yöntemleri önermiştir. Avrupa'da Mathew Dobson diyabetik idrar tadının şekerden kaynaklandığını ispatlamış, düşük karbonhidratlı diyetler vererek tedavide başarılı olmuştur. 1870 yıllarında Fransız doktor Bouchard DM hastalarının savaş esnasında yetersiz beslenmeye bağlı düşük şeker alımı sonucunda iyileştiğini tespit etmiştir. Araştırmacı Claude Bernard, karaciğerde aşırı glikojenoliz sonucu ortaya çıkan fazla glukozun idrara atıldığı ve diyabete neden olduğu hipotezini ortaya atmıştır. 1869 yılında Paul Langerhans, pankreas dokusunda daha sonradan kendi adıyla anılacak olan adacık hücrelerini keşfetmiştir. Alman bilim adamı, Georg Zuelzer ilk enjektabl insülin ekstresini üretmiş ancak aşırı yan etkileri görülmüştür. 1921 yılında Frederick Grant Banting ve Charles H. Best, pankreastan özel kimyasal yöntemlerle ilk saf insülini elde etmiş ve insülinle tedavi edilen ilk hasta olarak tarihe geçen Leonar Thomson'un tedavisinde başarıyla kullanmışlardır. Bu buluşları için Banting ve laboratuvarın yöneticisi olan John James Richard Macleod'a 1923 yılında Nobel Tıp Ödülü verilmiştir. 1936 yılında Hagedorn kristalize insüline bir balık proteini olan protamin ilave ederek daha uzun etkili insülin bulmuştur. 1940 yılında diyabet ve uzun dönem komplikasyonlar arasındaki ilişki tespit edilmiştir. 1955-1957 yıllarında hala geniş kapsamlı kullanıma sahip oral antidiyabetik ajanlardan metformin ve sülfonilüreler piyasaya sürülmüştür. 1966 yılında ilk pankreas nakli yapılmıştır. 1983 yılında ilk biyosentetik insan insülini bulunmuş ve 1986 yılında ilk kez insülin preparatları kalem halinde kullanıma sunulmuştur. Son yıllardaki gelişmelerle de etkili insülin analogları kullanımına başlanmıştır (30).

2.2. Diabetes Mellitus'un Tanımı ve Sınıflandırılması

Diabetes mellitus, insülin eksikliği ya da insülin etkisindeki bozukluklar nedeniyle organizmanın karbonhidrat, yağ ve proteinlerden yeterince yararlanamadığı, hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (31). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından etyopatogenez ve diyabetin evreleri göz önüne alınarak dört ana grup şeklinde sınıflanmıştır.

- I. Tip 1 Diabetes Mellitus
 - a. İmmün aracılı
 - b. İdiyopatik
- II. Tip 2 Diabetes Mellitus
- III. Diğer Spesifik Tipler
 - a. β -hücre fonksiyonun genetik bozuklukları
 - b. İnsülin etkisinde genetik bozukluklar
 - c. Ekzokrin pankreas hastalıkları
 - d. Endokrinopatiler
 - e. İlaç ya da kimyasallara bağlı
 - f. Enfeksiyonlar
 - g. İmmün aracılı diyabetin nadir formları
 - h. Diyabetle bazen birlikteliği olan diğer genetik sendromlar
- IV. Gestasyonal Diabetes Mellitus

Tip 2 diabetes mellitus (T2DM), DM'un en sık görülen formudur ve tüm olguların % 90'ını oluşturmaktadır. Özellikle sanayileşen toplumda önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Erişkin toplumda en yaygın görülen metabolizma hastalığıdır. Son yıllarda daha genç yaşlarda da görülmeye başlanmıştır (31). T2DM tüm dünyadaki yüksek insidansı ve neden olduğu akut ve kronik komplikasyonlardan dolayı günümüzde en önemli mortalite ve morbidite nedenlerinin başında gelmektedir (31,32).

2.3. Tip 2 Diabetes Mellitus ve Prediyabet Tanımı ve Tanı Kriterleri

T2DM, pankreas β -hücrelerinden insülin sekresyonunun yetersizliği ve/veya vücudun insülini yeterli kullanamaması sonucu ortaya çıkan insülin direnci ve hiperglisemi ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır (33,34). Klinik olarak polidipsi (çok su içme), poliüri (çok idrar yapma), polifaji (fazla yeme), pruritis (kaşıntı), kilo kaybı gibi belirtiler ile ortaya çıkar. Birçok olguda bu bulgularla tanı konulmadan yıllar önce hastalık başlamıştır. T2DM'da ortaya çıkan kronik hiperglisemi, uzun dönemli hasarın ve retinopati, nöropati, nefropati ve ateroskleroz gibi mikro-, ve makro-vasküler diyabetik komplikasyonların başlıca nedenidir.

Amerikan Diyabet Birliği (ADA) tarafından 1997 yılında yapılan düzenlemeyle T2DM tanı kriterleri; açlık kan glukozu (AKŞ) >126 mg/dL (7.0 mmol/L) ve 2. saat oral glukoz tolerans testi (OGTT) >200 mg/dL (11.1 mmol/L) olarak belirlemiştir. Hemoglobin A1c (HbA1c) ise 2010 yılında, ölçüm standardizasyonunun sağlanması nedeni ile tanı kriterleri arasına girmiştir. HbA1c >6.5 ve üzeri eşik değeri olarak kabul edilmiştir (**Tablo 1**). Prediyabet, subklinik diyabet olarak belirtilen yeni bir klinik terimdir, ilk olarak 2002 yılında ADA tarafından tanımlanmıştır (35). Orta düzeyde hipergliseminin gözleendiği, kan glukoz düzeylerinin normale göre yüksek, ancak T2DM tanısı alacak kadar yüksek olmadığı bir dönemdir (2). Prediyabetin erken tanısı, T2DM riskini azaltma veya önleme fırsatı sağlayabilir. WHO prediyabeti iki parametre ile tanımlamaktadır; bozulmuş açlık kan glukozu ve bozulmuş glukoz toleransı. Bozulmuş açlık kan glukozu (IFG), açlık kan glukozunun normal değerlerin üzerinde olup, T2DM tanısı için gerekli olan düzeylerin altında olması durumudur (100-125 mg/dL ya da 6.1-6.9 mmol/L). Bozulmuş glukoz toleransı (IGT) ise 75 gr oral glukoz tolerans testinin (OGTT) 2. saat ölçümünün normalden yüksek fakat T2DM tanısı için düşük olan bireyleri tanımlamaktadır (140-200 mg/dL ya da 7.8-11 mmol/L) (36). ADA bu kriterlere ek olarak HbA1c değerleri $\% 5.7-6.4$ arasında olan kişileri prediyabetik olarak tanımlamaktadır (37) (**Tablo 1**). Prediyabet olan bireylerin yaklaşık $\% 25$ 'inde T2DM gelişmektedir. Bu ilerleyiş etnik köken, obezitenin derecesi, vücut yağlarının dağılımı, sedanter yaşam tarzı, yaşlanma ve eşlik eden tıbbi durumlardan etkilenebilir. Prediyabet döneminde alınan önlemler ve yaşam tarzında yapılan değişiklikler ile T2DM riskinin $\% 40-70$ oranında önlenilebileceği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (2). Ayrıca yapılan birçok çalışmaya göre prediyabetli kişiler

T2DM gelişimine ilaveten kardiyovasküler hastalıkların gelişimi bakımından da yüksek risk taşımaktadır (38).

Tablo 1. ADA'nın 2011 yılında belirlediği DM tanı kriterleri

	Plazma Glukoz Konsantrasyonu		
	HbA1c (%)	AKŞ (mg/dL)	OGTT (mg/dL)
Normal	N/A	< 100	<140
Prediyabet	5.7- 6.4	100-125	140-199
T2DM	≥ 6.5	≥126	≥200

2.4. T2DM'un Etiyolojisi

T2DM insülin direnci ile karakterize kronik metabolik bir hastalıktır. İnsülin direnci, ekzojen veya endojen insüline karşı normal biyolojik yanıtın bozulmasıdır, reseptör düzeylerinde bozukluklar ile ortaya çıkmaktadır. İnsülinin hedef dokuları karaciğer, kas ve yağ dokusudur ve karaciğerde glukoneogenezi ve glikojenolizi inhibe ederek hepatik glukoz üretimini baskılar. Aynı zamanda glukozun kas ve yağ dokusuna alınımını ve bu dokularda enerji kaynağı olarak depolanmasını sağlar. İnsülin direncinin gelişmesi sonucu hepatik glukoz çıkışında artış olur, kas ve yağ dokusuna alınamayan glukoz ile hiperglisemi ortaya çıkar. Pankreas β -hücreleri fonksiyonunu kaybeder ve kan glukoz düzeyine yanıt olarak yeteri kadar insülin salgılayamaz ve sonuçta T2DM gelişir.

İnsülin direnci genellikle T2DM öncesinde başlayarak uzun yıllar devam etmekte, insülin salgılanmasında ciddi azalma ise hastalığın ileri dönemlerinde veya araya giren hastalıklar sırasında ön plana geçmektedir. T2DM gelişiminde insülin direnci ve β -hücre disfonksiyonunun hangisinin daha önemli olduğu tam bir kesinlik kazanmamıştır (39). T2DM gelişimi açısından risk taşıyan diyabetiklerin birinci derece

akrabalarında bozulmuş glukoz toleransı ortaya çıkmadan önceki dönemlerde insülin direnci varlığının gösterilmesi hastalığın patogenezinde insülin direncinin primer bozukluk olabileceğini düşündürmüştür (40,41). β -hücre disfonksiyonunun genellikle hastalığın erken dönemlerinde ortaya çıktığı bilinmektedir, ancak bu disfonksiyona yol açan mekanizmalar henüz tam anlaşılammıştır. Yaygın kabul edilmekte olan görüş ise her iki bozukluğun (insüline direnç ve β -hücre disfonksiyonu) da T2DM patogenezinde önemli olduğu ve erken basamaklarında yer aldığıdır (42). Fakat bu iki bozukluğun patogeneze olan etkileri heterojendir, etnik ve kişisel farklılıklar göstermektedir. T2DM, çevresel ve genetik faktörlerin karmaşık etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır. Diyabet açısından pozitif aile öyküsüne, azalmış fiziksel aktivite ve metabolik durumun (abdominal obezite, insülin direnci, hipertansiyon ve dislipidemi) eklenmesi T2DM gelişim riskini oldukça yükseltmektedir (43).

2.5. T2DM Komplikasyonları

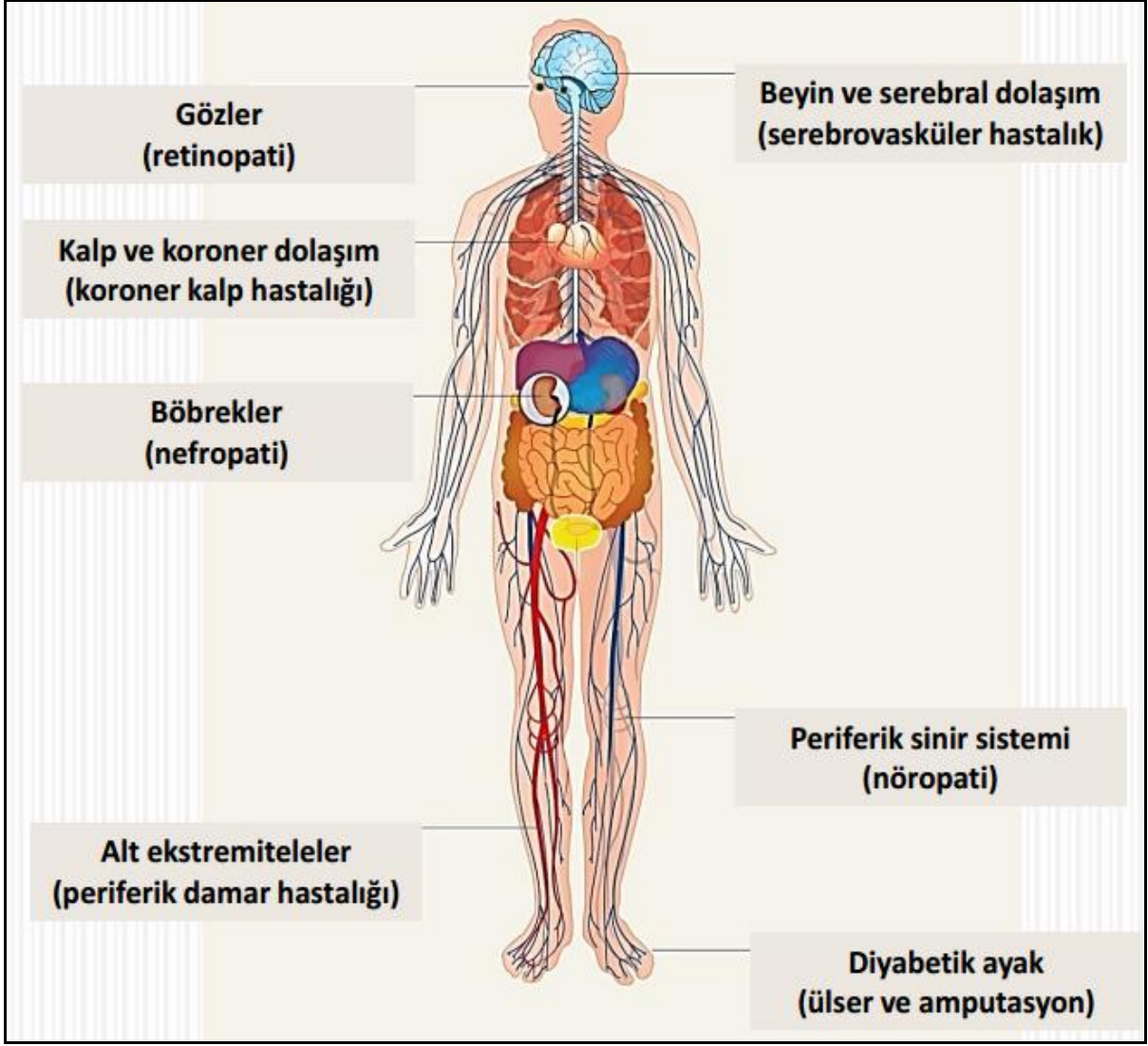
Diyabetik komplikasyonlar, T2DM'un morbidite ve mortalitesinde en yüksek riski oluşturmaktadır. Hastalığın gelişiminde ortaya çıkan kronik hiperglisemi, mikro-, ve makro-vasküler diyabetik komplikasyonların başlıca nedenidir. Bu komplikasyonlar akut ve kronik olmak üzere iki grup altında incelenebilir (**Şekil 1**).

Akut Komplikasyonlar: Hipoglisemi, hiperozmolar non-ketotik koma, diyabetik ketoasidoz ve laktik asidozdur. Bu akut komplikasyonlarından en sık görüleni hipoglisemidir. Diyabetiklerde hipoglisemi hemen daima tedavinin bir yan etkisi olarak ortaya çıkmaktadır.

Kronik Komplikasyonlar

Mikrovasküler Komplikasyonlar: Diyabetik retinopati, nefropati, nöropati (periferik simetrik polinöropati, otonom nöropatiler, mononöropatiler).

Makrovasküler Komplikasyonlar: Koroner arter hastalığı, serebrovasküler hastalık, periferik arter hastalığı, diyabetik ayak ve enfeksiyonlardır.



Şekil 1. Diyabetik komplikasyonlar

2.6. T2DM Epidemiyolojisi

Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde diyabet prevalansı hızla yükselmektedir. WHO verilerine göre, 2015 yılında T2DM prevalansı % 9 civarındadır. Bu oran yaşla birlikte artmakta ve yaşlanan dünya nüfusuyla beraber hasta sayısının artacağı tahmin edilmektedir (44). Birçok ülkede ölüme neden olan hastalıklar içinde T2DM beşinci sırada yer almaktadır. T.C. Sağlık Bakanlığı ve İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi işbirliği ile 18 Ocak–15 Haziran 2010 tarihleri arasında gerçekleştirilen 15 il 540 merkezi kapsayan "Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans

Çalışması-II (TURDEP-II)" sonuçlarına göre erişkin Türk toplumunda T2DM sıklığı % 13.7 ve prediyabet sıklığı % 13.9 olarak belirlenmiştir. İnsan sağlığını tehdit eden kronik bir hastalık olması yanında, T2DM'un hem bireye hem de ülkelerin sağlık sistemlerine maliyeti oldukça yüksektir. Kişiyeye ve topluma yükünü azaltmak için hastalığın ve gelişebilecek hasarların olabildiğince erken dönemde tanınması ve uygun şekilde tedavi edilmesi şarttır.

2.7. T2DM'da Genetik Faktörler

Tip 2 diyabetin oldukça karmaşık bir etyopatogenezi vardır. Hastalığın gelişiminde yaşam tarzından kaynaklanan düzensiz ve dengesiz beslenme, fiziksel aktivite azlığı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra, genetik faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. T2DM riskinin % 30-70'inin genetik temellere dayandığı tahmin edilmektedir (45). Ailesel T2DM hikâyesi olan kişilerin hastalığın gelişiminde daha yüksek risk altında olduğu belirlenmiştir. Genetik yatkınlığı belirleyen ortak bir gen gösterilememiştir, poligenik etki öngörülmektedir. Monogenik özellik taşıyan tek durum, MODY adı verilen erken başlangıçlı, insülin bağımlı olmayan otozomal dominant geçişli T2DM alt tipidir. T2DM'da poligenik etki hastalığın patogenezinde temel unsur olan β -hücre disfonksiyonu ve insülin direncini ayrı ayrı etkilemektedir (35).

Poligenik ya da multifaktöriyel T2DM, birçok farklı genin birbirleri ve çevre ile karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıktığı için klinik durumu daha karmaşık ve heterojendir. Gen-gen ve gen-çevre arasındaki bu oldukça karmaşık etkileşimlerin incelenmesi, T2DM patogenezinin aydınlatılması, komplikasyonların gelişimi açısından riskli bireylerin belirlenmesi ve genom-ilaç etkileşimlerinin aydınlatılarak hastaların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi açısından önemli bilgiler sağlayabilir. T2DM'un gelişiminde etkili genleri tanımlamaya yönelik çalışmalar aday gen testi ve tüm genom ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) olmak üzere iki yaklaşıma odaklanmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar sonucunda farklı genlerde bulunan yaklaşık 153 polimorfizm hastalıkla ilişkili olarak tanımlanmıştır (46–49). Bu polimorfizmler arasında T2DM gelişimde en yüksek riski taşıyanların transkripsiyon faktörü 7 benzeri 2 (TCF7L2) tek nükleotid polimorfizmleri (SNP) olduğu belirlenmiştir (27).

2.7.1. TCF7L2

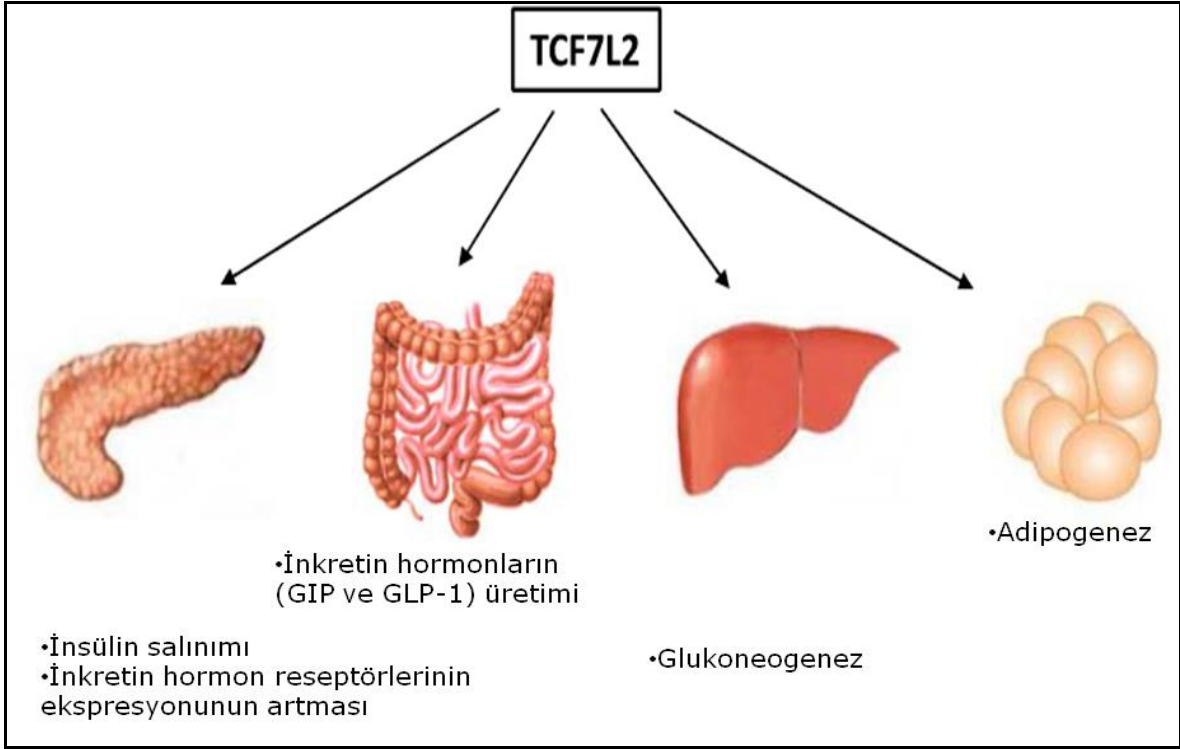
TCF7L2 geni yüksek mobiliteli grup (high mobility group box) içeren transkripsiyon faktörleri ailesinin üyesidir (27,50,51). İlk kez 2006 yılında T2DM ile ilişkili gen olarak tanımlanmıştır ve bir transkripsiyon faktörü olan T hücre transkripsiyon faktörü-4 (TCF-4) proteinini kodlamaktadır (52).

Memelilerde 4 tane TCF bulunmaktadır (53);

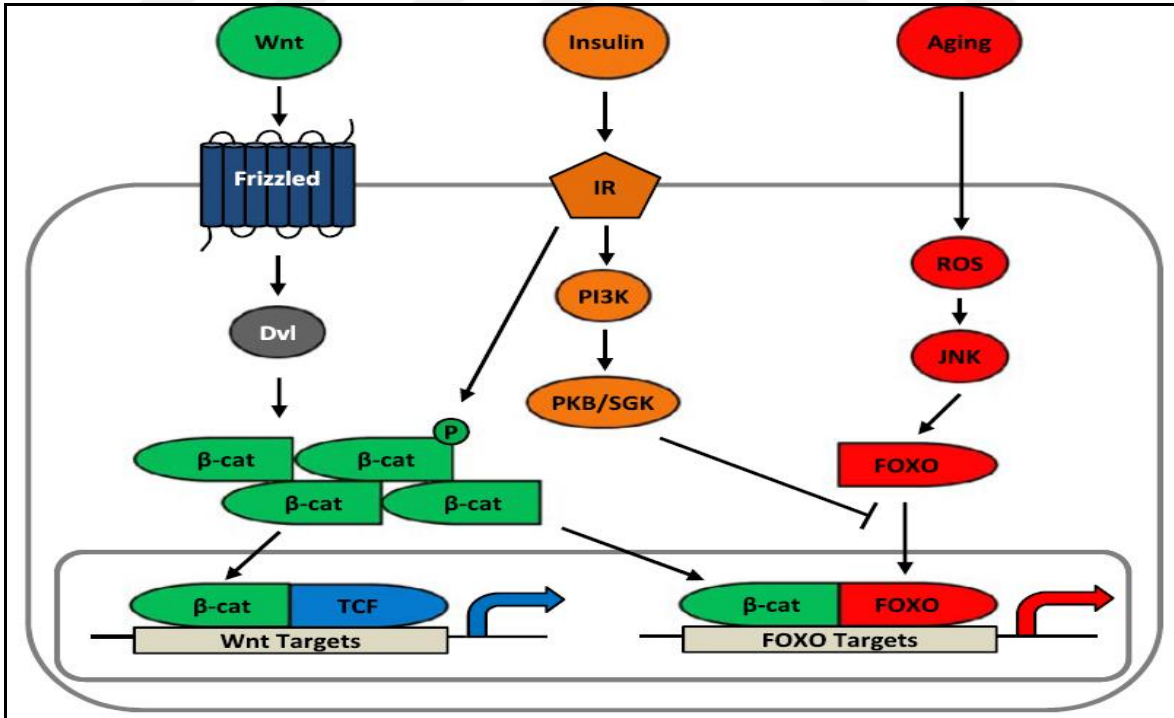
- Lenfoid güçlendirici bağlanma faktörü (LEF-1)
- TCF7 (TCF-1)
- TCF7L1 (TCF-3)
- TCF7L2 (TCF-4)

TCF7L2 geni 10. kromozomun q25.3 bölgesinde bulunur ve 215.9 kb büyüklüğünde geniş bir alanı kaplamaktadır (54). İnsan TCF7L2 geni 17 ekzon ve 13 intron bölgesinden oluşmaktadır. TCF7L2 proteini β -katenin bağlama bölgesi (CTNNB1), DNA-bağlanma bölgesi (HMG kutusu) ve birçok izoformda değişken olan C-terminal bölgesi olmak üzere 3 temel bölgeden oluşmaktadır.

TCF7L2'nin iskelet kasları dışında pankreas β -hücreleri de dâhil olmak üzere birçok dokuda üretildiği ve insülin sekresyonu, hepatik glukoz üretimi ve kan glukoz düzeylerini regule eden glukagon benzeri peptid 1 (GLP-1), glukozla bağımlı insülinotropik peptid (GIP) gibi inkretin hormonların düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (**Şekil 2**). TCF7L2, wnt sinyal yolağının son basamağında görev alarak yolaktaki diğer genlerin aktivasyonunu düzenlemektedir (**Şekil 3**) (55). Wnt sinyal yolağı metabolik homeostaz, β -hücre proliferasyonu ve insülin sekresyonunda önemli rol oynayan ve inkretin hormonların sentezini etkileyen bir yolaktır.



Şekil 2. TCF7L2'nin bilinen fonksiyonları

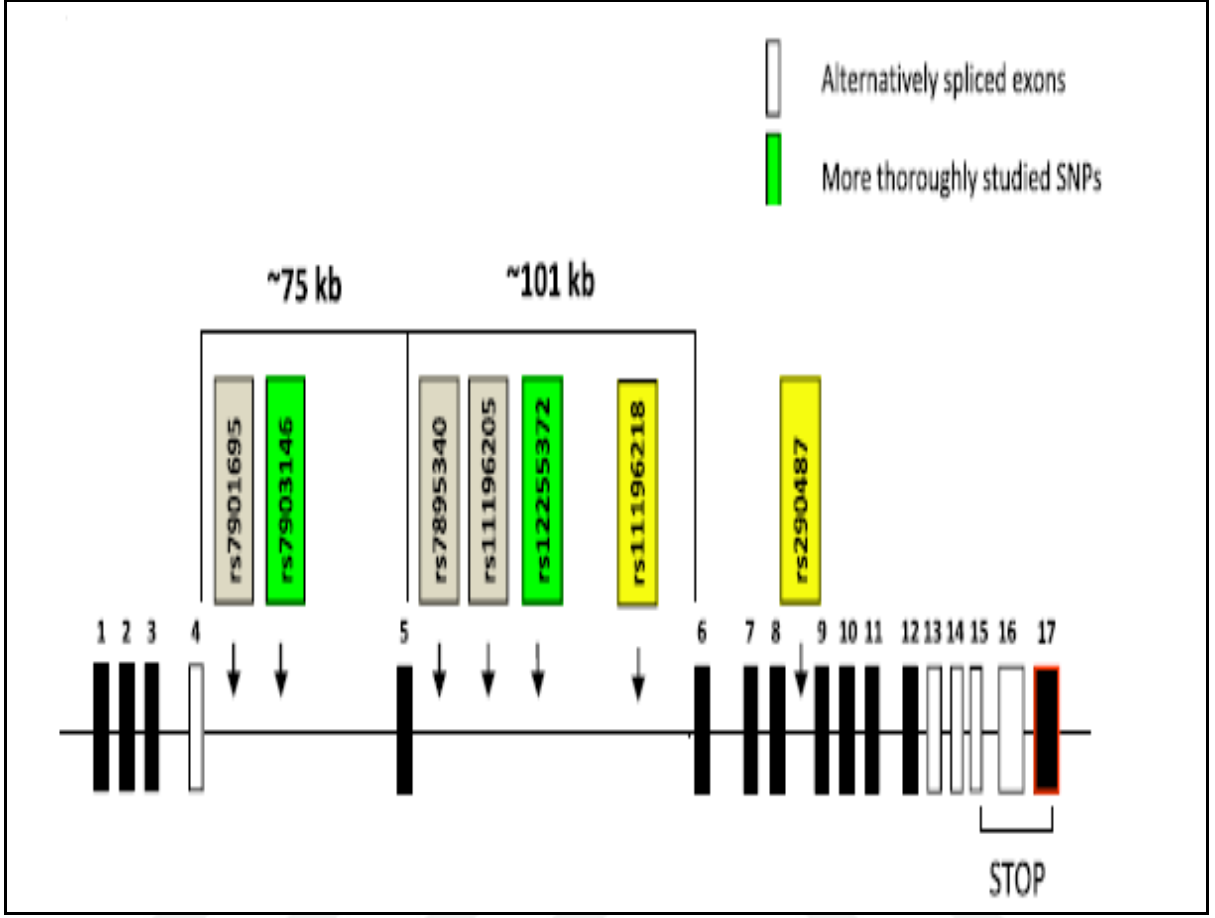


Şekil 3. Wnt sinyal yolağı

Son yıllarda yapılan çalışmalarla TCF7L2'nin DNA onarımı ile ilişkisi ortaya koyulmuştur. Poli (ADP-riboz) polimeraz-1 (PARP-1), DNA topoizomeraz 1, ATP bağımlı RNA helikaz A gibi DNA onarım proteinleri ile kompleks oluşturduğu ve bu proteinlerin TCF7L2 ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir (28,29). TCF7L2 ile oluşan bu protein kompleksi, DNA hasarına cevaben düzenlenmektedir. PARP-1'in, DNA hasarının tanınması ve onarımındaki rolü bilinmektedir, DNA hasarına cevaben PARP-1 ekspresyonu artar (56–59). Bu verilere göre TCF7L2'nin DNA onarımında rol oynadığı düşünülmektedir. DNA onarımı ve TCF7L2 arasındaki bu ilişkinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve T2DM'da ortaya çıkan oksidatif DNA hasarı ile ilişkisinin aydınlatılması gerekmektedir. Biz de çalışmamızda TCF7L2 polimorfizmi ile oksidatif DNA hasarı arasındaki ilişkiyi inceledik.

İncelenen tüm gen polimorfizmleri arasında TCF7L2'de bulunan SNP'lerin T2DM gelişiminde en önemli etkiye sahip olduğu gösterilmiş ve T2DM riskini iki kat arttırdığı belirlenmiştir (60). TCF7L2 gen bölgesinde belirlenmiş yedi SNP vardır ve bunlar DNA'nın kodlanmayan bölgeleri olan intronlarda bulunmaktadır. T2DM gelişiminde etkili olduğu düşünülen bölge dördüncü intronda yer alan rs7903146'dır (55). Bu bölgenin intronlarda bulunması ilişkili olduğu diğer proteinlerin regülasyon süreçlerinde rol oynayabileceğini göstermektedir (61,62) (**Şekil 4**).

DNA dizisinde sitozinin (C) timin (T) ile yer değiştirmesiyle ortaya çıkan TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi, amino asit sekansında bir değişikliğe yol açmadığı halde protein fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır. Bu durumun GLP-1 ve GIP gibi inkretin hormonların azalmasına, insülin sekresyonunun bozulmasına ve hepatik glukoz üretiminin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (63,64). 2007 yılında yapılan bir çalışmada TCF7L2 polimorfizminin diyabetin tedavisini etkilediği, insülin sekresyonunu indükleyen sülfonilürelerin tedavi etkinliğini azalttığı gözlenmiştir (65). T2DM ilişkili genlerin ve polimorfizmlerin tanımlanabilmesinin en önemli kazancı, hastalığın patofizyolojisini açıklayabilmek, hastalık gelişebilecek riskli bireyleri erken dönemde tespit edebilmek ve etkili tedavi edici yöntemler geliştirebilmektir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda prediyabet, T2DM hastalarında ve sağlıklı kontrol grubunda TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi DNA dizi analizi yöntemi ile incelendi.



Şekil 4. TCF7L2 gen bölgesinde belirlenmiş tek nükleotid polimorfizmleri

2.8. Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Makromolekül Hasarı

Serbest radikaller, atomik yörüngelerinde bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron taşıyan, kimyasal olarak çok aktif, zararlı moleküllerdir. Bu bileşikler kendi yörüngelerini tamamlamak için diğer bileşiklerden elektron alarak serbest radikal zincir tepkimelerini başlatırlar ve bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler. Serbest radikal zincir tepkimeleri canlı organizmalarda normal metabolik yolların işleyişi sırasında oluşabildiği gibi, ekzojen etkenlerin etkisiyle de oluşmaktadır.

Serbest radikaller üç yolla meydana gelirler (66);

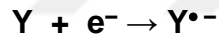
- Kovalent bağlı normal bir molekülün parçalarının her birinde ortak elektronlardan birinin kalmasıyla homolitik bölünmesi (homolitik ayrılma ile radikal oluşumu)



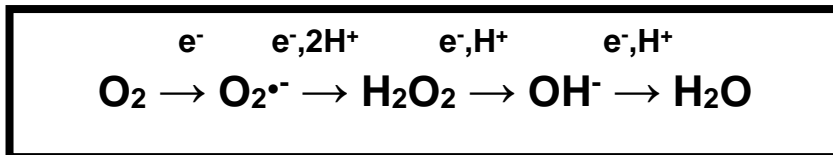
- Normal bir molekülden yalnız bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi



- Normal bir moleküle yalnız bir elektronun transferi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelerek, reaktif oksijen türlerini (ROT), reaktif nitrojen türlerini (RNT) ve diğer reaktifleri oluşturmaktadır (67). En önemli radikal kaynağı oksijen (O_2) dir. O_2 molekülü yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında vücuttaki O_2 'nin % 95-98'i enzimatik yollarla suya çevrilirken, geri kalan kısmı elektron eklenmesi sonucu serbest radikal kaynağı olarak bilinen ara ürünleri oluşturmaktadır. O_2 toplam dört elektron alma gücünde olup suya indirgenebilir (**Şekil 5**).



Şekil 5. O_2 'in dört elektron ile H_2O 'ya indirgenmesi

O₂ ayrı yörüngelerde iki tane eşleşmemiş elektron taşır ve hücrelerde endojen ve ekzojen kaynaklar sonucu tek elektron kabul ederek reaktif oksijen türlerinin ortaya çıkmasına yol açar (**Tablo 2 ve 3**).

Tablo 2. Reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olan etmenler

Endojen Kaynaklar	Ekzojen Kaynaklar
• Mitokondriyal elektron transport zinciri	• Diyetel faktörler
• Endoplazmik retikulum	• Çevresel faktörler
• Redoks döngüsü	• İlaçlar, ksenobiyotikler
• Araşidonik asit metabolizması	• Zararlı ışınlar (x-ray, U.V.)
• Fagositik hücreler ve endotelial hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar	
• Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz vs.	
• Otooksidasyon reaksiyonları	

Tablo 3. Serbest radikal olan ve radikal olmayan türler

Serbest Radikaller	Radikal Olmayan Türler
• Süperoksit, O ₂ ^{•-}	• Hidrojen peroksit, H ₂ O ₂
• Hidroksil, •OH	• Hipokloröz asit, HOCl
• Peroksil, •RO ₂	• Ozon, O ₃
• Alkoksil, •RO	• Singlet oksijen, O
• Hidroperoksit, •HO ₂	• Peroksinitrit, ONOO
• Nitrik oksit, •NO	• Hidroperoksid, L(R)OOH

Süperoksit radikali (O₂^{•-}), tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Bu radikal hem oksitleyici hem de indirgeyici özelliğe sahiptir. En önemli kaynağı elektron transport zinciridir; NADPH oksidaz, endotelial nitrik oksit sentaz, ksantin oksidaz ve sitokrom P450 ise diğer O₂^{•-} kaynaklarıdır. O₂^{•-} bir serbest radikal olmasına karşın çok reaktif değildir. Asıl önemi, hidrojen peroksit (H₂O₂) kaynağı olması ve geçiş metallerini indirgeyebilmesidir.

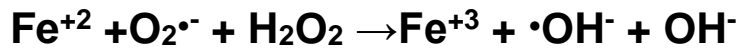
Lipofilik özelliği nedeniyle yarı ömrü uzundur, bu özelliğinden dolayı uzak bölgelere diffüze olabilmektedir (68).

Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması ya da $O_2^{\bullet-}$ 'in bir elektron alması sonucu peroksit molekülü meydana gelir. Peroksit molekülü iki hidrojen atomuyla birleşerek H_2O_2 'i meydana getirir (67). Ayrıca, $O_2^{\bullet-}$ spontan olarak ya da süperoksit dismutaz enziminin katalizi ile H_2O_2 'e dönüşmektedir. H_2O_2 eşleşmemiş elektronu bulunmadığı için aslında bir radikal değildir ama ortamda ağır metallerin etkisiyle hidroksil radikalini ($\bullet OH$) oluşturur. H_2O_2 membranlardan kolayca geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır.

$\bullet OH$, kimyasal olarak yüksek reaktif yapısı ve suda çözünebilir olması sebebiyle biyolojik sistemlerde en güçlü serbest radikaldir. H_2O_2 'in geçiş metalleri ile indirgenmesi sonucu $\bullet OH$ oluşur, enzimatik olmayan bu reaksiyona Fenton reaksiyonu adı verilmektedir (**Şekil 6**). $\bullet OH$ radikalinin diğer bir oluşum mekanizması da $O_2^{\bullet-}$ 'in H_2O_2 ya da ağır metallerle reaksiyonlarıdır, enzimatik olmayan bu reaksiyonlara Haber-Weiss reaksiyonları adı verilmektedir (**Şekil 7**) (69). Suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da $\bullet OH$ oluşur. Yarılanma ömrü 10^{-9} saniyeden daha kısadır, oluştuğu yerde büyük hasara sebep olur. Başlıca tepkimeleri elektron transfer tepkimeleri, hidrojen çıkarma tepkimeleri ve bunu takiben katılma tepkimeleridir. $\bullet OH$ 'in seçtiği başlıca hedef noktalar elektronca zengin bileşiklerdir; nükleik asitler, proteinler ve lipidlerde başlatılan tepkimelerde binlerce farklı ara ürün oluşturabilir (67).



Şekil 6. Fenton reaksiyonu

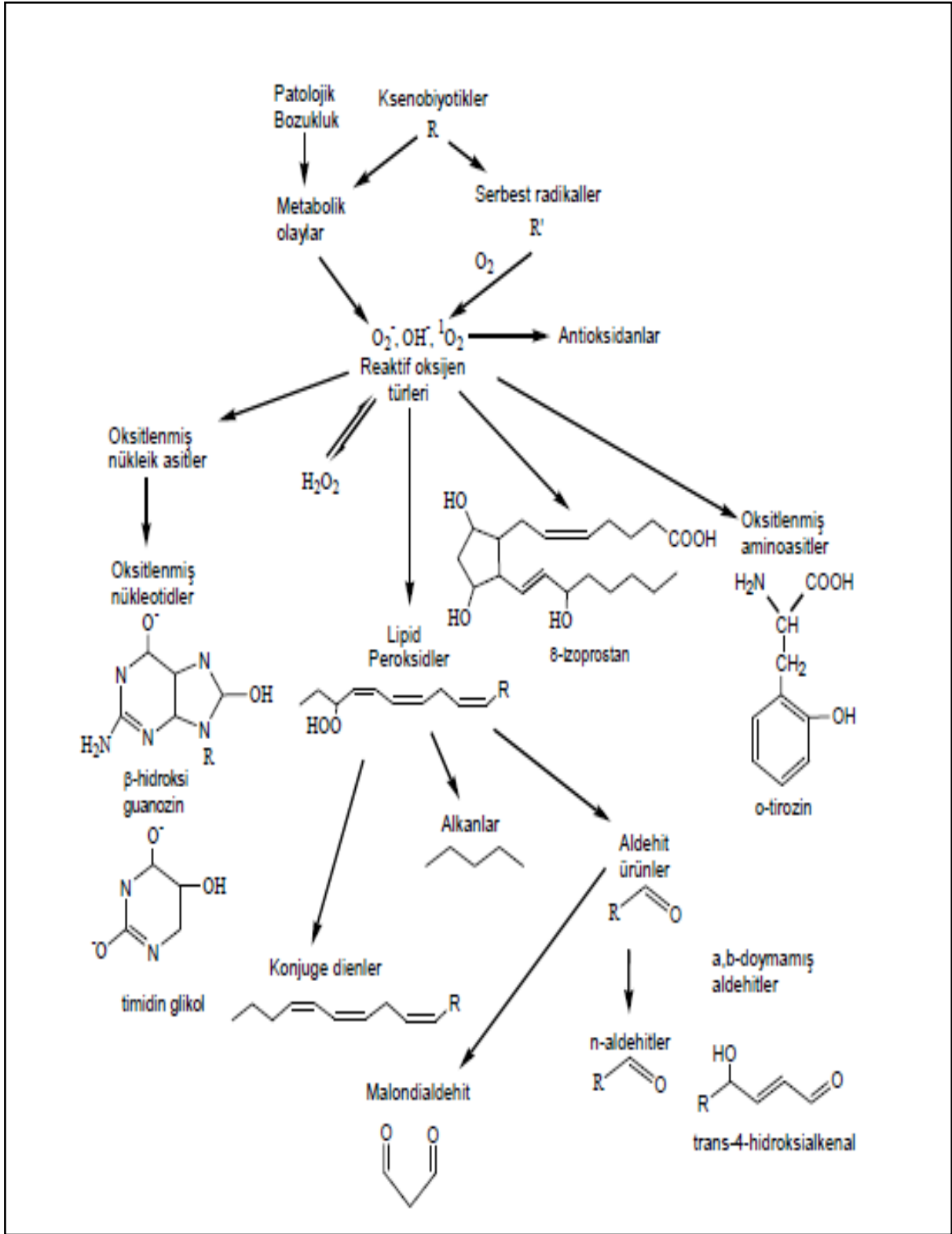


Şekil 7. Haber-Weiss reaksiyonu

Singlet oksijen (O), ortaklanmamış elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. Oksijenin eşleşmemiş elektronlarından birinin verilen enerji sonucu bulunduğu orbitalden başka bir orbitale veya kendi spin yönünün tersine yer değiştirmesi sonucunda oluşur. İn-vivo ortamda sitokrom P450, endoperoksit sentetaz ve myeloperoksidaz gibi enzimlerin reaksiyonlarıyla oluştuğu gibi iyonize radyasyonla da oluşabilir (67).

