

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

**SON DÖNEM BÖBREK YETMEZLİKLİ HASTALARDA
ACE GEN POLİMORFİZMİ, ANJİOTENSİNOJEN GEN
POLİMORFİZMİ VE ANJİOTENSİN RESEPTÖR TİP 1 GEN
POLİMORFİZMİNİN BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI İLE
İLİŞKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Dr. Derya ÖZ

Tez Danışmanı
Prof Dr Seyhun KÜRŞAT

MANİSA, 2009

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa

I. GİRİŞ

1

II. GENEL BİLGİLER

4

1-Kronik Böbrek Yetmezliği

4

2- Kronik Böbrek Yetmezliği ve Bozulmuş Glukoz Toleransı

8

3-Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi

9

4-ACE Gen Polimorfizmi

11

5-Anjiotensinojen Gen Polimorfizmi

12

6-Anjiotensin Tip 1 Reseptör Gen Polimorfizmi

13

7-Kronik Böbrek Yetmezliği ve Renin-Anjiotensin

Aldosteron Sisteminde Genetik Polimorfizm

14

III. GEREÇ VE YÖNTEM

16

IV. BULGULAR

21

V. TARTIŞMA

48

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

53

VII. ÖZET

56

VIII. İNGİLİZCE ÖZET

58

IX. KAYNAKLAR

60

ÖNSÖZ

İç Hastalıkları ihtisasım süresince bilimsel bir eğitim ve araştırma ortamının oluşması için her türlü olanağı sağlayan, iyi birer hekim ve insan olarak yetişmemiz için emek veren, bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan değerli hocam İç Hastalıkları Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof Dr Hakan Yüceyar' a, tezimin her aşamasında fikirleri ile yol gösterici olan, her zaman teşvik ve desteğini gördüğüm değerli hocam Nefroloji Bilim Dalı Başkanı sayın Prof Dr Seyhun Kürşat'a ve eğitimimin her aşamasına katkıda bulunan, birlikte çalışmaktan onur duyduğum sayın hocalarım Doç Dr Bilgin Özmen, Doç Dr Ülkü Ergene, Doç Dr Ender Ellidokuz, Doç Dr Timur Pırıldar, Doç Dr Zeliha Hekimsoy, Doç Cengiz Kırmaz, Yrd Doç Dr Mine Miskioğlun'a, tez çalışması süresince yardımlarından dolayı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Bilim Dalı öğretim görevlisi Yrd Doç Dr Sırrı Çam ile Uzm Dr Hülya Bahadır Çolak ve isimlerini sayamadığım üniversitemizin tüm çalışanlarına ve her zaman en büyük desteğim olan, ilkelerini hayat felsefesi edindiğim sevgili annem ve babama sonsuz teşekkürler ederim .

Dr. Derya ÖZ
İç Hastalıkları AD.

I . GİRİŞ

Kronik böbrek yetmezliği (KBY), hipertansiyon ve diyabet gibi major risk faktörlerine ek olarak genetik faktörlerinde rol oynadığı multifaktöryal bir hastalıktır (1). Son dönem böbrek yetmezliği gelişimi için güçlü ve bağımsız bir risk faktörü olan glisemik durum ve bilinen diyabetle birlikte diğer metabolik anormallikler progresif renal hastalığa ve diyaliz hastalarında mortalite nedenleri arasında ilk sırayı alan kardiyovasküler olaylara katkıda bulunur(2). Bu renal ve kardiyovasküler risk faktörleri arasında hipertansiyon ve insülin direnci ile hiperinsülinemi arasında iyi bilinen bir ilişki vardır (2). İnsülinin postreseptör sinyal yolağında görev alan fosfotidil inozitol-3 kinaz (PI3- K) enzimini aktive etmesi, endotel hücrelerinde NO (nitrik oksit) artışı ve vasküler düz kas hücrelerinde vazokonstrüksiyona neden olan miyozin hafif zincir aktivitesinin azalmasına yol açar. İnsülin direnci durumunda bu normal cevap kaybolmuştur (2, 3). Ayrıca insülin direncinde posttranskripsiyonel mekanizmalarla dokularda lokal anjiotensin reseptör tip1 (AT1 R) sayısında ve anjiotensin II (AII) üretiminde artış meydana gelir (4). İnsülin ve A II, PI3-K yolağında karşıt düzenleyici moleküller olarak rol oynarlar.

A II' nin İnsülin reseptöründe ve reseptör sonrası sinyal yollarında görev alan bazı enzimlerde serin fosforilasyonunu artırarak ve normal kaskad işleyişi için gerekli olan tirozin fosforilasyonunu azaltarak işlevsel bozulmaya yol açtığı, böylece glukozun hücre içine alınmasında azalma meydana geldiği düşünülmektedir (2, 3).

Hayvan çalışmalarında invivo olarak AT1 R bloke eden ajanların kullanımının postprandial insülin aracılı glukoz kullanımında düzelmeye yol açtığı görülmüştür(2). Renin anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS); renal hemodinami, kan basıncı ve sıvı elektrolit dengesinin regülasyonunda rol oynayan, hedef organ hasarının belirleyicisi bir enzim kaskadıdır (5, 6).

Bu enzim kaskadının iki enzimi; renin ve anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) aracılığıyla, anjiotensinojenden son ürünler anjiotensin I (AI) ve II meydana gelir (7). RAAS'ın önemli elemanı olan A II güçlü bir vazokonstrüktördür. AII vazokonstrüktör etkisini başlıca postglomerüler arterioller üzerinde göstererek, glomerüler hidrostatik basıncı artırır. Hücre büyümesi, inflamasyon ve fibrozisi devam ettirerek, kronik renal hasarın başlangıcı ve hızlanmasına doğrudan katkıda bulunur(6). Böylece RAAS'ın uygunsuz aktivasyonu KBY patogenezinde merkezi rol oynar (5). Bu sistemin aşırı aktivasyonuna genetik yatkınlık glomerüler filtrasyon hızının daha kısa sürede kaybına ve renal yetmezlik gelişimine yatkınlığa yol açabilir (8). Bu nedenle RAAS ile ilgili gen polimorfizmlerinin progresif renal yetmezlik riski taşıyan bireylerdeki önemi üzerinde durulmaktadır.

RAAS' ın aşırı aktivasyonu ile ilgili gen polimorfizmlerinden biri intron 16'da bir insersiyon (I) /delesyon (D) polimorfizmi olan ACE gen polimorfizmidir (8). ACE gen I/D polimorfizminin farklı etiyolojik nedenlere bağlı renal yetmezliğin gelişimi ve progresyonu ile bağlantılı olabileceğini gösteren çalışmalar mevcuttur (9). Delesyon polimorfizmi için homozigot olan bireyler (DD), İnsersiyon polimorfizmi için homozigot (II) olan bireylerden daha fazla plazma ACE aktivitesine sahiptir (8). Artmış ACE aktivitesi ise aşırı AII üretimi ile ilişkilidir (5).

AT1 R gen polimorfizminin böbrek hastalığı gelişimi ve son dönem böbrek yetmezliği progresyonu üzerine katkısı, AT1 R aracılığı ile etkisini gösteren AII' ye hedef organ duyarlılığındaki genetik çeşitlilikle ilişkili olabilir (9).

RAAS' ın aktivasyonu ile ilişkili diğer bir gen polimorfizmi olan anjiotensinojen (AGT) geninin, T174M ve M235T olmak üzere iki moleküler varyantı vardır. Her iki moleküler varyanta tüm hipertansif bireylerde kontrol gurubundan daha sık rastlanmıştır. Ayrıca M235T varyantı hipertansif bireylerde AGT'nin daha yüksek plazma seviyesi ile ilişkili bulunmuştur (8) . Renal yetmezlik ve insülin direncinin gerek total gerekse kardiyovasküler mortalite ve morbiditeyi arttırdığı bilinmektedir (10,11,12). RAAS ile ilişkili genetik polimorfizmlerin, insülin direnci ile ilişkisinin olup olmadığının ortaya

konulması ile artmış böbrek hastalığı riski taşıyan olgularda ve hastalığı ileri evrelerde tespit edilen olgularda alınan non-farmakolojik ve farmakolojik önlemlerle artmış kardiyovasküler mortalite ve morbiditenin önlenmesi, hastalık progresyonunun yavaşlatılmasını ortaya koyacak ileri araştırmalara ışık tutması açısından, son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda, literatürde rastlamadığımız ACE gen, AGT gen, AT1 R gen polimorfizmlerinin, bozulmuş glukoz toleransı (BGT) ilişkisinin olup olmadığını araştırmayı amaçladık. Böylece progresif renal yetmezlik riski taşıyan bireylerde RAAS ile ilişkili genetik polimorfizmlerin erken evrelerde tanımlanması ile, farklı etiyolojik nedenlere bağlı renal yetmezliğin gelişimi ve progresyonu üzerine bu genetik polimorfizmlerin katkısı olabileceğini gösteren çalışmaların mevcudiyeti de göz önünde bulundurulduğunda, hastalık asemptomatik olduğu erken fazda önlenebilir ya da hastalığa bağlı mortalite ve morbidite önemli ölçüde azaltılabilir.

II . GENEL BİLGİLER

KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ

Dünya çapında giderek artan sayıda hastayı etkileyen KBY, böbrek fonksiyon kaybının progresif seyri ile karakterizedir. Bu artış, diyaliz ve tranplantasyon gibi renal replasman tedavisi uygulanan son dönem böbrek yetmezlikli hasta sayısına yansır. Artıştan sorumlu iki önemli faktör vardır (13). Birinci faktör popülasyonun yaşı olup, insidans ileri yaşda, genel popülasyondan daha yüksektir. İkinci faktör ise global tip 2 diyabetes mellitus epidemisi (13). Etiyolojiden bağımsız olarak kronik böbrek hastalıklarının majör sonuçları, böbrek yetmezliğinde son evreye kadar varabilen progresyon, azalmış böbrek fonksiyonlarının komplikasyonları (anemi, sekonder hiperparatiroidi, malnütrisyon vd .) ve kardiyovasküler hastalıkları içerir (14, 15). Bu olumsuz sonuçların bazılarının erken tanı ya da tedavi ile önlenebileceği ya da geciktirilebileceğini gösteren kanıtlar artış göstermektedir (14) .