Serbest oksijen radikallerinin etkisi sonucu karbon merkezli radikaller (R•), peroksil - radikalleri (ROO•), alkoksil (alkoksi) radikalleri (RO•), thiyl radikalleri (RS•) gibi önemli serbest radikaller de meydana gelirler. Bunlardan özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinden meydana gelen peroksil radikali yarı ömrü uzun olan önemli bir radikaldir.

Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek amacıyla kullanılan birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri olarak adlandırılırlar (68,69). Ancak, çeşitli nedenlerle ROT üretiminin artması ve antioksidan mekanizmaların yetersiz kalması sonucu oksidatif stres adı verilen bir dizi patolojik olay meydana gelir. Oksidatif stres oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasıdır (70). Oksidan-antioksidan dengenin bozulduğu durumlarda reaktif oksijen türleri, DNA, lipid ve protein gibi hücrel makromoleküllerde oksidatif hasara yol açar. Özellikle DNA ve lipid kimyasal yapıları nedeniyle serbest radikallerin reaksiyonlarına karşı daha duyarlıdır. Ayrıca, organizmada yaygın olarak bulunmaları nedeniyle DNA ve lipid hasar ürünlerinin biyolojik sıvılardaki ölçümü organizmanın toplam oksidatif hasarını duyarlı bir şekilde yansıtmaktadır. Bu bilgilere dayanarak çalışmamızda oksidatif DNA nükleozid hasarının başlıca göstergeleri, 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve lipid peroksidasyonu altın standardı olan 8-iso-PGF_{2α} düzeylerini inceledik.

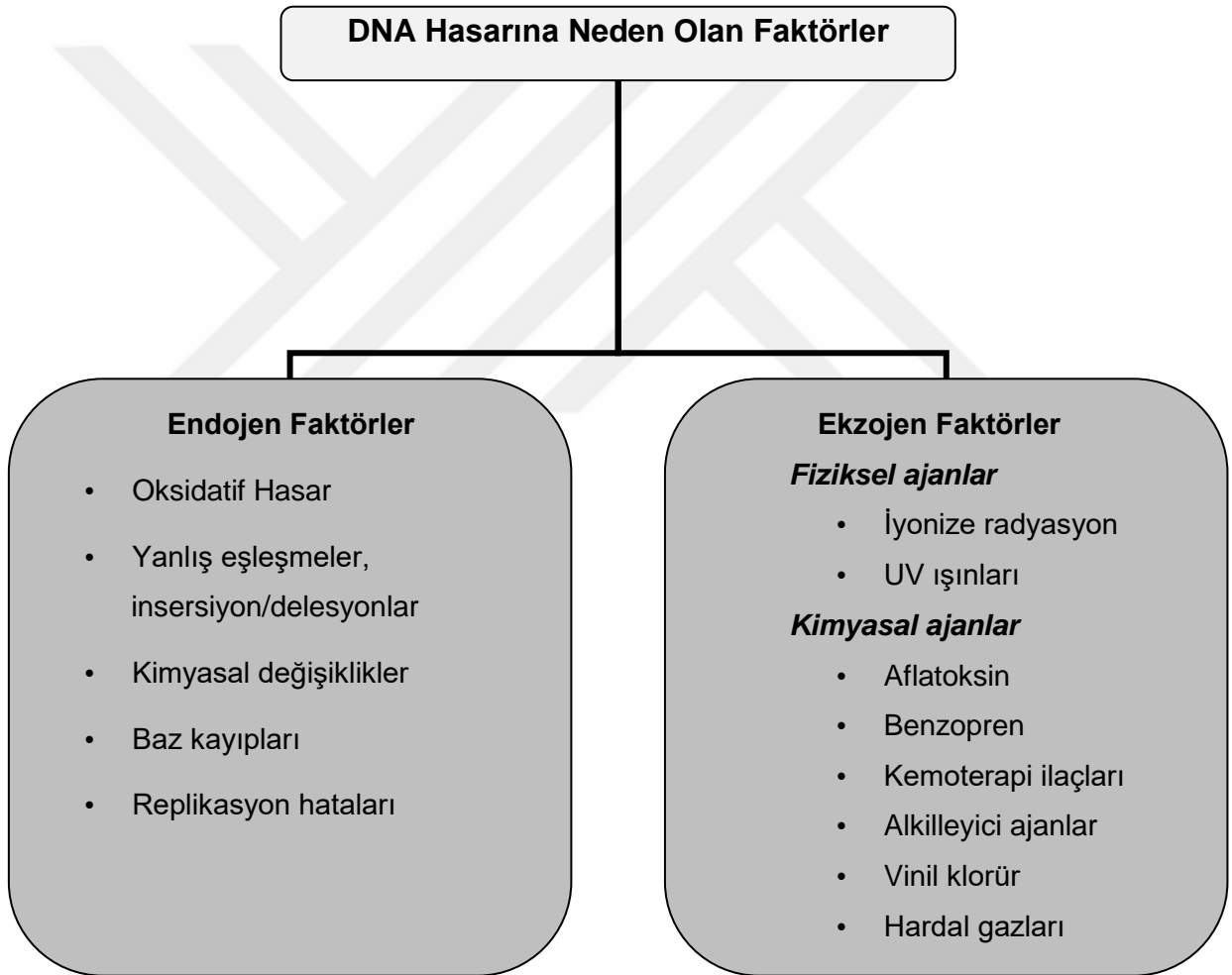


Şekil 8. Serbest radikallerin neden olduğu makromolekül hasarları

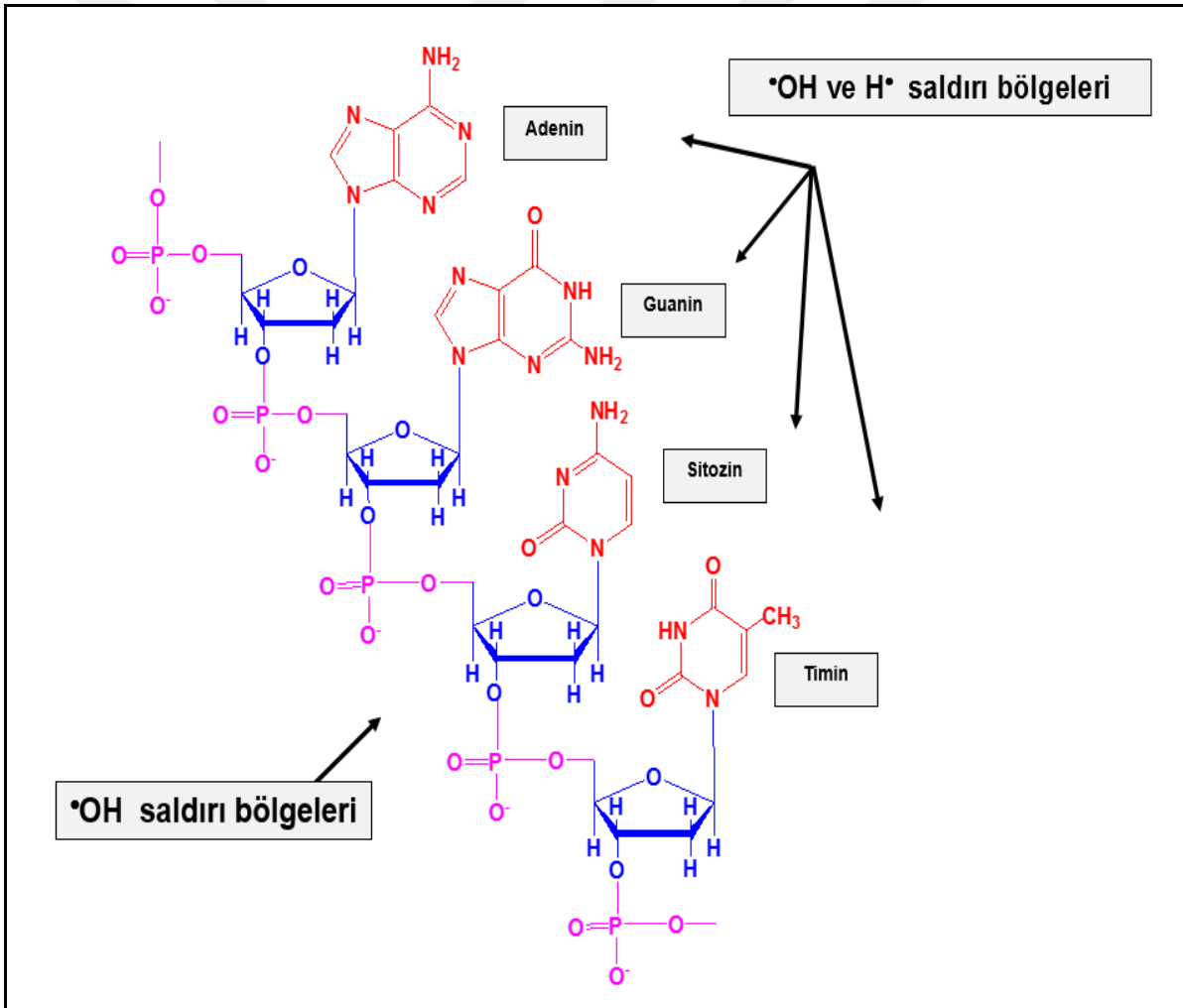
2.8.1. Oksidatif DNA Hasarı

Canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülü hücresel metabolik olaylar veya çevresel faktörlerin etkisiyle sürekli hasara maruz kalmaktadır. Bu etkenler, DNA'nın yapısını ve diğer nesillere aktarılan genetik bilgiyi değiştirebilir. Genetik materyalin bütünlüğünde endojen veya ekzojen faktörlerin etkisiyle meydana gelen tüm bu değişiklikler DNA hasarı olarak adlandırılmaktadır (71). DNA hasarına neden olan faktörler **Tablo 4**'te gösterilmiştir.

Tablo 4. DNA hasarına neden olan endojen ve ekzojen faktörler



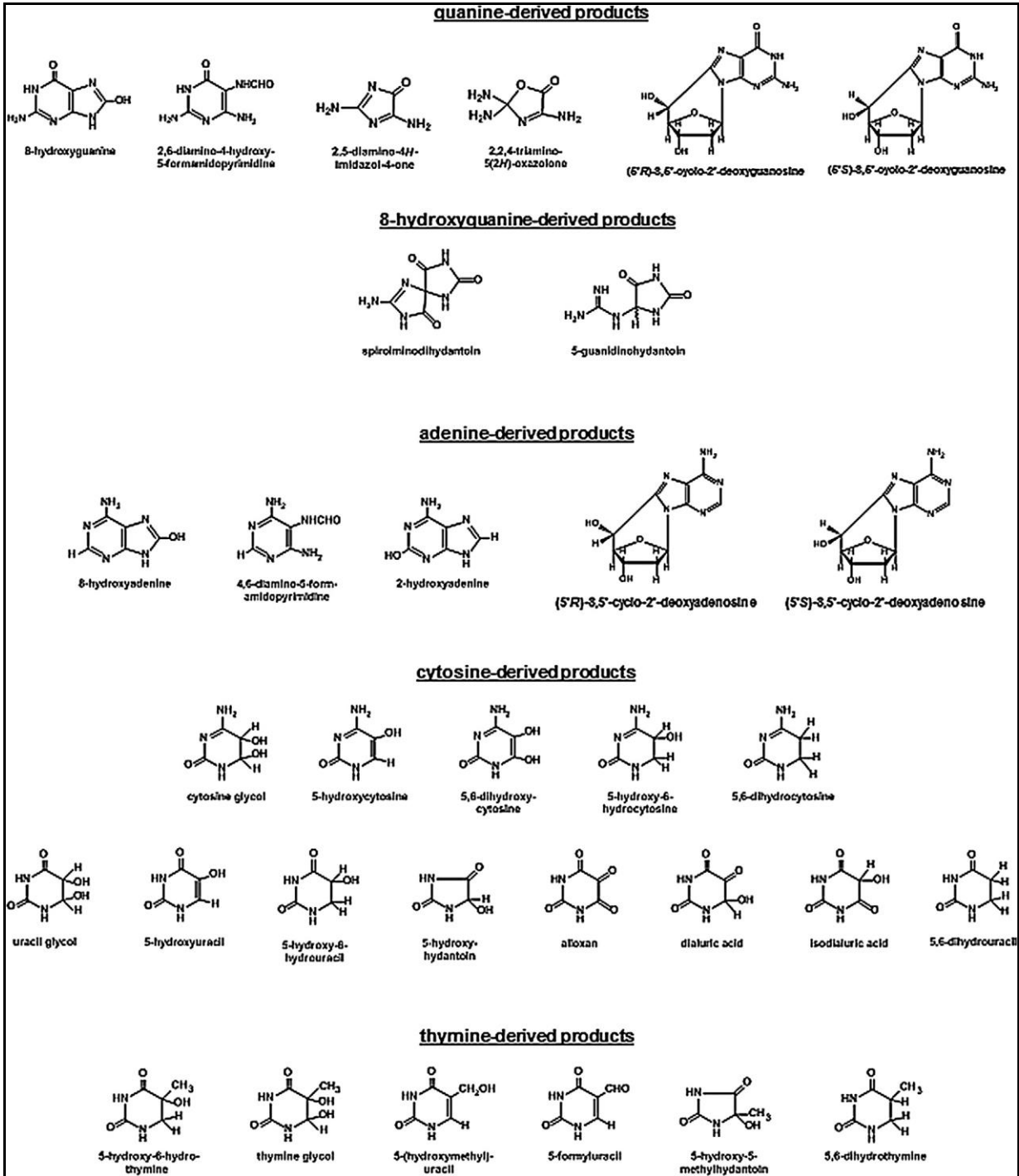
Aerobik organizmalar metabolik olaylar ve diğler faktörler nedeniyle sürekli serbest radikal ataklarına maruz kalmaktadır. Oksidatif DNA hasarı endojen faktörlerin başında gelen ve hastalıkların patolojik süreçlerinde rol oynayan mutajenik ve sitotoksik hasar ürünlerinin ortaya çıkmasına yol açan bir DNA hasar türüdür (72,73). Başta hidroksil radikali olmak üzere reaktif oksijen türleri, aromatik halkalara katılma eğilimleri nedeniyle DNA yapısında yer alan pürin ve pirimidinler ile reaksiyona girerek, çift bağların eklenmesi ve metil grubundan ya da deoksiriboz şekerin C-H bağlarından H atomu çıkartılmasına neden olmaktadır. Bu radikaller elektrofilik yapıları nedeniyle yüksek elektron yoğunluğuna sahip bölgelere eklenirler, özellikle adenin ve guanin bazları bu reaksiyonlarda önem taşımaktadır (**Şekil 9**).



Şekil 9. DNA'da ROT ataklarına duyarlı bölgeler

DNA yapısında gerçekleşen bu reaksiyonlar çeşitli oksidatif hasar ürünlerinin oluşumuna yol açar (7). DNA yapısında oluşan başlıca oksidatif hasar ürünleri aşağıda sınıflandırılmıştır:

- I. **DNA nükleozid hasarı:** DNA yapısında nükleozidlerin serbest radikallerle etkileşimi sonucu ortaya çıkan hasar ürünleri oksidatif nükleozid hasarı olarak tanımlanmaktadır.
- II. **DNA baz hasarı:** Serbest radikallerin DNA bazlarında oluşturduğu hasar ürünleri DNA baz hasarı olarak adlandırılmaktadır.
- III. **DNA şeker hasarı:** Hidroksil radikali DNA'daki şeker artıklarındaki karbon atomlarından H atomunu uzaklaştırarak C merkezli şeker modifikasyonlarının oluşumuna neden olur.
- IV. **Tandem lezyonlar (8-5'-siklopürin-2'-deoksinüklozidler):** Hidroksil radikalinin hem baz hem de şeker ile reaksiyonu girmesi sonucu oluşan halkasal yapıda hasar ürünleridir.
- V. **DNA protein çapraz bağları:** DNA bazının proteinin aromatik aminoasidine eklenmesiyle kovalent bağlı DNA-protein çapraz bağları oluşur.
- VI. **Abazik bölgeler:** DNA yapısında bulunan modifiye bazların glikozidik bağlarının enzim aracılığı ile ya da enzim olmaksızın kopması ve o bölgede boşluk oluşturmasıdır.
- VII. **Tek ve çift DNA zincir kırıkları:** Zincir kırıkları, DNA onarımı sırasında nükleaz aktivitesi ile oluşabilir, bu nedenle her zaman oksidatif DNA hasarını göstermez (**Şekil 10**).

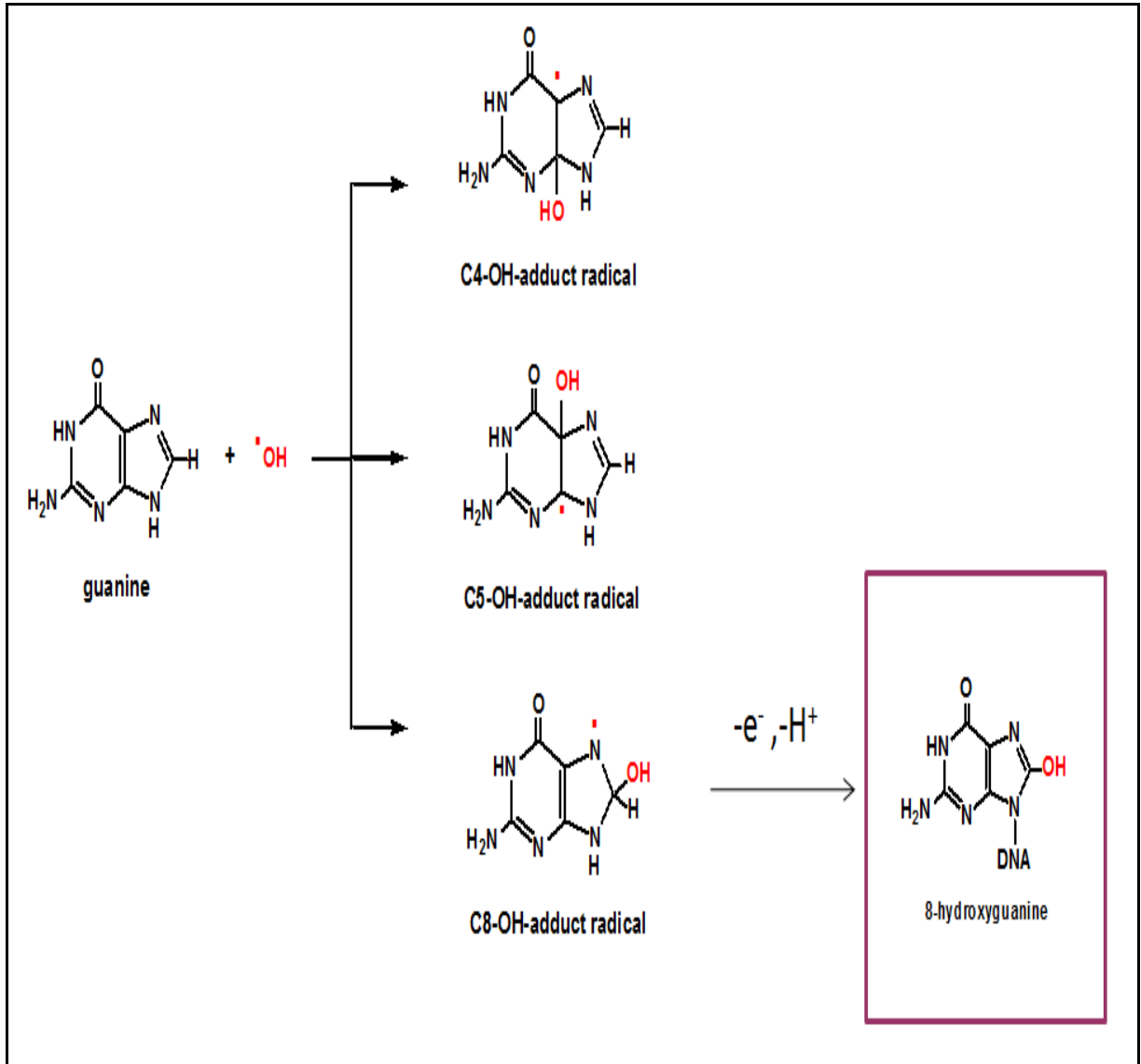


Şekil 10. DNA'da oksidatif hasar ürünleri

Tüm memeli hücrelerinde DNA hasarına karşı korunmak ve genetik materyalin evrim süreçleri boyunca nesillere değişmeden aktarılmasını sağlamak amacıyla DNA onarım mekanizmaları bulunmaktadır (74). Onarım süreci hasarın tanınması, hasarlı kısmın uzaklaştırılması ve boşluğun doldurulması şeklinde üç aşamada gerçekleşir. Onarım mekanizmaları ile tamir edilen hasarlı ürünler idrar ile atılmaktadır, bu nedenle oksidatif DNA hasar ürünlerinin idrar düzeyleri tüm vücuttaki belirli bir süredeki toplam oksidatif hasarı yansıtmaktadır (21,75,76). Normal koşullarda DNA hasarı ve onarımı arasındaki denge nedeniyle, sağlıklı bireylerde çok düşük düzeylerde hasar saptanmaktadır. DNA hasarı ve onarım mekanizmalarındaki bozukluklar ile T2DM, kanser, yaşlanma ve genetik hastalıklar arasında nedensel bir ilişkinin varlığı birçok deneysel ve epidemiyolojik veri ile gösterilmiştir (77,78). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında oksidatif DNA nükleozid hasarının başlıca göstergeleri olan 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA düzeylerini araştırdık. Çalışmamızın bu konuda literatürde önemli bir eksikliği tamamlayacağını düşünmekteyiz. Prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında oluşan oksidatif DNA hasarının erken tanımlanması hastalığın gelişimi açısından önemli bilgiler sağlayacaktır.

2.8.1.1. 8-hidroksi-deoksiguanozin (8-OH-dG)

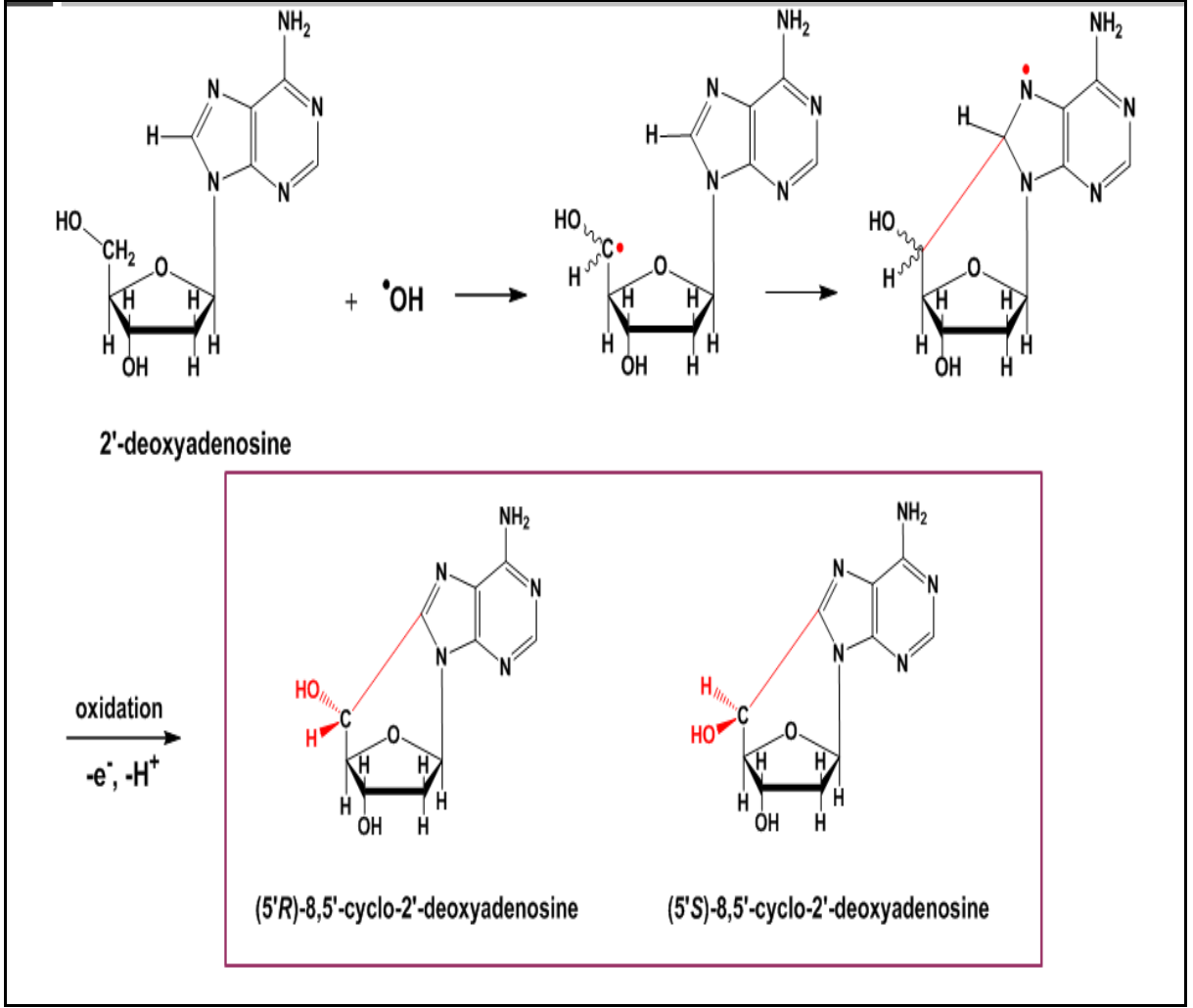
Okside bir nükleozid olan 8-OH-dG, nükleer ve mitokondriyal DNA'da en sık çalışılan ve tespit edilen hasar ürünüdür; •OH'in guaninin 8. karbon atomu ile reaksiyonu sonucunda oluşmaktadır (**Şekil 11**). Yüksek mutajenik etkisi olan bu hasar ürünü adenin ile yanlış eşleşerek G-T transversiyonuna neden olur (79). DNA'daki diğer hasar ürünlerinden farklı olarak hücre membranlarından geçerek farklı bölgelerdeki moleküllerin yapılarında değişikliğe neden olabilir. Bu nedenle diyabet, metabolik sendrom, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, ateroskleroz gibi hastalıkların patolojik süreçlerinde rol oynadığı belirlenmiştir (18,23,80,81). İdrarda ölçülebilmesi ve vücuttaki toplam oksidatif DNA hasarını yansıtmaması nedeniyle duyarlı bir in-vivo oksidatif stres biyobelirtecidir (8,9).



Şekil 11. 8-OH-dG oluşum mekanizması

2.8.1.2. 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozinler (R-cdA ve S-cdA)

Son yıllarda diğer nükleozid hasar parametresi olan 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozininin, fizyolojik koşullarda düşük düzeylerde bulunması ve kimyasal stabilitesi nedeniyle birçok hastalığın belirlenmesinde iyi bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmektedir (10). •OH radikalının DNA'daki şeker molekülünün 5. karbon atomundan H atomunu çıkarması ve 5. karbonun pürin nükleozidindeki 8. karbon ile halkasal yapı oluşturmasının ardından oksidasyonu ile 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin R- ve S-diastromerleri (R-cdA ve S-cdA) oluşmaktadır (**Şekil 12**). Aynı anda hem baz hem de şekerde hasar oluşması nedeniyle özgün bir yapı meydana gelir ve bu yapı tandem lezyon olarak adlandırılır. Bu tandem lezyonlar, DNA polimerazın ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına engel olur ve transkripsiyon kapasitesini azaltarak gen ekspresyonunu düşürür (82–85). 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin diğer bir önemi, deoksiriboz şekerde oluşan şekil değişikliğinin DNA'nın çift sarmal yapısını bozmasıdır (86). Bu özgün yapısı nedeniyle 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin araştırılması ve patolojik koşullardaki rolünün incelenmesi gerekmektedir.



Şekil 12. 8,5'-siklopürin-2'-deoksinükleozidlerin oluşum mekanizması

2.8.1.3. Oksidatif DNA Nükleozid Hasarının Ölçülmesi

Oksidatif DNA hasarının belirlenmesi için hasarlı DNA ürünleri immunohistokimya, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tek hücre jel elektroforezi (comet assay), yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC) ve kütle spektrometrik yöntemlerle ölçülmektedir. Bu hasar ürünlerinin vücut sıvılarında güvenilir analitik yöntemlerle doğru olarak değerlendirilmesi oksidatif DNA hasarının, onarımının ve hastalıklardaki rolünün anlaşılması açısından önemli bilgiler sağlamaktadır. İdrar ile atılan hasarlı DNA ürünlerinin ölçümünde düşük düzeylerde bulunan ürünlerin saptanması ve kantitasyonları için yüksek hassasiyet ve özgüllüğe

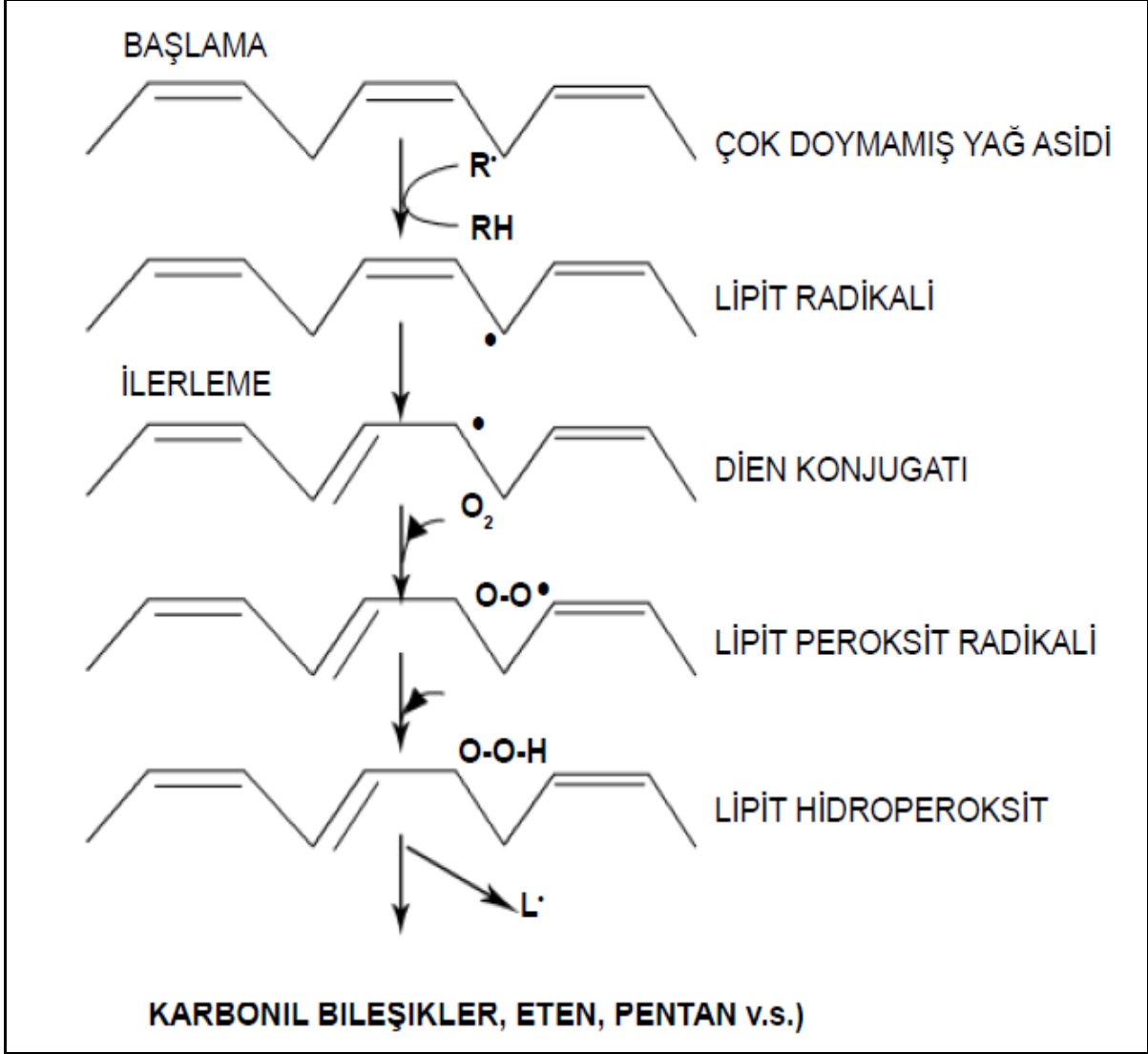
sahip yöntemlerin kullanılması gerektiği belirtilmiştir (7). Bu nedenle bu ürünlerin ölçümünde gaz kromatografi-kütle spektrometri (GC-MS), sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) ve sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri (LC-MS/MS) gibi kütle spektrometrik yöntemler tercih edilmektedir. DNA hasar ürünlerinin belirlenmesinde Avrupa Oksidatif DNA Hasarı Standartlar Komitesi (ESCOOD) tarafından referans yöntem olarak kabul edilen LC-MS/MS SID-MRM yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle diğer yöntemlerin yerini almaktadır (7,87). Biz de çalışmamızda olgu ve kontrol grubuna ait idrar örneklerinde oksidatif DNA nükleozid hasarının kantitasyonunu LC-MS/MS SID-MRM yöntemiyle gerçekleştirdik. Oksidatif DNA hasarının aynı anda birden fazla hasar ürünü aracılığı ile belirlenmesi bu yöntemin en önemli üstünlüğüdür ve tek ürün ölçümüne kıyasla daha güvenilir ve kesin sonuçlar elde edilmesini sağlar. LC-MS/MS SID-MRM yönteminin diğer bir üstünlüğü de türevlendirme gerektirmeyen örnek hazırlık işlemleridir, çünkü türevlendirme yalancı oksidasyona neden olabilir (88). Ayrıca çalışmamızda DNA hasar ürünlerinin kantitasyonunda kan yerine idrar örneklerinin kullanılması ve idrar örneklerinin non-invaziv olarak toplanması geniş çaplı klinik çalışmalar için büyük bir avantajdır.

2.8.2. Lipid Peroksidasyonu

Hücre içi ve hücre dışı biyomembran fosfolipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitleri konjuge çift bağlarının varlığı nedeniyle ROT'nin oluşturduğu oksidatif ataklara karşı duyarlıdır. Membran lipidlerinin oksidatif hasarı lipid peroksidasyonu (LP) olarak tanımlanır. LP'nun bazı biyolojik sonuçları; membran akışkanlığının azalması ve bütünlüğünün bozulması, H⁺ ve diğer iyonlara karşı membran geçirgenliğinin artması, hücre içeriği ile lizozomal hidrolitik enzimlerin dışarıya salınması, hücre içi sinyal iletiminin inhibisyonu, DNA ve protein hasarına neden olmasıdır (14).

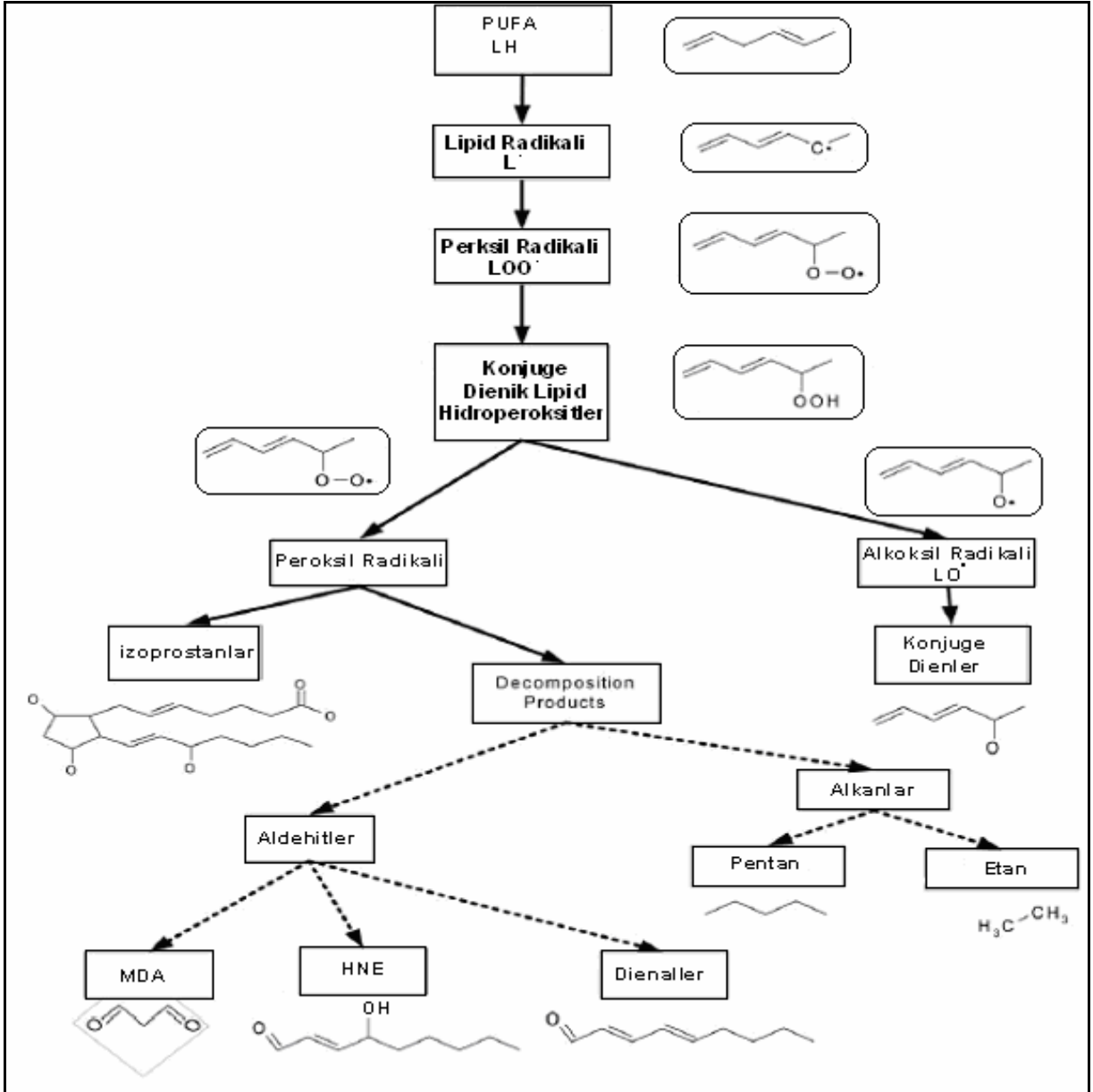
Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar. Lipid radikali (L[•]) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar, moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO[•]) oluşur. LOO[•], membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek, yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken

kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlerine (LOOH) dönüştürürler ve böylece olay zincirleme reaksiyonlarla devam eder (**Şekil 13**) (89).



Şekil 13. Lipid peroksidasyon basamakları

Çoklu doymamış yağ asitlerinin ve kolesterolün serbest ve ester formları in-vivo lipid peroksidasyonu için iyi bir substrat olarak bilinmektedir. Bunlar enzimatik veya non-enzimatik reaksiyonlarla okside olarak çok geniş yelpazede hasar ürünlerinin oluşumuna yol açmaktadır (**Şekil 14**).



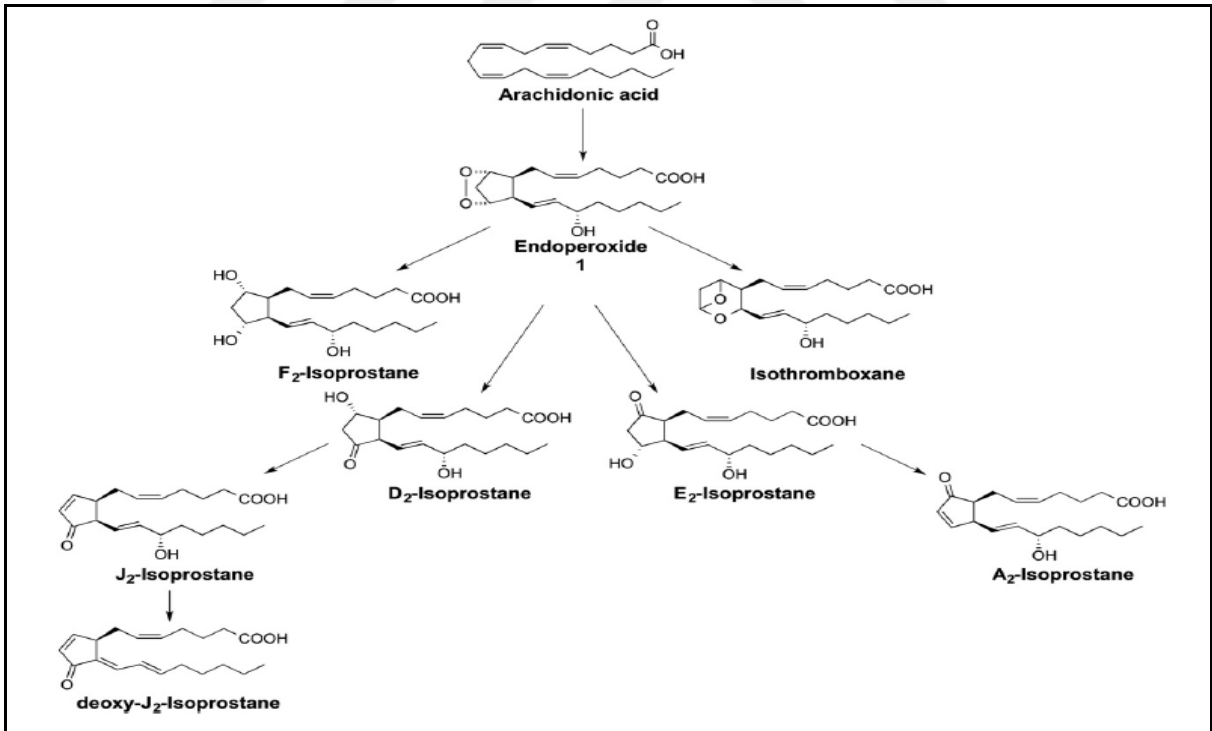
Şekil 14. Lipid peroksidasyon ürünleri

Tiyobarbitürik asit reaktif bileşikleri (TBARS), malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) otuz yıldan daha uzun bir süredir LP'nun biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Günümüzde halen MDA, lipid peroksidasyonunun geçerli bir biyobelirteçidir ve ölçümü spektrofotometrik, spektrofotometrik veya kromatografik yöntemlerle yapılabilmektedir. MDA'nın kararsız yapısı ve diğer moleküllerle çapraz reaksiyonları nedeniyle özgüllüğü ve duyarlılığı düşük bir LP biyobelirteci olduğu bilinmektedir (90). Bu nedenle MDA yerine daha stabil ve özgün LP biyobelirteçlerine

ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda izoprostanlar stabil kimyasal yapıları ve diyetel lipid miktarından etkilenmemeleri nedeniyle LP'nun güvenilir biyobelirteçleri olarak kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda endojen lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde 'altın standart' olarak kullanılabileceği onaylanmış olan 8-izoprostanı inceledik (13).

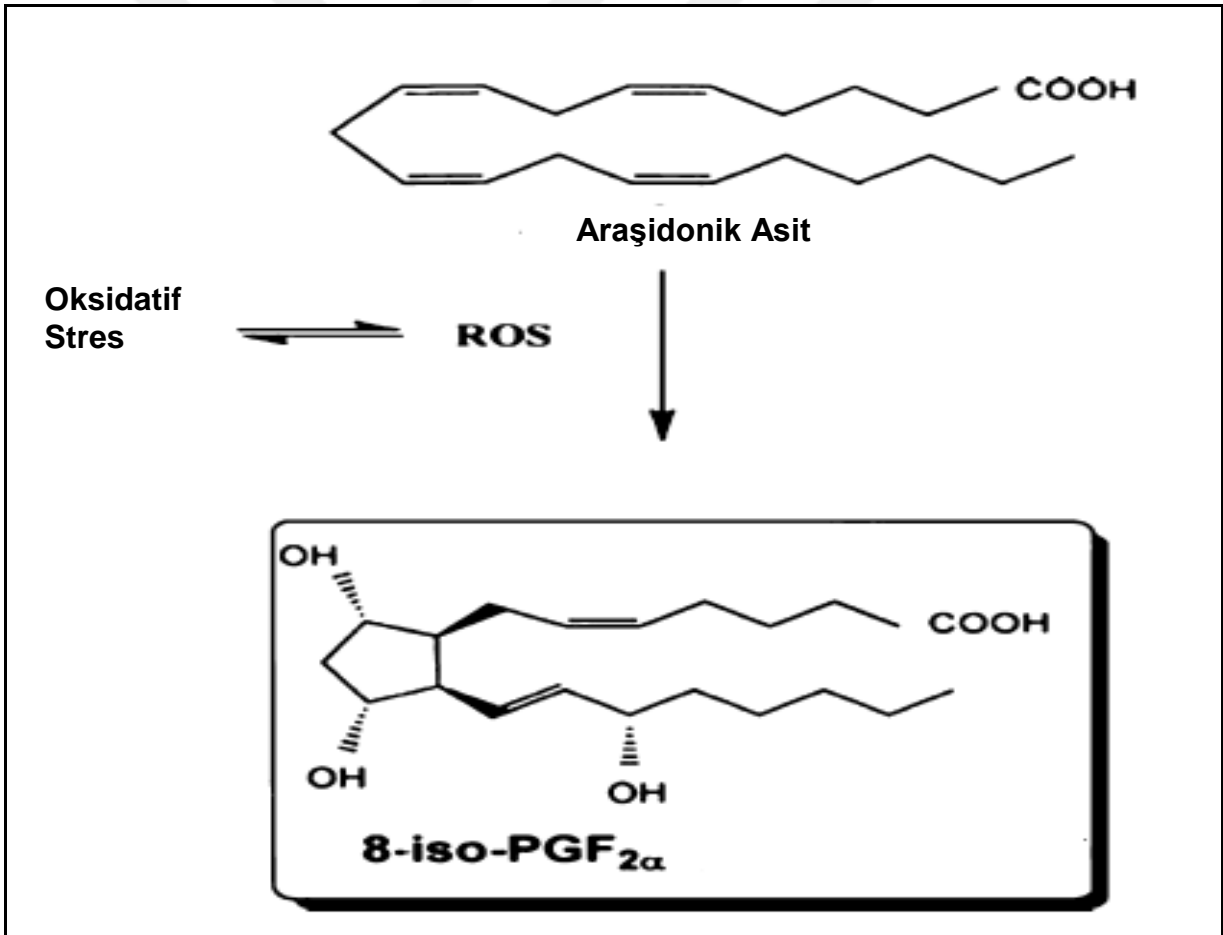
2.8.2.1. 8-izoprostan (8-iso-PGF_{2α})

İzoprostanlar, serbest radikallerin katalizlediği non-enzimatik reaksiyonlarla esterleşmiş araşidonik asitten in-vivo olarak sentezlenen prostaglandin benzeri bileşiklerdir. İlk olarak fosfolipidlerden ester halinde oluşturulur ve daha sonra fosfolipazlar tarafından serbest hale getirilerek salınırlar. Vücutta metabolize olduktan sonra idrar ile atılırlar. Araşidonik asitin oksidasyonu sonucu sentezlenen ve hidroksilin bulunduğu yan zincirin karbon sayılarına göre sınıflandırılan altı grup izoprostan ve bu gruptan altmış dört farklı izoprostan izomeri oluşur (**Şekil 15**).



Şekil 15. Non-enzimatik yolla oluşan lipid peroksidasyon ürünleri

F₂ izoprostanlar, biyolojik sıvılarda ester halinde ve serbest halde bulunmaktadır. İnsanlardaki F₂-IsoP düzeyleri, oksidatif stresin fizyolojik düzeylerinin en güvenilir göstergelerinden biridir (76). F₂ izoprostan ailesinin bir üyesi olan 8-iso-PGF_{2α} diğer izoprostanlar arasında vücutta en fazla bulunan izoprostandır (**Şekil 16**). 8-iso-PGF_{2α} National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS) tarafından gerçekleştirilen Oksidatif Stres Biyobelirteçleri Çalışmasında (BOSS) endojen lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde 'altın standart' olarak tanımlanmıştır (13–16). Çeşitli biyolojik sıvılarda (plazma, idrar, sinovial sıvı, bronkoalveoler sıvı, safra, lenf sıvısı, organlardan mikrodializ ile alınan sıvılar, amniyon sıvısı, sperm ve perikardiyal sıvı) ve dokularda (akciğer, karaciğer, böbrek, kalp, vasküler doku, yağ dokusu, kas, beyin ve mide vb.) saptanabilir düzeylerde bulunmaktadır (91).



Şekil 16. 8-iso-PGF_{2α} oluşum mekanizması

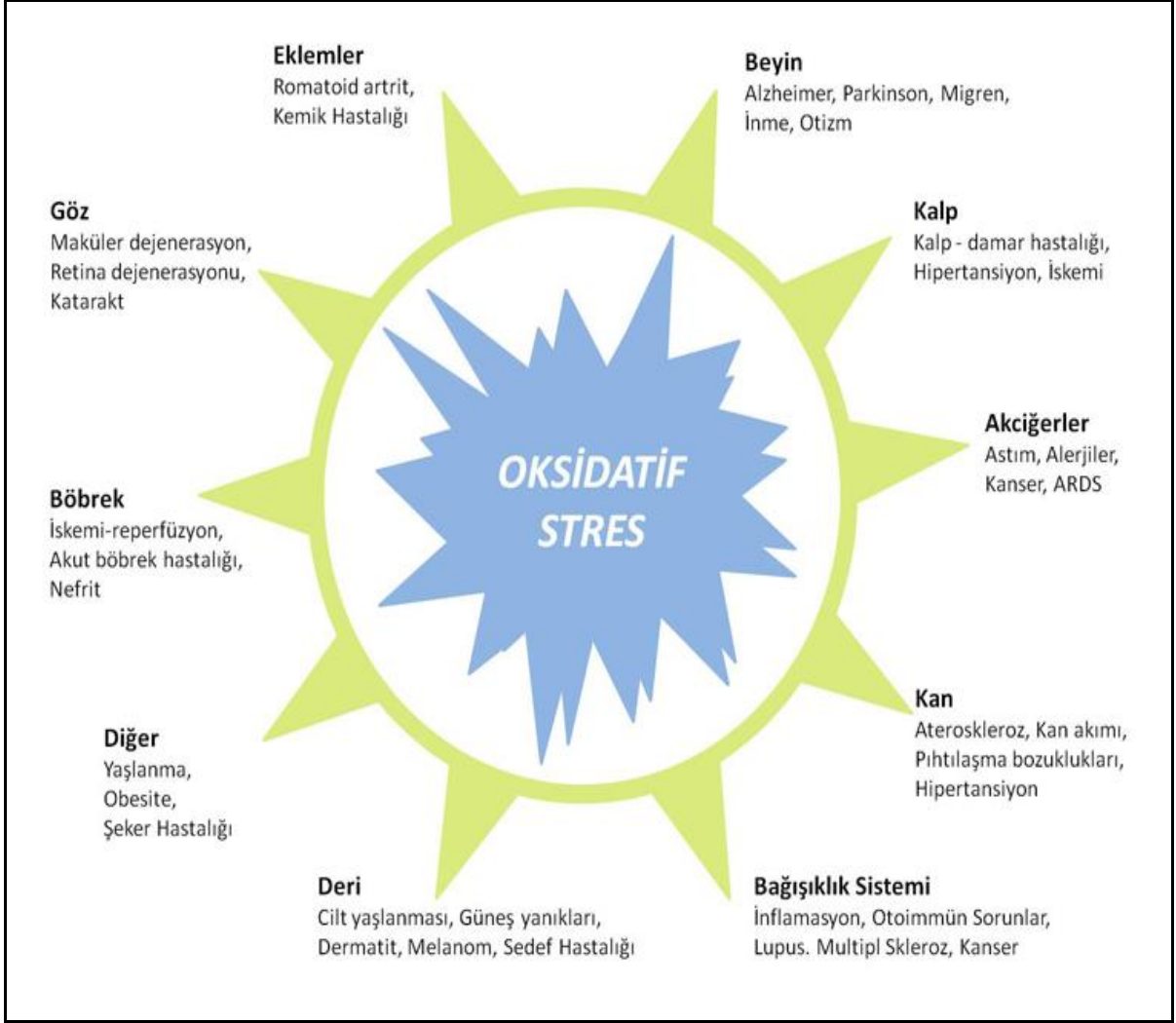
2.8.2.2. İzoprostanın Ölçülmesi

8-iso-PGF_{2α}'ın biyolojik örneklerde ölçümü için immunohistokimyasal yöntemler, ELISA, radioimmunoassay (RIA), HPLC ve kütle spektrometrik yöntemler kullanılmaktadır. İzoprostanların prostaglandin benzeri yapıları ve diğer izomerleri nedeniyle çapraz reaksiyonlar gözlenmektedir (16). Bu nedenle izoprostanların ölçümünde özgüllüğü ve hassasiyeti daha yüksek kütle spektrometrik yöntemler tercih edilmelidir. Literatürde 8-iso-PGF_{2α} ölçümü yapılan çalışmaların birçoğunda İmmunohistokimya, ELISA ve RIA gibi yöntemler kullanılmış, ancak çelişkili ve güvenilir olmayan sonuçlar elde edilmiştir (92). 2009-2010 yıllarından itibaren 8-iso-PGF_{2α}'ın ölçümünde kütle spektrometrik yöntemler kullanılmaya başlanmıştır.

Yapılan çalışmaların çoğunda 8-iso-PGF_{2α} idrar ya da plazmada ölçülmüştür, ancak kesin ve doğru sonuçlar için idrar örneklerinin tercih edilmesi gerektiği belirtilmiştir (93,94). Çalışmamızda 8-iso-PGF_{2α} olgu ve kontrol grubuna ait 24 saatlik idrar örneklerinde en güvenilir yöntem olan LC-MS/MS SID-MRM ile ölçülmüştür.

2.9. Oksidatif Stresin T2DM ile İlişkisi

Oksidatif stres T2DM, hipertansiyon, obezite, iskemik hastalıklar, Alzheimer, parkinson ve amyotrofik lateral skleroz gibi birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (**Şekil 17**). Artan reaktif oksijen türleri DNA, lipid, protein ve karbohidratları hedef alarak biyomoleküllerde hasara neden olur. Bu oksidatif hasar ürünlerinin sistemik hücresel hasarı erkenden yansıtabilecek biyobelirteçler olarak araştırılması ve ölçülmesi hastalıkların tanı, izlem ve tedavisinde yararlı bilgiler sağlayabilir (95,96).



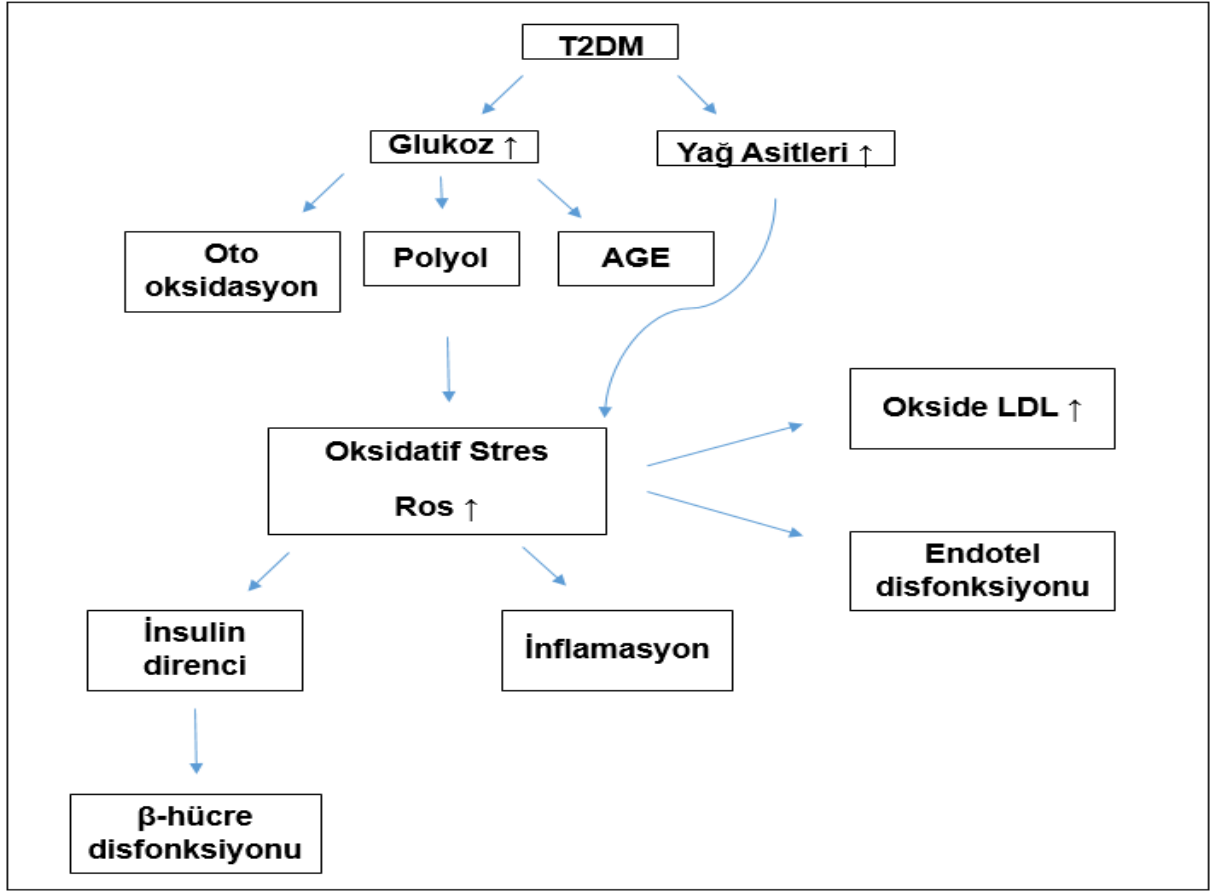
Şekil 17. Oksidatif stres ile ilişkili olan patolojik durumlar

T2DM gelişiminde oksidatif strese neden olan mekanizmalar yapılan birçok çalışma ile vurgulanmıştır. Bu çalışmalarda enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stresin artışı, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan enzimlerin aktivitesini azalttığı belirlenmiştir (97,98). T2DM'in patogenezinde ROT'un en önemli kaynakları, mitokondriyal elektron taşıma zinciri, NADPH oksidaz, endotelial nitrik oksit sentaz (eNOS) ve sitokrom p450'dir (99). Özellikle hastalık süresince artan glukoz düzeylerinin mitokondride ROT oluşumunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu önemli bulgu 2001 yılında Brownlee ve arkadaşları tarafından "unifying hipotezi" olarak adlandırılmıştır (100). "Unifying hipotezi", mitokondriyal

elektron transport zincirinde $O_2^{\bullet-}$ üretiminin artarak diğer metabolik yolların aktivasyonuna neden olmasıdır. Bu olayda en önemli rolü oynayan enzim PARP-1 dir. PARP-1 DNA onarımında görev alan bir proteindir, oksidatif DNA hasarına cevaben düzeyleri artmaktadır ve glikolitik bir enzim olan GAPDH'ın aktivitesini poly-ADP ribozilasyon ile inhibe ederek glikoliz ürünlerinin birikimine neden olmaktadır (101).

Unifying hipotezi ile birlikte T2DM döneminde oksidatif stresin artışını açıklayan farklı mekanizmalar da belirlenmiştir. Bu mekanizmaları prediyabet ve T2DM'da oksidatif stresin olası nedenleri olarak aşağıda sıralayabiliriz:

- I. Hiperglisemik koşullarda endotel ve vasküler hücrelerin ROT üretiminin artması
- II. Glukozun oto-oksidasyonu ve polyol yolağına yönelmesi
- III. İleri glikasyon son ürünlerinin (AGE) artışı
- IV. Protein kinaz C ve NADH oksidaz aktivasyonu
- V. Yağ asitleri ve lipid peroksidlerinin artışı
- VI. Glutasyon ve vitamin E gibi antioksidan düzeylerinin azalması ve süperoksit dismutaz ve katalaz gibi bazı antioksidan enzimlerin fonksiyonlarının bozulması
- VII. Protein kinaz C, c-Jun-N-terminal kinaz, mitojen-aktifli protein kinaz (MAPK), forkhead box O (FOXO) ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) gibi bazı biyokimyasal yollarda meydana gelen değişiklikler sonucu endotel disfonksiyonu ve süperoksit üretiminin artması (**Şekil 18**) (32,100,102–104).



Şekil 18. Prediyabet ve T2DM'da oksidatif stresin olası nedenleri

Oksidatif stres T2DM gelişimi ve sürecinde merkezi bir rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda oksidatif stresin, β -hücre disfonksiyonu ve insülin direncinin yanı sıra diyabetik komplikasyonların gelişiminde de etkili olduğu belirlenmiştir (21,105). β -hücre disfonksiyonu ve insülin direnci, kan glukozu T2DM tanısı konacak düzeylere ulaşmadan çok önce prediyabet döneminde ortaya çıkmaktadır (106). Oluşan oksidatif hasar hastalığın erken dönemlerinde tanımlanabilirse, T2DM gelişiminin ve diyabetik komplikasyonların önlenmesinde etkili olabilir. Bu nedenle prediyabet ve T2DM'in tanımlanması ve izlenmesi için kullanılacak ve sistemik hücrel hasarı erkenden yansıtabilecek biyobelirteçlere gereksinim duyulmaktadır. Çalışmamızda güvenilir oksidatif biyobelirteçleri olarak 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2 α} düzeyleri prediyabet ve T2DM hastalarının idrar örneklerinde incelenerek sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır.

Literatürde günümüze kadar yapılan çalışmalarda, prediyabet ve T2DM ile oksidatif stres arasındaki ilişkinin çeşitli oksidatif stres biyobelirteçleri ile incelendiği gözlenmektedir. Tip 2 diyabet hastalarının incelendiği çalışmalarda özellikle DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu öne çıkmış ve bu biyobelirteçler farklı yöntemler kullanılarak ölçülmüştür (17–24). Bu çalışmalarda yöntemsel farklılıklar ve güvenilirliği kanıtlanmamış biyobelirteçlerin kullanılması nedeniyle çelişkili sonuçlar elde edilmiştir. Hastalığın başlangıç ve geri dönüşümlü aşamasını kapsayan prediyabet döneminde ise oksidatif stresin incelendiği ve oksidatif hasar düzeylerinin referans yöntemler kullanılmaksızın araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır (4,25,107).

Oksidatif DNA hasarının biyobelirteçleri olarak yaygın olarak ölçülen biyobelirteçler DNA nükleozid hasarı, tandem lezyonlar, DNA baz hasarı, zincir kırıklarıdır. Bu biyobelirteçlerden yalnızca 8-OH-dG oksidatif DNA hasarının güvenilir bir biyobelirteçidir ve diğer biyobelirteçlerle birlikte ölçüldüğü zaman kesin sonuçlar elde edilebilmektedir. Prediyabet ya da T2DM hastalarında 8-OH-dG düzeyleri LC-MS/MS dışında diğer yöntemler ile ölçülmüş ve birbiri ile uyumsuz olan sonuçlar elde edilmiştir (4,23,25). Çalışmamızda kullandığımız oksidatif DNA hasarının diğer güvenilir biyobelirteçleri olan R-cdA ve S-cdA'nın prediyabet ya da T2DM hastalarında incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu parametreler klinik çalışmalarda ilk kez ateroskleroz hastalarında incelenmiştir (108). R-cdA ve S-cdA prediyabet ve T2DM hastalarında ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir. Bu yönüyle çalışmamız oksidatif DNA hasarının kapsamlı ve güvenilir biyobelirteçlerle incelendiği özgün bir çalışmadır.

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda lipid peroksidasyonunun belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan biyobelirteçler MDA, TBARS ve izoprostanlardır. Çalışmamızda diğer LP ürünlerine göre oksidatif stresin incelenmesinde en güvenilir biyobelirteçler olan 8-iso-PGF_{2α} kullanılmıştır. Yapılan birçok çalışmada 8-iso-PGF_{2α} T2DM hastalarında LC-MS/MS dışında diğer yöntemler ile ölçülmüş ve çelişkili sonuçlar elde edilmiştir, prediyabette ise tek bir çalışmada incelenmiştir (17,20,25). Çalışmamızda prediyabet grubunda 8-iso-PGF_{2α}'ın araştırılması literatüre önemli bir katkı sağlamıştır.

Biz de literatürdeki bu boşluğu doldurmak amacıyla çalışmamızda hem prediyabet hem de T2DM olgularını kapsayan bir örneklemede, DNA nükleozid hasarının ve lipid peroksidasyonunun altın standart parametreleri olan sırasıyla 8-OH-dG, S-cdA, R-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ı referans yöntem LC-MS/MS SID-MRM ile inceledik.

2.10. Oksidatif Makromolekül Hasarı ile TCF7L2 Arasındaki İlişki

TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi literatürde T2DM ile en fazla ilişkilendirilmiş olan genetik varyasyondur. Çalışmamızda TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi olan bireylerde oksidatif hasar düzeyleri, olmayanlardaki oksidatif hasar ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler prediyabet ve diyabet hastalarının izlem ve tedavisinde genetik faktörlerin rolünün belirlenmesine yönelik önemli bir adımdır.

Günümüze kadar TCF7L2 ile ilgili yapılmış çalışmalarda bu genden kodlanan proteinler, fonksiyonları, üretildiği dokular ve polimorfizmleri belirlenmiştir (50,55,61). TCF7L2'nin T2DM ile olan ilişkisi 2006 yılında bulunmuş ve 2006 yılından sonra farklı populasyonlarda birçok çalışma ile TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin T2DM riskini arttırdığı belirlenmiştir (52). Ancak, literatürde TCF7L2'nin oksidatif stres ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış ve T2DM hastalarında ortaya çıkan oksidatif makromolekül hasarına bir etkisi olup olmadığı belirlenmemiştir. Çalışmamız T2DM riskini arttıran TCF7L2 polimorfizminin oksidatif stres ile ilişkisinin incelendiği ilk çalışmadır ve TCF7L2 geninde bulunan polimorfizmi seçmemizin nedeni DNA onarımındaki rolüdür. 2007 yılında Idogawa ve arkadaşları TCF7L2'nin özellikle PARP-1 gibi DNA onarım proteinleri ile kompleks oluşturarak DNA onarımında rol aldığını göstermişlerdir (28,29). Bu onarım proteinlerinden PARP-1'in rolünden, T2DM ile oksidatif stres ilişkisinin anlatıldığı bölümde unifying hipotezinden bahsedilmiştir. PARP-1 glikolitik bir enzim olan GAPDH'ın aktivitesini poly-ADP ribozilasyon ile inhibe ederek glikoliz ürünlerinin birikimine neden olmaktadır (101). Bu olay tip 2 diyabette ortaya çıkan oksidatif stresin ve oksidatif makromolekül hasarının en önemli nedenidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Yapılan araştırma olgu-kontrol tipinde ve kesitsel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışmamız Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22 Mart 2012 onaylandıktan sonra başlatıldı. Nisan 2012 - Aralık 2015 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Endokrinoloji Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Olgu ve kontrol grubuna dâhil edilecek kişiler çalışma hakkında bilgilendirilerek kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı ve örnekler toplandı.

Olgu grubu; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji polikliniğine başvuran 18 - 70 yaşları arasındaki prediyabet (n=47) ve T2DM hastalarından (n=43) oluşmaktadır.

Kontrol grubu olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji polikliniğine başvurmuş yaş ve cinsiyet olarak olgu grubuyla benzer ve araştırmanın protokolüne uygun olan (dâhil etme ve dışlama kriterlerini karşılayan) ancak prediyabet ve T2DM hastası olmayan sağlıklı kişiler (n=37) çalışmaya dâhil edildi.

Endokrinoloji polikliniğine başvuran hastaların demografik verileri (yaş, cinsiyet, prediyabet veya T2DM süresi, ek hastalıkları, kullandığı ilaçlar, sigara ve alkol kullanım öyküsü) kan basıncı ve fizik muayene sonucunda nöropatisinin olup olmadığı kaydedildi. Prediyabet, T2DM hastalarından ve sağlıklı kontrol grubundan istenen rutin analizler Dokuz Eylül Üniversitesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu rutin analizler; açlık kan glukozu, oral glukoz tolerans testi (OGTT), hemogram, sedimentasyon, BUN, HbA1c, lipid profili (total kolesterol, LDL, HDL, trigliserid), karaciğer fonksiyon testleri (ALT, AST), 24 saatlik idrarda kreatinin ölçümü ve mikroalbuminüri değerlendirmesidir.

Olgu ve kontrol gruplarının seçilmesinde belirlenen dâhil olma ve dışlanma kriterleri aşağıda gösterilmiştir.

Prediyabet tanısı için kullanılan kriterler:

- Açlık plazma glukoz seviyesinin ≥ 100 mg/dL ile < 126 mg/dL,
- 75 gram glukoz yükleme testinde 2.saat glukoz değerinin ≥ 140 mg/dL ile < 200 mg/dL,
- HbA1c'nin $\geq \% 5.7$ ile $< \% 6.5$ arasında olmasıdır.

T2DM tanısı için kullanılan kriterler:

- İki kez ölçülen açlık plazma glukoz düzeyinin > 126 mg/dL,
- 75 gram glukoz ile yapılan yükleme testinde 2.saat glukoz değerinin > 200 mg/dL,
- HbA1c'nin $\geq \% 6.5$ ve üzerinde,
- Klinik olarak polidipsi ve poliüri yakınması olmasıdır.

Çalışmadan dışlanma kriterleri:

- 18 yaşından küçük olmak,
- 70 yaş ve üstü hastalar,
- Gebe olmak,
- Sigara içiyor olmak,
- Son üç ayda X-ışını ve DNA hasarına yol açabilecek solventlere maruz kalmak,
- Alkol kullanmak,
- Klinik olarak hipotiroidik veya hipertiroidik olmak,
- Romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus gibi sistemik romatolojik hastalıklara sahip olmak,
- Akut veya kronik bir enfeksiyonun varlığı,
- Kanseri hastalığı öyküsünün olması,
- Hemodiyaliz hastası olması,
- Karaciğer yetmezliğinin olması,
- Kronik obstrüktif akciğer hastalığı öyküsünün olması,
- Evre III-IV kalp yetmezliğinin olması,

- Herhangi bir sebepten dolayı steroid tedavisi alıyor olması veya son üç ay içerisinde steroid tedavi öyküsünün olması,
- Antioksidan etkisi olan (E vitamini, selenyum) preparat kullanımınıdır.

3.4. Çalışma Materyali

Etik Kurul onayını **(Ek 4)** takiben olgu ve kontrol gruplarındaki katılımcıların kendileri ve aileleri çalışma hakkında bilgilendirildi. Bu kişilere çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair onam formu imzalatıldı **(Ek 1 ve 2)**. Hasarlı DNA nükleozidleri, izoprostan ve TCF7L2 polimorfizminin belirlenmesi için olgu ve kontrol grubundan sabah idrarı, 24 saatlik idrar ve 10 cc EDTA'lı kan örneği alındı.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımlı değişken; prediyabet ve T2DM

Bağımsız değişkenler; hasarlı DNA nükleozidleri, izoprostan ve TCF7L2 polimorfizmidir.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler **Tablo 5'te** ve kullandığımız cihazlar **Tablo 6'da** gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Kimyasal/Malzeme Adı	Marka	Mevcut Olduğu Yer	Kullanım Amacı
Filtreli santrifüj tüpü	NANOSEP 3K OMEGA	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostanın örnek hazırlık aşaması
Asetonitril	Merck	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Metanol	Merck	DEÜTF Biyokimya AD	LC-MS/MS
Formik asit	Merck	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Tris HCL	Sigma	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidlerinin örnek hazırlık aşaması
Alkale fosfataz	Roche	DEÜTF Biyokimya AD	Hasarlı DNA nükleozidlerinin örnek hazırlık aşaması
HPLC Amber vial	Shimadzu	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
C18 HPLC kolonu	Agilent	DEÜTF Biyokimya AD.	LC-MS/MS
Katı faz ekstraksiyon kartuşu	Waters	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidlerinin örnek hazırlık aşaması
8-OH-dG standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidlerinin kantitatif analizleri
8-OH-dG internal standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD	Hasarlı DNA nükleozidlerinin kantitatif analizleri
S-cdA standardı	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidlerinin kantitatif analizleri
R-cdA ve S-cdA internal standartları	NIST	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidlerinin kantitatif analizleri
8-iso-PGF_{2α} standardı	Cayman Chemicals	DEÜTF Biyokimya AD	İzoprostanın kantitatif analizleri
8-iso-PGF_{2α} internal standardı	Cayman Chemicals	DEÜTF Biyokimya AD.	İzoprostanın kantitatif analizleri
Nucleospin Blood DNA izolasyon kolonları	MN	DEÜTF Biyokimya AD.	TCF7L2 polimorfizminin belirlenmesi

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka	Mevcut Olduğu Yer	Kullanım Amacı
MS/MS (Tandem kütle spektrometre)	AB Sciex 4000QTRAP	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostanın ölçülmesi
HPLC	Shimadzu 20AD	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostanın ölçülmesi
SpeedVac konsantratör sistemi	Thermo	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostanın örnek hazırlık aşaması
Salınımlı santrifüj	Nüve	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması
Santrifüj	Hettich	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması
Otomatik pipet	Eppendorf	DEÜTF Biyokimya AD	Genel kullanım
Nanodrop	Heraeus	DEÜTF Tıbbi Biyoloji AD.	DNA miktarının belirlenmesi
Ekstraksiyon manifoldu	Waters	DEÜTF Biyokimya AD	Hasarlı DNA nükleozidlerinin örnek hazırlık aşaması
Hassas terazi	Precisa, XB 22A	DEÜTF Biyokimya AD	Stok çözeltilerinin, tamponların ve diğer kimyasal malzemelerin tartılması
Manuel karıştırıcı	Heidolph Reax	DEÜTF Biyokimya AD.	Ependorf ve falkon içerisindeki örneklerin homojen hale getirilmesi
pH metre	Selecta pH 2005	DEÜTF Biyokimya AD.	Tampon çözeltilerin pH ayarlaması
Isıtmalı karıştırıcı	Labnet Vortemp 56	DEÜTF Biyokimya AD.	Tampon çözeltilerin pH ayarlaması
Distile su cihazı	Millipore (Elix3 +Milliq)	DEÜTF Biyokimya AD.	Genel kullanım
Soğutmalı santrifüj	Heraeus, Biofuge Stratos	DEÜTF Biyokimya AD.	Hasarlı DNA nükleozidleri ve izoprostanın örnek hazırlık aşaması
Derin dondurucu (-80 °C)	Thermo Scientific	DEÜTF Biyokimya AD.	Örneklerin saklanması
Derin dondurucu (-20 °C)	Beko	DEÜTF Biyokimya AD.	Örneklerin ve kimyasal maddelerin saklanması
Buzdolabı (+4 °C)	Beko	DEÜTF Biyokimya AD.	Kimyasal maddelerin, vialerin saklanması
Vorteks	Labortechnic	DEÜTF Biyokimya AD.	Örnek hazırlık aşaması

3.6.2. İdrarda Hasarlı DNA Nükleozidlerinin ve İzoprostanın Kantitasyon Yöntemi

Çalışmamızda olgu ve kontrol grubundan alınan idrar örneklerinde hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın düzeyleri LC-MS/MS SID-MRM yöntemi ile belirlendi.

3.6.2.1. Hasarlı DNA Nükleozidlerinin Ekstraksiyon Basamakları

- DNA nükleozidlerinin analizinde sabah ilk idrarı kullanıldı. Ekstraksiyon öncesinde bir miktar idrar örneğinden kreatinin ölçümü yapıldı.
- Ekstraksiyon için 1.3 mL idrar örneği içine stabil izotoplar ile işaretlenmiş internal standartlar, 8-OH-dG¹⁵N₅, R-cdA¹⁵N₅ ve S-cdA¹⁵N₅ eklendi.
- IS eklenmiş idrar örnekleri 1000 g'de 15 dk oda sıcaklığında santrifüjlendi.
- Süpernatantlar şırınga filtreleriyle (gözenek çapı 0.22 µm) filtrelendi.
- Katı faz ekstraksiyon kartuşu (60 mg) 1 mL metanol ile aktive edildi, 15 dk kuruması beklendi ve 2 mL dH₂O ile yıkandı.
- IS eklenmiş 1 mL idrar örneği katı faz ekstraksiyon kartuşlarına yüklendi ve kartuş 2 mL dH₂O ile yıkandı. Örnekler 1 mL % 30 metanol ile ekstrakte edildi ve SpeedVac ile kurutuldu.
- Örnekler 100 µL digestion buffer (10 mM Tris tamponu pH 7.5, 1 M NaAsetat) ile çözüldü ve 1 µL 22 U alkalin fosfataz eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrasında 14000 g'de 10 dk santrifüjlenen örnekler ultrafiltrasyon membranları ile 5000 g'de 50 dk filtrelendi.
- Örnekler HPLC viallerine aktarıldı ve LC-MS/MS analizleri gerçekleştirildi.

3.6.2.2. İzoprostanın Ekstraksiyon Basamakları

- 8-iso-PGF_{2α} ölçümünde olgu ve kontrol grubundan toplanan koruyucu içermeyen 24 saatlik idrar örnekleri kullanıldı.
- 2 mL idrar örneğine 40 µL 1 N HCl eklenerek asidik koşulların oluşması sağlandı.
- Örnekler 10 ng/mL 8-iso-PGF_{2α} internal standardı ilave edilerek 1500 g'de 10 dk 4°C de santrifüjlendi.

- Örneklerin ekstraksiyonu katı faz ekstraksiyon kartuşları (30 mg) ile gerçekleştirildi.
- Katı faz ekstraksiyon kartuşu 3 mL metanol ve 3 mL su ile aktive edildi. Süpernatant kartuşa yüklendi.
- Örnekler sırasıyla 1.5 mL 0.1 mol/L HCl, 1.5 mL % 5 metanol ve 0.3 mL hekzan ile yıkandı.
- 8-iso-PGF_{2α} % 0.5 NH₄OH içeren 480 µL metanol ile elue edildi ve örnekler 300 µL dH₂O eklendi.
- Ekstakte edilen örnekler LC-MS/MS analizi için HPLC viallerine aktarıldı.

3.6.2.3. LC-MS/MS SID-MRM

Hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın kantitatif analizleri LC-MS/MS SID-MRM (Shimadzu, Kyoto, Japan - 4000 QTRAP, AB SCIEX, ABD) yöntemiyle gerçekleştirildi. Veri analizi için Analyst Software Version 1.5 kullanıldı.

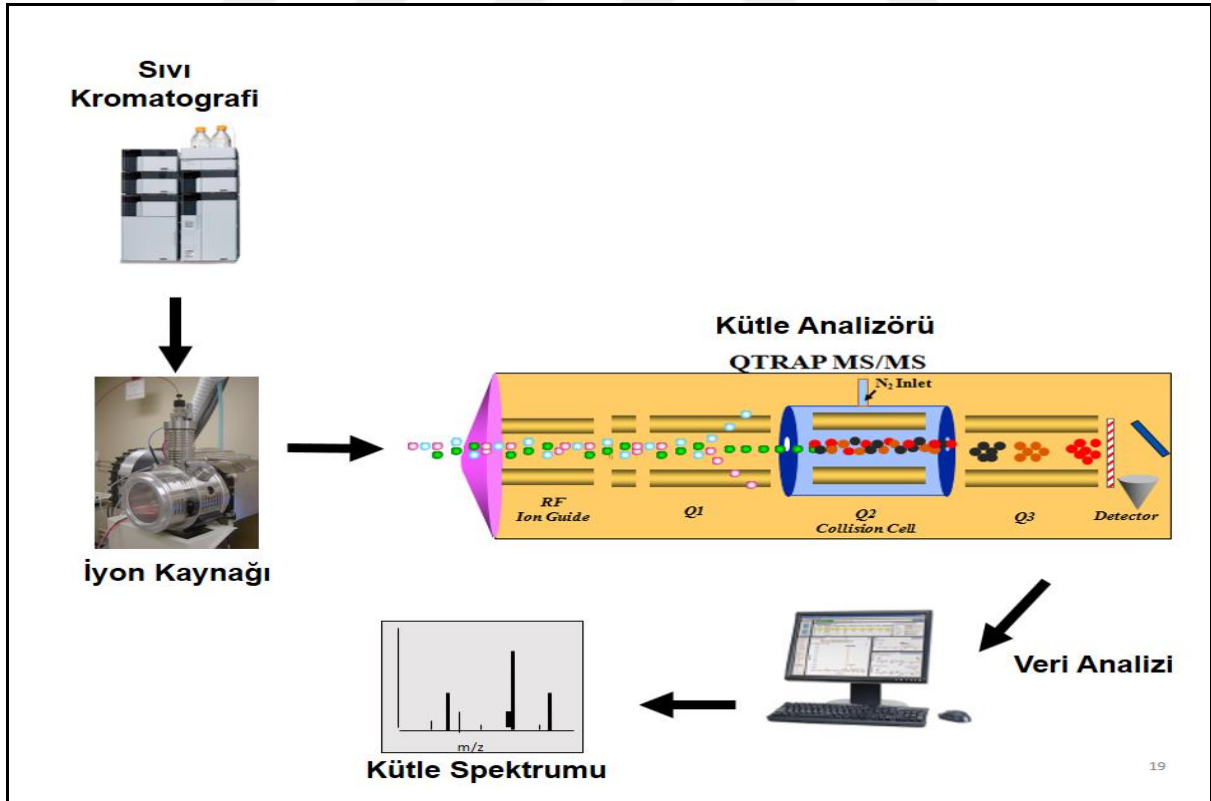
Kütle spektrometresinin temel prensibi, moleküllerin elektriksel bir alanda ve gaz fazında iyonize olmasının ardından kütle/yük (m/z) oranına göre ayrıştırılması ve tespitine dayanmaktadır. İyonizasyon kaynağı molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürür ve bu moleküllerin kütle/yük oranları kütle spektrometresi ile ölçülür. Yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip analitik bir teknik olan kütle spektrometresinin kullanım amaçları; bilinmeyen bileşiklerin tanımlanması, moleküllerin yapısal özelliklerinin belirlenmesi ve bilinen bileşiklerin hedefli kantitasyonudur (109,110).

Kütle spektrometresinin temel bileşenleri **Şekil 19**'da gösterilmiştir. Kompleks biyolojik karışımların analizinde MS öncesinde ilk boyut, kromatografik olarak bileşenlerine ayrılma işlemidir, bunun için HPLC kullanılır. Örnekler HPLC ile ayrılırlar ve ardından MS'e ulaşırlar. MS'in ilk aşaması ise moleküllerin iyonizasyonudur. Bu aşamada çeşitli iyonizasyon yöntemleri kullanılmaktadır.