KBY, üç ay ya da daha uzun süredir devam eden böbrek hasarı ya da glomerüler filtrasyon hızının (GFH) 60ml/dk/1,73 m²' nin altında olması olarak tanımlanır (14). Böbrek hasarının varlığında, GFH normal olsa bile bu tanımlama yapılabilir.

Hasarın göstergeleri; proteinüri, anormal idrar sediment bulgular, görüntüleme yöntemlerinde anormal bulgular, kan ve idrar biyokimyasal ölçümlerindeki diğer anormallikleri içerir (14,16).

KBY'de evreleme; etiyolojik neden ve progresyon oranından bağımsız olarak GFH' in seviyesi ile belirlenen, hastalığın şiddeti temelinde oluşturulmuştur. GFH' in azalması ile birlikte böbrek yetmezliğinin ileri evreleri, hipertansiyon, anemi, malnütrisyon, kemik hastalığı, nöropati ve azalmış yaşam kalitesi gibi komplikasyonların riskinde artış ile birlikte (16). KBY'nin evreleri Tablo-1'de belirtilmiştir (14). Hastalığın evrelemede olduğu kadar, erken tespit edilmesinde de böbrek hasarı riskini arttıran ve başlatan faktörler ile progresyona yol açan faktörlerin varlığının tespit edilmesi önem taşımaktadır (13,14, 16).

Riski arttıran faktörlere bakıldığında; İleri yaş, aile öyküsünün varlığı, düşük doğum ağırlığı ve sosyoekonomik düzey ya da eğitim düzeyi, ırk ya da etnik kökeni içerir. Böbrek hasarını başlatan faktörler ise diyabet, yüksek kan basıncı, otoimmün hastalıklar, sistemik enfeksiyonlar, üriner traktus enfeksiyonları ve taşlar, alt üriner sistem obstrüksiyonu ve ilaç toksisitesidir (13, 16).

Tablo 1.KBY evreleri

EVRE	TANIM	GFH (ml/dk)
0	Artmış risk	>90
1	Normal ya da artmış GFH ile birlikte böbrek hasarı	90
2	Hafif azalmış GFH ile birlikte böbrek hasarı	60-89
3	Orta derecede azalmış GFH ile birlikte böbrek hasarı	30-59
4	İleri derecede azalmış GFH	15-29
5	Son dönem böbrek yetmezliği	< 15

KBY' nin altta yatan etiyolojik nedenlerine bakıldığında, geçmişte en sık sebep glomerülonefritler iken günümüzde ise diyabet ve hipertansiyondur. Bu etiyolojik değişikliğin nedeni glomerülonefritlerin daha efektif tedavisi, korunma ile diyabetik ve hipertansiyonlu hastalarda mortalitedeki azalmadır. Azalmış mortalite ile bu hastalarda ölümcül kardiyovasküler komplikasyonlar öncesinde böbrek yetmezliği gelişimi için yeterli zaman kalabilmektedir. Ülkemizdeki etiyolojik nedenlerine göre prevalans, Türk Nefroloji Derneğinin 2007 yılında hazırladığı rapora dayanarak Tablo-2 ' de özetlenmiştir (17).

Tablo 2.Türkiye de kronik böbrek yetmezliği etiyolojik nedenleri ve prevalansları

HASTALIK	PREVALANS (%)
Diyabetes Mellitus (DM)	26,1
Hipertansiyon	24,4
Kronik Glomerülonefrit	9,4
Polikistik Böbrek Hastalıkları	4,4
Pyelonefrit	4,1
Amiloidoz	2,4
Renal Vasküler Hastalık	1
Diğer Nedenler	7,9
Etiyolojisi Bilinmeyen	18,4
Bilgi Yok	1,8

KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ VE BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI

BGT ve bozulmuş açlık glukozu (BAG) ; normal glukoz homeostazisi ile diyabetes mellitus (DM) arasındaki bir evreyi tanımlar ve prediyabet olarak adlandırılabilir. BAG gece açlığı takiben açlık kan şekerinin 100 mg/dl ve 126 mg/dl arasında olmasıdır. Standart 75 gram glukoz yüklemesi sonrası ikinci saat kan şekeri değerinin 140 mg/dl ve 200 mg/dl arasında olması BGT, 200 mg/dl ve üzerinde olması ise diyabet olarak tanımlanır (18) .

Diyabet son dönem böbrek yetmezliği gelişimi için majör bir risk faktörü olmasına rağmen, BGT ve BAG'nun böbrek hastalığı gelişimi ile ilişkisi açık değildir. Karşılaştırmalı çalışmalardan elde edilen sonuçlar; glukoz metabolizmasındaki değişiklikler ve hiperinsülineminin bozulmuş böbrek fonksiyonları ile ilişkisini göstermiştir. Glukoz intoleransı olan bireyler arasında böbrek fonksiyonlarında erken bozulmayı gösteren bulgular vardır. Fakat Amerikan diyabet birliği (ADA) tarafından tanımlanmış KBY ile ilişkili glisemik hastalık kategorisi bulunmamaktadır (19).

RENİN-ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİ

RAAS, her glomerülün afferent arteriolünde yer alan özelleşmiş hücreler olan jukstaglomerüler hücrelerden salınan proteolitik enzim renin tarafından başlatılır (20, 21,22). Renal perfüzyon basıncındaki azalmaya yanıt olarak salınan renin, karaciğer kaynaklı bir alfa-2 globulin olan AGT'nin bir dekapeptit olan Al' e dönümünü sağlar. Al daha sonra bir oktapeptit olan All' ye dönüşür. Bu dönüşümün %60'ından ACE sorumlu iken, geri kalanı kimaz, katepsin G ve diğer serin proteazlar tarafından gerçekleştirilir (23). ACE (kininaz II) hem RAAS hemde kinin kallikrein sisteminin anahtar komponentidir. Kinin kallikrein sistemindeki rolü, bradikinini inaktive etmesidir (21, 24). Böylece ACE iki ayrı enzimatik aktivite gösterir: vasodilatatör bir ajan olan bradikininin inaktivasyonu ve vasokonstrüktör bir ajan olan All'nin aktivasyonu (24). All, RAAS' ın temel medyatörü olup biyolojik etkilerini iki tip reseptör üzerinde gösterir: AT1 R ve anjiotensin reseptör tip 2 (AT2 R) (20, 21, 23) .

AT1 reseptörleri, dominant olarak böbrek, adrenal glandlar, vasküler düz kas hücreleri ve kalp de eksprese edilir. AT2 reseptörler, fetal gelişim esnasında yüksek yoğunlukta bulunurken, fetal dönem dışında sadece adrenal glandlar, uterus, overler, vasküler endotelyum ve beynin belirli bölgelerinde eksprese edilir (21). All' nin patolojik etkilerinin çoğuna AT1 R'ü ile etkileşiminin aracılık ettiği düşünülür (22).

Fizyolojik koşullarda erişkin dokularda en fazla sunulan reseptör AT1 R subtipidir. All bu reseptörlere bağlanarak vazokonstrüksiyon, aldosteron sekresyonu, sodyum reabsorbsiyonu, susama hissinin uyarılması , antidiüretik hormon (ADH) sekresyonu ve hücre büyümesinin uyarılması gibi etkilerini gerçekleştirir (20, 25).

All, AT1 R' ye göre daha az sunulan AT2 R' ye bağlanarak farklı işlevler gerçekleştirir. Bazı hastalık durumlarında ve kronik AT1 R blokajı uygulandığında; AT2 R sunusu artarak, vasodilatasyon, hücre büyümesi ve fibrozisin baskılanması gibi AT1 R etkilerine karşıt denge işlevler ön plana geçer (21, 25). All' nin hemodinamik etkilerine ek olarak, doğrudan ya da diğer büyüme faktörleri aracılığıyla dolaylı olarak, birçok nonhemodinamik etkisi mevcuttur. Böbrek hastalıklarının patofizyolojisinde bu iki tip etkinin de önemli payı bulunmaktadır (25, 26).

Kültüre glomerüler hücrelerde All' nin böbrekteki etkilerine bakıldığında; All' nin fizyolojik koşullarda glomerüler filtrasyon hızının ayarlanmasında kritik bir rolü olmakla birlikte, glomerüler kapiller basıncı arttırarak glomerüloskleroz gelişiminde de rol oynadığı görülecektir (25). Hemodinamik etkilerine ek olarak mezenjial hücreler üzerine doğrudan etkileri de vardır. Kültüre mezenjial hücrelerde AT1 R üzerinden hipertrofi ve proliferasyonu uyarır, süperoksid anyon oluşumunu doz bağımlı arttırır (25). Glomerülosklerozun progresyonunda transforming growth faktör beta (TGF-B), mezenjial hücre hipertrofisi ve ekstraselüler matriks artışı ile anahtar rol oynar.

All'ye bağlı glomerülosklerozun TGF-B ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (25, 26). All tarafından regüle edilen aldosteron, adrenal korteksin zona glomerülozasında sentez ve sekrete edilen mineralokortikoid bir hormondur. Aldosteron; gastrointestinal traktus, tükrük bezleri ve böbrek epitel hücrelerinde, sodyum reabsorpsiyonu, potasyum ve hidrojen iyon sekresyonunu arttıran mineralokortikoid reseptörleri etkiler. Son zamanlarda, hücre proliferasyonu, sitokin salınımı, inflamasyon ve fibrozisi içeren nongenomik etkileri de gösterilmiştir (22)

ACE GEN POLİMORFİZMİ

ACE , AI' in AII' ye dönüşümü ve bradikinin inaktivasyonu yoluyla kardiyovasküler homeostazisinde önemli rol oynar (27, 28). Aynı bireylerde plazma seviyesinin tekrarlayan ölçümleri sabit iken, bireyler arasında büyük farklılıklar gözlenmesi, plazma ACE seviyesinin genetik kontrol altında olduğunu düşündürmüştü ve 17. kromozom da lokalize olan, ACE genin I / D polimorfizmi ilk kez Rigat ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (29). Bu polimorfizm, intron 16 ' da lokalize 287 baz çiftinin varlığı (insersiyon) ya da yokluğu (delesyon) ile tanımlanır (28, 29) . Bu iki alel üç farklı genotip oluşturur; II, ID, DD.