İyonizasyon yöntemleri;

- ESI (Electrospray)
- MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization)
- APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
- APPI (Atmospheric Pressure Photon Ionization)
- PhotoSpray iyonizasyondur.

En sık kullanılan MS iyonizasyon yöntemlerinden biri çalışmamızda da kullandığımız elektrosprey iyonizasyondur (ESI). HPLC ile ayrımlanan bileşikler sıvı olarak ESI'ye ulaşır, burada nitrojen gazı ve yüksek sıcaklık etkisiyle sıvı fazda bulunan bileşikler iyonize damlacıklar haline dönüşür. Damlacıkların etrafındaki sıvı faz buharlaşır ve bu damlacıklar kütle analizörü kısmına gelir. Kütle analizöründeki elektriksel alan belirli iyonların geçişine izin verirken, istenmeyen diğer iyonları tutarak bir m/z filtresi görevini yapar. İki kütle analizörünün art arda geldiği sisteme sıralı kütle analizörü (Tandem MS) adı verilir.

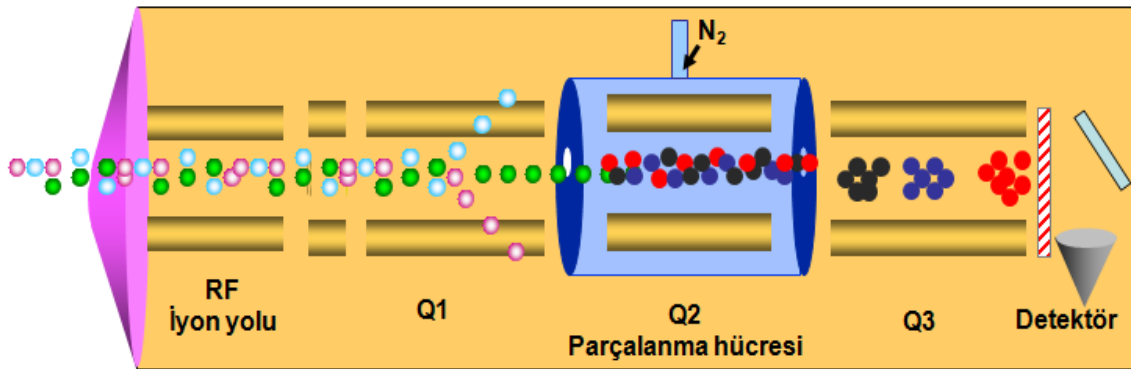


Şekil 19. Kütle spektrometresinin bileşenleri

Kütle analizörlerinin kullanım amaçlarına göre farklı çeşitleri vardır;

- Time of flight (TOF) MS
- Quadrupole MS
 - Single quadrupole
 - Triple quadrupole
- Ion trap (iyon yakalayıcı) MS
- Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR)
- Hibrid kütle analizörleri (Triple Quadrupole İyon Trap QTRAP, Quadrupole TOF)

Çalışmamızda kullanılan tandem kütle analizörü triple quadrupole-lineer iyon trap özelliğinde olup analitlerin mutlak kantitasyonuna ve kalitatif karakterizasyonuna olanak sağlayan bir hibrid kütle analizörüdür (**Şekil 20**).



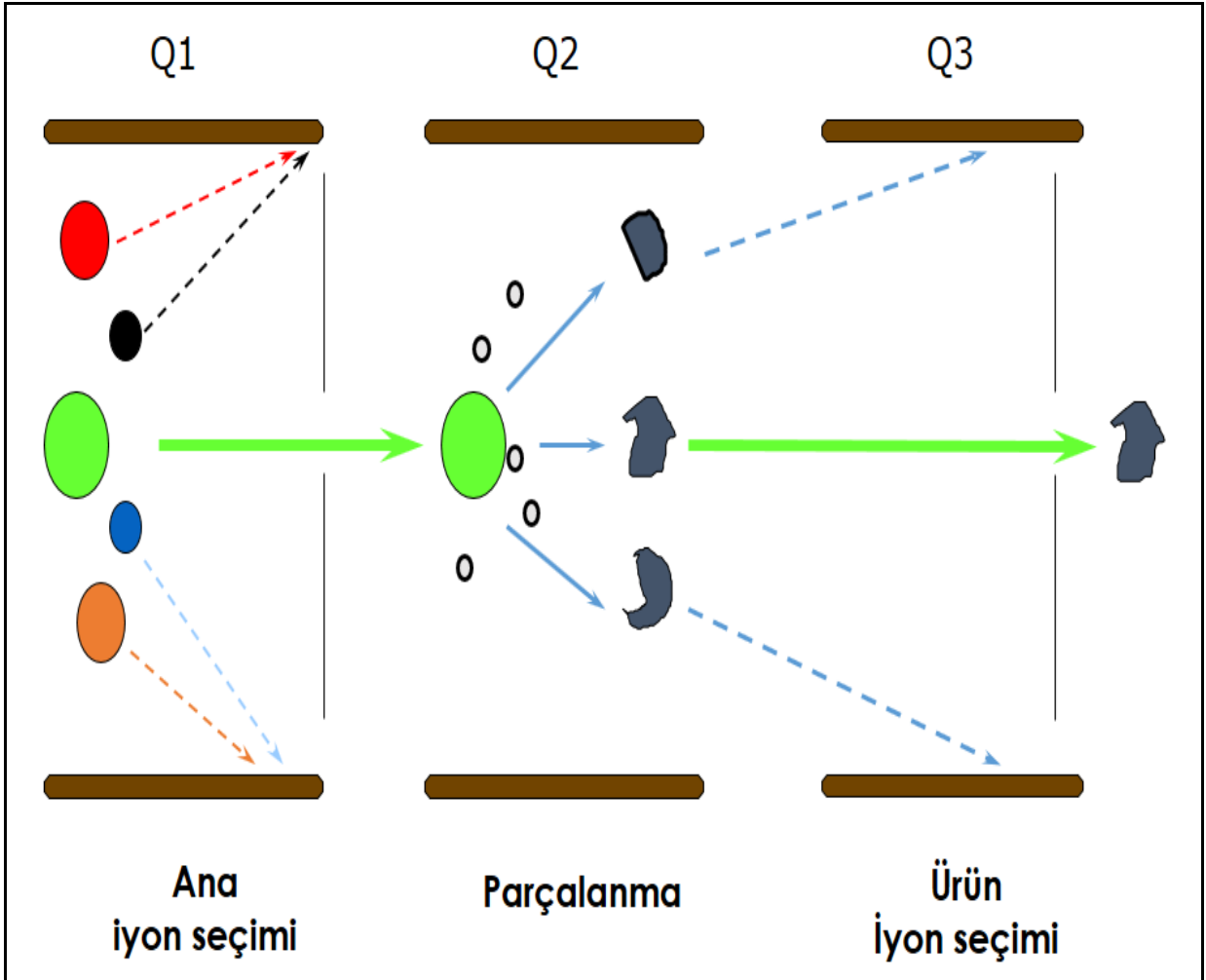
Şekil 20. Triple quadrupole iyon trap MS/MS

Triple quadrupole kütle analizörlerinde çeşitli amaçlara yönelik farklı tarama modları kullanılmaktadır;

- Öncül (precursor) iyon
- Ürün (product) iyon
- Nötral kayıp
- Çoklu reaksiyon izleme (Multiple Reaction Monitoring - MRM)

Çalışmamızda bu tarama modlarından çoklu reaksiyon izleme (MRM) modu kullanılmıştır. MRM bileşiklerin miktar tayinlerinin yüksek duyarlılık ve özgüllükte yapıldığı hedefli bir tandem MS yöntemidir. MRM'de birinci quadrupole (Q1) önceden tanımlanmış m/z değerindeki moleküllere ait ana iyon iyonlarının seçilmesini, ikinci

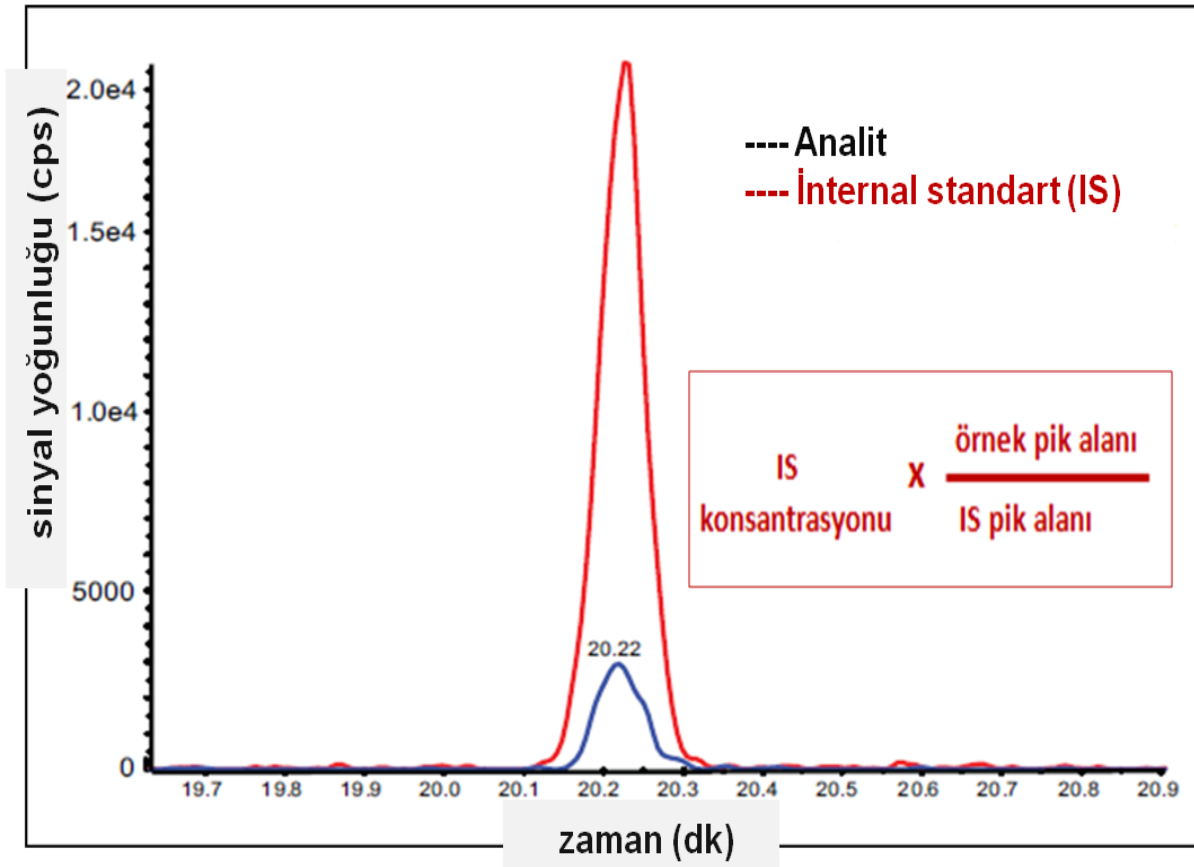
quadropole (Q2) bu seçilmiş iyonların çarpışma ile fragmente olmasını ve üçüncü quadropole (Q3) fragmente olmuş ürün iyonlardan tanımlanmış olan ürün iyonun seçilmesini sağlamaktadır. Ana iyonun fragmentasyonu, bu moleküllerin Q2'de N₂, Ar, He gibi inert gazlarla çarpıştırılmasıyla gerçekleştirilir. Çarpışma sırasında kinetik enerji moleküle transfer olur ve kararsızlaşan moleküldeki kovalent bağlar kırılarak ürün iyonlar oluşur. Q2'de oluşan ürün iyonlar Q3'e geldiklerinde belirlenen m/z değerlerindeki ürün iyonlar seçilir (**Şekil 21**). Seçilen ana iyon/ürün ikilisi (transition) dedektöre ulaştığında m/z değerine karşı iyonların sinyal yoğunluğu (intensite) kütle spektrumu olarak kaydedilir.



Şekil 21. Çoklu Reaksiyon İzleme

LC-MS/MS SID-MRM yönteminde kantitasyonun güvenilirliğini arttırmak amacıyla çalışmanın ilk aşamasında her bir örneğe belirli konsantrasyonda stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart eklenir.

İnternal standart eklenmesiyle; MS öncesi (ekstraksiyon, çöktürme, filtreleme gibi ön hazırlık işlemleri), MS koşullarındaki (iyonizasyon gibi) değişikliklerin standardizasyonu sağlanır ve aynı zamanda eklenen internal standardın konsantrasyonundan yararlanılarak analitin mutlak kantitasyonu gerçekleştirilir (111). Stabil izotop işaretli IS'ların hedef analit ile kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve ürün iyon dağılımı aynıdır. Hedef analitten farkı, ^{12}C yerine ^{13}C , ^{14}N yerine ^{15}N ve ^1H atomu yerine ^2H (döteryum) atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleyle sahip olmasıdır (Şekil 22).



Şekil 22. İnternal standart ve analitin kütle spektrumu

Son yıllarda LC-MS/MS'in birden fazla ürünün tek bir analizde ölçülmesi, yüksek hassasiyeti, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip kantitatif sonuçlar elde edilmesi ve türevlendirme gerektirmemesi nedeniyle diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmektedir.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Koşulları

HPLC sistemimiz Shimadzu Prominence modüler sistemdir, pompa sistemi (LC-20AD), oto-örnekleyici (SIL-20AC HT), degasser ünitesi (DGU-20A3) ve kolon fırınından (CTO-10AS) oluşmaktadır.

Hasarlı DNA nükleozidlerinin analizlerinde örnekler C18 kolonu (Agilent Zorbax SB Aq 2.1x150 mm, 3.5 µm) ve guard kolonu (Agilent Eclipse XDB C8 2.1x12.5 mm, 5 µm) ile 35°C'de 0.3 mL/dk akış hızında ayrımlandı. Mobil faz olarak % 0.1 formik asit içeren dH₂O (A) ve asetonytril (B) kullanılarak gradient analiz gerçekleştirildi. Toplam analiz zamanı 26 dk, enjeksiyon hacmi standartlar için 10 µL, idrar örnekleri için 30 µL'dir.

İzoprostanın analizlerinde örnekler C18 kolonu (Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 2.1x50 mm, 3.5 µm) ve guard kolonu (Agilent Eclipse XDB C8 2.1x12.5 mm, 5 µm) ile 35°C'de 0.3 mL/dk akış hızında ayrımlandı. Mobil faz olarak % 0.1 amonyum hidroksit içeren dH₂O (A) ve asetonytril (B) kullanılarak gradient analiz gerçekleştirildi. Toplam analiz zamanı 10 dk, enjeksiyon hacmi standartlar için 10 µL, idrar örnekleri için 20 µL'dir.

Tandem Kütle Spektrometre Koşulları

Çalışmamızda kullanılan tandem kütle spektrometresi elektrosprey iyonizasyon kaynağı (Turbo V[®]) ile bağlı 4000 QTRAP (AB SCIEX, ABD) modelidir, azot jeneratörü (Peak Scientific) ve vakum pompasını (Oerlikon) içermektedir.

Kütle spektrometresinde analite özgü parametreler, standartların infüzyon pompasından iyon kaynağına gönderilmesi ile optimize edildi ve MS/MS yöntemi oluşturuldu. Analizler MRM modunda gerçekleştirildi. 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA için pozitif, 8-iso-PGF_{2α} için negatif iyonizasyon kullanıldı. 8-OH-dG için m/z 284/168, 8-OH-dG¹⁵N₅ için m/z 289/173; S-cdA için m/z 250/164, S-cdA¹⁵N₅ için m/z 255/169

ana iyon/ürün iyon çiftleri (transitionları) izlendi. 8-iso-PGF_{2α} için m/z 353/193 ve 8-iso-PGF_{2α}-d₄ için m/z 357/197 ana iyon/ürün iyon çiftleri izlendi. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın iyon çiftleri ve alıkonma zamanları **Tablo 7'de** görülmektedir. İdrar örneklerinde 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri idrar kreatinin değerleriyle normalize edilerek hesaplandı (10,112–114).

Tablo 7. Hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın iyon çiftleri ve alıkonma zamanları

	Ana iyon/ürün iyon çiftleri (m/z)	Alıkonma zamanı (dk)
8-OH-dG	284 → 168	5.26
8-OH-dG-¹⁵N₅	289 → 173	5.26
R-cdA	250 → 164	3.64
R-cdA-¹⁵N₅	255 → 169	3.64
S-cdA	250 → 164	4.60
S-cdA-¹⁵N₅	255 → 169	4.60
8-iso-PGF_{2α}	353 → 193	3.22
8-iso-PGF_{2α}-d₄	357 → 197	3.22

3.6.2.4. Yöntem Geçerlilik Çalışmaları

Bir yöntemin geçerliliğinin belirlenmesi, laboratuvarlar arası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş bir metodun laboratuvar şartlarında doğrulanmasıdır (115). Çalışmamızda uluslararası laboratuvarlarda validasyonu tamamlanmış LC-MS/MS SID-MRM yöntemleri laboratuvarımızda optimize edilmiş ve yöntem geçerlilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} standartları ve idrar havuzu kullanılmıştır. Yöntem geçerlilik çalışmalarında kullanmak amacıyla sağlıklı kişilerden alınmış spot idrar örnekleri (n=10) birleştirilerek idrar havuzu hazırlanmıştır.

3.6.2.4.1. Seçicilik (Selectivity)

Analitimizin kompleks bir bileşim içinde doğru olarak belirlenebilmesidir. LC-MS/MS yöntemlerinde seçiciliğin belirlenmesi için alıkonma zamanı ve analite ait farklı ana iyon/ürün iyon çiftleri kullanılır (111). Bu parametreler farklı kişilerden elde edilen örneklerde doğrulanır.

3.6.2.4.2. Analitik Duyarlılık (Analytical Sensitivity)

Analitik Duyarlılık üç tekrarlı çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi (ortalama \pm standart sapma) ile ifade edilir.

3.6.2.4.3. Doğrusallık (Linearity)

Yöntem geçerlilik çalışmalarında analitin farklı konsantrasyonları kullanılarak bir kalibrasyon eğrisi çizilir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnekler veya kör örnek içine analitin bilinen konsantrasyonlarının eklenmesiyle gerçekleştirilir. Doğrusallık, kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin konsantrasyonu ve dedektör yanıtının doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır.

8-OH-dG için 0.2-50 pmol/mL, S-cdA için 0.05-25 pmol/mL ve 8-iso-PGF_{2 α} 0.25-50 ng/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrileri çizildi. Bütün örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

3.6.2.4.4. Doğruluk (Accuracy)

Analitik bir metodun doğruluğu, bir analitin ölçülen değerinin gerçek değere olan yakınlığı olarak tanımlanır. Doğruluk, bilinen konsantrasyonda analit içeren örneğin tekrarlanan analizleri ile belirlenir. İki değer arasındaki farkın \pm % 15 olması kabul edilir. Örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

3.6.2.4.5. Kesinlik (Precision)

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti ve tekrarlı ölçümlerin doğruluğudur (111). Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları idrar havuzu kullanılarak gerçekleştirildi.

İdrar havuzunda gün içi tekrarlanabilirlik için, bir gün içinde 10 tekrarlı okuma, günler arası tekrarlanabilirlik için 10 ardışık günde birer okuma yapılarak yöntemin kesinliği hesaplandı. Kesinlik varyasyon katsayısı (% CV) olarak ifade edildi.

3.6.2.4.6. Tespit ve Kantitasyon Limiti (LOD – LOQ)

En düşük tespit limiti (LOD), analitin tespit edilebilecek en düşük konsantrasyonudur. En düşük kantitasyon limiti (LOQ) ise, bir örnekteki analitin uygun doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak hesaplanabileceği en düşük konsantrasyonudur. LOD ve LOQ belirlenmesi için idrar havuzunun seri dilüsyonlu örnekleri (dilüsyon faktörü 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256) kullanıldı. Kromatografik ölçümlerde LOD ve LOQ belirlenmesi için sinyal/gürültü oranı (S/N) kullanılmaktadır. S/N>3 olduğu konsantrasyon LOD, S/N>10 olduğu konsantrasyon ise LOQ olarak belirlendi.

3.6.3. TCF7L2 rs7903146 Tek Nükleotid Polimorfizminin Belirlenmesi

TCF7L2'de SNP bölgeleri DNA dizi analizi ile belirlenerek, TCF7L2 polimorfizmi olan bireyler, olmayanlarla oksidatif hasar açısından karşılaştırıldı.

3.6.3.1. SNP Analizleri için Kan Örneklerinin Toplanması

Çalışmamızın ilk aşamasında olgu ve kontrol grubuna dâhil edilen kişiler telefon ile aranarak tekrar çağırıldı ve rutin kontrolleri gerçekleştirilirken TCF7L2 polimorfizminin belirlenmesi için 10 cc (1 tüp) EDTA'lı kan örnekleri alındı. Bu kişilerden bazılarında şehir değişikliği, diğer hastalıklar ve ölüm gibi sebeplerden dolayı ulaşılamadı. Toplanan kan örnekleri DNA izolasyonu öncesinde -20°C'de saklandı.

3.6.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

Genomik DNA izolasyonu EDTA'lı kan örneklerinden Nucleospin Blood DNA izolasyon kolonları kullanılarak gerçekleştirildi.

- 200 µL kan örneğine 200 µL lizis tamponu ve 25 µL proteinaz K eklendi, vortekslendi ve 70°C'de kuru blok ısıtıcıda 15 dk inkübe edildi.
- Bağlanma koşullarının hazırlanması için DNA izolasyon kolonu 210 µL etanol ile yıkandı. Parçalanma tamamlandıktan sonra lizatlar DNA izolasyon bu kolona yüklendi ve vortekslendi.
- Örnekler Nucleospin kolonuna yüklenerek 11000xg'de 2 dk santrifüjlendi. Santrifüj sonrasında Nucleospin kolonunda altta kalan kısım atılarak kolon 500 µL yıkama solüsyonu ile 11000xg'de 2 dk yıkandı.
- Yıkama işlemi iki kez tekrarlandı ve ardından Nucleospin kolonu 11000xg'de 1 dk santrifüjlenerek kurutuldu.
- DNA'nın izolasyonu için Nucleospin kolonuna 100 µL önceden 70°C'de ısıtılmış elusyon solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 1 dk inkübe edildi ve en son işlem olarak örnekler 11000xg'de 2 dk santrifüjlendi. DNA örnekleri 4°C'de saklandı.

3.6.3.3. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

İzole edilen DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonları spektrofotometre (NanoDrop ND 2000) ile ölçülerek belirlendi. 260 nm DNA'nın ve 280 nm proteinin maksimum absorbans verdiği dalga boyudur. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 oranına bakılmaktadır. Bu oranının 1.6-1.9 aralığında olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. İzole edilen DNA örneklerinin bu aralıkta olduğu ve konsantrasyonlarının yaklaşık 50 ng/µL olduğu belirlendi.

3.6.3.4. TCF7L2 SNP Analizleri

Tek nükleotid polimorfizmlerinin belirlenmesinde kullanılan klasik yöntemler hibridizasyon teknikleri (mikro array, real time PCR) ve enzime bağlı yöntemlerdir (PCR, oligonükleotid ligasyon testleri ve reaksiyon son ürünlerinin belirlenmesi).

Çalışmamızda SNP analizlerinde 'altın standart' yöntem olan DNA dizi analizi kullanıldı (116,117).

Elde edilen DNA örneklerinde TCF7L2 gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu yapıldı ve SNP'lerin belirlenmesi için ABI 3500XL Genetic Analyzer 24 cihazında DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

TCF7L2-Forward **GGTGACAAATTCATGGGCTT** ve TCF7L2-Reverse **GTTGCCAGTCAGCAAACACA** primerleri kullanıldı. Olgu ve kontrol grubundan elde edilen DNA dizi analizi bulguları, blast2sequences programında ile SNP bölgelerinin belirlenmesi ve bu bölgelerde genotiplerin (CC, CT ve TT) Chromas Lite programında taranmasıyla incelendi.



3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

İř Paketleri	1. Yıl (2013)				2. Yıl (2014)				3. Yıl (2015)			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Malzemelerin alımı ve yöntemlerin optimizasyonu	■	■	■									
Örneklerin toplanması			■	■	■	■	■	■				
Oksidatif stres biyobelirteçlerinin kantitatif analizleri					■	■	■	■				
TCF7L2 polimorfizminin Belirlenmesi									■	■	■	■
Ara rapor yazımı		■		■		■		■		■		■
İstatistiksel Değerlendirme						■	■	■	■	■	■	■
Tez ve makale yazımı									■	■	■	■

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

3.8.1. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 programında gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılıma uygun olup olmadığını belirlemek amacıyla Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanıldı. Normal dağılım gösteren veriler ortalama \pm standart sapma, normal dağılım göstermeyenler ortanca ve en düşük-en yüksek değer olarak gösterildi. Gruplar arası karşılaştırmalar normal dağılım gösterenler için “parametrik” testler (t testi), normal dağılım göstermeyen veriler için “non-parametrik” testler (Kruskal-Wallis testi) kullanılarak gerçekleştirildi. Oksidatif stres parametrelerinin tanısal performansları ve eşik değerleri işlem karakteristiği eğrisi (Receiver Operating Characteristic Curve – ROC) ile belirlendi. Beklenen ve gözlemlenen değerlerin karşılaştırılmasında Ki-kare testi yapıldı. İstatistiksel analizlerde $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi. Oksidatif makromolekül hasarının bulguları, klinik veriler ve rutin laboratuvar sonuçları ile birlikte değerlendirildi ve değişkenler arasındaki ilişkilerin belirlenmesi için Pearson (r) ve Spearman (rs) korelasyon katsayıları kullanıldı. Tüm örnekler üç tekrarlı olarak çalışıldı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızın ilk aşamasında olgu ve kontrol grubuna dâhil edilen kişiler TCF7L2 polimorfizminin belirlenmesi için telefon ile aranarak tekrar çağırıldı. Bu kişilerden bazılarında şehir değişikliği, diğer hastalıklar ve ölüm gibi sebeplerden dolayı ulaşılamadı.

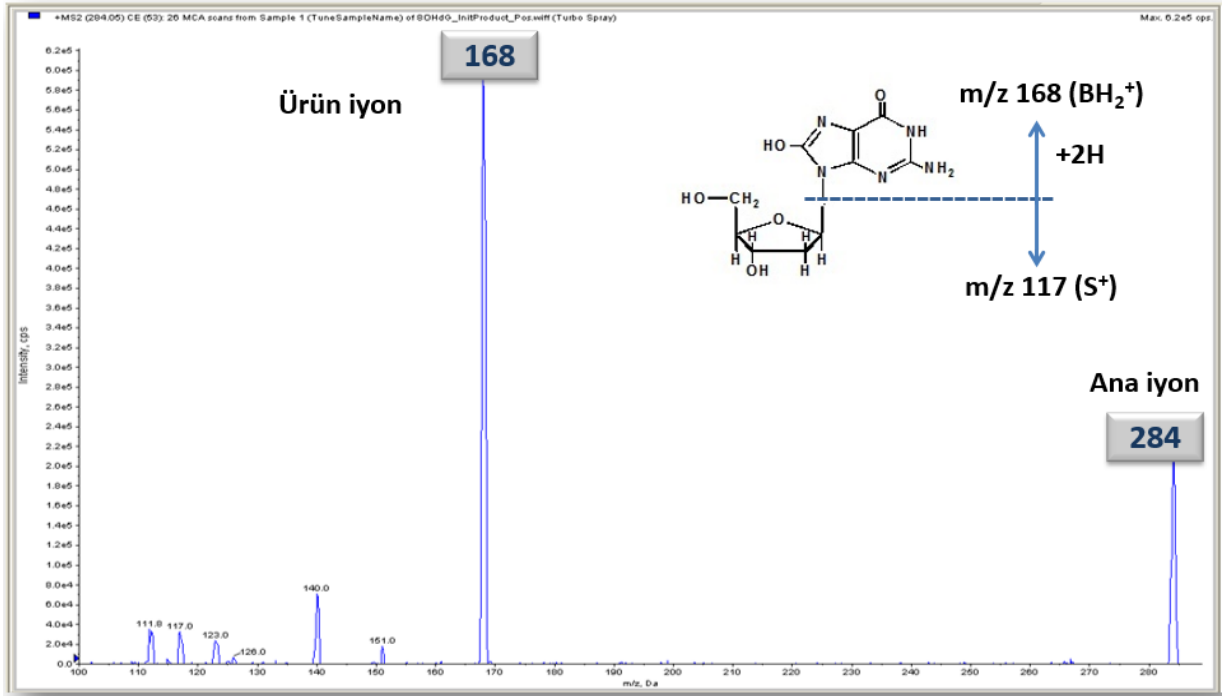
3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 22 Mart 2012 (protokol numarası: 41-SBKAEK - 2012/07-08) onaylandı. 15 Ağustos 2013 tarihinde isim değişikliği gerçekleştirilerek, bu değişiklik Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından kabul edildi (**Ek 4**).

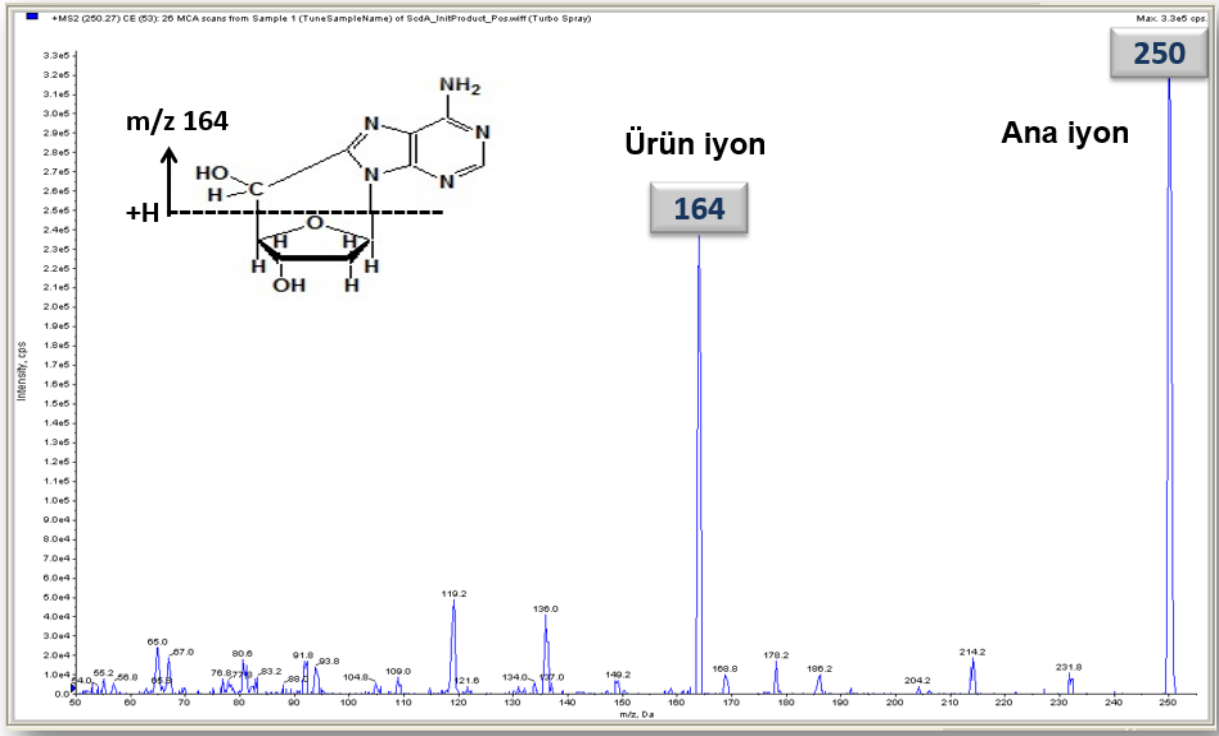
4. BULGULAR

4.1. LC-MS/MS SID-MRM Yönteminin Optimizasyonu

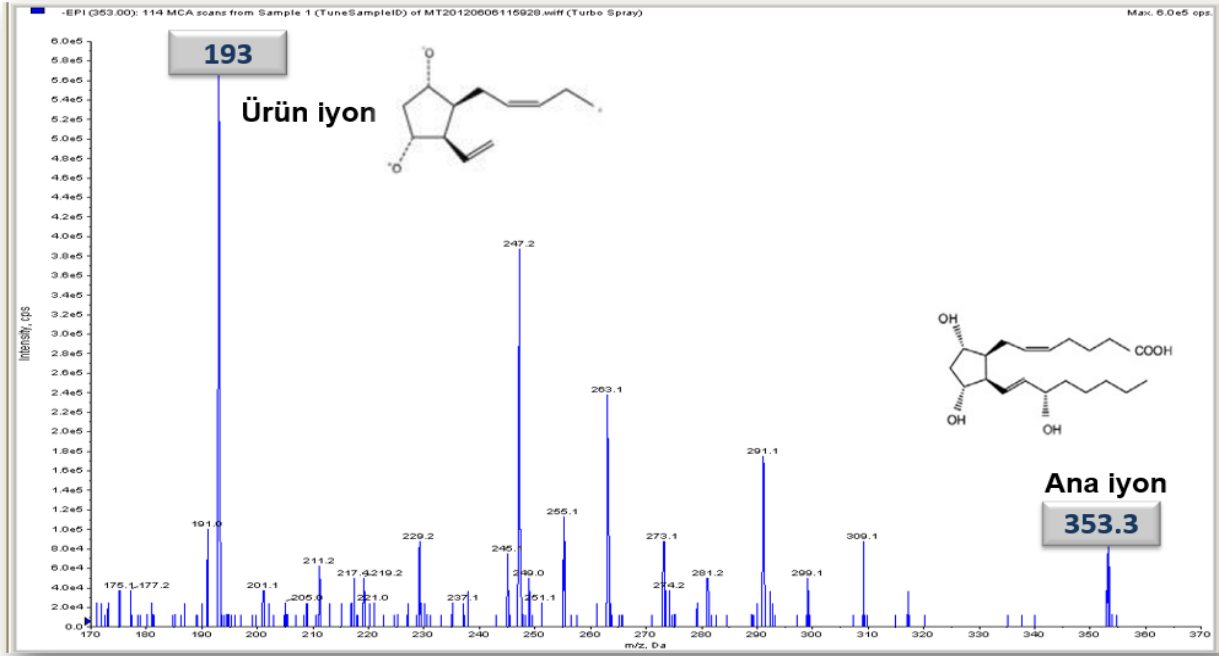
LC-MS/MS SID-MRM yönteminde kütle spektrometresine ait parametrelerin optimizasyonu için 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} standartları kullanıldı. Kütle spektrometresinde analite özgü parametreler, infüzyon pompasından standartların iyon kaynağına gönderilmesi (infüzyonu) ile optimize edildi. Bu parametreler kullanılarak yöntem oluşturuldu ve MRM yönteminde izlenecek ana iyon/ürün iyon çiftleri seçildi. 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} ürün iyon spektrumları **Şekil 23**'de görülmektedir. 8-OH-dG için m/z 284/168, 8-OH-dG¹⁵N₅ için m/z 289/173; S-cdA için m/z 250/164, S-cdA¹⁵N₅ için m/z 255/169; 8-iso-PGF_{2α} için m/z 353/193 ve 8-iso-PGF_{2α}-d₄ için m/z 357/197 ana iyon/ürün iyon çiftleri izlendi (**Şekil 24 ve 25**).



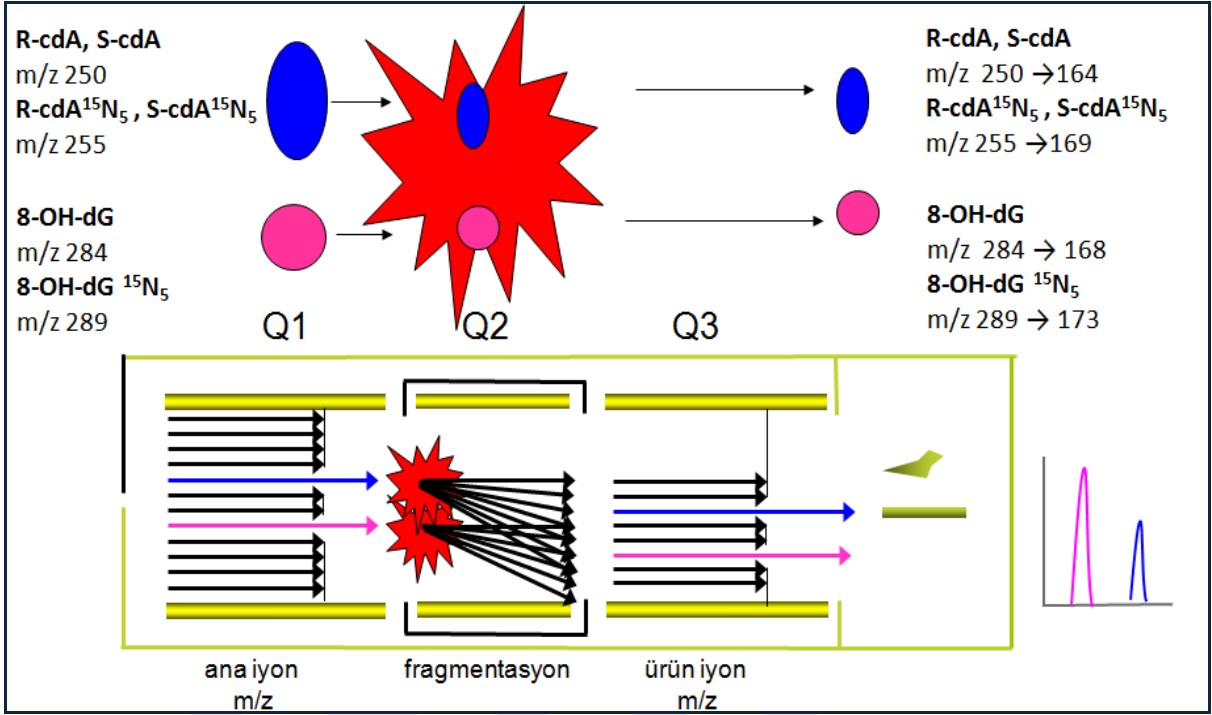
Şekil 23 a. 8-OH-dG ürün iyon spektrumu



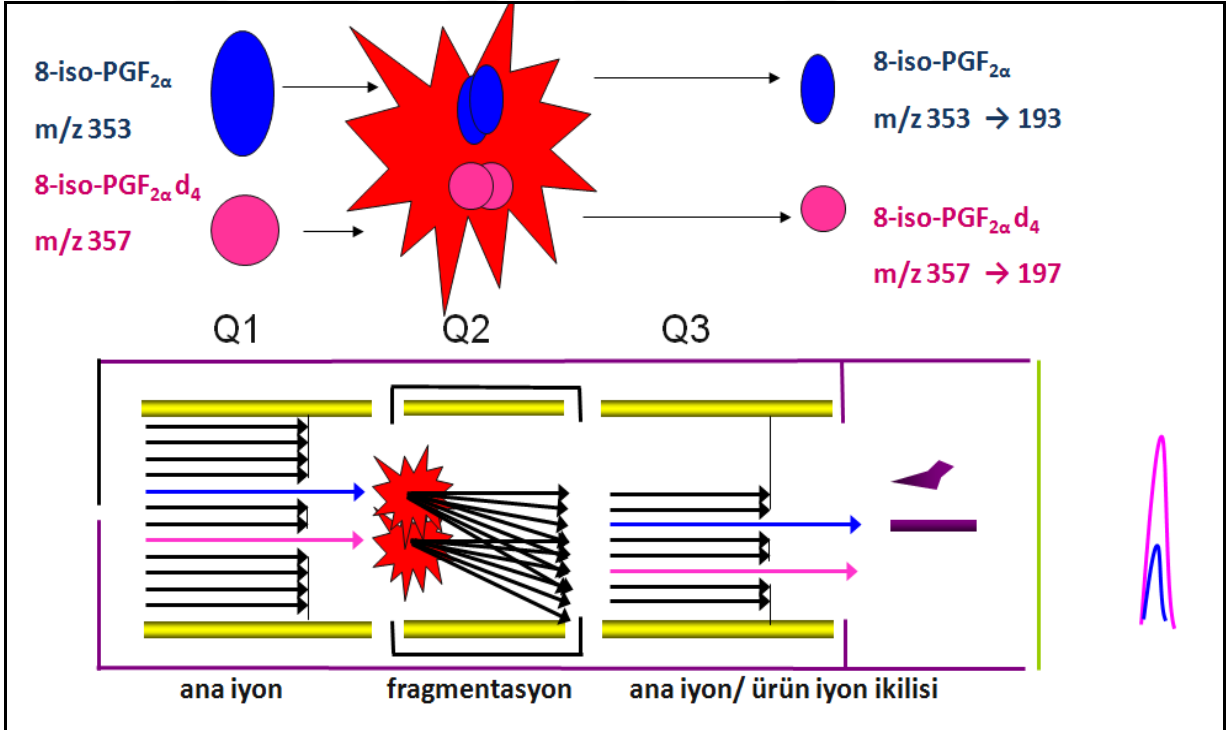
Şekil 23 b. R-cdA ve S-cdA ürün iyon spektrumu



Şekil 23 c. 8-iso-PGF_{2α} ürün iyon spektrumu

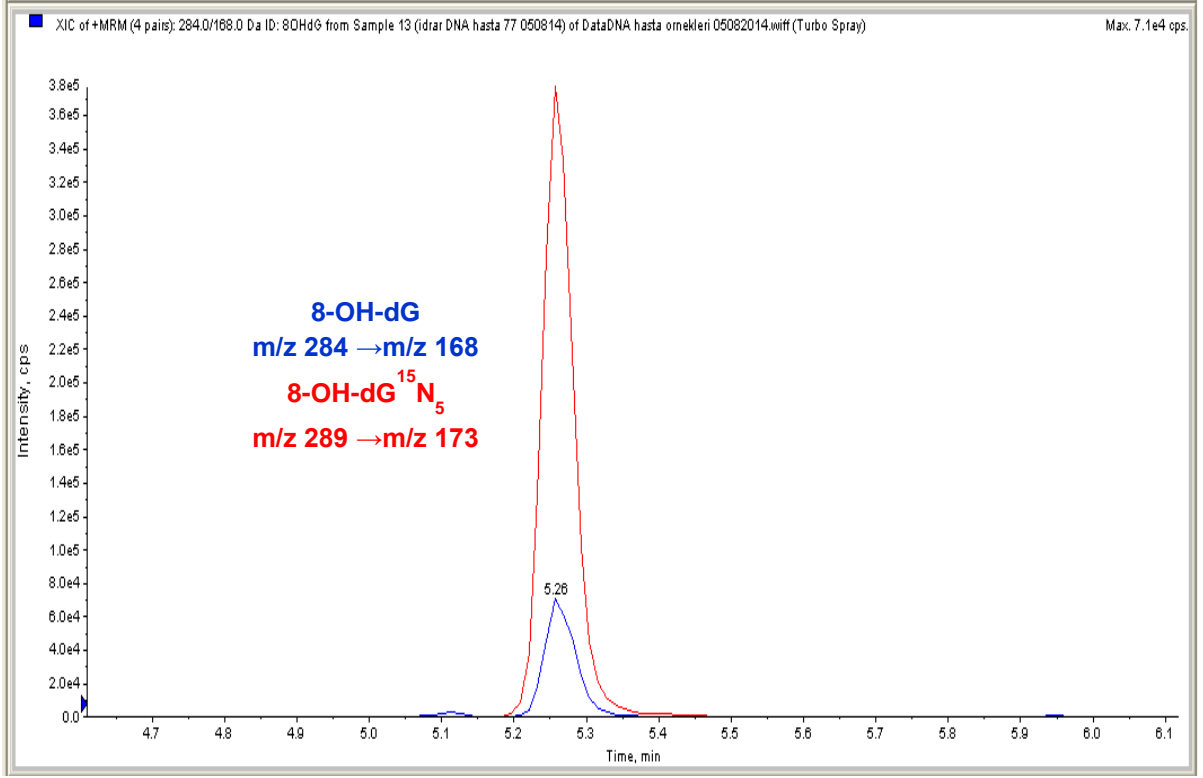


Şekil 24. 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA'ya ait ana iyon/ürün iyon çiftleri

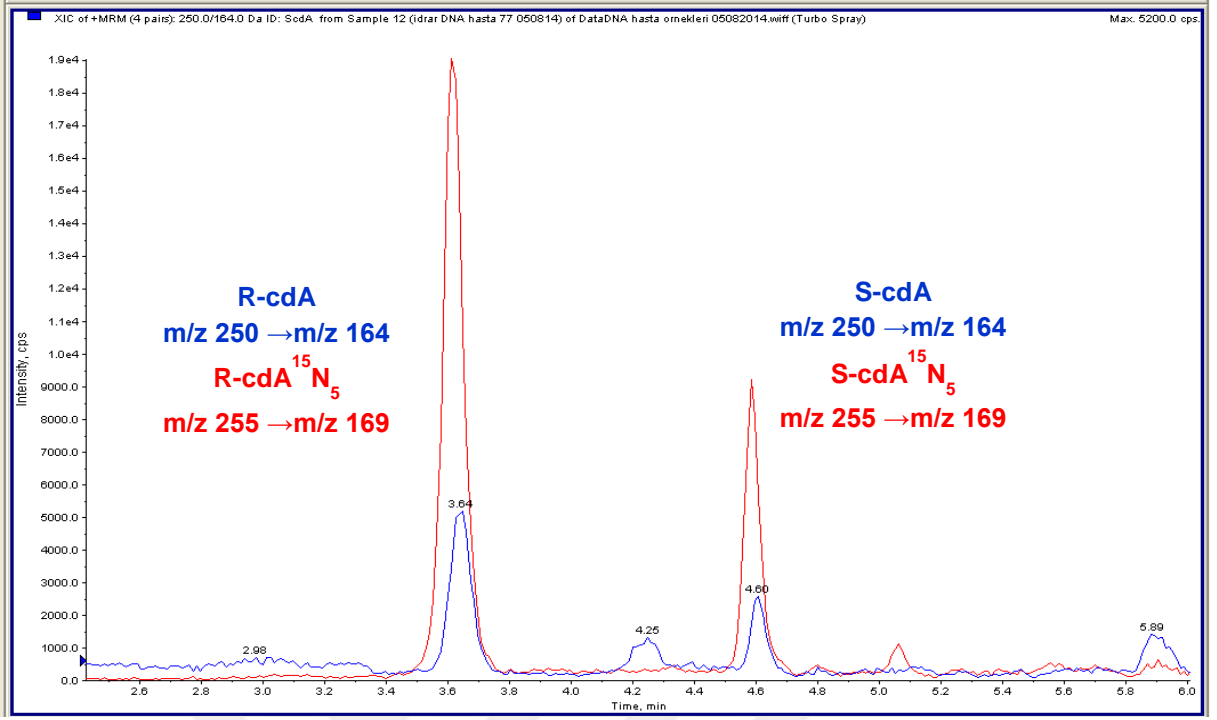


Şekil 25. 8-iso-PGF_{2α}'a ait ana iyon/ürün iyon çiftleri

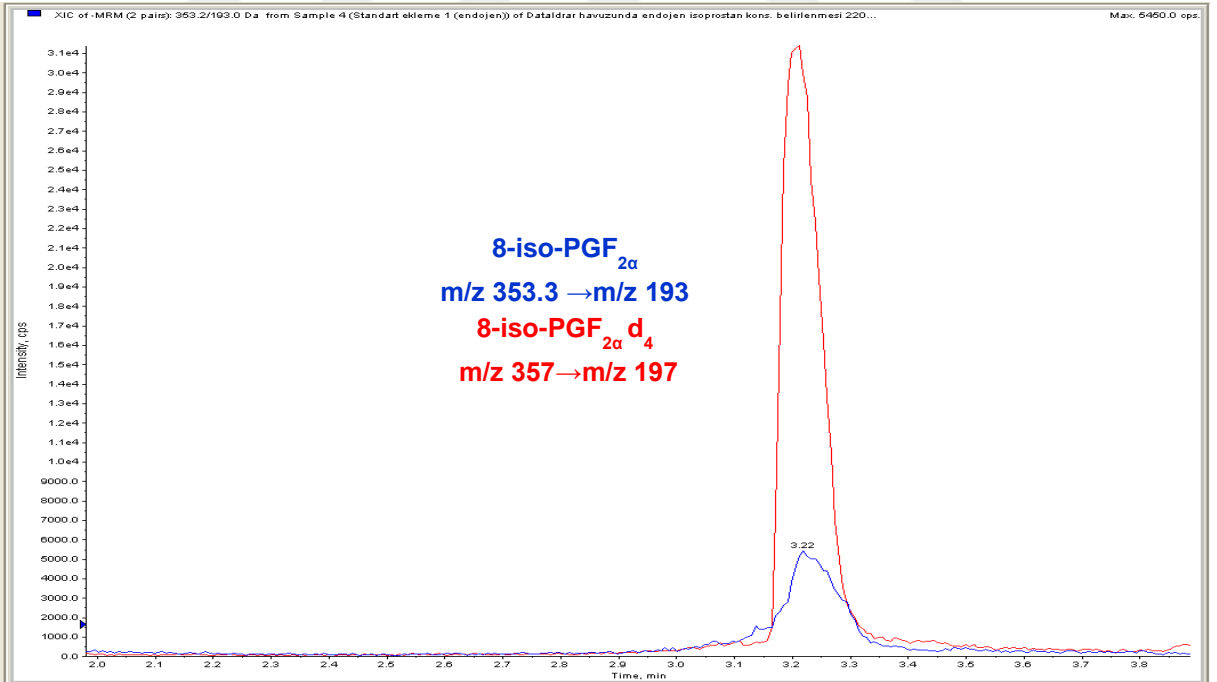
Sağlıklı idrar örneklerinin LC-MS/MS SID-MRM analizlerinden elde edilen total iyon kromatogramları **Şekil 26, 27 ve 28**'de görülmektedir. 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için alıkonma zamanları sırasıyla 5.26, 3.64, 4.60 ve 3.22 dk'dır.



Şekil 26. 8-OH-dG'nın idrarda total iyon kromatogramı



Şekil 27. R-cdA ve S-cdA'nın idrarda total iyon kromatogramı



Şekil 28. 8-iso-PGF_{2α}'ın idrarda total iyon kromatogramı

4.2. Yöntem Geçerlilik Çalışmalarının Bulguları

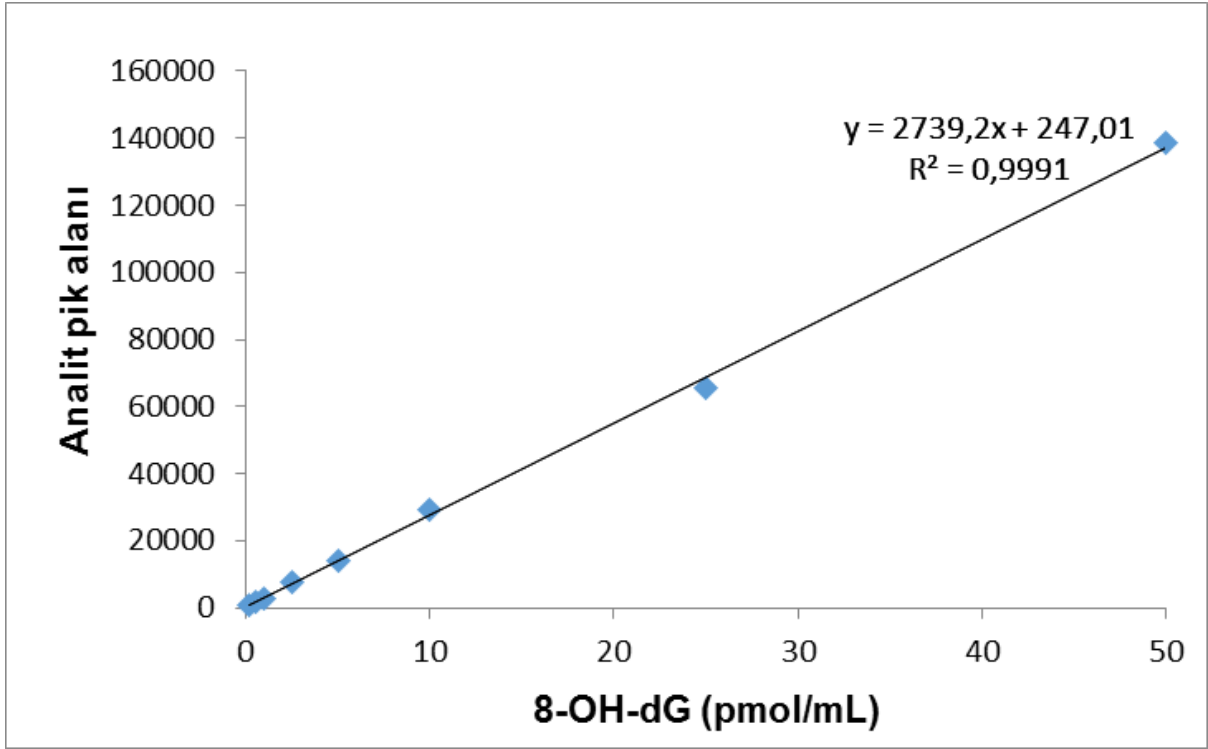
Oksidatif hasar parametrelerinin LC-MS/MS SID-MRM yöntemiyle ölçülmesi için 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} standartları ve sağlıklı bireylerden elde edilmiş idrar havuzu kullanılarak yöntem geçerlilik çalışmaları gerçekleştirildi. Bu kapsamda analitik duyarlılık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tespit ve kantitasyon limitleri belirlendi.

4.2.1. Analitik Duyarlılık

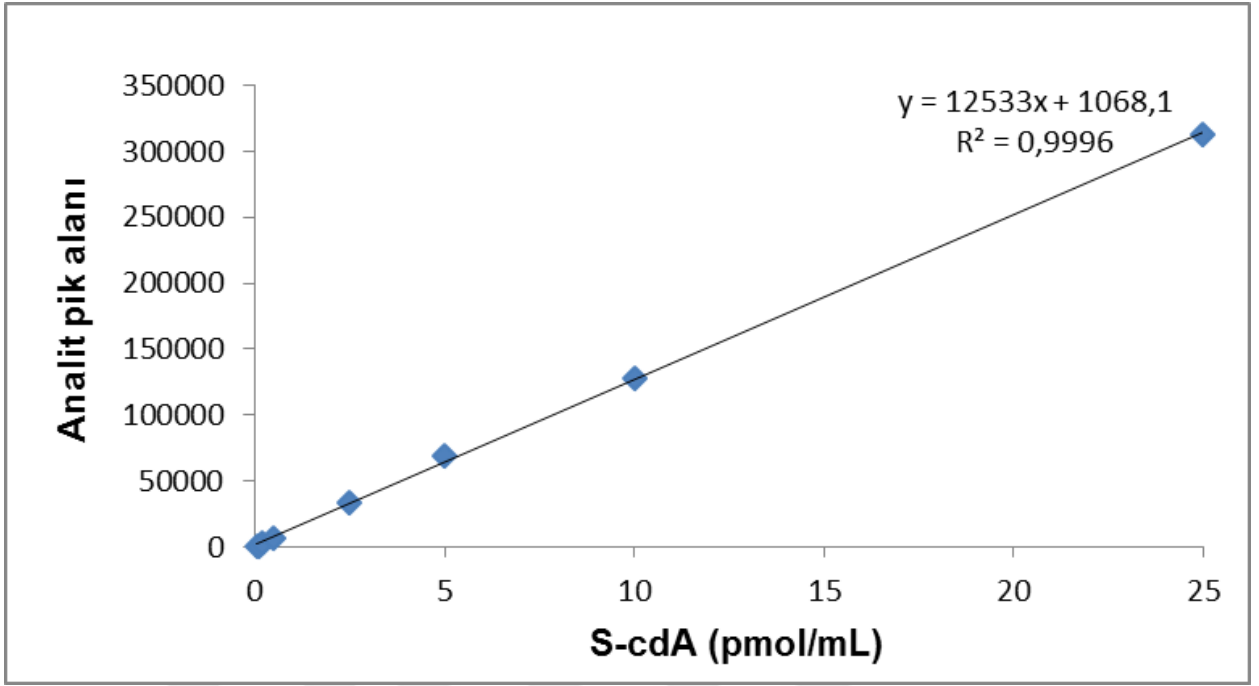
Analitik duyarlılık üç tekrarlı çizilen kalibrasyon eğrisinin eğimi ortalama \pm SS ile ifade edildi. 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ın kalibrasyon eğrisinin eğimi sırasıyla 2743.25 \pm 5.73, 1254.80 \pm 2.121 ve 2.349 \pm 0.079 olarak hesaplandı. 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için belirlenen % CV'ler 0.21, 0.17 ve 3.38'dir.

4.2.2. Doğrusallık

Yöntemimizin analitik performansının değerlendirilmesinde, oksidatif hasar parametrelerimizin herbiri için en az yedi farklı konsantrasyonda standart hazırlandı ve doğrusallık grafikleri çizildi. Her konsantrasyon üç tekrarlı olarak çalışıldı. 8-OH-dG'nin 0.2-50 pmol/mL, S-cdA'nın 0.05-25 pmol/mL ve 8-iso-PGF_{2α}'ın 0.25-20 ng/mL konsantrasyon aralığında doğrusal olduğu belirlendi, regresyon denklemleri ve korelasyon katsayısı (r^2) değerleri **Şekil 29, 30 ve 31**'de görülmektedir.

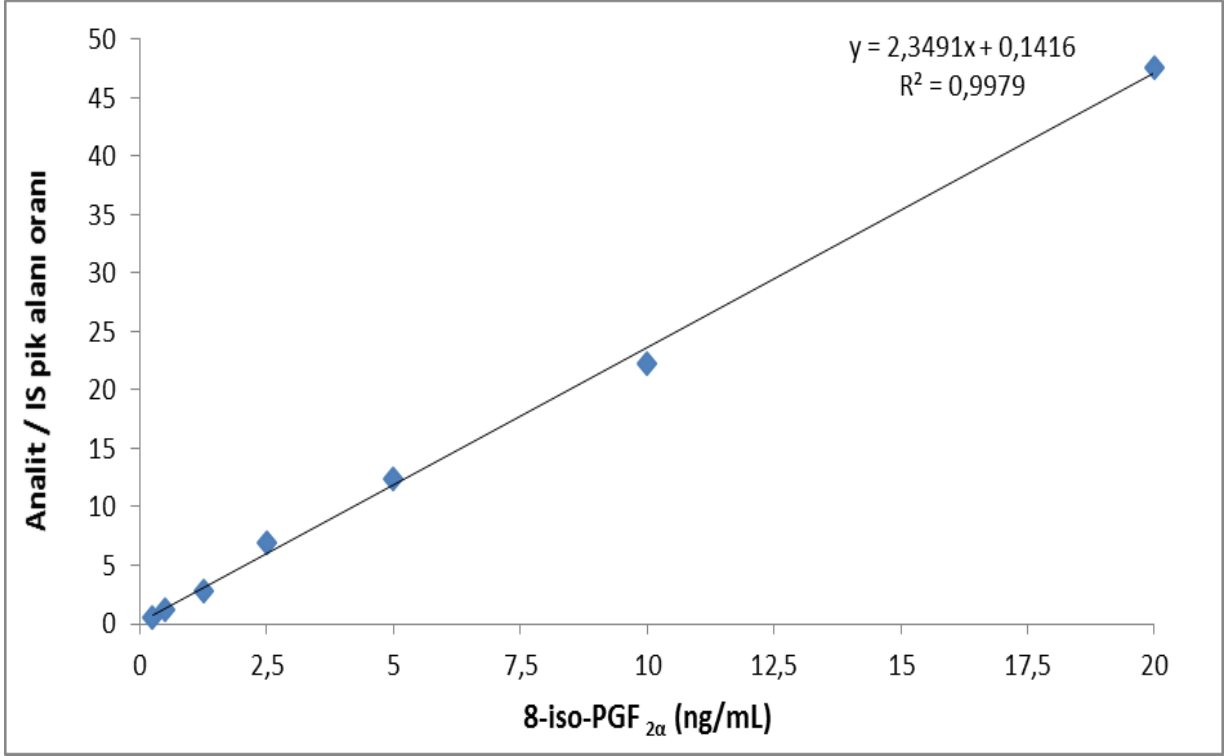


Şekil 29. 8-OH-dG kalibrasyon eğrisi
Konsantrasyon: 0.2, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 pmol/mL (n=3)



Şekil 30. S-cdA kalibrasyon eğrisi

Konsantrasyon: 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 2.5, 5, 10, 25 pmol/mL (n=3)



Şekil 31. 8-iso-PGF_{2α}'ın kalibrasyon eğrisi
Konsantrasyon: 0.25, 0.5, 1.25, 2.5, 5, 10, 20 ng/mL (n=3)

4.2.3. Doğruluk

8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} % doğruluk değerleri **Tablo 8, 9 ve 10'**da gösterilmektedir.

Tablo 8. 8-OH-dG kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu

8-OH-dG (pmol/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (n=3)	% Doğruluk
0.2	0.21	106.89
0.5	0.47	93.81
1	0.91	91.40
2.5	2.67	106.78
5	5.10	101.99
10	10.44	104.38
25	23.89	95.58
50	50.35	100.70

Tablo 9. S-cdA kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu

S-cdA (pmol/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (n=3)	% Doğruluk
0.05	0.06	126.00
0.1	0.11	112.73
0.2	0.19	97.25
0.5	0.45	89.92
2.5	2.66	106.58
5	5.49	109.84
10	10.19	101.91
25	24.96	99.82

Tablo 10. 8-iso-PGF_{2α} kalibrasyon eğrisi standartlarının doğruluğu

8-iso-PGF _{2α} (ng/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (n=3)	% Doğruluk
0.25	0.179	71.75
0.5	0.437	87.33
1.25	1.155	92.43
2.5	2.905	116.19
5	5.224	104.49
10	9.396	93.96
20	20.204	101.02

4.2.4. Kesinlik

Kesinlik çalışmalarında (n=10), 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için gün içi % CV sırasıyla % 5.2, % 4.9 ve % 1.2, günler arası % CV sırasıyla % 9.2, % 2.3 ve % 4.5 olarak belirlendi (Tablo 11 ve 12).

4.2.5. Tespit ve Kantitasyon Limiti

LC-MS/MS SID-MRM yönteminde sinyal/gürültü oranının S/N>3 olduğu konsantrasyon, en düşük tespit limiti; S/N>10 olduğu konsantrasyon ise en düşük kantitasyon limiti olarak belirlendi. 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için LOD sırasıyla 1.8×10^{-4} pmol/mL, 1.1×10^{-3} pmol/mL ve 2.4×10^{-2} ng/mL, LOQ değerleri ise sırasıyla 5.8×10^{-4} pmol/mL, 4.4×10^{-3} pmol/mL ve 38×10^{-2} ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Tablo 11. Hasarlı DNA nükleozidlerinin yöntem geçerlilik bulguları

	Doğrusallık (pmol/mL)	Gün-içi kesinlik (n=10)		Günler-arası kesinlik (n=10)		LOD	LOQ
		Ortalama±SS (pmol/mL)	% CV	Ortalama±SS (pmol/mL)	% CV	S/N≥3 (pmol/mL)	S/N≥10 (pmol/mL)
8-OH-dG	0.2-50	10.14±0.53	5.24	6.91±0.16	2.31	1.8x10 ⁻⁴	5.8x10 ⁻⁴
S-cdA	0.05-25	0.25±0.01	4.94	0.15±0.01	9.25	1.1x10 ⁻³	4.4x10 ⁻³

LOD: Tespit limiti, LOQ: Kantitasyon limiti, S/N: Sinyal gürültü oranı

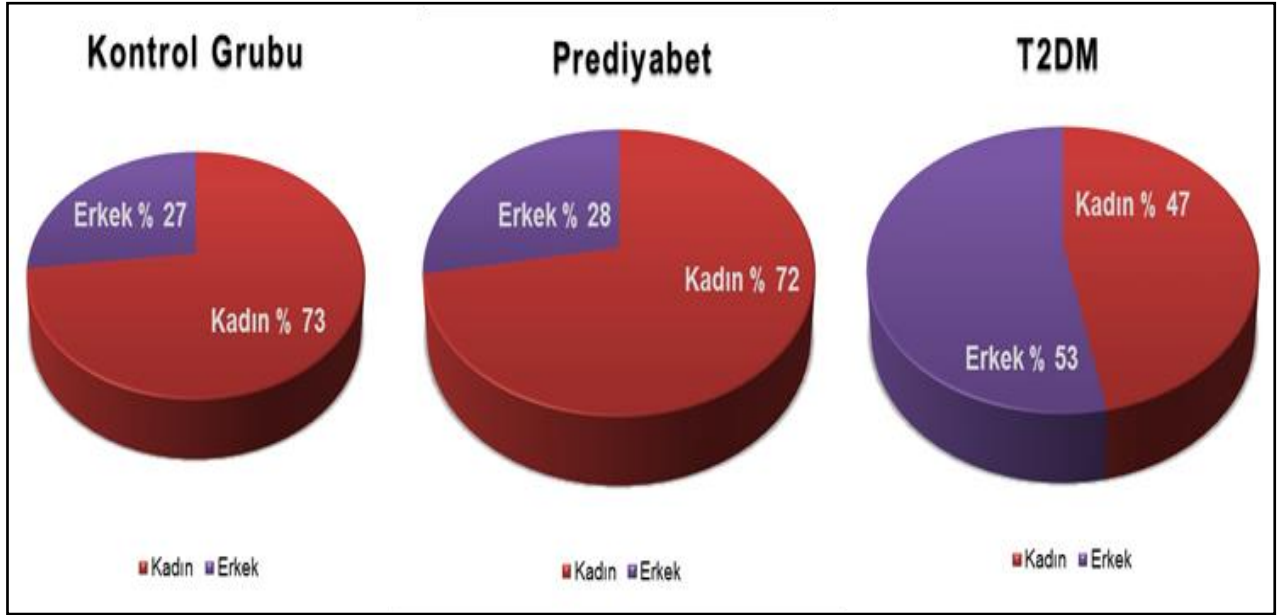
Tablo 12. İzoprostanın yöntem geçerlilik bulguları

	Doğrusallık (ng/mL)	Gün-içi kesinlik (n=10)		Günler-arası kesinlik (n=10)		LOD	LOQ
		Ortalama±SS (ng/mL)	% CV	Ortalama±SS (ng/mL)	% CV	S/N≥3 (ng/mL)	S/N≥10 (ng/mL)
8-iso-PGF _{2α}	0.25 – 20	1.25±0.01	1.20	1.25±0.02	5.32	2.4x10 ⁻²	38x10 ⁻²
		5±0.01	1.21	5±0.04	4.51		
		10±0.03	1.52	10±0.10	5.26		

LOD: Tespit limiti, LOQ: Kantitasyon limiti, S/N: Sinyal gürültü oranı

4.3. Prediyabet, T2DM Hastalarında ve Sağlıklı Kontrol Grubunda Tanımlayıcı Bulgular

Çalışmamızda sağlıklı kontrol grubuna % 73'ü kadın, % 27'si erkek olmak üzere 37 kişi, prediyabet grubuna % 72'si kadın, % 28'i erkek 47 kişi ve T2DM grubuna % 47'si kadın, % 53'ü erkek 43 kişi dâhil edildi (**Şekil 32**).



Şekil 32. Olgu ve kontrol gruplarının cinsiyete göre dağılımı

Olgu ve kontrol grubu örneklerinin demografik verileri Endokrinoloji polikliniğinde hastaların muayenesi sırasında kaydedildi ve rutin analizleri DEÜ Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Prediyabet ve T2DM gruplarında vücut kitle indeksi, bel çevresi, HbA1c, açlık kan glukozu, OGTT, ALT ve CRP düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (**Tablo 13 ve 14**). T2DM gruplarında HDL düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Trigliserid düzeylerinin T2DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlendi (**Tablo 14**). Gruplar arasında AST, BUN, total kolesterol ve LDL açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

Tablo 13. Olgu ve kontrol grubunun demografik ve antropometrik özellikleri

	Kontrol Grubu (n=37)	Prediyabet (n=47)	T2DM (n=43)	<i>p</i>
	Ortanca (Min-Max)			
Cinsiyet (Kadın/Erkek)	27/10	34/13	20/23	
Yaş (yıl)	40.50 (23-63)	48 (20-68)	51.50 (30-64)	>0.05
VKİ (kg/m²)	26.80 (20.12-41.14)	31,84 (19.83-45.01)	31.87 (22.66-46.80)	0.000 * 0.000 ¢
Bel çevresi (cm)	85 (70-121)	99 (67-122)	101 (71-160)	0.000 * 0.000 ¢
<p>Gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır. * Kontrol ile Prediyabet ¢ Kontrol ile T2DM VKİ: Vücut kitle endeksi</p>				

Tablo 14. Olgu ve kontrol grubunun rutin laboratuvar verileri

	Kontrol Grubu (n=37)	Prediyabet (n=47)	T2DM (n=43)	<i>P</i>
	Ortanca (Min-Max)			
HbA1c (%)	5.40 (4.90-6.10)	5.80 (5-6.40)	7.20 (5.80-18)	0.000 [¥] 0.000 [¤]
AKŞ (mg/dL)	83 (75-98)	105 (90-122)	131 (84-338)	0.000 [¥] 0.000 [¤]
OGTT (mg/dL)	112.50 (79-163)	121.50 (67-189)	212.50 (108-586)	0.000 [¤] 0.000 [£]
ALT (U/L)	17 (9-43)	21.50 (7-58)	29 (6-172)	0.005 [¤] 0.011 [£]
AST (U/L)	18 (13-29)	19.50 (12-34)	23.50 (9-128)	>0.05
CRP (mg/dL)	1.85 (0.20-24)	3.55 (0.40-19.30)	3.75 (0.60-55.50)	0.019 [¥] 0.018 [¤]
BUN (mg/dL)	12 (8-23)	12.50 (7-26)	12 (9-49)	>0.05
Total Kolesterol (mg/dL)	206 (153-300)	213.50 (148-276)	212.50 (129-372)	>0.05
LDL (mg/dL)	132 (88-208)	135 (69-196)	129.50 (68-312)	>0.05
HDL (mg/dL)	51 (35-94)	46 (31-96)	42.50 (29-68)	0.001 [¤]
Trigliserid (mg/dL)	89 (37-306)	119.50 (55-343)	162.50 (43-645)	>0.05

Gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

[¥]Kontrol ile Prediyabet
[¤] Kontrol ile T2DM
[£] Prediyabet ile T2DM

AKŞ: Açlık kan glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, CRP: c-reaktif protein, BUN: Kan üre nitrojen testi, LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein, HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

4.4. Hasarlı DNA Nükleozidlerinin ve İzoprostanın Kantitatif Analizleri

Olgu ve sağlıklı kontrol grubundan toplanan idrar örneklerinde;

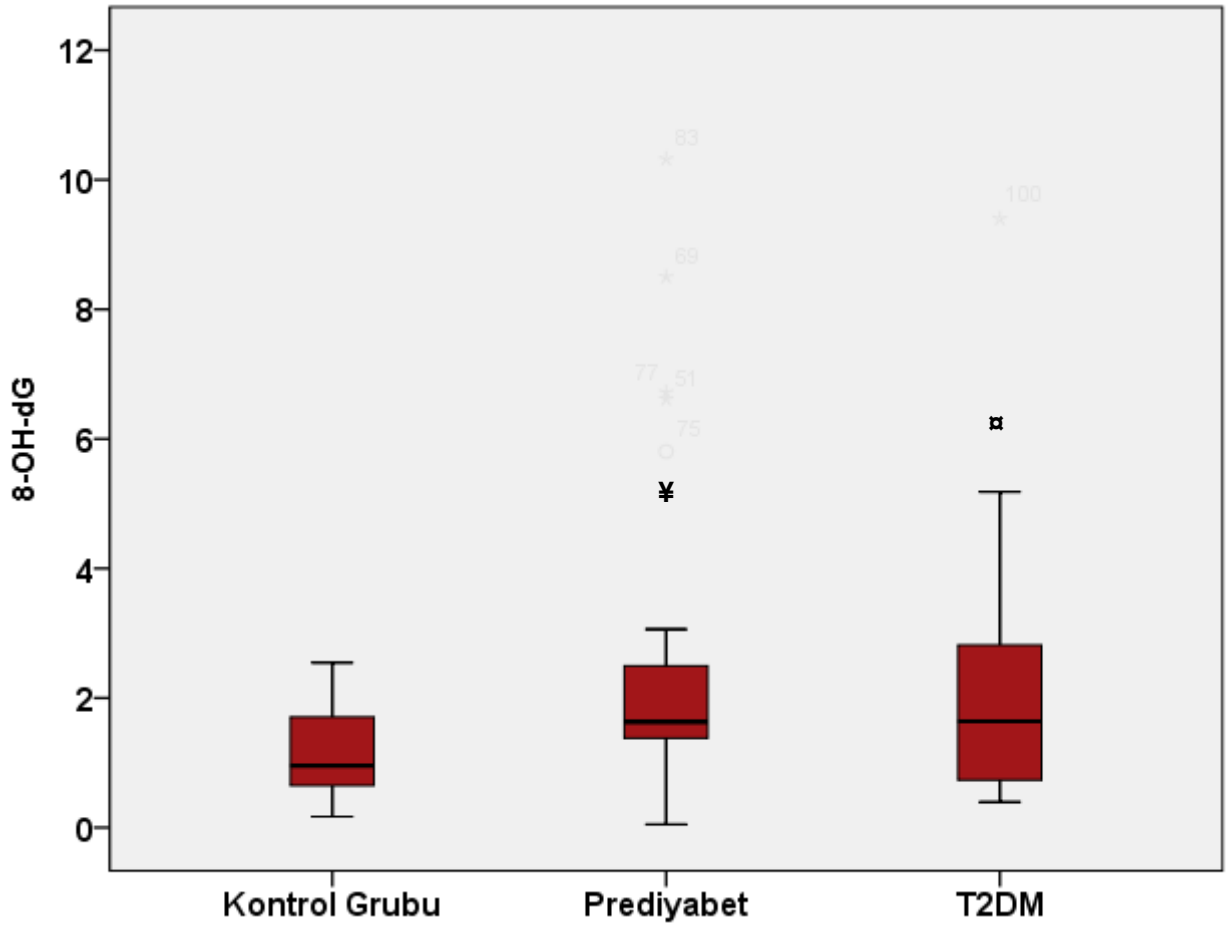
- 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA,
- 8-iso-PGF_{2α}'ın LC-MS/MS SID-MRM yöntemi ile kantitatif analizleri

gerçekleştirildi. Prediyabet hastalarının idrar örneklerinde 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (**sırasıyla p <0.0001, p=0.011 ve p=0.006**), (**Şekil 33, 34 ve 36**). 8-OH-dG düzeylerinin T2DM hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğu gözlemlendi (**p=0.031**), (**Tablo 15**), (**Şekil 33 ve 36**). R-cdA düzeylerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı (**Şekil 35**). Oksidatif makromolekül hasarı açısından prediyabet ve T2DM hastaları arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

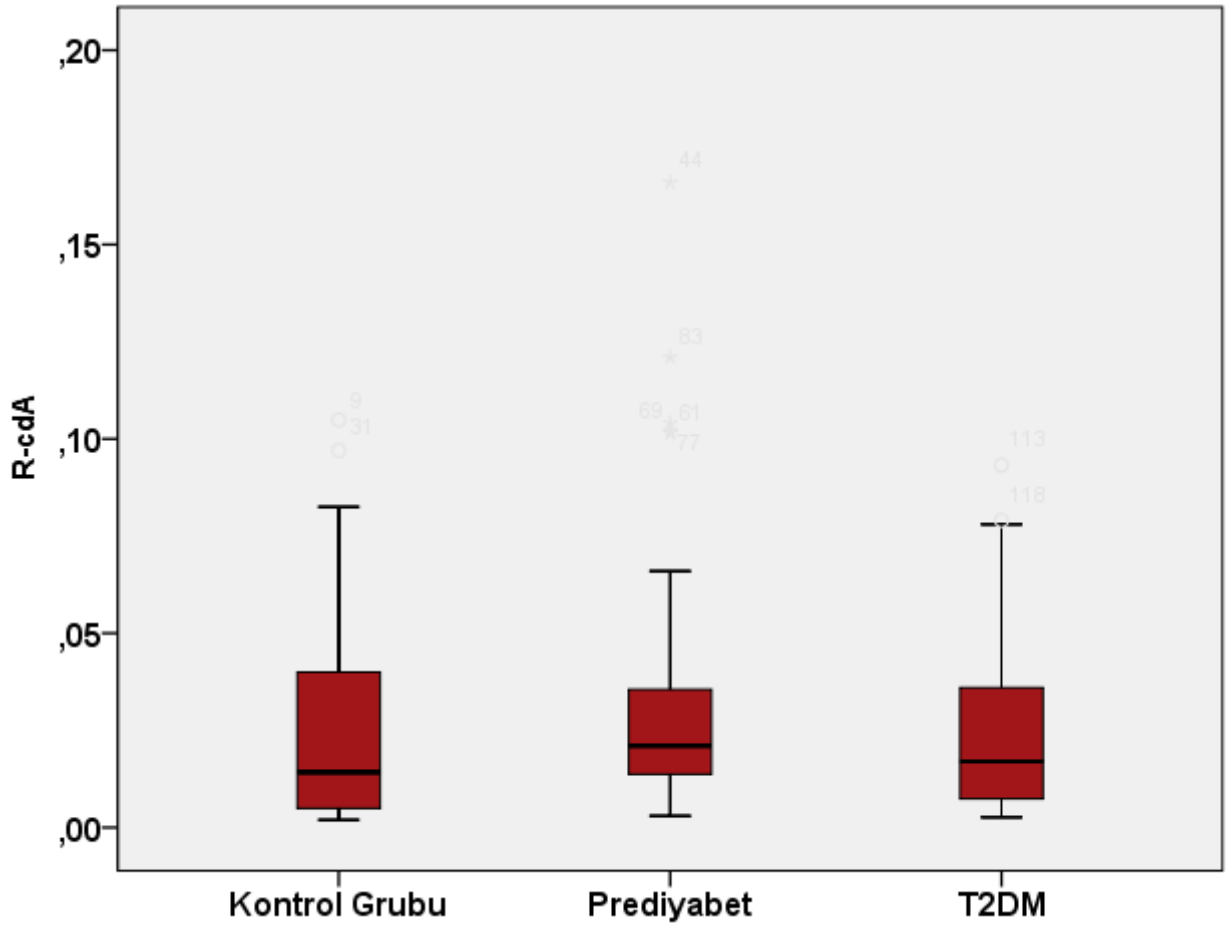
Tablo 15. Olgu ve kontrol grubu idrar örneklerinde 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri

Oksidatif stres parametreleri	Kontrol Grubu (n=37)	Prediyabet (n=47)	T2DM (n=43)	P
	Ortanca (Min-Max)			
8-OH-dG (nmol/mmol kr)	0.955 (0.171-2.546)	1.625 (0.050-10.323)	1.641 (0.394-9.399)	<0.0001 * 0.031 †
R-cdA (nmol/mmol kr)	0.014 (0.002-0.105)	0.021 (0.003-0.166)	0.017 (0.003-0.093)	>0.05
S-cdA (nmol/mmol kr)	0.027 (0.003-0.121)	0.039 (0.004-0.121)	0.037 (0.007-0.518)	0.011 *
8-iso-PGF_{2α} (ng/mg kr)	0.134 (0.015-0.344)	0.239 (0.010-0.750)	0.163 (0.013-0.712)	0.006 *

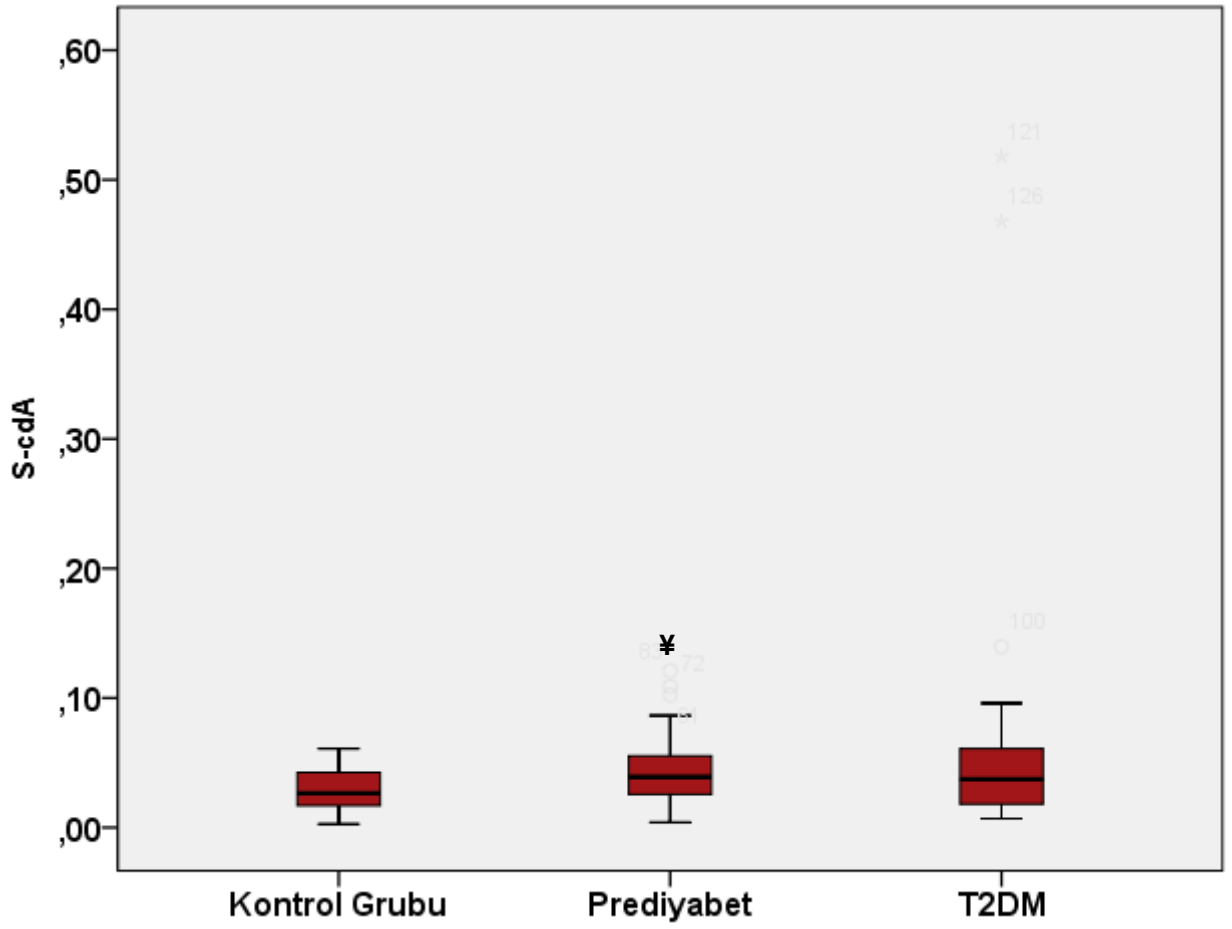
Gruplar Kruskal Wallis testi ile karşılaştırıldığında p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlıdır.
*Kontrol ile Prediyabet
† Kontrol ile T2DM
8-OH-dG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, R-cdA ve S-cdA: 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin, 8-iso-PGF_{2α}: 8-izoprostan, Kr: Kreatinin



Şekil 33. Olgu ve kontrol grubunda 8-OH-dG düzeyleri
 8-OH-dG düzeyleri ortanca değerleri ile gösterilmiştir.
 $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.
 *Kontrol ile prediyabet; ¤ Kontrol ile T2DM



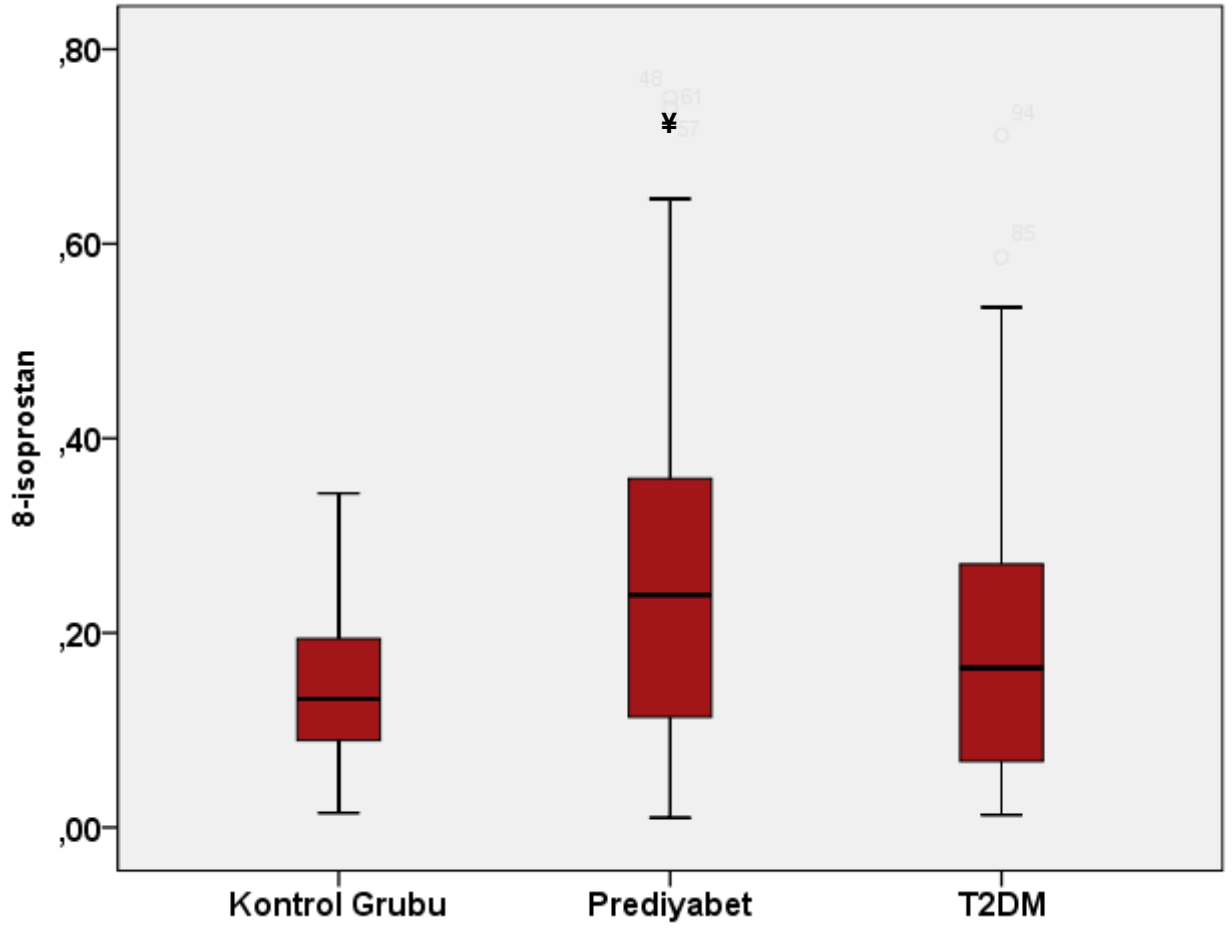
Şekil 34. Olgu ve kontrol grubunda R-cdA düzeyleri
R-cdA düzeyleri ortanca değerleri ile gösterilmiştir.