DD alel homozigot olan bireyler, II alel homozigot bireylerden daha yüksek plazma ACE seviyesine sahiptir. Heterozigot gurup ise (ID), orta seviyede yüksekliğe sahiptir (27). Epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına bakıldığında ; DD genotipin , IgA nefropatisi, diyabetik nefropati gibi bazı renal hastalıkların progresyonunda rol oynadığı, esansiyel hipertansiyonda hedef organ hasarı için bağımsız bir risk faktörü olabileceği ve ACE inhibitörleri ile nefroprotektif tedaviye zayıf yanıt ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (27, 30).

ANJİOTENSİNOJEN GEN POLİMORFİZMİ

RAAS'ın komponentlerinin çoğu hipertansiyonun, potansiyel belirleyicisidir. Anjiotensinojenin plazma seviyesi, bu anlamda birkaç nedene bağlı özel önem taşımaktadır. Bazı hastalarda, plazma seviyesi ile diyastolik kan basıncı arasında korelasyon, bazı ailelerde ise plazma seviyesi ile hipertansiyon arasında ilişki olduğu gösterilmiştir (31). AGT ile hipertansiyon arasındaki bu ilişki anjiotensinojen genindeki varyasyonların esansiyel hipertansiyona yatkınlığı etkileyebileceğini düşündürmüştür (32).

AGT geni, kromozom 1q42-43' de lokalize, beş tane exon içeren bir gendir. AGT'nin, tanımlanmış en azından 15 moleküler varyantı olmakla birlikte, çoğu çalışma da 174. ve 235. pozisyondaki metionin ve treonin rezidülerinin yerdeğişikliğine odaklanılmıştır. Bu yüzden M235T ve T174M moleküler varyantları üzerinde durulmaktadır (27).

Plazma AGT seviyesi genotipe göre önemli ölçüde değişiklik gösterir . T235 homozigotlar, M235 homozigotlardan %20 daha yüksek AGT seviyesine sahiptir. Östrojenler, glukokortikoidler ve tiroid hormonlarının stimülasyonu plazma AGT seviyesinde artışa yol açan genotip dışındaki faktörlerdir (32). Plazma seviyesindeki artış All oluşumunu etkiler. All ise glomerüler filtrasyon hızının ayarlanmasında kritik öneme sahip olması dışında, kan basıncı ve volüm homeostazisinin uzun süreli regülasyonunda da dominant rol oynar (32).

ANJİOTENSİN TİP 1 RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMİ

AT1 R normal fizyolojik koşullarda erişkin dokularda en fazla sunulan reseptördür. All, bu reseptörlere bağlanarak; vazokonstrüksiyon, aldosteron sekresyonu, sodyum reabsorbsiyonu, susama hissi, ADH sekresyonu ve hücre büyümesinin uyarılması gibi etkilerini gerçekleştirir (25).

AT1 R genin, A1166C polimorfizmi ilk kez Bonnardeux ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. C aleli All' ye artmış yanıtla ilişkili olup, KBY' li hastalarda renal fonksiyonlarda bozulma, normotansif bireylerde daha yüksek sistolik kan basıncı, hipertansif hastalarda sol ventrikül hipertrofisi ve tip 2 diyabetin 10. yılından sonra artmış albüminüri insidansı ile ilişkilendirilmiştir (27).

AT1 R gen polimorfizmi olan olgularda, genotip-fenotip korelasyonu üzerine cinsiyet, ırk ve etnik kökeninde etkili olabileceği gözlenmiştir (32) . Yapılan bir çalışmada; CC genotipli beyazlar da, sistolik kan basıncı ve nabız basıncının önemli ölçüde yüksek olduğu, fakat Afrika kökenli Amerikalılar da genotipe göre kan basıncının değişmediği gözlenmiş , bazal kan basıncı üzerine, cinsiyet ve genotipin etkisini değerlendiren bir başka çalışmada ise, C alelin sadece erkek cinsiyette daha yüksek arterial basınçla ilişkili olduğu, kadınlarda bu ilişkinin açık olmadığı gözlenmiştir (27) .

KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ VE RENİN-ANJİOTENSİN ALDOSTERON SİSTEMİNDE GENETİK POLİMORFİZM

KBY; çok sayıda gen ile çevresel faktörün bireysel yatkınlığa yol açtığı multifaktöryel bir hastalıktır. Renal fonksiyonlar ve kan basıncı yakın ilişki içindedir. Fizyolojik olarak ;böbrekler kronik kan basıncı kontrolünde önemli role sahip olduğu gibi, yüksek kan basıncı da, basınç natriürez mekanizmaları vasıtasıyla renal fonksiyonları etkiler. Uzun süreli yüksek kan basıncı, renal hasara katkıda bulunur ya da neden olur iken, bozulmuş renal fonksiyon da, arteriyal hipertansiyona neden olur ya da agreve eder (19, 33).

RAAS; kan basıncı ve renal fonksiyonun etkileşiminde ve regülasyonunda anahtar rol oynar. RAAS inhibitörleri ; kan basıncını düşürür , renal hasarı azaltabilir ya da önleyebilir (33). Bireyler arasında RAAS inhibisyonuna heterojen tedavi yanıtının, RAAS komponentlerinin genetik polimorfizminden kaynaklandığı düşünülmektedir (33). İlk olarak ACE gen polimorfizmi ile diyabetik nefropati arasındaki ilişki tanımlanmış ve D alel taşıyan hem tip 1 hemde tip 2 diyabetik bireylerde, nefropatiye progresyon riskinin daha fazla ve kısa sürede olduğu, ACE inhibitörleriyle renoprotektif tedaviye yanıtın zayıf olduğu doğrulanmıştır (33). Renal transplant hastalarında; greft fonksiyonu üzerine yapılan çalışmalar; D alelin renal fonksiyonu olumsuz etkileyebileceğini desteklemiştir. Otozomal dominant polikistik böbrek hastalığı, IgA nefropatisi, hipertansif nefropati ve son dönem böbrek yetmezliğinde yapılan benzer çalışmaların bir kısmı ise, ACE gen D alelin olumsuz etkilerini doğrular nitelikte sonuçlanmamıştır (33) .

Bu çelişkili sonuçların üç temel faktöre bağlı olabileceği düşünülmüştür. Bunlardan ilki; nefropati gelişimi ve progresyonunda tek faktörün RAAS olmayışı, ikincisi; varolan ilave faktörlerin, RAAS ' ın katkılarının tespit edilmesini engellemiş olması, üçüncüsü ise; renal yetmezlik gelişiminde ACE genden başka genetik polimorfizmlerin etkili olabileceğidir.

Etkili olabilecek diğer genetik polimorfizmler AGT gen , AT1 R gen ve aldosteron sentaz gen polimorfizmlerini içerir. Bu gen polimorfizmlerinin etkileri, All ve aldosteron aracılı yanıtlarla uyum içindedir. Bu nedenle renal yetmezlik gelişiminde; RAAS komponentlerini kodlayan, multipl gen polimorfizmlerinin spesifik kombinasyonlarının, herhangi bir polimorfizmin tek başına etkisinden daha belirleyici olması beklenebilir (33).

III.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji servisinde izlenmekte olan; son dönem böbrek yetmezlikli , prediyalitik ve diyalitik dönemdeki, bilinen diyabeti olan ve bilinen diyabeti olmayıp, oral glukoz tolerans testi (OGTT) sonrasında diyabet saptanan, 50' si diyabetik olmak üzere 100 hasta alındı. Bilinen diyabeti olmayan, KBY'li hastalara; 75 gram OGTT uygulandı. OGTT sonuçlarına ve açlık plazma glukoz değerlerine göre hastalar, normal glukoz toleransı (açlık plazma glukozu < 100 mg/dl ve OGTT sonrası ikinci saat glukozu < 140 mg/dl), BAG (açlık plazma glukozu 100-125 mg/dl arasında) ,BGT (OGTT sonrası ikinci saat plazma glukozu 140-199 mg/dl arasında) ve DM (OGTT sonrası ikinci saat plazma glukozu 200 mg/dl ve üstünde) olarak gruplandırıldı . OGTT uygulanan tüm hastalarda insülin direnci ve insülin duyarlılık indeksi (ISI) hesaplandı . İnsülin direnci; açlık glukozu ve açlık insülin seviyelerinden faydalanılarak HOMA-IR [açlık glukozu (mmol/lt) x açlık insülini (mikroünit/mlt) /22.5)] metodu ile, İnsülin sensitivite indeksi ise ISI-S [0.226 – 0.0032 x BMI – 0.0000645 x insülin (120.dakika) - 0.0375 x glukoz (90.dakika)] metodu ile belirlendi.

Aktif malignitesi ya da malignite öyküsü olan, KBY nedeni, üriner sistem obstrüksiyonu ile ilişkili olan, kronik ya da aktif enfeksiyonu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

ACE GEN , ANJİOTENSİNOJEN (AGT) GEN VE ANJİOTENSİN TİP 1 (AT1) RESEPTÖR GEN POLİMORFİZMLERİNİN TAYİNİ

Genetik polimorfizm dağılımının yapılması için hastalardan EDTA'lı tüpe 1 ml t periferik venöz kan alındı. Kanlar -80 C' de saklandı.

1.Genetik Analiz

1.Kullanılan Kimyasallar ve araçlar

1.1.Kimyasallar: Çalışmanın her aşamasında moleküler grade kalitesinde kimyasallar ve tip-1 kalitesinde ddH₂O (çift distile su) (18 megaohm / cm) kullanıldı.