Şekil 35. Olgu ve kontrol grubunda S-cdA düzeyleri
S-cdA düzeyleri ortanca değerleri ile gösterilmiştir.

$p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.

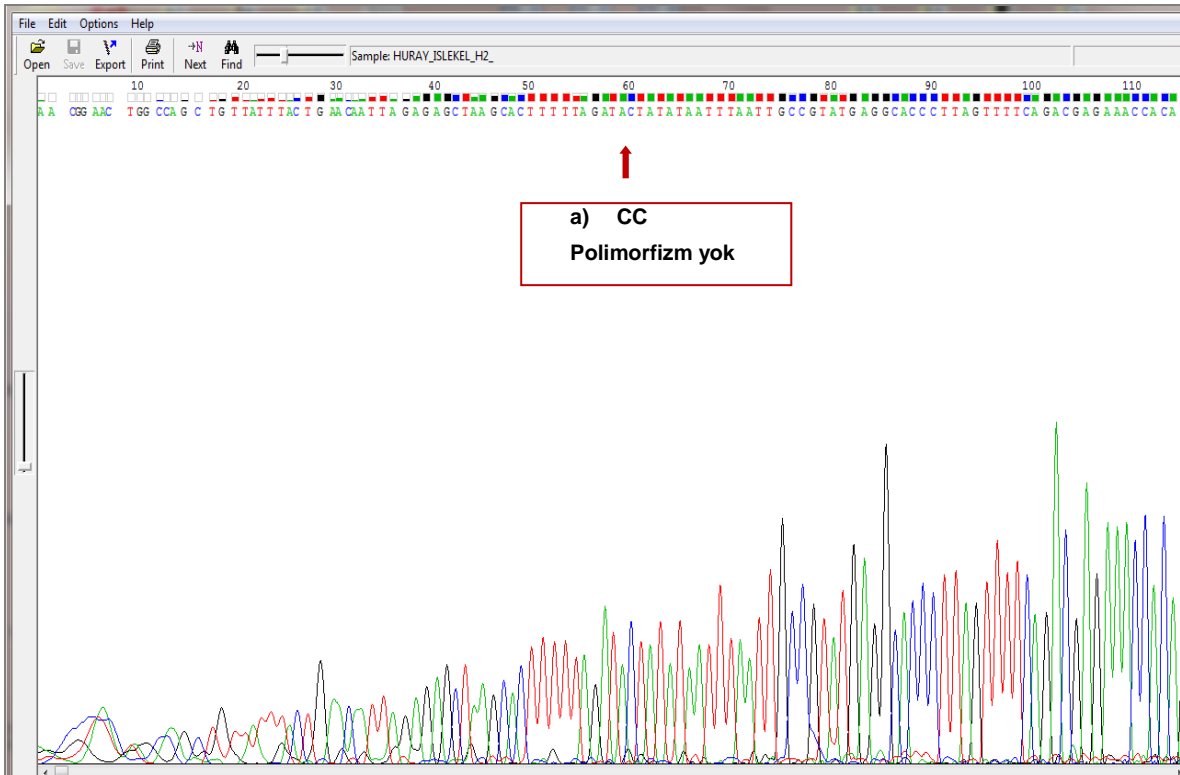
*Kontrol ile prediyabet



Şekil 36. Olgu ve kontrol grubunda izoprostan düzeyleri
İzoprostan düzeyleri ortanca değerleri ile gösterilmiştir.
 $p < 0.05$ ise istatistiksel olarak anlamlıdır.
*Kontrol ile prediyabet

4.5. TCF7L2 SNP Analizlerinin Bulguları

TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi, DNA dizisinde sitozinin timin ile yer değiştirmesiyle ortaya çıkar. Çalışmamızda TCF7L2 polimorfizmi olgu ve kontrol grubu kan örneklerinde DNA dizi analizi ile incelendi. Elde edilen verilerin ilgili SNP bölgeleri blast2sequences programında belirlendi ve bu bölgelerin genotipleri (CC, CT ve TT) Chromas Lite programı ile tarandı (**Şekil 37 ve 38**).





Şekil 37. DNA dizi analizi bulgularının değerlendirilmesi ve genotiplerin belirlenmesi

Sağlıklı kişilerden temsili bir DNA dizi analizi verisi gösterilmektedir.

- TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi gözlenmedi
- TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi heterozigot CT alellerini taşıyan örnek bir DNA dizisi
- TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi homozigot TT alellerini taşıyan örnek bir DNA dizisi

BLAST® Basic Local Alignment Search Tool

Home Recent Results Saved Strategies Help

NCBI/BLAST/blastn suite-2sequences/ Formatting Results - RN35Y21Z114

Edit and Resubmit Save Search Strategies Formatting options Download

Blast 2 sequences

NC_000010:Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p2...

RID [RN35Y21Z114](#) (Expires on 06-13 15:39 pm)

Query ID [gi|568815588|ref|NC_000010.11|](#)

Description Homo sapiens chromosome 10, GRCh38.p2 Primary Assembly

Molecule type dna

Query Length 133797422

Subject ID Id|Query_65059

Description HURAY_ISLEKEL_H36_

Molecule type nucleic acid

Subject Length 587

Program BLASTN 2.2.31+ Citation

Other reports: Search Summary Taxonomy reports

Graphic Summary

Distribution of 1 Blast Hits on the Query Sequence

Mouse over to see the define, click to show alignments

Color key for alignment scores

Query 1 25000000 50000000 75000000 100000000 125000000

Range 1: 9 to 260 Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
466 bits(252)	3e-130	252/252(100%)	0/252(0%)	Plus/Plus
Query 112998543	CAGCTGTTATTTACTGAACAATTAGAGAGCTAAGCACCTTTTAGATACTATATAAATTTAA	112998602		
Sbjct 9	CAGCTGTTATTTACTGAACAATTAGAGAGCTAAGCACCTTTTAGATACTATATAAATTTAA	68		
Query 112998603	TTGCCGTATGAGGCACCCCTTAGTTTTAGACGAGAAACCACAGTTACAGGGAAGGCAAGT	112998662		
Sbjct 69	TTGCCGTATGAGGCACCCCTTAGTTTTAGACGAGAAACCACAGTTACAGGGAAGGCAAGT	128		
Query 112998663	AACTTAGTCAATGTCAGATAACTAGGAAAAGGTTAGAGGGGCCCTGGACACAGGCCTGTG	112998722		
Sbjct 129	AACTTAGTCAATGTCAGATAACTAGGAAAAGGTTAGAGGGGCCCTGGACACAGGCCTGTG	188		
Query 112998723	TGACTGAGAAGCTTGGGCACCTTCACTGCTACATTTTCATCTCTTCGCTATAAACATTTTAG	112998782		
Sbjct 189	TGACTGAGAAGCTTGGGCACCTTCACTGCTACATTTTCATCTCTTCGCTATAAACATTTTAG	248		
Query 112998783	CTTTTTGTGTTT	112998794		
Sbjct 249	CTTTTTGTGTTT	260		

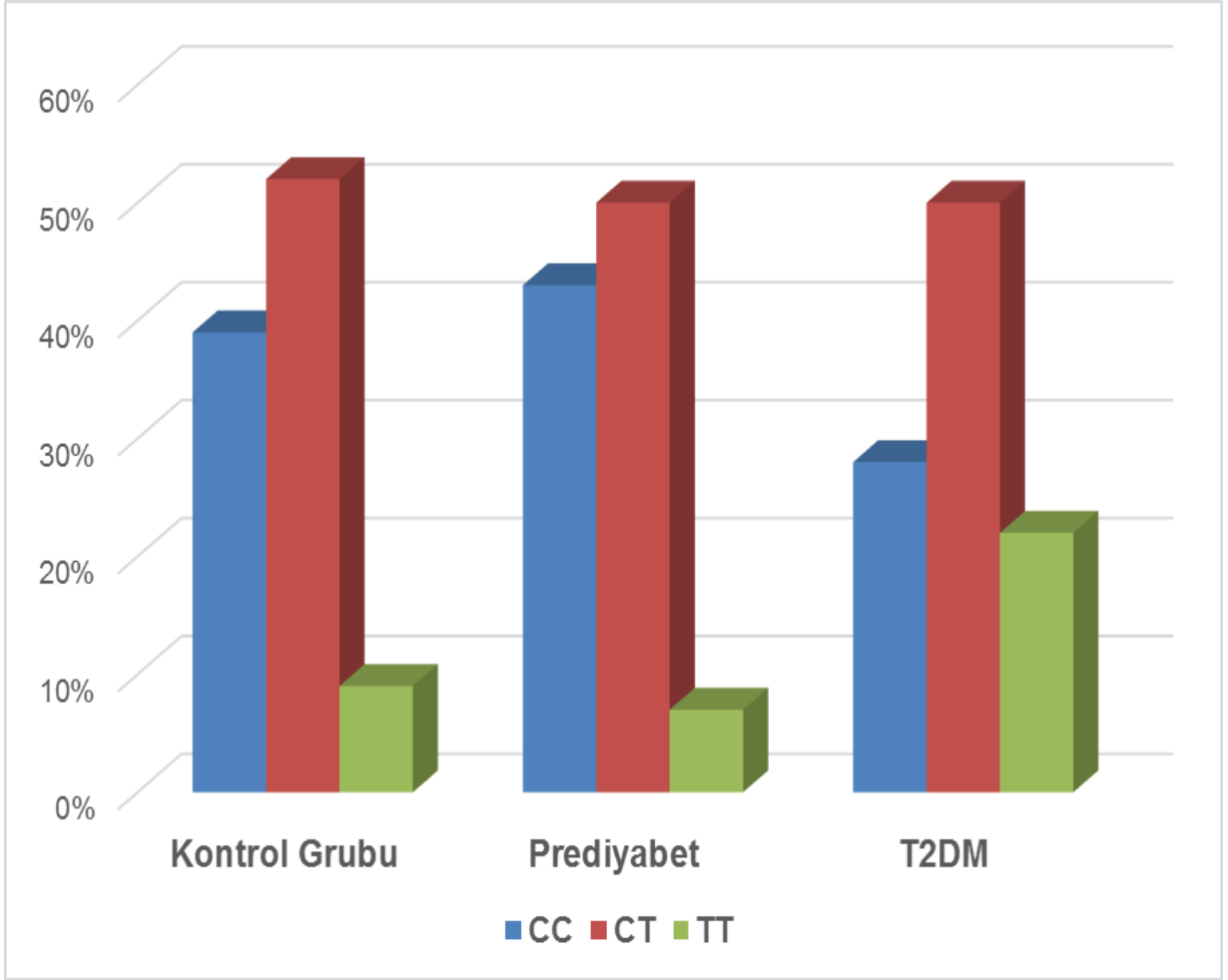
Şekil 38. Blast2sequence programında TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin değerlendirilmesi

Kontrol grubunun % 39'unda polimorfizm yoktur, % 52'si heterozigot CT alellerini ve % 9'u homozigot TT alellerini taşımaktadır. Prediyabet grubunun % 43'ünde polimorfizm yokken, % 50'sinde heterozigot CT alelleri ve % 7'sinde homozigot TT alelleri gözlenmektedir. Tip 2 diyabet hastalarının % 28'inde polimorfizm yoktur, % 50'si heterozigot CT alellerini ve % 22'si homozigot TT alellerini taşımaktadır (**Tablo 16, Şekil 39**).

Tablo 16. Olgu ve kontrol grubunda TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin genotipleri

GENOTİP			
TCF7L2			
	CC	CT	TT
Kontrol Grubu	10 (% 39)	13 (% 52)	2 (% 9)
Prediyabet	12 (% 43)	14 (% 50)	2 (% 7)
T2DM	9 (% 28)	16 (% 50)	7 (% 22)

Gruplar arasındaki fark Ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır.



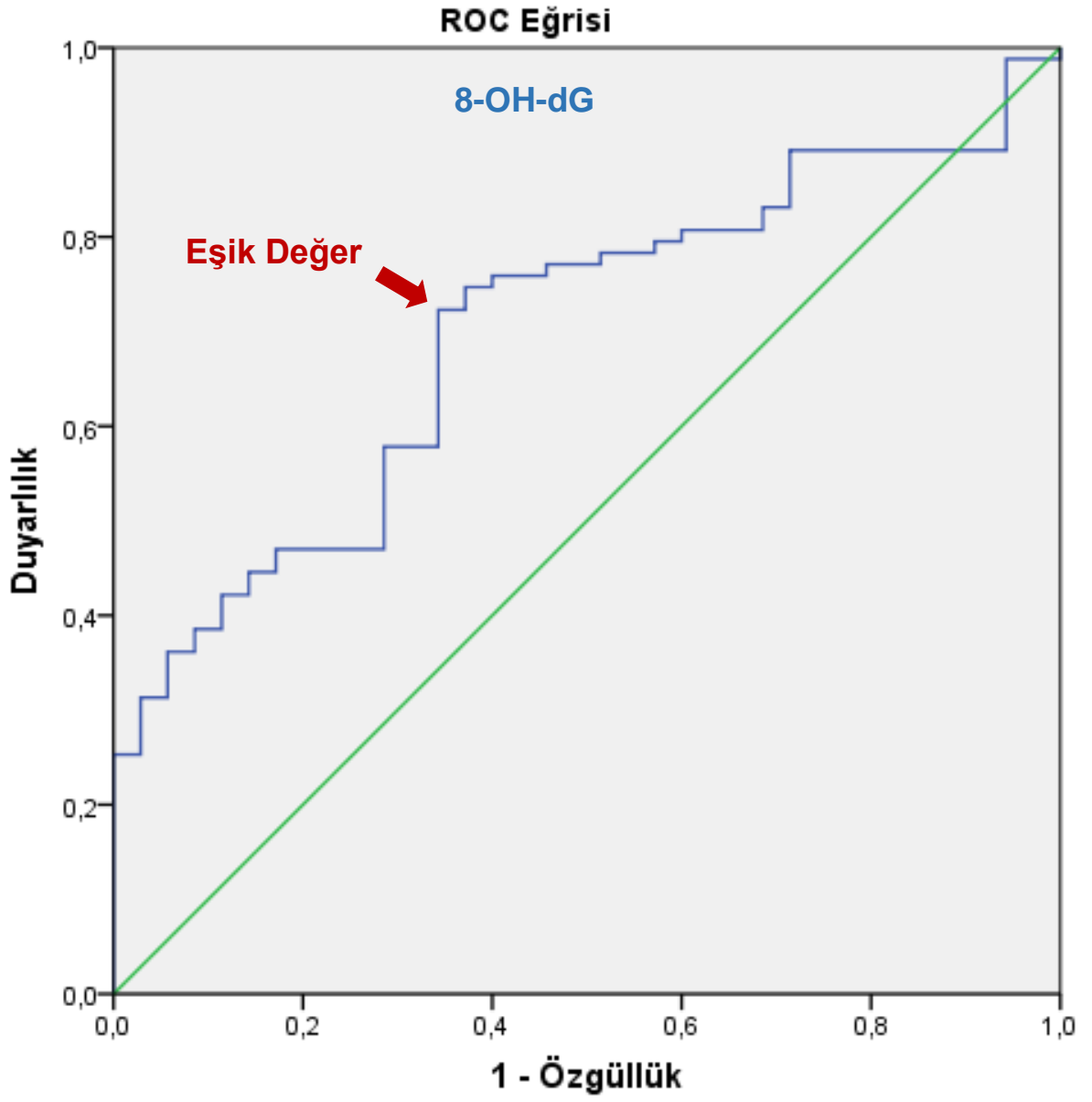
Şekil 39. TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin gruplara göre dağılımı

4.6. Oksidatif Hasarın TCF7L2 Polimorfizmine Göre Değerlendirilmesi

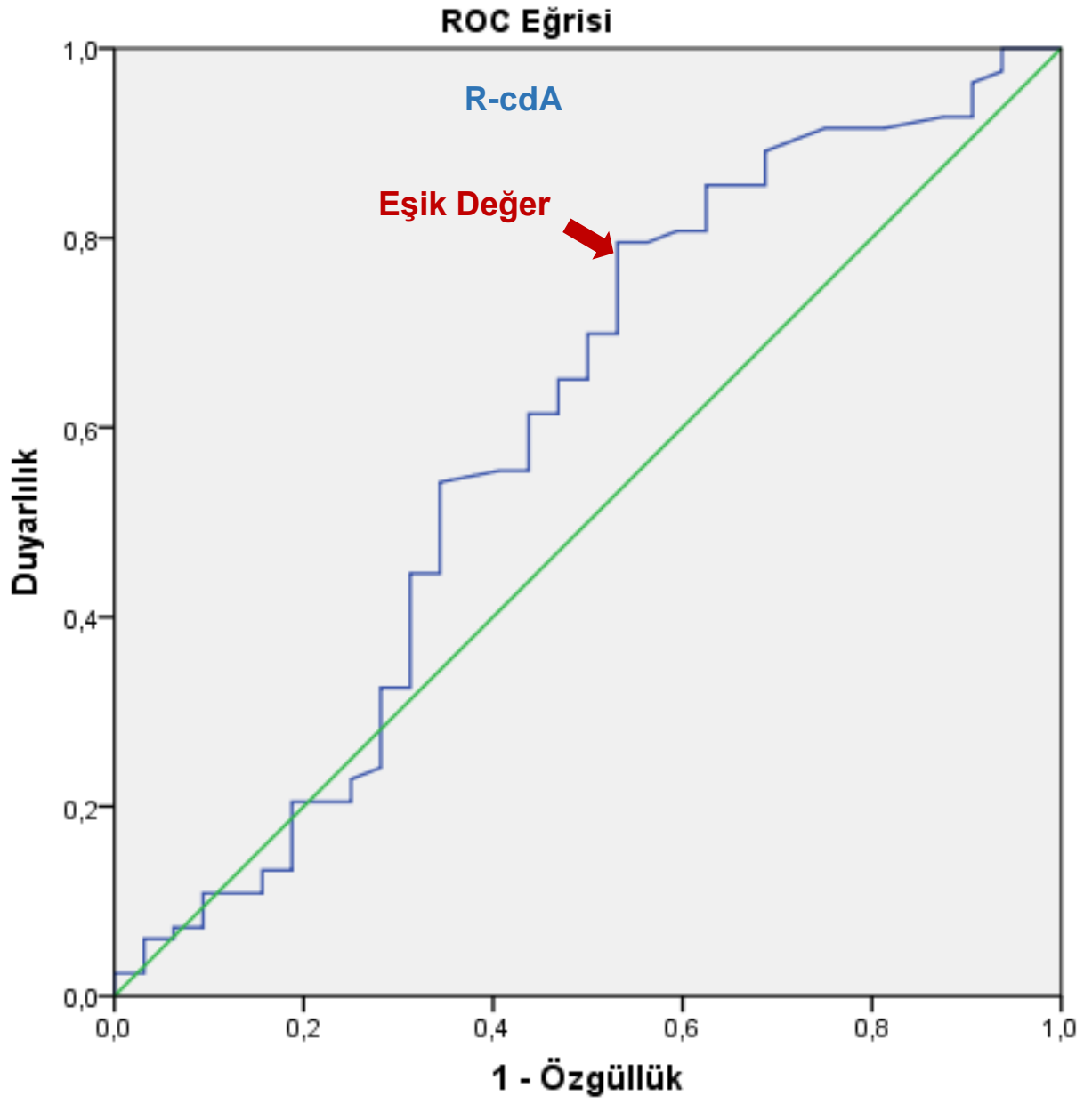
Oksidatif hasarın TCF7L2 polimorfizmine göre değerlendirilmesi için öncelikle olguların oksidatif hasar düzeyine göre gruplandırılması gereklidir. Bu amaçla prediyabet ve T2DM olgularını kapsayan disglisemi grubu ile normoglisemik sağlıklı kontrol grubunda 8-OH-dG, R-cdA ve S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için hiperglisemik koşullarda belirleyici olan eşik değerlerinin bulunması amacıyla ROC eğrileri çizildi (**Şekil 40, 41, 42 ve 43**).

4.6.1. Oksidatif Stres Parametrelerinin Eşik Değerlerinin Belirlenmesi ve Tanısal Performansı

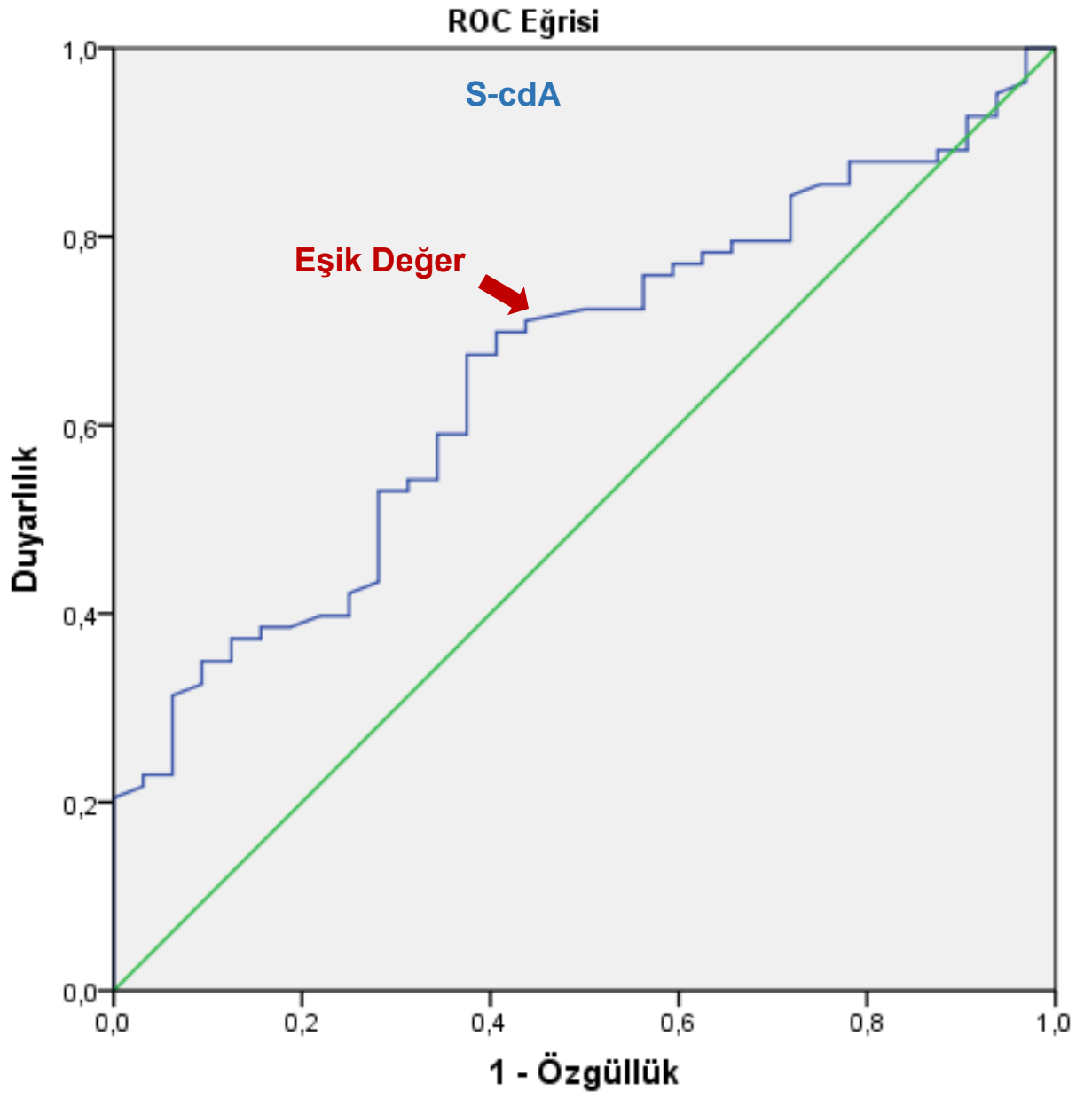
ROC eğrisi, farklı eşik değerleri için dikey eksen üzerinde doğru pozitiflik (duyarlılık) ve yatay eksen üzerinde yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranlarının yer aldığı bir eğridir. ROC eğrisi üzerindeki her nokta, farklı eşik değerlerine karşılık gelen duyarlılık ve 1-özgüllük değerlerini ortaya koyar. Genelde düşük yanlış pozitiflik oranlarını veren eşik değerleri, düşük doğru pozitiflik oranına da sahiptir. Doğru pozitiflik oranı arttıkça, yanlış pozitiflik oranı da artar. Bu eğri; testin sağlıklı ve hasta bireyleri ayırt etme gücünün belirlenmesine, farklı testlerin etkinliklerinin kıyaslanmasına, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek en uygun eşik değerinin belirlenmesine olanak sağlar (118).



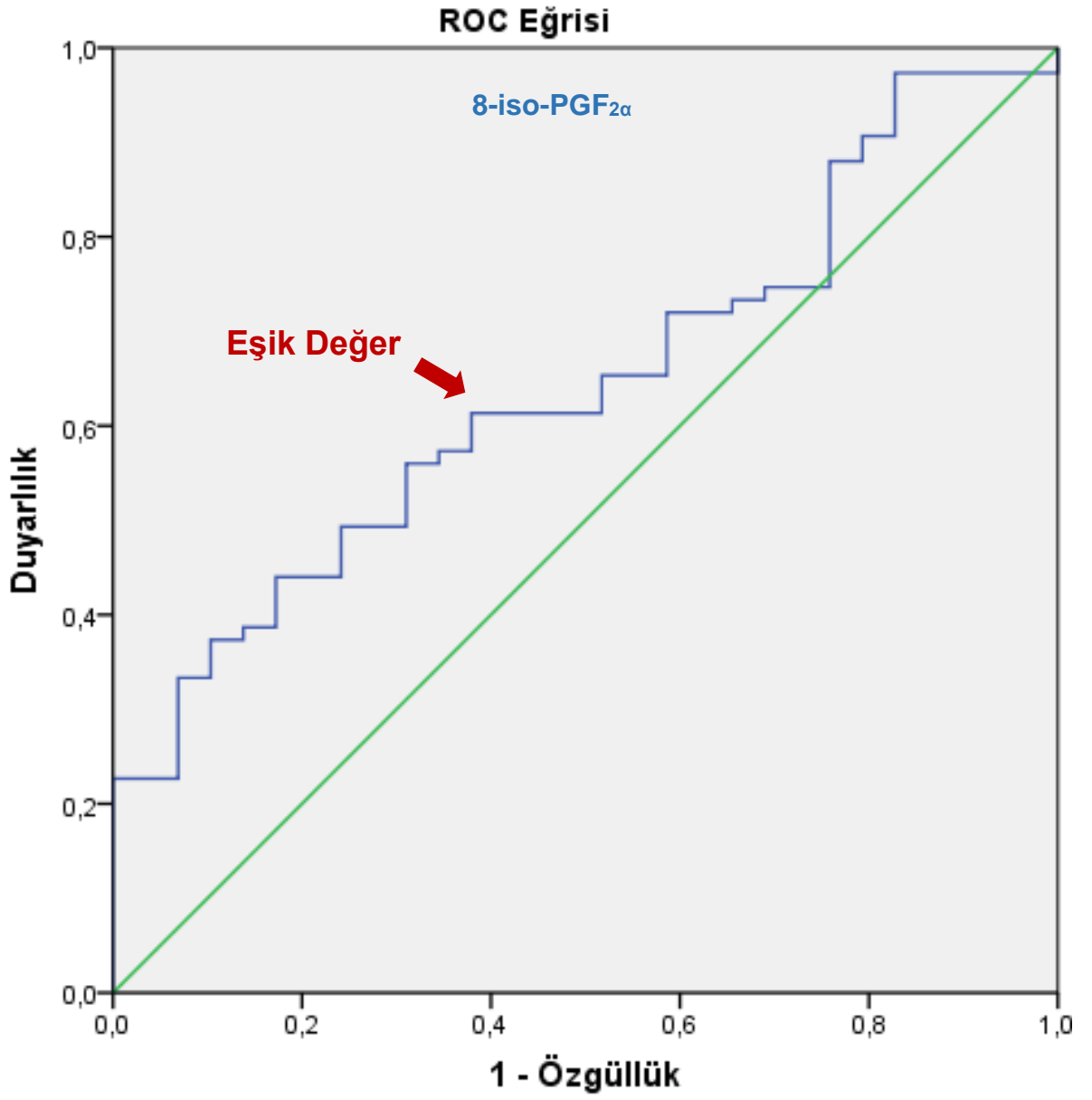
Şekil 40. 8-OH-dG'nin ROC eğrisi



Şekil 41. R-cdA'nın ROC eğrisi



Şekil 42. S-cdA'nın ROC eğrisi



Şekil 43. 8-iso-PGF_{2α}'ın ROC eğrisi

Çalışmamızda ROC eğrisinde Youden İndex yöntemi kullanılarak (ROC eğrisinde bire en yakın eşik değeri belirlenerek) 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ın eşik değerleri hesaplandı (**Tablo 17, Ek 4**)(118). ROC eğrisinde eğri altında kalan alan (AUC) bir biyobelirtecin ya da bir testin doğruluğunun ve tanısal yeterliliğinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için hesaplanan AUC değerleri sırasıyla 0.699, 0.595, 0.657 ve 0.642'dir. 8-OH-dG için 1.170 nmol/mmol kreatinin değerinin, prediyabet ve T2DM hastalarını kapsayan disglisemik olgularda % 75 duyarlılık ve % 63 özgüllükle belirleyici olduğu gösterildi. S-cdA için 0.027 nmol/mmol kreatinin değerinin % 71 duyarlılık ve % 56 özgüllükle, 8-iso-PGF_{2α} için 0.146 ng/mg kreatinin değerinin % 61 duyarlılık ve % 62 özgüllükle prediyabet ve T2DM hastalarını kapsayan disglisemik olgular için belirleyici olduğu bulundu. Bizim çalışmamızda bu düzeyler hastalara tanı koymak amacıyla kullanılmamıştır. Olgu ve kontrol grubundaki kişilerin oksidatif hasar düzeyleri bu değerlerden yararlanılarak belirlendi. Düşük ve yüksek oksidatif hasar gruplarına ayrılan kişiler TCF7L2 polimorfizmi açısından değerlendirildi.

Tablo 17. Oksidatif stres parametrelerinin eşik değerlerinin belirlenmesi

Oksidatif Stres Parametreleri	AUC	% 95 Güven Aralığı	Duyarlılık	Özgüllük	Eşik Değeri
8-OH-dG	0.699	0.603-0.795	% 75	% 63	1.170 (nmol/mmol kr)
R-cdA	0.595	0.468-0.721	% 79	% 44	0.008 (nmol/mmol kr)
S-cdA	0.657	0.553-0.761	% 71	% 56	0.027 (nmol/mmol kr)
8-iso-PGF_{2α}	0.642	0.533-0.752	% 61	% 62	0.146 (ng/mg kr)

AUC: Eğri altında kalan alan
8-OH-dG: 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin, R-cdA ve S-cdA: 8,5'-siklo-2'-deoksiadenozin,
8-iso-PGF_{2α}: 8-izoprostan, kr: kreatinin

8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için ROC analizlerinde belirlenen eşik değerler kullanılarak olgu ve kontrol grubuna ait tüm bireyler yüksek oksidatif hasar ve düşük oksidatif hasar düzeyleri olarak gruplandırıldı. Oksidatif stres parametrelerinden en az üçünün yüksek düzeyde bulunduğu bireyler yüksek oksidatif hasar grubuna, üçten azının yüksek olduğu kişiler ise düşük oksidatif hasar grubuna dâhil edildi. Daha sonra TCF7L2 polimorfizmi olan ve olmayan kişilerde oksidatif hasar düzeyleri incelendi. TCF7L2 polimorfizmi olan ve olmayan kişilerde oksidatif hasar düzeyleri arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. TCF7L2 polimorfizmi olmayan kişilerin % 33'ünde oksidatif hasar düzeyinin düşük olduğu, % 67'sinin oksidatif hasar düzeylerinin yüksek olduğu belirlendi. TCF7L2 polimorfizmi olan kişilerin % 52'sinde oksidatif hasar düzeyleri düşük, % 48'inde ise yüksek bulundu (**Tablo 18**).

Tablo 18. TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi olan ve olmayan kişilerde oksidatif hasar düzeyleri

Oksidatif Hasar Düzeyi			
		Düşük	Yüksek
TCF7L2 rs7903146 Tek Nükleotid Polimorfizmi	Yok	10 (% 33)	20 (% 67)
	Var	28 (% 52)	26 (% 48)

4.7. Korelasyon Analizleri

DNA nükleozid hasarı ve izoprostan düzeylerinin ölçümüyle elde edilen bulgular ile hastaların rutin laboratuvar verileri, klinik bulguları ve demografik parametreleri arasındaki ilişkilere ait istatistiksel olarak anlamlı bulunan korelasyon analizleri **Tablo 19, 20 ve 21**'de gösterilmiştir.

Kontrol grubunda; 8-OH-dG'nin S-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu, S-cdA'nın R-cdA ile orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu ve R-cdA'nın 8-iso-PGF_{2α} ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu bulundu. S-cdA'nın AKŞ ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu gösterildi. TCF7L2'nin 8-OH-dG ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu, S-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı negatif korelasyonu ve R-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı negatif korelasyonu belirlendi.

Prediabet grubunda; 8-OH-dG'nin S-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu ve R-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu bulundu. S-cdA'nın R-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu ve HbA1c ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu belirlendi. R-cdA ve S-cdA'nın yaş ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu ve 8-iso-PGF_{2α}'nın HbA1c ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu bulundu.

T2DM grubunda; 8-OH-dG'nin S-cdA ile orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu ve R-cdA ile güçlü düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu gözlemlendi. S-cdA'nın R-cdA ile orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu ve R-cdA'nın trigliserid düzeyleri ile orta düzeyde anlamlı negatif korelasyonu belirlendi. TCF7L2'nin bel çevresi ile orta düzeyde anlamlı pozitif korelasyonu bulundu.

Tablo 19. Kontrol grubunda korelasyon analizlerinin sonuçları

			Yaş	Bel çevresi	HbA1c	AKŞ	Trigliserid	8-OH-dG	S-cdA	R-cdA	8-iso-PGF _{2α}	TCF7L2
Kontrol Grubu	Yaş	r		,203	-,142	,235	-,021	,321	,232	,202	-,068	-,149
		p		,249	,402	,161	,902	,060	,201	,267	,724	,489
	Bel çevresi	r			,224	,403*	,206	,212	,066	,114	,242	-,262
		p			,203	,018	,243	,244	,732	,555	,224	,228
	HbA1c	r				,266	,184	-,253	-,279	-,125	-,201	,186
		p				,112	,277	,143	,122	,497	,296	,385
	AKŞ	r					,136	-,035	-,367*	,000	,076	,099
		p					,421	,844	,039	1,000	,695	,644
	Trigliserid	r						-,054	,112	-,050	,175	,009
		p						,760	,542	,785	,364	,967
	8-OH-dG	r							,642**	,310	,205	-,468*
		p							,000	,084	,295	,024
	S-cdA	r								,478**	,193	-,673**
		p								,007	,344	,001
	R-cdA	r									,554**	-,663**
		p									,004	,001
	8-iso-PGF _{2α}	r										-,100
		p										,674
	TCF7L2	r										
		p										

* p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı

** p<0.01 ise istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 20. Prediyabet grubunda korelasyon analizlerinin sonuçları

			Yaş	Bel çevresi	HbA1c	AKŞ	Trigliserid	8-OH-dG	S-cdA	R-cdA	8-iso-PGF _{2α}	TCF7L2	
Prediyabet	Yaş	r		,277	,202	,241	,127	-,093	-,315*	-,342*	,136	-,350	
		p		,097	,188	,114	,410	,565	,045	,028	,390	,073	
	Bel çevresi	r			,212	,098	,169	,152	-,203	-,060	,068	,050	
		p			,208	,565	,319	,407	,257	,746	,706	,813	
	HbA1c	r				,300*	,180	-,242	-,424**	-,082	-,373*	,190	
		p				,048	,241	,138	,007	,620	,018	,342	
	AKŞ	r					,269	-,033	-,123	,147	,160	,018	
		p					,077	,843	,454	,373	,324	,927	
	Trigliserid	r						-,068	-,061	-,068	,136	,114	
		p						,681	,714	,682	,403	,570	
	8-OH-dG	r							,599**	,549**	,226	,174	
		p							,000	,000	,172	,405	
	S-cdA	r								,626**	,088	-,029	
		p								,000	,600	,889	
	R-cdA	r									-,028	,229	
		p									,868	,270	
	8-iso-PGF _{2α}	r										-,049	
		p										,816	
	TCF7L2	r											
		p											

* p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı

** p<0.01 ise istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 21. T2DM hastalarında korelasyon analizlerinin sonuçları

			Yaş	Bel çevresi	HbA1c	AKŞ	Trigliserid	8-OH-dG	S-cdA	R-cdA	8-iso-PGF _{2α}	TCF7L2	
T2DM	Yaş	r		,003	-,134	-,036	-,131	,117	,163	,131	-,002	,322	
		p		,986	,403	,820	,408	,465	,308	,414	,991	,078	
	Bel çevresi	r			,184	,261	-,100	-,162	,010	,189	-,322	,479**	
		p			,262	,104	,543	,325	,953	,249	,088	,007	
	HbA1c	r				,489**	,227	,011	,038	,092	,008	,259	
		p				,001	,153	,944	,814	,566	,964	,160	
	AKŞ	r					-,071	-,077	,093	,022	,061	,123	
		p					,657	,626	,558	,888	,740	,501	
	Trigliserid	r						-,171	-,162	-,337*	-,173	-,025	
		p						,285	,313	,031	,343	,892	
	8-OH-dG	r								,388*	,661**	,073	-,079
		p								,011	,000	,692	,668
	S-cdA	r									,436**	,033	,318
		p									,004	,858	,076
	R-cdA	r										-,119	,062
		p										,517	,738
	8-iso-PGF _{2α}	r											-,113
		p											,607
	TCF7L2	r											
		p											

* p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı

** p<0.01 ise istatistiksel olarak anlamlı

5. TARTIŞMA

Tip 2 diyabet glukoz metabolizmasının bozulması sonucu vücuttaki tüm doku ve organlar üzerinde etkili olan kompleks metabolik bir hastalıktır (119). T2DM gelişimi, bozulmuş glukoz toleransı ile karakterize geri dönüşümlü ve uzun bir prediyabet aşamasını izler (120). Prediyabet olan bireylerin yaklaşık % 25'inde T2DM gelişmektedir. Prediyabet döneminde alınan önlemler ve yaşam tarzında yapılan değişiklikler ile T2DM riskinin % 40-70 oranında önlenebileceği yapılan birçok çalışmada belirtilmektedir (2). Bu nedenle prediyabet ve T2DM'in erken tanısı, vücutta oluşan hasarların ve metabolizmaya yansıyan etkilerinin erken belirlenmesi ve önüne geçilmesi hastalığın uygun şekilde tedavi edilmesi açısından önemlidir. Prediyabet ve T2DM'in rutin laboratuvar parametrelerine ek olarak hastalık riskinin ve tedavi etkinliğinin belirlenmesi için kullanılabilecek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Oksidatif stres T2DM gelişimi ve sürecinde merkezi bir role sahiptir. Hiperglisemi nedeniyle ortaya çıkan reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres insülin direncinin gelişimi, β -hücre disfonksiyonunun ortaya çıkışı ve diyabetin uzun dönem komplikasyonlarının gelişiminde rol oynamaktadır (21,105). Oksidatif stres-diyabet ilişkisi birçok mekanizma aracılığı ile gerçekleşmektedir: Prediyabet ve T2DM hastalarında biriken glikoliz ürünlerinin ROT üretimini arttırması, glukozun oto-oksidasyonu ve polyol yolağına yönlenebilmesi, AGE'lerin artışı, protein kinaz C ve NADPH oksidaz aktivasyonu, yağ asitleri ve lipid peroksidlerinin artışı gibi nedenlerle ortaya çıkan oksidatif stres DNA, lipid, protein ve karbohidratlar gibi önemli makromoleküllerde hasara yol açmaktadır. Oluşan hasarlı ürünlerinin ölçülmesi oksidatif hasar düzeyi ile ilgili bilgi verir. Literatürde günümüze kadar yapılan çalışmalarda, T2DM hastalarında oksidatif makromolekül hasarının incelenmesinde çeşitli oksidatif stres biyobelirteçleri farklı yöntemler ile ölçülmüş ve çelişkili sonuçlar bildirilmiştir (17–24). Hastalığın başlangıç ve geri dönüşümlü aşaması olan prediyabet dönemini de kapsayan hasta grubunda ise oksidatif stresin incelendiği sınırlı sayıda çalışmaya rastlanmakta olup, bu çalışmalarda oksidatif stres düzeylerinin referans yöntemler kullanılmaksızın araştırıldığı belirlenmiştir (4,25). Ancak, hastalığın ortaya çıkmasından önce vücutta oluşan hasarların ve metabolizmaya yansıyan etkilerinin erken tanımlanması ve oksidatif hasarın tam

anlamıyla belirlenmesi için prediyabet döneminin daha ayrıntılı olarak araştırılması gerekmektedir.