- Agaroz (Sigma, A 9539)
- Bromfenol mavisi (Sigma, 5525)
- dNTP karışımı (Boehringer Mannheim, 1277049)
- Etidium Bromid (Sigma , E 7637)
- Moleküler Ağırlık Marker' ı (Hae III, Fermentas)
- Nükleospin DNA izolasyon kiti (Macherey-Nagel, No:740 951.250)
- PCR tampon seti (Boehringer Mannheim, 1699121)
- Taq DNA Polimeraz (Boehringer Mannheim, 1146165)

1.2.Araçlar:

- GeneAmp PCR System 9700 Applied Biosystems, Foster City, CA
- Elektroforez sistemi EC105 (EC Apparatus Corporation, < 500 mA) OWL, Heilberg, Germany
- Sorvall RMC 14 Mikrosantrifüj.
- Pharmacia Biotech Ultraspec 2000. UV/Visible Spektrofotometre
- Grant LTD 6 G (-20 to 100 C) su banyosu

2- ACE-ID, AGT- M235T ve AT1- A1166C Genotiplerinin Belirlenmesi

2.1.Kan örneklerinden DNA İzolasyonu

Hastalardan EDTA' lı tüpe alınan 1mlt periferik kandan 200 µl alınarak, periferal kan lökositlerinden, genomik DNA elde edildi . Bu amaçla tuzsuz DNA ekstraksiyon yöntemi kullanıldı . Bu yöntem için Nucleospin DNA izolasyon kiti kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri kit prospektüsüne uygun olarak yapıldı.

2.2. PCR Amplifikasyonu:

2.2.1. Amplifikasyonda Kullanılacak Primerlerin Seçimi

ACE gen, AGT gen ve AT1 reseptör gen polimorfizmleri PCR yöntemi ile belirlendi. Kullanılacak primerler Tablo 3' de belirtildi ve yapılan literatür taraması sonucunda belirlendi (34, 35, 36). Belirlenen primerler HPLC ile saflaştırılmış olarak Oncor Appligen' e sentezlettirildi. Liyofilize hale gelen primerler 10 pmol / µl konsantrasyonda olacak şekilde ddH₂O ile çözüldü.

2.2.2.Uygulanan PCR Protokolü ve PCR Ürünlerinin Elektroforezde Değerlendirilmesi

PCR reaksiyonunda yer alan bütün bileşenler (PCR tamponu, dNTP, Primerler, Taq DNA Polimeraz) ve sıcaklık profilleri tek tek kontrol edilerek standardizasyonları yapıldı.

ACE ID gen polimorfizmi, PCR yöntemi ile 200 µM dNTP karışımı, 1.5 mM MgCl₂, 1xTampon, 1 ünite AmpliTaq polymeraz (PE Applied Biosystems) ve her bir primerden 10 pmol içeren 15 µl birer primerden analiz edildi. ACE' nin polimorfik bölgelerini kaplamak için tablo da (Tablo 3.) belirtilen primerler kullanıldı.

DNA 35 döngü süresince Thermal Cycler' da amplifiye edildi ve her bir döngüde 30 saniye 94 °C ısıda denaturasyon, 30 saniye 50 °C' de annealing ve sonrasında 1 dakika 72 °C'de extention uygulandı. Her bir DD genotipi, insersiyon sekansına spesifik primer kullanarak ikinci bir PCR analizi ile doğrulandı (34) .

Elde edilen 2µl (100ng) DNA molekülü %1'lik agaroz jel de elektroforeze tabii tutuldu . Moleküler biyoloji de kullanılan agarozdan 1 gram tartılarak, üzerine 100µl 10 X TBE ve 10 µg / ml konsantrasyonlu etidyum bromid solüsyonları ilave edilip karıştırıldı. Önceden hazırlanmış elektroforez tankına taraklar yerleştirildi ve bu agaroz solüsyonu kamerasına döküldü, sertleşinceye kadar bekletildi. Üzerine 1 X TBE tamponu eklendikten sonra taraklar çıkarıldı. 2 µl DNA ve 2 µl Orange G karıştırılarak jele yüklendi . Elektroforez 100Mv, 80 mA koşullarında kullanılarak 30-40 dakika arasında uygulandı. Jeldeki DNA ultraviyole de, baz çifti sayısı bilinen standart olarak kullanılan DNA markerı (Moleküler ağırlık marker' ı) ile karşılıklı olarak görüntülendi. Hastalar ACE gen intron 16' da 287 baz çifti insersiyonunun varlığı ya da yokluğuna göre II, ID ve DD olarak sınıflandırıldı.

AGT M235T polimorfizmini analiz etmek için PCR ile amplifiye edilmiş Tablo 3 ' de belirtilen genomik DNA primerleri kullanıldı. PCR ürünleri 2 saat süreli 37 °C ' de restriksiyon enzimi Aspl ile muamele edildi. DNA parçaları, etidyum bromid ile boyalı %1' lik agaroz jel üzerinde elektroforez yoluyla ayrıldı ve ultraviyole ışığı kullanarak görüntülendi ve genotipler MM, MT ve TT olarak kodlandı.

AT1-A1166C polimorfizmini analiz etmek için PCR ile amplifiye edilmiş Tablo 3'de belirtilen genomik DNA primerleri kullanıldı. DNA 35 döngü süresince Thermal Cyclers ' da amplifiye edildi ve her bir döngüde 30 saniye 94 °C ısıda denaturasyon, 30 saniye 50 °C'de annealing ve sonrasında 1 dakika 72 °C'de extention uygulandı. PCR ürünleri, 37 °C' de 1.5 U Ddel ile geceleyin muamele edildi . Sindirim ürünleri %1' lik agaroz jel üzerinde ayrıldı ve etidyum bromid ile görüntülendi. Genotipler; AA , AC ve CC olarak kodlandı.

Tablo 3. Kullanılan Primerler

ACE gen Polimorfizmi	Forward Primer : 5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' Revers Primer : 5'-ATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'
AGT M235T Polimorfizmi	Forward Primer :5'-GATGCGCACAAGGTCCTG-3' Revers Primer : 5'-CAGGGTGCTGTCCACACTGGCTCGC-3'
AT1R A1166C Polimorfizmi	Forward Primer : 5'-GCAGCACTTCACTACCAAATGAT-3' Revers Primer : 5'-TGTTCTTCGAGCAGCCGT-3'

Tüm istatistiksel analizler " SPSS 14.0 for Windows " yazılımı ile yapıldı. Sürekli değişkenler ortalama \pm SD şeklinde ifade edildi. Genotiplerin gruplar arasındaki dağılımının değerlendirilmesi; Ki-kare, Kruskal Wallis ve Mann Whitney testleri kullanılarak yapıldı. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.005$ olması durumu olarak kabul edildi.

IV.BULGULAR

Çalışmaya son dönem böbrek yetmezlikli, prediyalitik ve diyalitik dönemdeki toplam 100 hasta alındı. Hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ortalamaları Tablo 4' de belirtildi.

Tablo 4. Hastaların demografik özellikleri ve laboratuvar parametrelerinin ortalamaları

	Minimum Değer	Maximum değer	Ortalama \pm SD
Yaş	31,00	87,00	62,92 \pm 12,71
Boy	1,40	1,85	1,62 \pm 0,072
Vücut ağırlığı	44,00	98,00	66,39 \pm 11,95
Beden kitle indeksi	17,00	36,00	24,95 \pm 4,38
Üre	36,00	443,00	155,46 \pm 73,86
Kreatinin	3,50	13,90	6,21 \pm 2,18
Kreatinin klerensi	4,40	14,80	10,77 \pm 2,40

Çalışmaya alınan ve bilinen diyabeti olmayan hastalara oral glukoz tolerans testi yapıldı. Açlık plazma glukozu ve oral glukoz tolerans testi sonuçlarına göre, glukoz toleransı normal ve glukoz intoleransı saptanan hastaların sıklığı Tablo 5 ' de, glukoz intoleransı olan (BAG, BGT, DM) hastaların sıklığı ise Tablo 6 ' da belirtildi .

Tablo 5. Hastaların glukoz tolerans durumlarına göre sıklığı .

	n	%
Normal glukoz toleranslı	20	20,0
Glukoz İntoleranslı	80	80,0
Total	100	100,0

Tablo 6 . OGTT sonucuna göre glikoz intoleransı (BAG, BGT) saptanan ve DM olan hastaların sıklığı

Glukoz intoleranslı gurup	n	%
DM	50	50,0
BAG	5	5,0
BGT	25	25,0

Glukoz tolerans durumuna göre, normal glukoz toleranslı ve intoleranslı olarak gruplandırılan hastalarda ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin dağılımının glukoz tolerans durumu ile ilişkisi, Ki-kare testi ile incelendiğinde; ACE gen II genotipe sahip bireyler normal glukoz toleranslı gurupda %45, intoleranslı gurupda %21,3 olarak saptanmasına rağmen, guruplar arasında genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadığı Tablo 7' de gösterildi .

Tablo 7. ACE, AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin dağılımının glikoz tolerans durumu ile ilişkisi .* Ki-kare test

Glukoz toleransı	ACE GEN POLİMORFİZMİ						P
	II Genotip		ID Genotip		DD Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Normal	9	45,0	7	35,0	4	20,0	0,095
İntoleranslı	17	21,3	39	48,8	24	30,0	
	AT1 R GEN POLİMORFİZMİ						P
	AA Genotip		AC Genotip		CC genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Normal	14	70,0	4	20,0	2	10,0	0,159
İntoleranslı	42	52,5	34	42,5	4	5,0	
	AGT GEN POLİMORFİZMİ						P
	MM Genotip		MT Genotip		TT Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Normal	3	15,0	8	40,0	9	45,0	0,678
İntoleranslı	8	10,0	28	35,0	44	55,0	

ACE, AT1 R ve AGT genlerin , genotiplerinin dağılımının, glukoz intoleransı saptanan gruplarla (BAG, BGT ve DM) ilişkisi, Ki-kare testi ile incelendiğinde, gruplar arasında genotiplerin dağılımı açısından anlamlı fark saptanmadığı Tablo 8’ de gösterildi .

Tablo 8 . ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin dağılımının glikoz intoleranslı gruplarla (DM, BAG, BGT) ilişkisi . * Ki-kare test

Glukoz intoleransı	ACE GEN POLİMORFİZMİ						P
	II Genotip		ID Genotip		DD Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabetes mellitus	11	22,0	25	50,0	14	28,0	0,983
Bozulmuş açlık glisemisi	1	20,0	2	40,0	2	40,0	
Bozulmuş glukoz toleransı	5	20,0	12	48,0	8	32,0	
	AT1 R GEN POLİMORFİZMİ						P
	AA Genotip		AC Genotip		CC genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabetes mellitus	25	50,0	21	42,0	4	8,0	0,513
Bozulmuş açlık glisemisi	2	40,0	3	60,0	0	0	
Bozulmuş glukoz toleransı	15	60	10	40	0	0	
	AGT GEN POLİMORFİZMİ						P
	MM Genotip		MT Genotip		TT Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabetes mellitus	3	6,0	20	40,0	27	54,0	0,137
Bozulmuş açlık glisemisi	0	0	3	60,0	2	40,0	
Bozulmuş glukoz toleransı	5	20,0	5	20,0	15	60,0	

Bilinen diyabeti olmayan ve OGTT yapılan tüm hastalar (n = 68) ile glukoz toleransı normal olan gurupda (n = 20) HOMA-IR metodu ile insülin direnci hesaplandı ve 2,7' nin üstündeki değerler insülin direnci olarak kabul edildi. İnsülin direnci hesaplanan bu iki hasta gurubunda ACE gen, AT1R gen ve anjiotensinojen genlerin, genotiplerinin, insülin direnci ile ilişkisi Ki-kare testi ile değerlendirildiğinde, genotipler arasında, insülin direnci açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadığı Tablo 9 ve Tablo 10' da gösterildi .

Tablo 9. Normal glukoz toleranslı hastalar da ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin insülin direnci ile ilişkisi * Ki-kare test

Glukoz toleransı normal hastalar	HOMA-IR				P
	< 2,7		> 2,7		
ACE Gen	N	%	n	%	0,509
II Genotip	7	77,8	2	22,2	
ID Genotip	5	71,4	2	28,6	
DD Genotip	4	100	0	0	
AT1 R Gen	N	%	n	%	P
AA Genotip	10	71,4	4	28,6	
AC Genotip	4	100	0	0	0,343
CC Genotip	2	100	0	0	
AGT Gen	N	%	n	%	P
MM Genotip	3	100	0	0	
MT Genotip	6	75	2	25	0,637
TT Genotip	16	80	4	20	

Tablo 10. OGTT testi yapılarak HOMA-IR metodu ile insülin direnci hesaplanan tüm hastalarda (n = 68) ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin insülin direnci ile ilişkisi . * Ki-kare test

OGTT uygulanan hastaların tümü	HOMA-IR				P
	< 2,7		> 2,7		
ACE Gen	N	%	n	%	0,653
II Genotip	12	63,2	7	36,8	
ID Genotip	20	69,0	9	31,0	
DD Genotip	14	70,0	6	30,0	
AT1R Gen	N	%	n	%	P
AA Genotip	28	70,0	12	30,0	
AC Genotip	15	62,5	9	37,5	0,783
CC Genotip	3	75,0	1	25,0	
AGT Gen	N	%	n	%	P
MM Genotip	8	88,9	1	11,1	
MT Genotip	15	65,2	8	34,8	0,341
TT Genotip	23	63,9	13	36,1	

İnsülin direnci hesaplanan, bilinen diyabeti olmayan ve OGTT yapılan tüm hastalar (n = 68) ile glukoz toleransı normal olan gurupda (n = 20) insülin direnci ortalama değerleri ile ACE gen , AT1 R gen ve AGT genlerin, genotiplerinin ilişkisi Kruskal Wallis test ile değerlendirildiğinde; genotipler arasında, insülin direnci ortalama değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadığı Tablo 11 ve Tablo 12' de gösterildi.

Tablo 11. Normal glukoz toleranslı hastaların HOMA-IR metodu ile hesaplanan insülin direnci ortalama değerlerinin, ACE gen, AT1 R gen ve AGT genlerin, genotipleri ile ilişkisi. * Kruskal Wallis test

Glukoz toleransı normal hastalar	HOMA-IR Ortalama \pm SD	
ACE Gen		P
II Genotip	1,84 \pm 1,05	
ID Genotip	2,71 \pm 2,43	
DD Genotip	1,84 \pm 0,73	0,938
AT1 R Gen		P
AA Genotip	2,39 \pm 1,84	
AC Genotip	1,49 \pm 0,88	
CC Genotip	1,69 \pm 0,29	0,465
AGT Gen		P
MM Genotip	1,50 \pm 1,10	
MT Genotip	0,80 \pm 2,17	
TT Genotip	2,26 \pm 1,60	0,718

Tablo 12 . OGTT testi yapılarak HOMA-IR metodu ile insülin direnci hesaplanan tüm hastalarda (n = 68) insülin direnci ortalama değerlerinin , ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotipleri ile ilişkisi. * Kruskal Wallis test

OGTT uygulanan hastaların tümü	HOMA-IR Ortalama \pm SD	
ACE Gen		P
II Genotip	2,92 \pm 2,19	
ID Genotip	2,63 \pm 2,79	
DD Genotip	3,17 \pm 3,27	0,468
AT1 R Gen		P
AA Genotip	2,88 \pm 2,64	
AC Genotip	3,04 \pm 3,16	
CC Genotip	1,73 \pm 0,88	0,626
AGT Gen		P
MM Genotip	1,89 \pm 1,83	
MT Genotip	3,01 \pm 3,17	
TT Genotip	3,03 \pm 2,69	0,238

İnsülin direnci hesaplanan, bilinen diyabeti olmayan ve OGTT yapılan tüm hastalar (n = 68) ile glukoz toleransı normal olan gurupda (n = 20) İnsülin sensitivite indeksi , ISI-S metodu ile hesaplandı. Bu hastaların ACE , AT1 R ve anjiotensinojen genlerin, genotiplerinin insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisi Kruskal Wallis test ile değerlendirildi. Genotipler arasında, insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadığı Tablo 13 ve Tablo 14' de gösterildi.

Tablo 13 . Normal glukoz toleranslı hastaların ISI-S metodu ile hesaplanan insülin sensitivite indeksi ortalama değerlerinin ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotipleri ile ilişkisi. * Kruskal Wallis test

Glukoz toleransı normal hastalar	ISI-S Ortalama ± SD	
ACE Gen		P
II Genotip	-6,51 ± 1,36	
ID Genotip	-6,94 ±2,43	0,442
DD Genotip	-6,10±1,78	
AT1 R Gen		P
AA Genotip	-6,51±2,10	
AC Genotip	-6,58±1,60	0,943
CC Genotip	-7,07±3,43	
AGT Gen		P
MM Genotip	-6,66±1,37	
MT Genotip	-6,20±2,24	0,447
TT Genotip	-6,78±1,98	

Tablo 14 . OGTT testi yapılarak ISI-S metodu ile insülin sensivite indeksi hesaplanan tüm hastalarda (n=68) insülin sensivite indeksi ortalama değerlerinin, ACE, AT1 R ve AGT genlerin, genotipleri ile ilişkisi .

* Kruskal Wallis test

OGTT uygulanan hastaların tümü	ISI-S Ortalama \pm SD	
ACE Gen		P
II Genotip	-5,83 \pm 1,37	
ID Genotip	-4,8 \pm 1,80	
DD Genotip	-3,5 \pm 0,23	0,123
AT1 R Gen		P
AA Genotip	-4,8 \pm 1,50	
AC Genotip	-5,7 \pm 2,23	0,552
CC Genotip	-4,5 \pm 1,83	
Anjiotensinojen Gen		P
MM Genotip	-6,1 \pm 2,21	
MT Genotip	-4,3 \pm 1,35	
TT Genotip	-5,2 \pm 1,56	0,276

ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotiplerde, glukoz tolerans durumunun I ve D aleli ile ilişkisinin, Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 15 'de gösterildi. II ve DD genotip, II ve ID genotip, ID ve DD genotiplerinin, normal ve glukoz intoleranslı guruplarda dağılımı incelendi. II ve DD genotip (p = 0,081) ile II ve ID genotip (p = 0,057) taşıyan gurupta D aleli ile ilişkili olarak istatistiksel anlamlılığa yakın sonuçlara ulaşıldığı görüldü . (istatistiksel anlamlılık p < 0,05)

Tablo 15 . ACE gen polimorfizmin de I aleli taşıyan ve D aleli taşıyan genotiplerin glukoz toleransı ile ilişkisi. * Ki-kare test

Glukoz toleransı	ACE GEN POLİMORFİZMİ				P
	II Genotip		DD Genotip		
	n	%	n	%	
Normal	9	34,6	4	14,3	0,081
İntloreanslı	17	65,4	24	85,7	
	II Genotip		ID Genotip		P
	n	%	n	%	
	Normal	9	34,6	7	
İntoleranslı	17	65,4	39	84,8	
	ID Genotip		DD Genotip		P
	n	%	n	%	
	Normal	7	15,2	4	
İntoleranslı	39	84,8	24	85,7	

AT1 R gen polimorfizmi için, A ve C aleli taşıyan genotiplerin, glukoz tolerans durumunun A ve C aleli ile ilişkisinin, Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 16' da gösterildi. AA ve CC genotip AA ve AC genotip, AC ve CC genotiplerinin, normal ve glukoz intoleranslı guruplarda dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 16 . AT1 R gen polimorfizmin de A aleli ve C aleli taşıyan genotiplerin glukoz toleransı ile ilişkisi. * Ki-kare test

Glukoz toleransı	AT1 R GEN POLİMORFİZMİ				P
	AA Genotip		CC Genotip		
	N	%	n	%	
Normal	14	25,0	2	33,3	0,658
İntlorensli	42	75,0	4	66,7	
	AA Genotip		AC Genotip		P
	n	%	n	%	
	Normal	14	25,0	4	
İntoleranslı	42	75,0	34	89,5	
	AC Genotip		CC Genotip		P
	N	%	n	%	
	Normal	4	10,5	2	
İntoleranslı	34	89,5	4	66,7	

AGT gen polimorfizmi için, M ve T aleli taşıyan genotiplerin, glukoz tolerans durumunun M ve T aleli ile ilişkisinin Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 17 'de gösterildi. MM ve TT genotip, MM ve MT genotip, MT ve TT genotiplerinin, normal ve glukoz intoleranslı guruplarda dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 17 . AGT gen polimorfizmin de M aleli ve T aleli taşıyan genotiplerin glukoz toleransı ile ilişkisi . * Ki-kare test

Glukoz toleransı	AGT GEN POLİMORFİZMİ				
	MM Genotip		TT Genotip		P
	N	%	n	%	
Normal	3	27,3	9	17,0	0,426
İntloreanslı	8	72,7	44	83,0	
	MM Genotip		MT Genotip		P
	n	%	n	%	
	Normal	3	27,3	8	22,2
İntoleranslı	8	72,7	28	77,8	
	MT Genotip		TT Genotip		P
	N	%	n	%	
	Normal	8	22,2	9	17,0
İntoleranslı	28	77,8	44	83,0	

OGTT yapılan ve HOMA-IR metodu ile insülin direnci hesaplanan tüm hastaların insülin direnci ortalama değerleri Tablo 18' de belirtildi .