Tip 2 diyabetin gelişiminde yaşam tarzından kaynaklanan düzensiz ve dengesiz beslenme, fiziksel aktivite azlığı gibi çevresel faktörlerin yanı sıra, genetik faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir. T2DM riskinin % 30-70'inin genetik temellere dayandığı tahmin edilmektedir. Hastalığın genetik temelini incelemesi; T2DM patogenezinin aydınlatılması, komplikasyonların gelişimi açısından riskli bireylerin belirlenmesi ve genom-ilaç etkileşimlerinin aydınlatılarak hastaların etkin bir şekilde tedavi edilebilmesi açısından önemli bilgiler sağlayabilir. T2DM'un gelişiminde etkili genleri tanımlamaya yönelik çalışmalarda farklı genlerde bulunun yaklaşık 153 polimorfizm hastalıkla ilişkili olarak tanımlanmıştır (46–49). Bu polimorfizmler arasında T2DM gelişiminde en yüksek riski taşıyan TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmidir (27). Ancak, literatürde TCF7L2'nin oksidatif stres ile ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamış ve T2DM hastalarında ortaya çıkan oksidatif makromolekül hasarına bir etkisi olup olmadığı belirlenmemiştir. Diğer yandan, 2007 yılında Idoğawa ve arkadaşları TCF7L2'nin özellikle PARP-1 gibi DNA onarım proteinleri ile kompleks oluşturarak DNA onarımında rol aldığını göstermişlerdir (28,29).

Tüm bu bilgiler ışığında ve ilgili literatür taraması sonucunda eksik olduğunu düşündüğümüz prediyabet ve T2DM hastalarında oksidatif makromolekül hasarının ve TCF7L2 tek nükleotid polimorfizminin incelendiği bir çalışma planladık. Çalışmamızda 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri sıvı kromatografi tandem kütle spektrometri yöntemiyle ölçüldü ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı. TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizmi DNA dizi analizi yöntemiyle belirlenerek ve TCF7L2 SNP'leri olan ve olmayan bireylerde oksidatif hasar düzeyleri incelendi.

Çalışmamızı örnek seçimi açısından irdelediğimizde; planlanma aşamasında özellikle literatürde eksik olan bilgiler dikkate alınarak örnek seçimi büyük bir titizlikle gerçekleştirildi. Olgu ve kontrol grubuna dâhil edilen örneklerin seçiminde sigara, antioksidan etkisi olan preparat kullanımı ve diğer kronik hastalıklar gibi kafa karıştırıcı etkenlerin dışlama kriterleri arasında olması çalışmamızın önemli bir üstünlüğüdür. Ayrıca prediyabet ve T2DM hasta grubunda bulunan örnekler yeni tanı almış ve daha önce diyabet ile ilgili hiçbir tedavi almamış kişiler arasından

seçildi. 2010 yılında Al-Aubaidy ve Jelinek tarafından yapılan çalışmada prediyabet ve T2DM hastalarında oksidatif DNA hasarı 8-OH-dG ve lipid peroksidasyonu MDA ile ölçülmüş, ancak dışlama kriterleri arasında sigaranın olmaması ve sigara içen kişilerin çalışmaya dâhil edilmesi nedeniyle çalışmada güvenilir olmayan sonuçlar elde edilmiştir (4). Maschirow ve arkadaşlarının 2015 yılında gerçekleştirdiği çalışmada dışlama kriterlerinin olmadığı prediyabet ve T2DM hastalarında oksidatif DNA hasarı 8-OH-dG ve lipid peroksidasyonu 8-iso-PGF_{2α} ile ölçülmüştür, oysa sigaranın oksidatif stres üzerindeki etkisi yıllar önce belirlenmiş ve birçok güvenilir oksidatif stres biyobelirteci ile doğrulanmıştır (121,122). Bu nedenle Maschirow ve arkadaşlarının çalışmasında sigaranın kafa karıştırıcı etkisinden dolayı prediyabet döneminde ortaya çıkan oksidatif hasarın tam olarak belirlenmesi mümkün değildir. Oksidatif stres biyobelirteçlerimizin idrarda ölçülebilmesi yöntemimizin diğer bir üstünlüğüdür. İdrar örnek alımının kolay ve non-invaziv olması nedeniyle klinik araştırmalarda tercih edilen bir örnektir. İdrarda hasarlı DNA nükleozidleri ve lipid peroksidasyonu düzeyleri vücuttaki toplam oksidatif stres miktarını yansıtmaktadır (75,76). Maschirow ve arkadaşları 2015 yılında yaptıkları çalışmada 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α}'ın idrarda seruma göre daha stabil olduğunu ve oksidatif stres biyobelirteçlerinin ölçümünde idrar örneklerinin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (25).

Çalışmamız kullanılan yöntemler açısından literatürde yapılmış olan diğer çalışmalara göre üstünlük göstermektedir. Oksidatif DNA hasarının incelenmesinde, ESCODD tarafından referans yöntem olarak kabul edilmiş ve yüksek duyarlılık ve özgüllüğü nedeniyle diğer yöntemlerin yerini almaya başlayan LC-MS/MS SID-MRM yöntemi kullanılmıştır (7,87). Bu yöntem son yıllarda klinik ve araştırma laboratuvarlarında türevlendirme gerektirmeyen zahmetsiz örnek hazırlık aşaması, düşük analiz maliyeti, kısa analiz süresi ve düşük konsantrasyonlardaki analitlerin ölçülebilmesi nedeniyle diğer yöntemlere göre daha fazla tercih edilmeye başlamıştır. LC-MS/MS aynı anda birden fazla analitin belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Oksidatif DNA hasarının aynı anda birden fazla hasar ürünü aracılığı ile belirlenmesi bu yöntemin en önemli üstünlüğüdür ve tek ürün ölçümüne kıyasla daha güvenilir sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır.

Hasarlı DNA nükleozidlerinin idrar örneklerinde ölçümü için LC-MS/MS SID-MRM yöntemi ilk kez Dizdaroğlu ve arkadaşları tarafından oluşturuldu ve validasyonu gerçekleştirildi (26,112). Biz de çalışmamızda hasarlı DNA nükleozidlerinin LC-MS/MS SID-MRM yöntemini laboratuvarımızda optimize ederek yöntem geçerlilik çalışmalarını gerçekleştirdik. Yöntem optimizasyonu sırasında orijinal yöntemden farklı olarak optimum koşulların sağlanması için kromatografik koşullarda değişiklik yaptık ve kullanılan mobil fazın içine % 0.1 formik asit ekledik. Formik asitin hasarlı DNA nükleozidlerinin iyonizasyonunu arttırdığını gözlemledik. Bu yöntemler daha sonra yapılacak çalışmalarda farklı hasta gruplarında oksidatif DNA hasarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir.

İdrar örneklerinde izoprostanın LC-MS/MS SID-MRM yönteminde 2010 yılında Teng ve arkadaşlarının valide ettiği yöntem kullanıldı (113). Bu yöntemin literatürde daha önce kullanılmakta olan yöntemlere üstünlüğü, örnek hazırlık aşamasında katı faz ekstraksiyon kartuşlarının kullanılması ve 8-iso-PGF_{2α}'ın diğer izomerleri ile çapraz reaksiyonlarını engelleyerek, bu izomerlerinden ayırabilmesidir. İzoprostanların ekstraksiyonu ve örnek hazırlık işlemleri için literatürde klasik olarak kullanılmakta olan sıvı-sıvı ekstraksiyon, katı-sıvı ekstraksiyon ve affinite kromatografi gibi yöntemler daha zahmetlidir ve düşük örnek geri kazanımı sağlanabilmektedir. İzoprostanın LC-MS/MS SID-MRM yöntemi laboratuvarımızda optimize edilmiş ve yöntem geçerlilik çalışmaları tamamlanmıştır, bu yöntem gelecek çalışmalarda değişik hasta gruplarında oksidatif lipid hasarının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir.

LC-MS/MS SID-MRM yönteminde kantitasyonun güvenilirliğini arttırmak amacıyla ticari olarak mevcut ya da özel laboratuvarlarda sentezlenmiş stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standartlar kullanılmaktadır (110). Biz de çalışmamızda stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standartlar kullanarak literatürde aynı yöntem ile yapılmış çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir kesin ve güvenilir kantitatif sonuçlar elde ettik. Çalışmamızda sağlıklı kişilerin idrar örneklerinde LC-MS/MS SID-MRM yöntemiyle ölçülen 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri literatür ile uyumludur (26,112–114). Bu parametreler için literatürde daha önce bir eşik değeri belirlenmediği gözlemlendi ve çalışmamızda olgu ve sağlıklı kontrol

grubundan elde edilen veriler kullanılarak ROC eğrisinden Youden İndex yöntemiyle 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ın eşik değerleri belirlendi.

Çalışmamız oksidatif stres parametrelerinin sonuçları açısından değerlendirildiğinde; literatürde T2DM ve oksidatif stres arasındaki ilişki incelendiğinde bu ilişkinin uzun yıllardır değişik yönleri ile ele alındığı ancak prediyabet döneminde oksidatif stresin rolü ve oluşan oksidatif hasarın henüz tam olarak ortaya koyulmadığı görülmektedir (17–24). T2DM hastalarında oksidatif stresin incelendiği çalışmalarda bizim çalışmamızın aksine, tedavi görmekte olan hasta grubu seçilmiş ve çeşitli oksidatif stres biyobelirteçleri genellikle ELISA, RIA ve HPLC yöntemleriyle ölçülerek birbirinden farklı sonuçlar elde edilmiştir (25,123,124). Yapılan çalışmalarda elde edilen çelişkili sonuçlar, herhangi tedavi almamış olan T2DM hastalarında oksidatif stresin referans yöntemler kullanılarak daha kapsamlı bir çalışma ile araştırılması gerektiğini düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda yeni tanı almış ve tedaviye başlanmamış prediyabet ve T2DM hastalarında 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin LC-MS/MS SID-MRM yöntemi ile ölçülmesi sonucunda oksidatif DNA hasarı ve lipid peroksidasyonu sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Prediyabet hastalarında kontrol grubuna göre artmış 8-OH-dG, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri ortaya çıkan oksidatif hasarın erken dönemlerde oluşmaya başladığını ve ölçülebilir düzeylerde olduğunu göstermektedir. Bu kapsamdaki bir bulgu literatürde daha önce bildirilmemiş, ilk kez bizim çalışmamızla ortaya koyulmuştur. Hastalığın aşikar klinik bulgu vermeden önceki erken döneminde bu bulguların çıkıyor olması, olasılıkla ılımlı hiperglisemi ya da prediyabet dönemi için karakteristik olan kan glukoz dalgalanmaları nedeniyle vücudun yaygın olarak oksidatif stres etkisine maruz kaldığını düşündürmektedir.

Literatürde hastalığın erken klinik evresi olan prediyabet döneminde oksidatif stresin araştırıldığı iki çalışma yer almaktadır. Bu çalışmalarda oksidatif stres düzeyleri referans yöntemler kullanılmaksızın incelenmiş ve oksidatif DNA hasarı sadece 8-OH-dG ve lipid peroksidasyonu 8-iso-PGF_{2α} ile belirlenmiştir (4,25). Bu iki çalışmada da 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri idrar örneklerinde ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve 8-OH-dG düzeyleri prediyabet grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek gözlenirken, 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinde anlamlı bir fark

bulunmamıştır (4,25). 2015 yılında Maschirow ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin herhangi bir dışlama kriterleri olmaksızın seçilmiş 176 prediyabet olgusunda incelenmiş olması çalışmanın güvenilirliğini etkilemektedir. Bizim çalışmamızda olgu ve kontrol grubuna dâhil olan kişiler sigara, antioksidan etkisi olan preparat kullanımı ve diğer kronik hastalıklar gibi oksidatif stresi etkileyecek dışlama kriterleri dikkate alınarak titizlikle seçilmiştir. Maschirow ve arkadaşlarının çalışmasından farklı olarak biz 8-iso-PGF_{2α} düzeylerini prediyabet grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulduk. Prediyabet grubunu kapsayan ikinci çalışmada ise Al-Aubaidy ve Jelinek, 33 prediyabet, 35 T2DM hastasını ve 98 sağlıklı bireyi dışlama kriterleri olmaksızın çalışmalarına dâhil etmişler ve serum 8-OH-dG düzeylerini prediyabet ve T2DM grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (4). Bu çalışmanın sonuçları bizim çalışmamızla uyumludur ancak örnek seçiminde dışlama kriterlerinin olmaması oksidatif DNA hasarının gerçek kaynağı konusunda kafa karıştırmaktadır. Bu çalışmaların yanı sıra prediyabet hastalarında DNA hasarını vurgulayan 2013 yılında yapılan diğer bir çalışmada, belirli bir hasar tipinin hedef alınmadan duyarlılığı ve özgüllüğü düşük Comet assay yöntemi kullanılarak ölçüldüğü 28 prediyabet olgusunda DNA hasarı sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (125). Bu çalışmanın sonuçları, oksidatif DNA hasarı sonuçlarımızın bir kısmı ile paralellik göstermekle birlikte gerek yöntem gerekse hasta sayısı açısından bizim çalışmamız daha üstündür.

Çalışmamız T2DM hastalarının sonuçları açısından değerlendirildiğinde, idrarda artmış 8-OH-dG düzeyleri erken dönemde ortaya çıkmaya başlayan oksidatif DNA hasarının, hastalığın ilerleyen dönemlerinde de sistemik etkilerini gösterdiğini desteklemektedir. 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin prediyabet grubunda yüksek, T2DM hastalarında ise normal düzeylerde olması ortaya çıkan lipid peroksidlerinin hastalığın ilerleyen dönemlerinde diğer makromoleküllerle özellikle DNA ile reaksiyona girmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Literatürdeki diğer T2DM çalışmaları incelendiğinde; 2010 yılında Zheng ve arkadaşları T2DM hastalarında ELISA yöntemiyle ölçülen idrar 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeylerini sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır (20). Bu çalışmada yeni tanı almış 27 T2DM olgusu çalışmaya dâhil edilmiştir. Bizim

çalışmamızda 43 yeni tanı almış T2DM olgusu ile birlikte 47 prediyabet olgusu incelenmiştir. Zheng ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bu çalışmanın üstünlüğü üç gün boyunca glukoz dalgalanmalarını sürekli glukoz izleme (CGMS) sistemiyle ölçmeleridir. Glukoz dalgalanmalarının oksidatif stresi arttırdığını 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri ile göstermişlerdir (20). Bulgularımızda bu çalışmadan farklı olarak, 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinde T2DM hastalarıyla sağlıklı kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda DEU Endokrinoloji polikliniğinde CGMS sisteminin olmaması nedeniyle glukoz dalgalanmaları ölçülemedi. Tabak ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada, plazma 8-OH-dG ve serum 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin T2DM hastalarında sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı yüksek olduğunu belirtilmiştir (126). Tabak ve arkadaşlarının çalışmasında T2DM grubuna 69 kişi dâhil edilmiş ve bu kişiler komplikasyonlarına göre gruplanmıştır. Ancak 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin komplikasyonsuz ve komplikasyonlu T2DM hastalarında anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir. Çalışmamızda yeni tanı T2DM hastalarını seçtiğimiz için komplikasyonlu T2DM grubunu oluşturmamız mümkün olmadı. 2012 yılında Chang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sağlıklı kontrol grubunda ve T2DM hastalarında idrar 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri ELISA yöntemiyle ölçülmüş ve T2DM grubunda 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek gözlenirken, 8-OH-dG düzeylerinde anlamlı bir fark bulunmamıştır (22). Yukarıda bahsedilen çalışmalarda 8-OH-dG ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri bizim çalışmamızdan farklı olarak ELISA yöntemiyle ölçülmüştür, ELISA yöntemi çapraz reaksiyonlar gösterebilen hassasiyeti ve güvenilirliği düşük bir yöntemdir. Bu nedenle bu yöntem ile yapılan çalışmalardan elde edilen veriler bizim çalışmamızın sonuçları ile karşılaştırılmaz.

Tip 2 diyabet hastalarında oksidatif stres biyobelirteçlerinin LC-MS/MS ile ölçüldüğü iki çalışma yapılmıştır. 2012 yılında Serdar ve arkadaşları tarafından tip 2 diyabet hastalarında idrar 8-OH-dG düzeyleri LC-MS/MS ile ölçülmüş ve anlamlı olarak yüksek bulunmuştur, bizim çalışmamızda bu çalışmadan farklı olarak prediyabet ve yeni tanı almış T2DM hastaları incelenmiştir. Bu çalışma tedavi görmekte olan diyabetik nefropati hastalarını içermektedir (127). Komplike T2DM hastalarının birçoğu uzun süredir ilaç tedavisi almaktadır, bu ilaçların oksidatif

stres üzerindeki etkisini değerlendirmek için araştırmayı hastaların aldıkları tedaviye göre alt gruplara ayrılmış daha büyük hasta gruplarında planlamak gerektiğini düşünüyöruz. Tip 2 diyabet hastalarında oksidatif stres biyobelirteçlerinin LC-MS/MS ile ölçüldüğü diğer bir çalışma 2011 yılında Siegelaar ve arkadaşları tarafından idrar 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinin incelendiği araştırmadır. Bu çalışmada bizim çalışmamızla uyumlu olarak 8-iso-PGF_{2α} düzeylerinde sağlıklı kontrol grubu ile T2DM arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (24). Siegelaar ve arkadaşlarının çalışmasına dâhil edilen 28 kişi oral hipoglisemik ajan kullanmakta olan uzun dönem T2DM hastalarıdır. Oral hipoglisemik ajanların oksidatif stres üzerindeki olumlu etkisi bilinmektedir (128).

Çalışmamızda kullandığımız oksidatif DNA hasarının diğer güvenilir biyobelirteçleri olan ve aynı anda hem baz hem de şekerde hasar oluşturan tandem lezyonlar R-cdA ve S-cdA'nın prediyabet ya da T2DM hastalarında incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu parametreler klinik çalışmalarda ilk kez ateroksleroz hastalarında LC-MS/MS yöntemiyle incelenmiş ve sağlıklı kontrol grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (107). Bu anlamda çalışmamız R-cdA ve S-cdA'nın prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında LC-MS/MS SID-MRM yöntemiyle ölçüldüğü ilk çalışmadır, dolayısıyla oksidatif DNA nükleozid hasarının güvenilir biyobelirteçleri olarak kullanılması için diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

Çalışmamızı incelediğimiz parametrelerin birbirleriyle ilişkileri açısından değerlendirdiğimizde; prediyabet ve T2DM hastalarında oksidatif stres biyobelirteçlerinin anlamlı korelasyonları bu parametrelerin paralel artış gösteren güvenilir biyobelirteçler olarak kullanılabileceğini göstermektedir. 8-OH-dG'nin R-cdA ve S-cdA ile pozitif korelasyonu ve R-cdA'nın kontrol grubunda 8-iso-PGF_{2α} ile pozitif korelasyonu oksidatif stresin belirlenmesinde birden fazla parametre kullanılarak daha doğru sonuçlar alınabileceğini desteklemektedir. Bu anlamlı korelasyonlar daha önce hiçbir çalışmada gösterilmemiştir. Prediyabet hastalarında hem oksidatif DNA hasarı hem de izoprostanda artış gözlenmesi oksidatif hasarın farklı makromoleküllere yansıdığını ve vücuttaki sistemik hasarın erken biyobelirteçleri olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Oksidatif stres parametrelerinin rutin laboratuvar verileri, klinik bulgular ve demografik parametreleri ile ilişkileri incelendiğinde; sadece prediyabet grubunda S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α}'ın HbA1c ile negatif yönde anlamlı korelasyonu bulunması, bize yüksek açlık kan şekeri kadar ziyade, HbA1c'nin çok yüksek olmadığı T2DM'in erken subklinik dönemlerinde, glukoz dalgalanmalarının oksidatif hasara daha önemli bir etkisi olabileceğini düşündürmektedir. Zheng ve arkadaşlarının çalışmasında yeni tanı T2DM hastalarında 8-iso-PGF_{2α} ile glukoz dalgalanmaları arasında belirlenen anlamlı korelasyon, bu bulgumuzu desteklemektedir (20). T2DM grubunda R-cdA'nın trigliserid düzeyleri ile pozitif yönde anlamlı ilişkisi belirlenmiştir. DNA hasarının lipid metabolizması ile ilişkisi beklenen bir bulgudur. Çalışmamızda elde edilen bu bilgiler literatürde ilk kez gösterilmiş olan oksidatif makromolekül hasarının belirlenmesinde önemli bilgilerdir.

Çalışmamızı TCF7L2 rs7903146 tek nükleotid polimorfizm belirleme yöntemi açısından ele aldığımızda; tek nükleotid polimorfizmlerinin ölçülmesinde kullanılan yöntemler DNA dizi analizi, Micro Array ve RT-PCR gibi hibridizasyon teknikleri ve oligonükleotid ligasyon testleri gibi enzime bağlı tekniklerdir. Bu yöntemlerden DNA dizi analizi 1977 yılında Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemidir ve günümüzde polimorfizmlerin belirlenmesinde 'altın standart' olarak kullanılmaktadır (117). Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliği yeni sentezlenecek iplik için kalıp görevi görmektedir. DNA sentezini sağlamak için Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP'lerin (deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA'ya bir ddNTP'nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. DNA dizi analizi gerçekleştirilirken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP'lerin dördü ve az miktarda ddNTP'lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelmektedir (116).

Günümüzde Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi DNA dizi analizörlerinde gerçekleştirilmektedir. DNA dizi analizörleri kısa analiz süresi, standart çalışma koşulları ve güvenilir sonuçları ile önemli yararlar sağlamaktadır. Bu sistemlerde elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur, DNA'nın bulunduğu jelmatris bu monokromatik ışık ile taranır ve elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır ve bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır (129). Çalışmamızda TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi, Sanger'in zincir sonlanma yöntemine dayanan ABI 3500XL Genetic Analyzer 24 ile belirlenmiştir. Bu yöntemin kullanılmasıyla elde edilen güvenilir sonuçlar çalışmamızın gücünü arttırmaktadır.

TCF7L2 rs7903146 polimorfizm bulguları değerlendirildiğinde; prediyabet ve T2DM hastaları sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin prediyabet ve T2DM grubunda olduğu gibi sağlıklı kontrol grubunda da yüksek oranda bulunduğu belirlenmiştir. Özellikle heterozigot alelleri taşıyan kişiler göz önünde bulundurulduğunda sağlıklı kontrol grubunun, prediyabet ve T2DM gruplarından farkı olmadığı gözlenmektedir. Bu bulgular toplumumuzda TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin görülme sıklığının yüksek olmasıyla açıklanabilir. Tüm gruplarda homozigot aleller değerlendirildiğinde, T2DM grubundaki oranın diğer gruplara göre üç kat yüksek olması homozigot TT alellerinin T2DM riskini arttırdığını destekleyen bir bulgudur. Olgu ve kontrol grubu örnekleri oksidatif hasar düzeylerine göre gruplandırılmış ve bu gruplarda oksidatif stres parametrelerinden en az üçünün yüksek düzeyde bulunduğu kişiler yüksek oksidatif hasar grubuna, üçten azının yüksek olduğu kişiler ise düşük oksidatif hasar grubuna dâhil edilmiştir. TCF7L2 polimorfizmi olan ve olmayan kişilerde oksidatif hasar düzeylerinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu bulgulara göre TCF7L2 polimorfizminin oksidatif hasar üzerine direkt bir etkisi yoktur. Gelecek dönemlerde çalışmamızın bu bulguları ile ilgili daha yüksek olgu sayısı ile çalışmalar planlanmaktadır.

TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin oksidatif stres biyobelirteçleri ile ilişkileri değerlendirildiğinde önemli sonuçlar ortaya çıkmaktadır. TCF7L2'nin hasarlı DNA nükleozidleri ile negatif yönde anlamlı korelasyonu TCF7L2'nin DNA onarımında rolü olabileceğini desteklemektedir. Bu bulgu literatürde ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir. 2007 yılında Idoğawa ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada bizim bu bulgularımızı destekler nitelikte bulgular elde edilmiş ve TCF7L2'nin özellikle PARP-1 gibi DNA onarım proteinleri ile kompleks oluşturarak DNA onarımında rol aldığı belirtilmiştir (28,29). Bu bilgiler TCF7L2'nin PARP-1 ile birlikte T2DM hastalarında oluşan DNA hasarının onarılmasında önem rol oynadığını göstermektedir. TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi bir yandan genetik olarak T2DM riskini artırırken diğer yandan oluşabilecek DNA hasarının onarımı yönünde olumlu rol oynamaktadır. Çalışmamız bu paradoks ilişkiyi ortaya koyması açısından da literatüre önemli bir katkı sağlamaktadır.

TCF7L2 rs7903146 polimorfizmi ile ilgili diğer bir yeni bulgu ise, T2DM hastalarında bel çevresi ile anlamlı pozitif korelasyonudur. Bu korelasyon TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin lipid metabolizması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgulara göre T2DM riskini arttıran bu polimorfizmlerin metabolik sendrom ve obezite ile ilişkisi olabilir. Literatürde daha önce yapılan çalışmalarda TCF7L2'nin bel çevresi ile ilişkisi gösterilmemiştir, bu yönüyle çalışmamızda önemli yeni bulgular elde edilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak çalışmamızdan elde edilen veriler, prediyabet ve T2DM'da meydana gelen oksidatif makromolekül hasarının ortaya koyulması açısından literatürde önemli bir boşluğu doldurmuş ve daha önce belirlenmemiş olan yeni bilgiler sağlamıştır.

Bu yeni bilgiler ve çalışmamızın literatüre katkıları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- T2DM hastalarında oksidatif makromolekül hasarının arttığı gözlenmiş ve bu bulgu literatürdeki diğer sonuçlara son noktayı koymaktadır. Çünkü titizlikle seçilmiş olgu ve kontrol grubunda güvenilir oksidatif stres biyobelirteçleri referans yöntem ile ölçülmüştür.
- Prediyabet döneminde oksidatif makromolekül hasarının arttığı belirlenmiştir. Prediyabet dönemi hastalığın gelişiminde kritik bir noktadadır. Oksidatif hasarın bu dönemde oluşmaya başlaması T2DM'un erken evrelerinin ve özellikle prediyabet döneminin daha fazla önemsenmesi gerektiğini düşündürmektedir.
- Bu bulgular vücutta oksidatif makromolekül hasarınının hastalık tanısı konulmadan çok önce birikebileceğini göstermiştir. Bu önemli bilgi gelecek çalışmalara ışık tutmaktadır.
- Prediyabet dönemi T2DM gelişim riskinin belirlenebileceği ve vücutta meydana gelecek makromolekül zararının önlenilebileceği bir dönemdir. Bu nedenle prediyabet döneminde yüksek düzeylerde bulunan hasarlı DNA nükleozidlerinin ve izoprostanın T2DM riskinin belirlenmesinde erken biyobelirteçler olarak kullanılabilirliği düşünülmektedir. Bu bulgumuz ayrıca prediyabet döneminde proflaktik olarak antioksidan kullanım etkinliği tartışmalarına ışık tutacak bir bulgudur.
- Laboratuvarımızda 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} ölçüm yöntemleri optimize edilerek validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemlerle elde ettiğimiz bulgular 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} düzeyleri açısından literatürde daha önce yapılan çalışmaların bulguları ile uyumludur. Bu yöntemler daha sonra yapılacak çalışmalarda kullanılabilir.

- Prediyabet ve T2DM hastalarında 8-OH-dG, R-cdA, S-cdA ve 8-iso-PGF_{2α} için eşik değerleri belirlenmiştir, literatürde daha önce bu eşik değerlerin belirlendiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.
- TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin prediyabet ve T2DM grubuna benzer olarak, sağlıklı kontrol grubunda da yüksek düzeylerde gözlenmesi, bu polimorfizmin toplumda yaygın olarak bulunduğunun kanıtıdır.
- Ancak TCF7L2'nin hasarlı DNA nükleozidleri ile negatif yönde anlamlı korelasyonu belirlenmiştir. Bu bulgu literatürde yenidir ve TCF7L2'nin DNA onarımında rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamız ile elde ettiğimiz bu bulgular literatüre önemli katkılar sağlamanın yanı sıra gelecek çalışmalar için bir kaynaktır ve yeni hipotezler için ipucu oluşturmaktadır.

Geleceğe yönelik planlanan diğer çalışmalar:

- Prediyabet döneminde prospektif bir çalışma planlanarak T2DM oluşma riski ile oksidatif stres parametreleri arasındaki ilişkiler incelenebilir.
- Prediyabet ve T2DM hasta grubunda DNA onarım enzimleri özellikle PARP-1'in incelendiği kapsamlı bir çalışma gerçekleştirilebilir.
- TCF7L2 rs7903146 polimorfizminin daha geniş bir grup oluşturularak sağlıklı kişilerde de incelenmesi ve bu kişilerin ileriye yönelik takip edilerek hastalık riskinin belirlenmesi, bu bulguların DNA onarımı ile ilişkilerinin araştırılması literatürde önemli bir ihtiyaçtır.

7. REFERANSLAR

1. International Diabetes Federation (IDF). IDF Diabetes Atlas 7th edition. idf.org. 2015;
2. Bansal N. Prediabetes diagnosis and treatment: A review. World J Diabetes [Internet]. 2015;6(2):296.
3. Fatehi-Hassanabad Z, Chan CB, Furman BL. Reactive Oxygen Species and Endothelial Function in Diabetes. Eur J Pharmacol. 2010;636:8–17.
4. Al-Aubaidy H. 8-Hydroxy-2-deoxy-guanosine identifies oxidative DNA damage in a rural prediabetes cohort. Redox Rep. 2010;15(4):155–60.
5. Bloomgarden ZT, Inzucchi SE, Karnieli E, Le Roith D. The proposed terminology “A(1c)-derived average glucose” is inherently imprecise and should not be adopted. Diabetologia. 2008;51(7):1111–4.
6. Cohen RM, Snieder H, Lindsell CJ, Beyan H, Hawa MI, Blinko S, et al. Evidence for independent heritability of the glycation gap (glycosylation gap) fraction of HbA1c in nondiabetic twins. Diabetes Care. 2006;29(8):1739–43.
7. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. Cancer Letters. 2012. p. 26–47.
8. Kaneko T, Tahara S, Matsuo M. Non-linear accumulation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidized DNA damage, during aging. Mutat Res - DNAGing Genet Instab Aging. 1996;316(5-6):277–85.
9. Kawanishi S, Hiraku Y, Oikawa S. Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. Mutat Res - Rev Mutat Res. 2001;488(1):65–76.
10. Jaruga P, Rodriguez H, Dizdaroglu M. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. Free Radic Biol Med. 2001;31:336–44.
11. Jaruga P, Dizdaroglu M. 8,5-Cyclopurine-2-deoxynucleosides in DNA: Mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. DNA

Repair. 2008. p. 1413–25.

12. Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2009;27:120–39.
13. Kadiiska MB, Gladen BC, Baird DD, Germolec D, Graham LB, Parker CE, et al. Biomarkers of Oxidative Stress Study II. Are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCl₄ poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005;38:698–710.
14. Milne GL, Yin H, Hardy KD, Davies SS, Roberts LJ. Isoprostane generation and function. *Chem Rev.* 2011;111(10):5973–96.
15. Basu S. F₂-isoprostanes in human health and diseases: from molecular mechanisms to clinical implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10(8):1405–34.
16. Schwedhelm E, Benndorf R a., Boger RH, Tsikas D. Mass Spectrometric Analysis of F₂-Isoprostanes: Markers and Mediators in Human Disease. *Curr Pharm Anal.* 2007;3(1):39–51.
17. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med.* 2011;34(3):E163–71.
18. Zengi A, Ercan G, Caglayan O, Tamsel S, Karadeniz M, Simsir I, et al. Increased oxidative DNA damage in lean normoglycemic offspring of type 2 diabetic patients. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2011;119(8):467–71.
19. Song F, Jia W, Yao Y, Hu Y, Lei L, Lin J, et al. Oxidative stress, antioxidant status and DNA damage in patients with impaired glucose regulation and newly diagnosed Type 2 diabetes. *Clinical Science.* 2007. p. 599.
20. Zheng F, Lu W, Jia C, Li H, Wang Z, Jia W. Relationships between glucose excursion and the activation of oxidative stress in patients with newly diagnosed type 2 diabetes or impaired glucose regulation. *Endocrine.* 2010;37:201–8.
21. Broedbaek K, Siersma V, Henriksen T, Weimann A, Petersen M, Andersen JT,

- et al. Urinary markers of nucleic acid oxidation and long-term mortality of newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 2011;34(12):2594–6.
22. Chang C-M, Hsieh C-J, Huang J-C, Huang I-C. Acute and chronic fluctuations in blood glucose levels can increase oxidative stress in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol*. 2012;49:171–7.
 23. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol*. 2011;164(6):899–904.
 24. Siegelaar SE, Barwari T, Kulik W, Hoekstra JB, DeVries HJ. No relevant relationship between glucose variability and oxidative stress in well-regulated type 2 diabetes patients. *J diabetes Sci Technol*. 2011;5(1):86–92.
 25. Maschirow L, Khalaf K, Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Inflammation, coagulation, endothelial dysfunction and oxidative stress in prediabetes - Biomarkers as a possible tool for early disease detection for rural screening. *Clin Biochem*. 2015;48(9):581–5.
 26. Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:E12.
 27. Florez JC. The new type 2 diabetes gene TCF7L2. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10:391–6.
 28. Idogawa M, Masutani M, Shitashige M, Honda K, Tokino T, Shinomura Y, et al. Ku70 and poly(ADP-ribose) polymerase-1 competitively regulate β -catenin and T-cell factor-4-mediated gene transactivation: Possible linkage of DNA damage recognition and Wnt signaling. *Cancer Res*. 2007;67:911–8.
 29. Xia Q, Deliard S, Yuan C-X, Johnson ME, Grant SF. Characterization of the transcriptional machinery bound across the widely presumed type 2 diabetes causal variant, rs7903146, within TCF7L2. *Eur J Hum Genet*. 2014;23(1):103–9.
 30. Lakhtakia R. The history of diabetes mellitus. *Textb Diabetes, Fourth Ed*. 2010;13(August):368–70.

31. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013;36(SUPPL.1):67–74.
32. Giugliano D, Ceriello a, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? *Metabolism*. 1995;44(3):363–8.
33. Barnett AH. NICE draft type 2 diabetes guidelines: A cause for concern. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. 2015. p. 403–5.
34. Group NDD. Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus and Other Categories of Glucose Intolerance. *Diabetes*. 1979;28(12):1039–57.
35. Drouin P, Blicke JF, Charbonnel B, Eschwege E, Guillausseau PJ, Plouin PF, et al. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2009;32(Supplement_1):S62–7.
36. WHO. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva: World Health Organisation. 2006.
37. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2011;34 Suppl 1:S62–9.
38. Group DPPR. Lipid, lipoproteins, C-reactive protein, and hemostatic factors at baseline in the diabetes prevention program. *Diabetes Care*. 2005;28(10):2472–9.
39. Ozbek M, Erdogan M, Karadeniz M, Cetinkalp S, Ozgen AG, Saygili F, et al. Evaluation of beta cell dysfunction by mixed meal tolerance test and oral L-arginine in patients with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009;117(10):573–6.
40. Martin BC, Warram JH, Krolewski a. S, Soeldner JS, Kahn CR, Martin BC, et al. Role of glucose and insulin resistance in development of type 2 diabetes mellitus: results of a 25-year follow-up study. *Lancet*. 1992;340(8825):925–9.
41. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840–6.

42. Lyssenko V, Almgren P, Anevski D, Perfekt R, Lahti K, Nissén M, et al. Predictors of and longitudinal changes in insulin sensitivity and secretion preceding onset of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(1):166–74.
43. Laaksonen DE. Metabolic Syndrome and Development of Diabetes Mellitus: Application and Validation of Recently Suggested Definitions of the Metabolic Syndrome in a Prospective Cohort Study. *Am J Epidemiol*. 2002;156(11):1070–7.
44. International Diabetes Federation (IDF). International Diabetes Federation Diabetes Atlas. IDF diabetes atlas, 5th ed.; retrieved from www.idf.org. 2014.
45. Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metab*. 2008;8(3):186–200.
46. Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, et al. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881–5.
47. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PIW, Chen H, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science*. 2007;316(5829):1331–6.
48. WTCCC. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature*. 2007;447(7145):661–78.
49. Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burtt NP, de Bakker PI, Chen H, et al. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* (80-). 2007;316(5829):1331–6.
50. Weedon MN. The importance of TCF7L2. *Diabetic Medicine*. 2007. p. 1062–6.
51. Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H, et al. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Med Genet*. 2009;10:15.
52. Grant SFA, Thorleifsson G, Reynisdottir I, Benediktsson R, Manolescu A, Sainz J, et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. *Nat Genet*. 2006;38:320–3.

53. Jin T. The WNT signalling pathway and diabetes mellitus. *Diabetologia*. 2008. p. 1771–80.
54. Damcott CM, Pollin TI, Reinhart LJ, Ott SH, Shen H, Silver KD, et al. Polymorphisms in the Transcription Factor 7-Like 2 (TCF7L2) Gene Are Associated With Type 2 Diabetes in the Amish. *Diabetes*. 2006;55(9):2654–9.
55. Ip W, Chiang Y, Jin T. The involvement of the wnt signaling pathway and TCF7L2 in diabetes mellitus: The current understanding, dispute, and perspective. *Cell Biosci*. 2012;2(1):28.
56. Idogawa M, Yamada T, Honda K, Sato S, Imai K, Hirohashi S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a component of the oncogenic T-cell factor-4/beta;-catenin complex. *Gastroenterology*. 2005;128(7):1919–36.
57. Ilnytska O, Lyzogubov V V, Stevens MJ, Drel VR, Mashtalir N, Pacher P, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition alleviates experimental diabetic sensory neuropathy. *Diabetes*. 2006;55(6):1686–94.
58. Li F, Drel VR, Szabo C, Stevens MJ, Obrosova IG. Low-dose poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor-containing combination therapies reverse early peripheral diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2005;54(5):1514–22.
59. Obrosova IG, Li F, Abatan OI, Forsell M a, Komjáti K, Pacher P, et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in diabetic neuropathy. *Diabetes*. 2004;53(3):711–20.
60. Jin W, Patti M-E. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond)*. 2009;116(2):99–111.
61. Saxena R, Gianniny L, Burt NP, Lyssenko V, Giuducci C, Sjögren M, et al. Common single nucleotide polymorphisms in TCF7L2 are reproducibly associated with type 2 diabetes and reduce the insulin response to glucose in nondiabetic individuals. *Diabetes*. 2006;55(10):2890–5.
62. Helgason A, Pálsson S, Thorleifsson G, Grant SF a, Emilsson V, Gunnarsdottir S, et al. Refining the impact of TCF7L2 gene variants on type 2 diabetes and adaptive evolution. *Nat Genet*. 2007;39(2):218–25.
63. Schafer SA, Tschritter O, Machicao F, Thamer C, Stefan N, Gallwitz B, et al. Impaired glucagon-like peptide-1-induced insulin secretion in carriers of

transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene polymorphisms. *Diabetologia* [Internet]. 2007;50(12):2443–50.