Tablo 18. ACE , AT1 R ve AGT genlerinin, genotiplerini taşıyan , çalışmaya katılan ve OGTT uygulanan tüm hastalar için HOMA-IR metodu ile hesaplanan insülin direnci ortalama değerleri .

		HOMA-IR
		Ortalama \pm SD
ACE Gen	N	
II Genotip	19	2,92 \pm 2,19
ID Genotip	29	2,63 \pm 2,79
DD Genotip	20	3,17 \pm 3,27
Total	68	2,87 \pm 2,76
AT1R Gen	N	
AA Genotip	40	2,88 \pm 2,64
AC Genotip	24	3,04 \pm 3,16
CC Genotip	4	1,73 \pm 0,88
Total	68	2,87 \pm 2,76
Anjiotensinojen Gen	N	
MM Genotip	9	1,89 \pm 1,83
MT Genotip	23	3,01 \pm 3,17
TT Genotip	36	3,03 \pm 2,69
Total	68	2,87 \pm 2,76

ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotiplerin I ve D alellerinin, İnsülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 19' da gösterildi. II ve DD genotip, II ve ID genotip, ID ve DD genotipleri, insülin direnci ortalama değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 19 . ACE gen polimorfizmin de I aleli taşıyan ve D aleli taşıyan genotiplerin, HOMA-IR metodu ile belirlenen insülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisi. * Mann-Whitney test.

	HOMA -IR	
	Ortalama \pm SD	
ACE Gen		P
II Genotip	2,92 \pm 2,19	0 ,123
ID Genotip	2,63 \pm 2,79	
ACE Gen		P
II Genotip	2,92 \pm 2,19	0 , 323
DD Genotip	3,17 \pm 3,27	
ACE Gen		P
ID Genotip	2,63 \pm 2,79	0,219
DD Genotip	3,17 \pm 3,27	

AT1 R gen polimorfizmi için, A ve C aleli taşıyan genotiplerin A ve C alellerinin, İnsülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 20' de gösterildi . AA ve CC genotip, AA ve AC genotip, AC ve CC genotipleri, insülin direnci ortalama değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 20. AT1 R gen polimorfizmin de A aleli ve C aleli taşıyan genotiplerin, HOMA metodu ile belirlenen insülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisi. * Mann-Whitney test.

	HOMA-IR	
	Ortalama \pm SD	
A AT1R Gen		P
AA Genotip	2,88 \pm 2,64	0,331
AC Genotip	3,04 \pm 3,16	
AT1R Gen		P
AC Genotip	3,04 \pm 3,16	0,273
CC Genotip	1,73 \pm 0,88	
AT1R Gen		P
AA Genotip	2,88 \pm 2,64	0,186
CC Genotip	1,73 \pm 0,88	

AGT gen polimorfizmi için, M ve T aleli taşıyan genotiplerin M ve T alellerinin, İnsülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 21' de gösterildi. MM ve TT genotip , MM ve MT genotip, MT ve TT genotipleri , insülin direnci ortalama değerleri açısından incelendiğinde ; MM ve TT genotipleri ile insülin direnci ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi.($p < 0,043$) .

Tablo 21 . AGT gen polimorfizmin de M aleli ve T aleli taşıyan genotiplerin , HOMA-IR metodu ile belirlenen insülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisi . * Mann-Whitney test.

	HOMA	
	Ortalama \pm SD	
AGT Gen		P
MM Genotip	1,89 \pm 1,83	0,106
MT Genotip	3,01 \pm 3,17	
AGT Gen		P
MM Genotip	1,89 \pm 1,83	0,043
TT Genotip	3,03 \pm 2,69	
AGT Gen		P
MT Genotip	3,01 \pm 3,17	0,369
TT Genotip	3,03 \pm 2,69	

OGTT yapılan ve ISI-S metodu ile insülin sensitivite indeksi hesaplanan tüm hastaların insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri Tablo 22' de belirtildi .

Tablo 22 . ACE, AT1 R ve AGT genlerinin , genotiplerini taşıyan, çalışmaya katılan ve OGTT uygulanan tüm hastalar için ISI-S metodu ile hesaplanan insülin sensitivite indeksinin ortalama değerleri .

		ISI-S
		Ortalama \pm SD
ACE Gen	n	
II Genotip	19	-6,51 \pm 1,36
ID Genotip	29	-6,94 \pm 2,43
DD Genotip	20	-6,10 \pm 1,78
Total	68	-6,57 \pm 2,00
AT1R Gen	n	
AA Genotip	40	-6,51 \pm 2,10
AC Genotip	24	-6,58 \pm 1,60
CC Genotip	4	-7,07 \pm 3,43
Total	68	-6,57 \pm 2,00
AGT Gen	n	
MM Genotip	9	-6,66 \pm 1,37
MT Genotip	23	-6,20 \pm 2,24
TT Genotip	36	-6,78 \pm 1,98
Total	68	-6,57 \pm 2,00

ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotiplerin I ve D alellerinin, insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 23 ' de gösterildi. II ve DD genotip, II ve ID genotip, ID ve DD genotipleri, insülin sensivite indeksi ortalama değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 23. ACE gen polimorfizmin de I aleli taşıyan ve D aleli taşıyan genotiplerin, ISI-S metodu ile belirlenen insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisi. *Mann-Whitney test

	ISI-S Ortalama \pm SD	
ACE Gen		P
II Genotip	-6,51 \pm 1,36	0,321
ID Genotip	-6,94 \pm 2,43	
ACE Gen		P
II Genotip	-6,51 \pm 1,36	0,190
DD Genotip	-6,10 \pm 1,78	
ACE Gen		P
ID Genotip	-6,94 \pm 2,43	0,117
DD Genotip	-6,10 \pm 1,78	

AT1 R gen polimorfizmi için, A ve C aleli taşıyan genotiplerin A ve C alellerinin, insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 24' de gösterildi . AA ve CC genotip, AA ve AC genotip, AC ve CC genotipleri, insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 24. AT1 R gen polimorfizmin de A aleli ve C aleli taşıyan genotiplerin , ISI-S metodu ile hesaplanan insülin sensitivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisi . *Mann-Whitney test.

	ISI-S	
	Ortalama ± SD	
AT1 R Gen		P
AA Genotip	-6,51 ± 2,10	0,380
AC Genotip	-6,58 ± 1,60	
AT1 R Gen		P
AC Genotip	-6,58 ± 1,60	0,429
CC Genotip	-7,07 ± 3,43	
AT1 R Gen		P
AA Genotip	-6,51 ± 2,10	0,487
CC Genotip	-7,07 ± 3,43	

AGT gen polimorfizmi için, M ve T aleli taşıyan genotiplerin M ve T alellerinin, insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisinin Mann-Whitney test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 25' de gösterildi. MM ve TT genotip, MM ve MT genotip, MT ve TT genotipleri, insülin sensivite indeksi ortalama değerleri açısından incelendiğinde istatistiksel anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 25 . AGT gen polimorfizmin de M aleli ve T aleli taşıyan genotiplerin , ISI-S metodu ile hesaplanan insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisi . * Mann-Whitney test.

	ISI-S	
	Ortalama ± SD	
AGT Gen		P
MM Genotip	-6,66 ± 1,37	0,229
MT Genotip	-6,20 ± 2,24	
AGT Gen		P
MM Genotip	-6,66 ± 1,37	0,483
TT Genotip	-6,78 ± 1,98	
AGT Gen		P
MT Genotip	-6,20 ± 2,24	0,173
TT Genotip	-6,78 ± 1,98	

Bilinen diyabeti olan ve OGTT sonucu diyabet saptanan hastalar (n=50) ile glukoz toleransı normal olan hastalarda (n=20) ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin dağılımı, Ki-kare testi ile incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı farklılığa rastlanmadığı Tablo 26 ' da gösterildi.

Tablo 26. Diyabetli hastalar ile normal glukoz toleranslı hastalarda ACE gen genotiplerinin dağılımı * Ki-kare test.

	ACE GEN POLİMORFİZMİ						P
	II Genotip		ID Genotip		DD Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabet	11	22	25	50	14	28	0,157
Normal	9	45	7	35	4	20	
	AT1R GEN POLİMORFİZMİ						P
	AA Genotip		AC Genotip		CC genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabet	25	50	21	42	4	8	0,220
Normal	14	70	4	20	2	10	
	AGT GEN POLİMORFİZMİ						P
	MM Genotip		MT Genotip		TT Genotip		
	n	%	n	%	n	%	
Diyabet	3	6	20	40	27	54	0,455
Normal	3	15	8	40	9	45	

ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotipler de, normal glukoz toleransı ve diyabetik olma durumunun; I ve D aleli ile ilişkisinin, Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 27' de gösterildi. Glukoz toleransı normal ve diyabetik hastalarda II ve DD genotip, II ve ID genotip, ID ve DD genotiplerinin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı .

Tablo 27. ACE gen polimorfizmin de I aleli taşıyan ve D aleli taşıyan genotiplerin normal glukoz toleransı ve diyabet ile ilişkisi

* Ki-kare test

	ACE GEN POLİMORFİZMİ				
	II Genotip		DD Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	11	44	14	56	0,139
Normal	9	69,2	4	30,8	
	II Genotip		ID Genotip		P
	n	%	n	%	
Diyabet	11	30,6	25	69,4	0,079
Normal	9	56,3	7	43,8	
	ID Genotip		DD Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	25	64,1	14	35,9	0,977
Normal	7	63,6	4	36,4	

AGT gen polimorfizmi için, M ve T aleli taşıyan genotiplerde, normal glukoz toleransı ve diyabetik olma durumunun; M ve T aleli ile ilişkisinin, Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 28’de gösterildi. Glukoz toleransı normal ve diyabetik hastalarda MM ve TT genotip, MM ve MT genotip, MT ve TT genotiplerinin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı .

Tablo 28. AGT gen polimorfizminde M aleli taşıyan ve T aleli taşıyan genotiplerin normal glukoz toleransı ve diyabet ile ilişkisi * Ki-kare test

	AGT GEN POLİMORFİZMİ				
	MM Genotip		TT Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	3	10	27	90	0,209
Normal	3	25,0	9	75,0	
	MM Genotip		MT Genotip		P
	n	%	n	%	
Diyabet	3	13,0	20	87,0	0,309
Normal	3	27,3	8	72,7	
	MT Genotip		TT Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	20	42,6	27	57,4	0,748
Normal	8	47,1	9	52,9	

AT1 R gen polimorfizmi için, A ve C aleli taşıyan genotipler de, normal glukoz toleransı ve diyabetik olma durumunun; A ve C aleli ile ilişkisinin, Ki-kare test ile değerlendirilme sonuçları Tablo 29' de gösterildi. Glukoz toleransı normal ve diyabetik hastalarda AA ve CC genotip, AA ve AC genotip, AC ve CC genotiplerinin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı .

Tablo 29. AT1 R gen polimorfizminde A aleli taşıyan ve C aleli taşıyan genotiplerin normal glukoz toleransı ve diyabet ile ilişkisi

* Ki-kare test

	AT1 R GEN POLİMORFİZMİ				
	AA Genotip		CC Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	25	86,2	4	13,8	0,903
Normal	14	87,5	2	12,5	
	AA Genotip		AC Genotip		P
	n	%	n	%	
Diyabet	25	54,3	21	45,7	0,084
Normal	14	77,8	4	22,2	
	AC Genotip		CC Genotip		P
	N	%	n	%	
Diyabet	21	84	4	16	0,335
Normal	4	66,7	2	33,3	

V.TARTIŞMA

RAAS vasküler ve renal fonksiyonların düzenlenmesinde son derece önemli bir sistemdir. Son zamanlarda bu sistemin regülasyonunda rol oynadıkları tespit edilmiş, bir takım gen polimorfizmleri tanımlanmıştır. Üç gen polimorfizmi; AGT gen M235T, ACE gen I / D ve AT1 R gen A1166C polimorfizmine literatür de geniş ölçüde yer verilmiştir.

ACE gen I/D polimorfizmi, plazma ACE aktivitesinde bireyler arasında %50' den fazla farklılığın nedeni olabilmektedir. DD homozigotlar en yüksek , II homozigotlar ise en düşük plazma ACE aktivitesine sahiptir. AGT gen polimorfizmi artmış plazma AGT seviyesi ile, AT1 R gen polimorfizmi ise A II 'ye artmış yanıtla ilişkilendirilmiştir.

ACE gen polimorfizmi ve kardiyovasküler hastalıklar arasındaki ilişki üzerine yayınlanmış tüm çalışmaların meta analizinde, ACE gen D alel ve miyokard infarktüs riski arasındaki ilişki desteklenilmiştir. Ayrıca, AT1R gen polimorfizmi C alel için homozigot olan bireyler ve AGT gen polimorfizmi T aleli için homozigot bireyler de artmış hipertansiyon ve iskemik kalp hastalığı riski de gösterilmiştir (37) .

RAAS aktivitesinin en son ürünü olan efektör peptit A II ' nin vasküler ve miyokardial etkilerine ek olarak , intraglomerüler basıncı arttırdığı ve deneysel modeller de glomerüloskleroza hızlandırdığı da gösterilmiştir. Hem tip 1 diyabet, hem de tip 2 diyabetik hastalarda ACE inhibitörlerinin antiproteinürik ve renoprotektif etkisi diyabetik renal hastalıklarda RAAS 'ın önemli patofizyolojik rolü olduğunu düşündürmüştür (37) .

ACE inhibitörü ve AT1 R antagonistleri ile tedavinin son dönem böbrek yetmezlikli hastalar da önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olan, kardiyovasküler hastalık riskini azaltabildiği, ateroskleroz ve insülin direnci gibi metabolik sendrom komponentlerinin patogenezi de etkileyebildiği gösterilmiştir. ACE inhibitörleri ile tedavinin insülin direnci ve aterosklerozda düzelmeye neden olduğunun gösterilmesi, RAAS aktivasyonunun dislipidemi ve diyabet gelişimini de arttırabileceğini düşündürmüştür. Dogra G. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma da, inflamasyon, sistolik hipertansiyon ve artmış nabız basıncının yanı sıra insülin direnci de, KBY'li hastalarda vasküler disfonksiyonla ilişkilendirilmiştir (12) . Bu metabolik sendrom kriterlerinin tümü böbrek yetmezliğinin mortalite, morbidite ve progresyonuna katkıda bulunan faktörlerdir. Bu açıdan bakıldığında, literatür de, RAAS aktivitesi ve metabolik sendrom ilişkisini değerlendiren bir çalışma da ACE gen polimorfizmi ile glukoz intoleransı arasında ilişki olduğu gösterilmiş ve glukoz intoleransı olan grup da I alel sıklığı daha yüksek olarak bulunmuştur (38) .

Literatürde; son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda, RAAS gen polimorfizmini (39, 40), KBY'li tip 2 diyabetik hastalarda RAAS genlerinin rolünü(41), DM dışında son dönem böbrek yetmezliğine yol açabilen IgA nefropatisi (42), interstisyel nefrit (43), kronik glomerülofrit (44), fokal segmental glomerüloskleroz (45), polikistik böbrek hastalığı (46) gibi diğer etiyolojik nedenlerde RAAS genlerinin rolünü ve RAAS genlerinin glukoz intoleransı ile ilişkisini inceleyen çalışmaların mevcut olduğu görüldü. Bu bilgiler ışığında, son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda ACE gen , AT1 R gen ve AGT gen polimorfizmi ile glukoz intoleransı arasında bir ilişki olabileceği düşünülerek literatür araştırıldığında; bu ilişkiyi değerlendiren bir çalışmaya rastlanmadı.

Çalışmamızda prediyalitik ve diyalitik dönemdeki son dönem böbrek yetmezlikli hastalar, açlık plazma glukozu ve OGTT 2. saat plazma glukoz değerlerine göre normal glukoz toleranslı ve glukoz intoleranslı (BAG, BGT ve DM) olmak üzere iki guruba ayrıldı. ACE, A T1 R ve AGT genlerin , genotiplerinin dağılımının glikoz tolerans durumu ile ilişkisi incelendiğinde; normal glukoz toleranslı gurup ile glukoz intoleranslı gurup arasında genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmadı. Aynı şekilde genotiplerin dağılımının glukoz intoleransı alt gurupları (BAG, BGT ve DM) ile ilişkisi değerlendirildiğinde de istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı görüldü. Aynı değerlendirme, diyabetik olan hastalar ve glukoz toleransı normal hastalar arasında yapıldığında da , genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel açıdan anlamlı olabilecek fark saptanmadı.

ACE gen II genotipe sahip bireyler; normal glukoz toleranslı gurupta %45, intoleranslı gurupta ise %21,3 olarak bulunmasına rağmen, guruplar arasında genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmama sebebinin karşılaştırılan iki guruptaki hasta sayısının az olması olduğu ve hasta sayısının artırılması ile istatistiksel anlamlı değerler elde edilebileceği düşünüldü.

Bilinen diyabeti olmayan ve OGTT yaptığımız tüm hastalarda HOMA-IR metodu ile insülin direnci, Stumvoll ve arkadaşları tarafından önerilen ISI-S metodu ile de insülin sensivite indeksi hesaplandı (47, 48). Normal glukoz toleranslı gurupda ve OGTT yapılan tüm hastalarda ACE , AT1 R ve AGT genlerin, genotiplerinin, insülin direnci , insülin direnci ortalama değerleri ve insülin sensivite indeksinin ortalama değerleri ile ilişkisi ayrı ayrı incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı olabilecek fark saptanmadı.

Hastalarda ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotiplerde, glukoz tolerans durumunun, I ve D aleli ile ilişkisi incelendiğinde II ve DD genotip ($p = 0,081$) ile II ve ID genotip ($p = 0,057$) taşıyan grupta D aleli ile ilişkili olarak, istatistiksel anlamlılığa yakın sonuçlara ulaşıldı. ACE gen II genotipin glukoz toleransı normal olanlarda %45, intoleranslı grupta %21,3 olarak saptandığı da göz önünde bulundurulduğunda, ACE gen D alelinin son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda glikoz intoleransı ile ilişkili olduğu ve çalışmaya alınan hasta sayısının artırılması durumunda istatistiksel anlamlı değerlere ulaşılabileceği düşünüldü .

Daha önce değinildiği gibi ; total popülasyonunu 853 katılımcının oluşturduğu, metabolik sendrom kriterlerini taşıyan hastalarda, RAS aktivitesi ve metabolik sendrom ilişkisini değerlendiren çalışmada I alelin glikoz intoleransı ile ilişkisi Thomas GN ve arkadaşları tarafından saptanmıştı (38).

AT1 R gen polimorfizminde A aleli ve C aleli taşıyan genotiplerin , AGT gen polimorfizminde M aleli ve T aleli taşıyan genotiplerin glukoz toleransı ile ilişkisi incelendiğinde ise normal ve glukoz intoleranslı gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlara ulaşılamadığı görüldü. Benzer şekilde ACE gen polimorfizminde I aleli ve D aleli taşıyan genotiplerin , AGT gen polimorfizminde M aleli ve T aleli taşıyan genotiplerin, AT1 R gen polimorfizminde ise A ve C aleli taşıyan genotiplerin normal glukoz toleranslı ve diyabetik olma durumu ile ilişkisi incelendiğinde normal ve diyabetli gruplar arasında da istatistiksel açıdan anlamlı sonuçlara ulaşılamadı.

Çalışmamızda, ACE gen I ve D aleli taşıyan genotiplerin, I ve D alellerinin, AT1 R gen için A ve C aleli taşıyan genotiplerin, A ve C alellerinin, AGT gen polimorfizmi için ise, M ve T aleli taşıyan genotiplerin , M ve T alellerinin, İnsülin direnci ortalama değerleri ve insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisinde ayrı ayrı değerlendirildi.Sadece, T alel için homozigot bireyler ve M alel için homozigot olan bireyler de insülin direnci ortalama değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlendi ($p < 0,043$).