64. Lyssenko V, Lupi R, Marchetti P, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest*. 2007;117(8):2155–63.
65. Pearson ER, Donnelly LA, Kimber C, Whitley A, Doney ASF, McCarthy MI, et al. Variation in TCF7L2 influences therapeutic response to sulfonylureas: a GoDARTs study. *Diabetes*. 2007;56(8):2178–82.
66. Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: State of the art. *Am J Med*. 1991;91(3 SUPPL. 3).
67. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Free Radical Biology and Medicine. 1999. 449-450 p.
68. Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochem Pharmacol*. 1995;49(10):1341–8.
69. Wood EJ. Marks' basic medical biochemistry: A clinical approach (second edition). *Biochem Mol Biol Educ*. 2006;34(5):395.
70. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 1997;82(2):291–5.
71. Dinant C, Houtsmuller AB, Vermeulen W. Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin*. 2008;1(1):9.
72. Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treat Rev*. 2005;31(8):603–17.
73. Broedbaek K, Weimann A, Stovgaard ES, Poulsen HE. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a biomarker in type 2 diabetes. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(8):1473–9.
74. Valerie K, Povirk LF. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene*. 2003;22(37):5792–812.

75. Poulsen HE. Oxidative DNA modifications. *Exp Toxicol Pathol*. 2005;57(SUPPL. 1):161–9.
76. Milne GL, Dai Q, Roberts LJ. The isoprostanes-25 years later. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):433–45.
77. Dizdaroglu M. Oxidatively induced DNA damage and its repair in cancer. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2015;763:212–45.
78. Evans MD, Cooke MS. Factors contributing to the outcome of oxidative damage to nucleic acids. *BioEssays*. 2004;26(5):533–42.
79. Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb L a. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem*. 1992;267(1):166–72.
80. Ock CY, Kim EH, Choi DJ, Lee HJ, Hahm KB, Chung MH. 8-hydroxydeoxyguanosine: Not mere biomarker for oxidative stress, but remedy for oxidative stress-implicated gastrointestinal diseases. *World Journal of Gastroenterology*. 2012. p. 302–8.
81. Ock CY, Hong KS, Choi KS, Chung MH, Kim Y soo, Kim JH, et al. A novel approach for stress-induced gastritis based on paradoxical anti-oxidative and anti-inflammatory action of exogenous 8-hydroxydeoxyguanosine. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(1):111–22.
82. Brooks PJ, Wise DS, Berry D a, Kosmoski J V, Smerdon MJ, Somers RL, et al. The oxidative DNA lesion 8,5'-(S)-cyclo-2'-deoxyadenosine is repaired by the nucleotide excision repair pathway and blocks gene expression in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*. 2000. 22355-62 p.
83. Kuraoka I, Bender C, Romieu a, Cadet J, Wood RD, Lindahl T. Removal of oxygen free-radical-induced 5',8-purine cyclodeoxynucleosides from DNA by the nucleotide excision-repair pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):3832–7.
84. Kuraoka I, Robins P, Masutani C, Hanaoka F, Gasparutto D, Cadet J, et al. Oxygen free radical damage to DNA. Translesion synthesis by human DNA polymerase eta and resistance to exonuclease action at cyclopurine deoxynucleoside residues. *J Biol Chem*. 2001;276:49283–8.

85. Marietta C, Gulam H, Brooks PJ. A single 8,5'-cyclo-2'-deoxyadenosine lesion in a TATA box prevents binding of the TATA binding protein and strongly reduces transcription in vivo. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1(11):967–75.
86. Miaskiewicz K, Miller JH, Fuciarelli AF. Theoretical analysis of DNA intrastrand cross linking by formation of 8,5'-cyclodeoxyadenosine. *Nucleic Acids Res*. 1995;23(3):515–21.
87. Dizdaroglu M, Jaruga P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*. 2012;46(4):382–419.
88. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002. p. 1102–15.
89. Ayala A, Muoz MF, Argelles S. Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2014.
90. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu C-C, Bhindi R, Figtree GA. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol*. 2013;1(1):483–91.
91. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F2-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000. p. 505–13.
92. Morrow JD. The isoprostanes: their quantification as an index of oxidant stress status in vivo. *Drug Metab Rev*. 2000;32(3-4):377–85.
93. Giustarini D, Dalle-Donne I, Tsikas D, Rossi R. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2009;46(5-6):241–81.
94. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clinical Chemistry*. 2006. p. 601–23.
95. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol* [Internet]. 2015;4C:180–3.
96. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type

- 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes*. 2015;6(3):456–80.
97. Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*. 1999. p. 1–9.
 98. Saxena AK, Srivastava P, Kale RK, Baquer NZ. Impaired antioxidant status in diabetic rat liver. Effect of vanadate. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(3):539–42.
 99. Schaffer SW, Jong CJ, Mozaffari M. Role of oxidative stress in diabetes-mediated vascular dysfunction: Unifying hypothesis of diabetes revisited. *Vascular Pharmacology*. 2012. p. 139–49.
 100. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001;414(December):813–20.
 101. Simsek S, Van Den Oever IAM, Raterman HG, Nurmohamed MT. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus. *Mediators of Inflammation*. 2010.
 102. Evans JL, Goldfine ID, Maddux B a., Grodsky GM. Are oxidative stress - Activated signaling pathways mediators of insulin resistance and β -cell dysfunction? *Diabetes*. 2003;52(1):1–8.
 103. Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling XF, et al. Oxidative stress in type 1 diabetes. *Immunol Diabetes li Pathog From Mouse To Man*. 2003;1005:43–54.
 104. Feng B, Ruiz MA, Chakrabarti S. Oxidative-stress-induced epigenetic changes in chronic diabetic complications. *Can J Physiol Pharmacol*. 2013;91(3):213–20.
 105. Nowotny K, Jung T, Höhn A, Weber D, Grune T. Advanced Glycation End Products and Oxidative Stress in Type 2 Diabetes Mellitus. *Biomolecules*. 2015;5(1):194–222.
 106. Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Arch Med Res*. 2005;36(3):197–209.
 107. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative stress and triglycerides as predictors of subclinical atherosclerosis in prediabetes. *Redox Rep*. 2014;19(2):87–91.

108. Jaruga P, Rozalski R, Jawien A, Migdalski A, Olinski R, Dizdaroglu M. DNA Damage Products (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'- deoxyadenosines as Potential Biomarkers in Human Urine for Atherosclerosis. *Biochemistry*. 2012;51:1822–4.
109. Chatfield D a. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*. Robert E. Ardrey. Huddersfield, UK: Wiley, 2003, 276 pp., \$110.00, hardcover. ISBN 0-471-49799-1. *Clinical Chemistry*. 2004. 261-262 p.
110. Hoffmann E De, Stroobant V. *Mass Spectrometry - Principles and Applications*. *Mass spectrometry reviews*. 2007. 945-61 p.
111. Honour JW. Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*. 2011;48(Pt 2):97–111.
112. Jaruga P, Dizdaroglu M. Identification and quantification of (5 ' R)- and (5 ' S)-8,5 ' -cyclo-2 ' -deoxyadenosines in human urine as putative biomarkers of oxidatively induced damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;397:48–52.
113. Teng Y-H, Wang C-W, Liao Y-T, Yang M-W, Liu T-Y. Quantification of Urinary 8-iso-Prostaglandin F(2 alpha) Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry During Cardiac Valve Surgery. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(4):237–45.
114. Smith KA, Shepherd J, Wakil A, Kilpatrick ES. A comparison of methods for the measurement of 8-isoPGF(2alpha): a marker of oxidative stress. *Ann Clin Biochem*. 2011;48(Pt 2):147–54.
115. Food and Drug Administration. *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*. U.S. Department of Health and Human Services. 2001. 4-10 p.
116. Men AE, Wilson P, Siemering K, Forrest S. *Sanger DNA Sequencing*. *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. 2008. p. 1–11.
117. Sanger F, Nicklen S, Coulson a R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463–7.

118. Liu X. Classification accuracy and cut point selection. *Stat Med*. 2012;31(23):2676–86.
119. Gradinaru D, Borsa C, Ionescu C, Margina D. Advanced oxidative and glycoxidative protein damage markers in the elderly with type 2 diabetes. *J Proteomics* [Internet]. 2013 Oct 30 [cited 2014 Jan 21];92:313–22.
120. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: A high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012;379(9833):2279–90.
121. Asami S. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis*. 1997;18(9):1763–6.
122. Lee BM, Lee SK, Kim HS. Inhibition of oxidative DNA damage, 8-OHdG, and carbonyl contents in smokers treated with antioxidants (vitamin E, vitamin C, B-carotene and red ginseng). *Cancer Lett*. 1998;132(1-2):219–27.
123. Dziągielewska-Gęsiak S. of Lipid Peroxidation Products, Plasma Total Antioxidant Status, and Cu-, Zn-Superoxide Dismutase Activity as Biomarkers of Oxidative Stress in Elderly Prediabetics. *Oxidative Med* 2014;2014:8 pages.
124. Pereira CS, Molz P, Palazzo RP, de Freitas TAB, Maluf SW, Horta JA, et al. DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes. *Mutat Res* [Internet]. 2013 May 15 [cited 2014 Jan 21];753(2):76–81.
125. Pereira CS, Molz P, Palazzo RP, de Freitas TAB, Maluf SW, Horta JA, et al. DNA damage and cytotoxicity in adult subjects with prediabetes. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2013;
126. Tabak O, Gelisgen R, Erman H, Erdenen F, Muderrisoglu C, Aral H, et al. Oxidative lipid, protein, and DNA damage as oxidative stress markers in vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Invest Med*. 2011;34(3):E163–71.
127. Serdar M, Sertoglu E, Uyanik M, Tapan S, Akin K, Bilgi C, et al. Comparison of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy. 2012;46(October):1291–5.

128. Monnier L, Colette C, Mas E, Michel F, Cristol JP, Boegner C, et al. Regulation of oxidative stress by glycaemic control: Evidence for an independent inhibitory effect of insulin therapy. *Diabetologia*. 2010;53(3):562–71.
129. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning - Sambrook & Russel - Vol. 1, 2, 3.pdf*. Human Mutation. 2001. p. 1–2231.



8. EKLER

EK 1. Araştırma Amaçlı Çalışma için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Hastalar için)

(Hekimin Açıklaması)

Diyabet (Şeker Hastalığı), insülin salgılanması veya dokulardaki insülin cevabında meydana gelen bozukluklara bağlı olarak kan glukoz düzeyinin yükselmesiyle ortaya çıkan uzun süreli bir hastalıktır. 2010 yılında ülkemizde yapılan TURDEP-2 çalışmasında (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II) 20 yaş ve üzerindeki kişilerde diyabet görülme sıklığı % 13.7, prediyabet (diyabete yatkınlık) görülme sıklığı ise % 13.9 bulunmuştur. Bu verilere göre toplumumuzda yaklaşık olarak her 4 erişkinden biri diyabet açısından risk altındadır. Diyabetin kesin bir tedavisi yoktur, erken teşhisi önemlidir ve hem uzun vadede hem de kısa süre içerisinde ortaya çıkabilecek diyabete bağlı sorunlar için gereken tıbbi önem verilmelidir.

Bu hastalığa ışık tutmak amacıyla bizler de Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya ve Endokrinoloji Anabilim Dalı olarak, prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında oksidatif DNA hasarının ve lipid peroksidasyonunun incelenmesi ile ilgili bir araştırma planlamaktayız. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı açısından önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Uzm. Dr. Mehmet Çalan veya Uzm. Dr. Tuğba Gümüş tarafından muayene edileceksiniz ve bulgularınız kaydedilecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda rutin laboratuvar tetkikleri için verdiğiniz kan örneğine ek olarak 10 cc (1 tüp) kan, sabah ilk idrarı ve 24 saatlik idrardan 10 mL almamız gerekmektedir. Kan ve idrar örneği, rutin tetkikleriniz alınırken alınacak, bu sebeple ikinci bir örnek alma girişimi olmayacaktır. Kan alma işlemi sırasında kanın damar dışına sızmasına bağlı ciltte morarma ve ağrı olabilir, bu durum ciddi bir risk oluşturmayacak; kendiliğinden gerileyecektir. Bunun dışında araştırmaya bağlı herhangi bir zarar görmemiz söz konusu değildir.

Sizinle birlikte yaklaşık 300 hastanın çalışmaya dâhil edilmesi planlanmaktadır. Bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme

hakkına sahipsiniz. Bu çalışmaya katılmamanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu çalışma sırasında bakılacak ek tetkikler için gerekli olan işlemin masrafı size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kişisel kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız da kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Bu bilgileri okuduktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir kopyası hekimde kalırken, bir kopyası da size verilecektir.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilirim ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; Uzm. Dr.Mehmet Çalan'ı 0(232)4123746 no'lu telefonda ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

EK 2. Araştırma Amaçlı Çalışma için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Sağlıklı Kontrol Grubu için)

(Hekimin Açıklaması)

Diyabet (şeker Hastalığı), insülin salgılanması veya dokulardaki insülin cevabında meydana gelen bozukluklara bağlı olarak kan glukoz düzeyinin yükselmesiyle ortaya çıkan uzun süreli bir hastalıktır. 2010 yılında ölkemizde yapılan TURDEP-2 çalışmasında (Türkiye Diyabet, Hipertansiyon, Obezite ve Endokrinolojik Hastalıklar Prevalans Çalışması-II) 20 yaş ve üzerindeki kişilerde diyabet görölme sıklığı % 13.7, prediyabet (diyabete yatkınlık) görölme sıklığı ise % 13.9 bulunmuştur. Bu verilere göre toplumumuzda yaklaşık olarak her 4 erişkinden biri diyabet açasından risk altındadır. Diyabetin kesin bir tedavisi yoktur, erken teşhisi önemlidir ve hem uzun vadede hem de kısa süre içerisinde ortaya çıkabilecek diyabete bağlı sorunlar için gereken tıbbi önem verilmelidir.

Bu hastalığa ışık tutmak amacıyla bizler de Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya ve Endokrinoloji Anabilim Dalı olarak, prediyabet ve tip 2 diyabet hastalarında oksidatif DNA hasarının ve lipid peroksidasyonunun incelenmesi ile ilgili bir araştırma planlamaktayız. Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Bu çalışmaya katılıminız araştırmanın başarısı açasından önemlidir.

Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz Uzm. Dr. Mehmet Çalan veya Uzm. Dr. Tuğba Gümüş tarafından muayene edileceksiniz ve sistemdeki daha önce yapılmış olan rutin analizleriniz (açlık kan şekeri, hemogram, sedimentasyon, BUN, kreatinin, lipid profili, karaciğer fonksiyon testleri) incelenecektir. Muayene sonucunda doktorunuz uygun görürse bu çalışmaya alınacaksınız. Yine izniniz doğrultusunda 10 cc (1 tüp) kan, sabah ilk idrarı ve 24 saatlik idrardan 10 mL almamız gerekmektedir. Kan alma işlemi sırasında kanın damar dışına sızmasına bağlı ciltte morarma ve ağrı olabilir, bu durum ciddi bir risk oluşturmayacak; kendiliğinden gerileyecektir. Bunun dışında araştırmaya bağlı herhangi bir zarar görmeniz söz konusu değildir.

Sizinle birlikte yaklaşık 150 sağlıklı kişinin çalışmaya dâhil edilmesi planlanmaktadır. Bu kişiler çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahiptir. Bu çalışmaya katılmanız veya başladıktan sonra herhangi bir safhasında ayrılmanız daha sonraki tıbbi bakımınızı

etkilemeyecektir. Araştırmacı da gönüllünün kendi rızasına bakmadan, olguyu araştırma dışı bırakabilir. Bu alışma sırasında bakılacak ek tetkikler için gerekli olan işlemin masrafı size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılamayacaktır.

Bu bilgileri okuduktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız. Bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun bir kopyası hekimde kalırken, bir kopyası da size verilecektir.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum. İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim). Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; Uzm. Dr.Mehmet çalan'ı 0(232)4123746 no'lu telefondan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji Bilim Dalı adresinden arayabileceğimi biliyorum. Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:



Ek 3. ROC Eğrisinde Eşik Değer Belirlenmesi için Kullanılan Değerler

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): 8-OH-dG

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
-,95016	1,000	1,000
,11042	,988	1,000
,21088	,988	,971
,32251	,988	,943
,39487	,976	,943
,40724	,964	,943
,42692	,952	,943
,43642	,940	,943
,44700	,928	,943
,45738	,916	,943
,45914	,904	,943
,46115	,892	,943
,48238	,892	,914
,51200	,892	,886
,55866	,892	,857
,60816	,892	,829
,62150	,892	,800
,63300	,892	,771
,65050	,892	,743
,66467	,892	,714
,67393	,880	,714
,68876	,867	,714
,70985	,855	,714
,72635	,843	,714
,73800	,831	,714
,75050	,831	,686
,76466	,819	,686
,77365	,807	,686
,80299	,807	,657
,83900	,807	,629
,85500	,807	,600
,86750	,795	,600
,87900	,795	,571
,88350	,783	,571
,90500	,783	,543

,93993	,783	,514
,95450	,771	,514
,96057	,771	,486
,98556	,771	,457
1,02606	,759	,457
1,05698	,759	,429
1,07798	,759	,400
1,12950	,747	,400
1,17041	,747	,371
1,17607	,735	,371
1,21526	,723	,371
1,25310	,723	,343
1,27281	,711	,343
1,29131	,699	,343
1,33350	,687	,343
1,37721	,675	,343
1,38621	,663	,343
1,39450	,651	,343
1,39900	,639	,343
1,43600	,627	,343
1,47420	,614	,343
1,50362	,602	,343
1,54158	,590	,343
1,55466	,578	,343
1,55800	,578	,314
1,56716	,578	,286
1,58167	,566	,286
1,58975	,554	,286
1,60524	,542	,286
1,61901	,530	,286
1,62508	,518	,286
1,63485	,506	,286
1,64103	,494	,286
1,66125	,482	,286
1,69150	,470	,286
1,70487	,470	,257
1,70887	,470	,229
1,75250	,470	,200
1,82185	,470	,171
1,86821	,458	,171
1,90985	,446	,171

1,93800	,446	,143
1,94950	,434	,143
1,96150	,422	,143
1,97688	,422	,114
2,01691	,410	,114
2,06717	,398	,114
2,09449	,386	,114
2,11335	,386	,086
2,13900	,373	,086
2,18828	,361	,086
2,24028	,361	,057
2,25838	,349	,057
2,30535	,337	,057
2,36236	,325	,057
2,37939	,313	,057
2,39950	,313	,029
2,42505	,301	,029
2,46571	,289	,029
2,50666	,277	,029
2,52869	,265	,029
2,54300	,253	,029
2,59879	,253	,000
2,70697	,241	,000
2,77400	,229	,000
2,80106	,217	,000
2,84041	,205	,000
2,90690	,193	,000
3,00420	,181	,000
3,27079	,169	,000
3,49115	,157	,000
3,72321	,145	,000
3,97721	,133	,000
4,21850	,120	,000
4,55422	,108	,000
4,79408	,096	,000
5,04600	,084	,000
5,49364	,072	,000
6,20921	,060	,000
6,66674	,048	,000
7,61069	,036	,000
8,95067	,024	,000

9,86102	,012	,000
11,32300	,000	,000

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): ScdA

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
,00000	1,000	1,000
,00332	1,000	,969
,00550	,988	,969
,00731	,976	,969
,00781	,964	,969
,00850	,952	,938
,00905	,928	,938
,01055	,928	,906
,01225	,916	,906
,01260	,904	,906
,01274	,892	,906
,01289	,892	,875
,01350	,880	,875
,01403	,880	,844
,01453	,880	,813
,01539	,880	,781
,01584	,867	,781
,01633	,855	,781
,01688	,855	,750
,01736	,843	,719
,01786	,831	,719
,01804	,819	,719
,01833	,807	,719
,01879	,795	,719
,02000	,795	,688
,02111	,795	,656
,02160	,783	,656
,02228	,783	,625
,02279	,771	,625
,02302	,771	,594
,02329	,759	,594
,02378	,759	,563
,02417	,747	,563

,02500	,735	,563
,02578	,723	,563
,02597	,723	,531
,02652	,723	,500
,02747	,711	,438
,02797	,699	,438
,02880	,699	,406
,02962	,687	,406
,03050	,675	,406
,03146	,675	,375
,03178	,663	,375
,03210	,651	,375
,03236	,639	,375
,03269	,627	,375
,03293	,614	,375
,03352	,602	,375
,03417	,590	,375
,03443	,590	,344
,03525	,578	,344
,03596	,566	,344
,03598	,554	,344
,03637	,542	,344
,03675	,542	,313
,03688	,530	,313
,03743	,530	,281
,03813	,518	,281
,03856	,506	,281
,03886	,494	,281
,03950	,446	,281
,04100	,434	,281
,04221	,422	,250
,04252	,410	,250
,04280	,398	,250
,04299	,398	,219
,04350	,386	,188
,04414	,386	,156
,04514	,373	,156
,04650	,373	,125
,04778	,349	,125
,04881	,349	,094
,04942	,337	,094

,05039	,325	,094
,05120	,313	,063
,05159	,301	,063
,05238	,289	,063
,05414	,277	,063
,05550	,265	,063
,05625	,253	,063
,05688	,241	,063
,05885	,229	,063
,06072	,229	,031
,06087	,217	,031
,06200	,205	,000
,06420	,193	,000
,06620	,181	,000
,06800	,169	,000
,07055	,157	,000
,07424	,145	,000
,07912	,133	,000
,08394	,120	,000
,08630	,108	,000
,08735	,096	,000
,09208	,084	,000
,09917	,072	,000
,10567	,060	,000
,11500	,048	,000
,13025	,036	,000
,30375	,024	,000
,49300	,012	,000
1,00000	,000	,000

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): RcdA

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 - Specificity
,00000	1,000	1,000
,00233	1,000	,938
,00268	,988	,938
,00285	,976	,938
,00316	,964	,906
,00337	,952	,906

,00358	,940	,906
,00380	,928	,906
,00394	,928	,875
,00401	,916	,813
,00444	,916	,781
,00493	,916	,750
,00529	,892	,688
,00579	,880	,688
,00612	,867	,688
,00634	,855	,688
,00662	,855	,656
,00700	,855	,625
,00729	,843	,625
,00738	,831	,625
,00745	,819	,625
,00759	,807	,625
,00785	,807	,594
,00802	,795	,563
,00818	,795	,531
,00832	,783	,531
,00836	,771	,531
,00899	,759	,531
,00979	,747	,531
,01016	,735	,531
,01116	,723	,531
,01276	,699	,531
,01362	,699	,500
,01386	,687	,500
,01450	,651	,500
,01550	,651	,469
,01608	,639	,469
,01617	,627	,469
,01631	,614	,469
,01671	,614	,438
,01700	,578	,438
,01717	,566	,438
,01745	,554	,438
,01779	,554	,406
,01814	,542	,344
,01849	,530	,344
,01916	,518	,344

,01971	,506	,344
,01988	,494	,344
,01997	,482	,344
,02050	,470	,344
,02110	,446	,344
,02147	,446	,313
,02187	,434	,313
,02250	,410	,313
,02346	,386	,313
,02408	,373	,313
,02540	,361	,313
,02706	,349	,313
,02775	,337	,313
,02843	,325	,313
,02910	,325	,281
,02964	,313	,281
,03100	,301	,281
,03267	,289	,281
,03363	,277	,281
,03474	,265	,281
,03562	,253	,281
,03585	,241	,281
,03876	,229	,250
,04176	,217	,250
,04300	,205	,250
,04420	,205	,219
,04456	,205	,188
,04498	,193	,188
,04617	,181	,188
,04731	,169	,188
,04790	,157	,188
,04944	,145	,188
,05071	,133	,188
,05169	,133	,156
,05367	,120	,156
,05540	,108	,156
,06050	,108	,125
,06550	,108	,094
,07200	,096	,094
,07850	,084	,094
,08076	,072	,094

,08789	,072	,063
,09512	,060	,063
,09920	,060	,031
,10169	,048	,031
,10299	,036	,031
,10443	,024	,031
,11293	,024	,000
,14350	,012	,000
1,00000	,000	,000

Coordinates of the Curve

Test Result Variable(s): isoprostan

Positive if Greater Than or Equal To ^a	Sensitivity	1 – Specificity
,00000	1,000	1,000
,01140	,987	1,000
,01390	,973	1,000
,02020	,973	,966
,02655	,973	,931
,02835	,973	,897
,02930	,973	,862
,03030	,973	,828
,03270	,960	,828
,03570	,947	,828
,03755	,933	,828
,03880	,920	,828
,03975	,907	,828
,04125	,907	,793
,04295	,893	,793
,04670	,880	,793
,05035	,880	,759
,05170	,867	,759
,05375	,853	,759
,05835	,840	,759
,06245	,827	,759
,06805	,813	,759
,07650	,800	,759
,08295	,787	,759
,08650	,773	,759
,08830	,747	,759

,09275	,747	,724
,09645	,747	,690
,09740	,733	,690
,09990	,733	,655
,10400	,720	,655
,10610	,720	,621
,10690	,720	,586
,10830	,707	,586
,11075	,693	,586
,11320	,680	,586
,11415	,667	,586
,11485	,653	,586
,11730	,653	,552
,12065	,653	,517
,12560	,640	,517
,12980	,627	,517
,13125	,613	,517
,13390	,613	,483
,13690	,613	,448
,14055	,613	,414
,14640	,613	,379
,15340	,600	,379
,15785	,587	,379
,15885	,573	,379
,16400	,573	,345
,16905	,560	,345
,17155	,560	,310
,17540	,547	,310
,17940	,533	,310
,18455	,520	,310
,18740	,507	,310
,19035	,493	,310
,19350	,493	,276
,19665	,493	,241
,21040	,480	,241
,22975	,467	,241
,23850	,453	,241
,24000	,440	,241
,24225	,440	,207
,24610	,440	,172
,24885	,427	,172

,25095	,413	,172
,25665	,400	,172
,26070	,387	,172
,26175	,387	,138
,26825	,373	,138
,27650	,373	,103
,27940	,360	,103
,28240	,347	,103
,28600	,333	,103
,29150	,333	,069
,29635	,320	,069
,29685	,307	,069
,29915	,293	,069
,30915	,280	,069
,32450	,267	,069
,33350	,253	,069
,33850	,240	,069
,34275	,227	,069
,34425	,227	,000
,34550	,213	,000
,35040	,200	,000
,35870	,187	,000
,36570	,160	,000
,39090	,147	,000
,43550	,133	,000
,49635	,120	,000
,55235	,107	,000
,57805	,093	,000
,59555	,080	,000
,62555	,067	,000
,67885	,053	,000
,71940	,040	,000
,73365	,027	,000
,74505	,013	,000
1,00000	,000	,000

EK 4. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/16-19	Tarih: 15.08.2013						
	<p>Prof.Dr.Hüray İŞLEKEL'in sorumlusu Melis KANT'ın yürütücüsü olduğu "Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif DNA Hasarının ve Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait sorumlu araştırmacı tarafından gönderilen 12.08.2013 tarihli dilekçeye ilişkin olarak;</p> <p>-"Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif DNA Hasarının ve Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi" isimli klinik araştırmanın adının "Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen Polimorfizminin İncelenmesi" olarak değiştirilmesi,</p> <p>-Protokol değişikliği- 12.08.2013 Versiyon 3.0</p> <p>-Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu - 12.08.2013 Versiyon 3.0 incelenerek uygun bulunmuştur.</p> <p>-Araştırma bütçesi- 12.08.2013 Versiyon 3.0</p> <p>- Araştırma başvuru formu örneği incelenerek bilgi edinilmiştir.</p>							
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU								
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ							
Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	Uzmanlık Alanı	Cinsiyet	Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Öğr.Gör.Dr.İskender İNCE	Biyofarmasötik ve Farmakokinetik	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk.	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		Katılırdı
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji A.D.	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		Katılırdı
Prof.Dr.Hale ÖREN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Çocuk Hematoloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		Katılırdı
Prof.Dr.Şule KALKAN	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		Katılırdı
Doç.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Doç.Dr.Mualla Aylin ARICI	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		Katılırdı
Uzm.Dr.Uğur Önsel TÜRK	Kardiyoloji	Batı Anadolu Mersinli Tıp Merkezi	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
Av.Semra MARMARA	Hukuk	DEÜ Rektörlüğü	E <input type="checkbox"/> K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		
İhsan ÇELİKDEMİR	75.Yıl Özel İlköğretim Okulu Md. Yard.	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E <input checked="" type="checkbox"/> K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>		

EK 5. Özgeçmiş

I. Genel Bilgiler

Düzenleme Tarihi:	Mayıs, 2015		
Adı Soyadı :	Melis KANT		
TC Kimlik No:	61987090842		
Doğum Yılı:	1984		
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İnciraltı 35340/İZMİR		
Tel:	0 232 412 44 28	GSM:	0 533 468 38 04
E-Posta:	melis.dinc@deu.edu.tr melissdinc@gmail.com	Faks:	0 232 412 44 39

II. Eğitim Bilgileri

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Öğrenim Dönemi
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Tıp Fakültesi	Biyokimya	Doktora	2009-
Türkiye	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Mühendislik ve Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Yüksek Lisans	2006-2009
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji Bölümü	Lisans	2004-2006

III. Akademik ve Mesleki Deneyim

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Türkiye	İzmir	Biyokimya Bölümü	Araştırma Görevlisi	2010-
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü	Türkiye	İzmir	Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	Araştırma Görevlisi	2006-2009

IV. Yurtdışı Deneyimi

Eylül-Kasım 2013	Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) Biyomoleküler Ölçüm Laboratuvarı, Washington DC, ABD Bu Dönemde Gerçekleştirilen Çalışmalar: <ul style="list-style-type: none">• Hasarlı DNA Bazlarının GC-MS/MS ve Hasarlı DNA Nükleozidlerinin LC-MS/MS ile Ölçümleri• DNA Onarım Enzimleri Apürinik/Apirimidinik Endonükleaz (APE 1) ve DNA Polimeraz II (POLB) nın LC-MS/MS SID-MRM Yöntemi ile Analizleri
-----------------------------	---

V. Uzmanlık Alanları

<ul style="list-style-type: none">• Oksidatif Stres, Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı, DNA Onarım Proteinleri, Lipid Peroksidasyonu, Diyabet ve Diğer Metabolik Hastalıklar, Hücre Ölümü, Tek Nükleotid Polimorfizmleri• Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi, Gaz Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi, Akım Sitometrisi, Western-Blot ve Elektroforez Teknikleri, DNA Dizi Analizi, Hücre Kültürü Çalışmaları
--

VI. Diğer Akademik Faaliyetler

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı		6	
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)	2009-	Türk Biyokimya Derneği	
	2016	16. FEBS Young Scientists' Forum Organizasyon Komite Üyesi	
	27 Temmuz - 1 Ağustos 2015	ARLAB XI. Hücresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu LC-MS/MS Laboratuvar Uygulaması Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir, Türkiye	

	20-22 Mayıs 2015	International Congress of Molecular Medicine, İZMİR
	21-23 Ekim 2014	DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Proteomiks, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İnciraltı-İZMİR
	22-24 Ocak 2014	7. EUA-CDE WORKSHOP Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir, Türkiye
	26-27 Kasım 2013	ARLAB IX. Hüresel, Moleküler ve Analitik Teknikler Kursu LC-MS/MS Laboratuar Uygulaması Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir, Türkiye
	16-17 Mayıs 2013	Sağlıkta İnovasyon Çalıştayı Üniversiteden Sanayiye Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir, Türkiye
	22-25 Mayıs 2012	Oksidatif stres, DNA hasarı, DNA onarımı ve hastalıklarla ilişkisi teorik ve uygulamalı kursu, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir, Türkiye
	27-30 Nisan 2011	6. ORPHEUS Konferansı Organizasyon Komitesi, Dokuz Eylül Üniversitesi İzmir

VII. Ödüller

Alındığı Kuruluş	Ödülün Adı	Tarih
Türk Psikiyatri Derneği	Proje Teşvik Ödülü, " Depresyonda DNA Hasarının ve Onarımının Belirtili Dönem ve Düzeltme ile İlişkisi "	Mayıs, 2016
Türk Biyokimya Derneği	Poster Ödülü " Kordon Kanı İskemi-Modifiye Albumin Perinatal Asfiksi Tanısında Erken Bir Biyobelirteç Olabilir mi? " adlı poster ile 25. Ulusal Biyokimya Kongresi	03-06 Eylül 2013
European Molecular Biology Organization	EMBO Kısa Dönem Yurtdışı Araştırma Bursu	Eylül-Kasım 2013

VIII. Burslar

Tarih	Bursun Adı
22-26 Haziran 2014	IFCC WorldLab Istanbul 2014 kongre kayıt bursu
03-06 Eylül 2013	25. Ulusal Biyokimya Kongresi destekleyen firma Roche tarafından kayıt bursu
14-16 Haziran 2012	EMBO Young Scientists' Forum konaklama bursu
29 Kasım-2 Aralık 2011	23. Ulusal Biyokimya Kongresi katılım için Türk Biyokimya Derneği tarafından kayıt ve konaklama bursu
27-30 Ekim 2010	22. Ulusal Biyokimya Kongresi katılım için Türk Biyokimya Derneği tarafından kayıt ve konaklama bursu
28 - 31 Ekim 2009	21. Ulusal Biyokimya Kongresi katılım için Türk Biyokimya Derneği tarafından kayıt ve konaklama bursu

IX. Yayınlar

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI)
1. Kumral A, Okyay E, Guclu S, Gencpinar P, Islekel GH, Oguz SS, Kant M , Demirel G, Duman N, Ozkan H. Cord Blood Ischemia-Modified Albumin: Is It Associated With Abnormal Doppler Findings in Complicated Pregnancies and Predictive value of Perinatal Asphyxia? J Obstet Gynaecol Res. 2013 Mar;39(3):663-71. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.02055.x.
Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI-EXPANDED)
1. Kant M , Akgül B, Nalbant A. Endogenous Heat Shock Protein GroEL of A.Actinomycescomitans Preferentially Targets Primary Human CD8+ T Cells Turk J Biol 2015 Ocak 39:104-110 doi:10.3906/biy-1404-64
Hakemli Konferans/ Sempozyumların Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar
1. Acet F, Celiloğlu M, Okyay E, Akış M, Kant M , İşlekel H. The Importance of Maternal Ischemia Modified Albumin in Foreseeing Perinatal Asphyxia V. International Congress of Molecular Medicine 20-22 May 2015
2. Turan R, Akış M, Kuyum P, Çakar S, Kant M , Arslan N, İşlekel H. Evaluation of Vitamin B12, Methymalonic Acid and Homocysteine Levels in Obese Adolescents V. International

Congress of Molecular Medicine 20-22 May 2015

3. **Kant M, Akış M, Çalan M, Gümüş T, Bayraktar F, Dizdaroğlu M, İşlekel H. Absolute Quantification of Oxidatively Induced DNA Damage and Lipid Peroxidation Products in Patients with Prediabetes and Type 2 Diabetes Mellitus** IFCC WorldLab Istanbul, 6/2014 doi:10.1515/cclm-2014-4019 (SCI)
4. Akış M, **Kant M**, Işık I, Arslan M, N, İşlekel H. **Plasma Methylmalonic Acid and Homocysteine As Functional Vitamin B12 Deficiency Markers in Phenylketonuria and Healthy Children** IFCC WorldLab Istanbul, 6/2014 doi:10.1515/cclm-2014-4060 (SCI)
5. Kumral A, **Kant M**, Okyay E, Guclu S, Gencpinar P, Oguz SS, Demirel G, Duman N, Ozkan H, Islekel H. **Kordon Kanı İskemi-Modifiye Albumin Perinatal Asfiksi Tanısında Erken Bir Biyobelirteç Olabilir mi?** 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 9/2013 Turk J Biochem, 2013; 38 (S), Sayfa 340 (SCI-Expanded)
6. Akış M, **Kant M**, Işık İ, Arslan N, İşlekel H. **Fenilketonüride Merilmalonik asit ile Fonksiyonel B12 vitamin eksikliğinin araştırılması** 25. Ulusal Biyokimya Kongresi, 9/2013 Turk J Biochem, 2013; 38 (S), Sayfa 362 (Aynı bildiri sunulmuştur.) (SCI-Expanded)
7. Akış M, **Kant M**, Işık İ, Arslan N, İşlekel H. **Fenilketonürlü Çocuklarda Fonksiyonel B12 Vitamin Eksikliğinin Plazma Metilmalonik Asit ve Homosistein Düzeyleri ile Araştırılması** Uluslararası katılımlı XII.Metabolik Hastalıklar ve Beslenme Kongresi Eskişehir, Türkiye 2013 (Aynı bildiri sunulmuştur.)
8. Islekel H, Akis M, **Kant M**. **A Model of Biochemistry Dry Practical for Learning Liver Functions and Bilirubin Metabolism in Medical School; Student Feedback**, FEBS Education Workshop "Trends in Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips for Postgraduate Students and Beyond", Izmir, Turkey
9. Islekel H, **Kant M**, Akis M. **Metabolic Acid-Base Disorder Cases as an Effective Vehicle for Comprehension of Acid-Base Balance**, FEBS Education Workshop Trends in Undergraduate Biomolecular Science Education & Tips for Postgraduate Students and Beyond, Izmir, Turkey
10. **Kant M**, Akış M, Tuna G, İşlekel H, Kırkalı G, Dizdaroğlu M. **Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi ile Hasarlı DNA Nükleozidleri S-cdA ve 8-OH-dG'nin İdrarda Ölçümü için Yöntem Geçerlilik Çalışması** 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 11/2011 Turk J Biochem, 2011; 36 (S), Sayfa 211 (SCI-Expanded)
11. İşlekel H, Yusufoglu N, **Kant M**, Akış M, Şanlı A, Özdemir N. **Akciğer Kanserinde Doku ve Serum VEGF, Anjiopietin-1 ve Anjiopietin-2 Düzeylerinin Değerlendirilmesi** 23. Ulusal Biyokimya Kongresi, 11/2011. Turk J Biochem, 2011; 36 (S), Sayfa 226 (SCI-Expanded)
12. **Kant M**, Tuna G, Akis M, Islekel H, Kırkalı G. **The PhD Program in Department of Medical Biochemistry Institute of Health Sciences Dokuz Eylul University** 6th ORPHEUS Conference-

PhD Quality Indicators for Biomedicine and Health Sciences, 04/2011. Orpheus Conference Book 2011, Page 74

13. Akış M, Dinç M, İşlekel H. **Metilmalonik Asit Ölçümünde LC-MS/MS-MRM Yönteminin Geçerliliğinin Belirlenmesi** 22. Ulusal Biyokimya Kongresi, 10/2010. Turk J Biochem, 2010; 35 (S) Page 97 **(SCI-Expanded)**

14. Dinc M, İşlekel H, Güner G. **A Biochemistry Dry Practical Prepared For Comprehension of Acid-Base Balance Using Metabolic Acid-Base Disorder Cases** IX. International Congress of Medical Sciences, 05/2010. Conference Book 2010; LXII Page 93

X. Projeler

Destekleyen Kurum	Proje Adı	Projedeki Görevi	Proje Başlangıç-Bitiş Tarihleri
TÜBİTAK 3001	Adrenal Adenomu Olan Hastalarda Deksametazon Supresyon Testi Sonuçlarına Serum Kortikosteroid Bağlayıcı Globulin Düzeyi, Plazma Deksametazon Konsantrasyonu, Kortizol Ölçüm Yöntemi ve Ölçülen Kortizol Fraksiyonunun Etkilerinin Araştırılması	Bursiyer	Ocak 2016- Şubat 2018
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2016.KB.SAĞ)	Gestasyonel Diabetes Mellitus ve Bozulmuş Glukoz Toleransı Olan Gebelerde Oksidatif DNA Hasarının Demir Düzeyleriyle İlişkisinin İncelenmesi	Araştırmacı	Mart 2016-Mart 2018
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2014.KB.SAĞ.41)	İnsan Umbilikal Ven Endotel Hücre Kültüründe Kalsitriol ve Parikalsitol'ün Oksidatif DNA Hasarı ve Onarımı Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	Araştırmacı	Mart 2014-Haziran 2017
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2013.KB.SAĞ.94)	Prediyabet ve Tip 2 Diyabet Hastalarında Oksidatif Makromolekül Hasarının ve Transkripsiyon Faktör 7 Benzeri 2 (TCF7L2) Gen Polimorfizminin İncelenmesi	Araştırmacı	Aralık 2013- Aralık 2015

Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi	Obez Adölesanlarda B12 Vitamin Eksikliği Fonksiyonel Biyobelirteçleri, Serum Metilmalonik Asit ve Homosistein Düzeylerinin İncelenmesi	Araştırmacı	Ekim 2013- Haziran 2015
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2013.KB.SAĞ.61)	Adipoz Doku Kökenli Erişkin Kök Hücre Uygulamasının D-Galaktoz Yaşlanma Modeli Oluşturulmuş Deride Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Moleküler Düzeyde Gösterilmesi	Araştırmacı	Temmuz 2013- Ocak 2014
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2013.KB.SAĞ.54)	Maternal İskemi Modifiye Albumin, Non-Stres Test ve Fetal Doppler Ultrasonografinin Perinatal Asfiksiyi Öngörmedeki Yeri	Araştırmacı	Haziran 2013- Haziran 2014
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2009.KB.SAĞ.154)	Preterm Bebeklerde Kord Kanı İskemi Modifiye Albumin Düzeyleri Beyaz Cevher Hasarının Tanısal Göstergesi Olabilir mi?	Araştırmacı	Aralık 2009- Aralık 2010
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2009.KB.SAĞ.37)	Sağlıklı Ve Fenilketonürlü Çocuklarda Fonksiyonel B12 Vitamin Eksikliğinin Plazma Metilmalonik Asit Ve Homosistein Düzeyleri İle Araştırılması	Araştırmacı	Temmuz 2008- Temmuz 2012
Dokuz Eylül Üniversitesi Rektörlüğü Projesi (Proje No: 2009.KB.SAĞ.54)	Akciğer Kanserinde Serum ve Doku Protein Belirteçlerinin İncelenmesi	Araştırmacı	Ağustos 2009 - Ağustos 2012
TÜBİTAK (Proje No: 106T417)	Proteomik Yaklaşım: Bakteriyel Isı Şoku Proteini GroEL'e Cevaben T Lenfosit Sitokin Profillerinin Çıkarılması	Araştırmacı	Aralık 2006- Aralık 2008