Çalışmaya alınan hasta sayısı göz önünde bulundurulduğunda, bu sayı arttırılırsa T alel ile insülin direnci arasındaki ilişki açısından istatistiksel anlamlılığın artacağı düşünüldü. Üç genetik polimorfizmde de alellerin, insülin sensivite indeksi ortalama değerleri ile ilişkisi açısından yapılan incelemede istatistiksel anlamlı sonuç elde edilemedi.

RAAS komponentlerinin, farklı etiyolojik nedenlere bağlı böbrek yetmezliği olan hastalarda; son dönem böbrek yetmezliğine progresyonda, böbrek yetmezliğinin nedeni ve sonucu olarak ortaya çıkabilen hipertansiyonun patofizyolojisinde, iskemik kalp hastalıkları, insülin direnci ve diyabetik renal hastalıktaki rolü daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarının; RAAS komponentlerini kodlayan genetik polimorfizmlerin, böbrek yetmezliği riski taşıyan ve böbrek yetmezliği olan bireylerde tanımlanması ile, hastalığın gelişimi ve son dönem böbrek yetmezliğine progresyonda rol oynayan faktörlere yönelik, özellikle metabolik sendrom kriterlerini taşıyan hastalarda yaşam tarzı değişiklikleri ve farmakolojik tedavi metodlarının erken dönemde başlanması önemine ışık tutmak açısından özgün olduğu düşünüldü.

Farmakolojik tedavi yöntemleri olarak; ACE gen polimorfizmi olan ve özellikle DD homozigot olan bireylerde artmış serum ACE düzeyi nedeni ile , renin inhibitörleri ya da A II reseptör blokerlerinin , AGT gen polimorfizmi olan ve özellikle TT homozigot bireylerde, artmış AGT düzeyi beklenildiği için direk renin inhibitörlerinin, AT1 R gen polimorfizmi olan ve özellikle CC homozigot bireylerde ise AII reseptör yanıtının artmış olması beklendiğinden , ACE inhibitör ya da renin inhibitörleri ile tedavinin göz önünde bulundurulabileceği düşünüldü.

VI.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- 1.Prediyalitik ve diyalitik dönemdeki son dönem böbrek yetmezlikli hastalar glukoz toleransı normal ve glukoz intoleranslı (BAG, BGT ve DM) olarak guruplandırılmıştır.
2. ACE , A T1 R ve AGT genlerinin, genotiplerinin dağılımının glikoz tolerans durumu ile ilişkisi incelendiğinde normal ve glukoz intoleranslı guruplarda genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. (ACE gen p:0,095, AT1 R gen p:0,159 ,AGT gen p:0,679)
3. ACE gen II genotipe sahip bireyler; normal glukoz toleranslı gurupda %45 (n= 9), intoleranslı gurupda ise %21,3(n=17) olarak bulunmasına rağmen, guruplar arasında genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamasının karşılaştırılan iki gurupdaki hasta sayısının az olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.
4. Genotiplerin dağılımının, glukoz intoleranslı alt gurupları (BAG n=5, BGT n=25 ve DM n=50) ile ilişkisi değerlendirildiğinde istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanamamış ve bu sonucun alt guruplarda hasta sayısının az olmasına bağlı olduğu düşünülmüştür.(ACE gen p:0,983, AT1 R gen p:0,513 ,AGT gen p:0,137)
- 5.ACE , AT1 R ve AGT genlerinin, genotiplerininin dağılımı açısından, normal glukoz toleranslı hastalar ile diyabetikler arasında istatistiksel açıdan anlamlı olabilecek fark saptanmamıştır. (ACE gen p:0,157, AT1 R gen p:0,220, AGT gen p:0,655)
- 6.Normal ve glukoz intoleranslı guruplarda; AT1 R gen polimorfizmi için, A ve C aleli taşıyan genotiplerin, dağılımı açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır.(AA ve CC p:0,658, AA ve AC p:0,080, AC ve CC p:0,130)

7. Aynı şekilde, normal ve glukoz intoleranslı guruplarda, AGT gen polimorfizmi için, M ve T aleli taşıyan genotiplerin dağılımı açısından istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. (MM ve TT p:0,426, MM ve MT p:0,729, MT ve TT p:0,537)

8. Hastalarda ACE gen polimorfizmi , I ve D aleli taşıyan genotiplerde, glukoz tolerans durumunun, I ve D aleli ile ilişkisi incelendiğinde II ve DD genotip (p = 0,081) ile II ve ID genotip (p = 0,057) taşıyan gurupta D aleli ile ilişkili olarak, istatistiksel anlamlılığa yakın sonuçlara ulaşılmıştır (ID ve DD p: 0,913).

9. ACE gen II genotipe sahip bireylerin; normal glukoz toleranslı gurupta %45, intoleranslı gurupta ise %21,3 olarak saptanmasının da, son dönem böbrek yetmezlikli hastalar da D alelin glikoz intoleransı ile ilişkili olduğu fikrini desteklediği düşünülmüştür.

10. ACE gen (I ve D) ,AT1 R gen (A ve C) ve AGT gen (M ve T) polimorfizmi, alellerinin normal glukoz toleransı ve diyabetik olma durumu ile ilişkisi incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır . (II ve DD p:0,139, II ve ID p:0,079, ID ve DD p:0,977, AA ve CC p:0,903 , AA ve AC p:0,084, AC ve CC p:0,0335, MM ve TT p:0,209, MM ve MT p:0,309, MT ve TT p:0,748)

11. Normal glukoz toleranslı gurupda ve OGTT yapılan tüm hastalarda ACE , AT1 R ve AGT genlerinin, genotiplerinin; insülin direnci , insülin direnci ortalama değerleri ve insülin sensivite indeksinin ortalama değerleri ile ilişkisi ayrı ayrı incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı olabilecek fark saptanmamıştır.

12. AT1 R gen polimorfizmi için , A ve C aleli taşıyan genotiplerin, insülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisi incelendiğinde istatistiksel açıdan anlamlı fark saptanmamıştır. (AA ve CC p:0,186, AA ve AC p:0,331, AC ve CC p:0,273)

13. ACE gen polimorfizmi için, I ve D aleli taşıyan genotiplerin insülin direnci ortalama değerleri ile ilişkisi incelendiğinde de istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. (II ve DD p:0,323 , II ve ID p:0,123, ID ve DD p:0,219)

14.AGT gen, T ve M alel için insülin direnci ortalama değerleri ile ilişki incelendiğinde T alel homozigot bireyler ve M alel homozigot olan bireyler arasında insülin direnci ortalama değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,043$)

15.AGT gen, genotipleri ile insülin direnci ve insülin direnci ortalama değerleri arasında istatistiksel anlamlı ilişkinin saptanamamasının hasta sayısının az olmasına bağlı olduğu dūřünölmüřtür.

16.Sonuçta; Son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda; ACE gen D alel ile glikoz intoleransı arasında bir ilişki olduğu dūřündüren istatistiksel anlamlılığa yakın sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca AGT gen,T alel ile insülin direnci arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.

17.Bu çalışmanın sonuçları ile; Böbrek yetmezliği riski taşıyan ve böbrek yetmezliği olan bireylerde, bu genotipik varyasyonların tanımlanması ile, farklı etiyolojik nedenlere bağlı böbrek yetmezliğinin, son dönem böbrek yetmezliğine progresyonunda rol oynayan, renin anjiotensin aldosteron enzim kaskadını ve bu kaskadın temel medyatörü All 'nin etkilerinin erken dönemde, renin inhibitörleri, ACE inhibitörleri ve A II reseptör blokerleri ile farmakolojik blokajı ve özellikle insülin direnci zemininde gelişen metabolik sendrom komponentlerini taşıyan hastalarda erken dönemde nonfarmakolojik önlemlerin alınmasının gerekliliği ortaya konulmaya çalışılmıştır.

VII.ÖZET

SON DÖNEM BÖBREK YETMEZLİKLİ HASTALARDA ACE GEN POLİMORFİZMİ , ANJİOTENSİNOJEN GEN POLİMORFİZMİ VE ANJİOTENSİN RESEPTÖR TİP 1 GEN POLİMORFİZMİNİN BOZULMUŞ GLUKOZ TOLERANSI İLE İLİŞKİSİ

Amaç ve Kapsam: RAAS renal hemodinami, kan basıncı ve sıvı elektrolit dengesinin regülasyonu yanı sıra son dönem böbrek yetmezliğine progresyonda da rolü olan bir sistemdir. Bu sistemin temel medyatörü, anjiotensin II' nin İnsülin reseptöründe ve reseptör sonrası sinyal yollarında işlevsel bozulmaya yol açtığı düşünülmektedir. Bu çalışma ile RAAS' ın aşırı aktivasyonuna genetik yatkınlığa yol açan ACE, AT1 R ve AGT gen polimorfizmlerinin, glikoz intoleransı ile ilişkisini son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda ortaya koymayı amaçladık.

Materyal-metod:Çalışmaya prediyalitik ve diyalitik dönemdeki son dönem böbrek yetmezlikli 100 hasta alındı. Bilinen diyabeti olmayan hastalara 75 gram OGTT uygulandı. Açlık plazma glukoz değeri ve OGTT ikinci saat glukoz değerlerine göre hastalar, glukoz toleransı normal ve glukoz intoleranslılar (BAG, BGT ve DM) olarak guruplandırıldılar. Ayrıca OGTT yapılan tüm hastalarda HOMA-IR metodu ile insülin direnci ve ISI-S metodu ile insülin sensivite indeksi hesaplandı. ACE gen,AT1 R gen ve anjiotensinojen gen polimorfizmi PCR yöntemi ile belirlendi.

Bulgular: Hastaların kreatinin klerensi ortalama değerleri $10,77 \pm 2,40$ olarak hesaplandı. Normal glukoz toleranslı ve glukoz intoleranslı hastaların sayısı sırasıyla 20 ve 80 olarak bulundu. Glukoz intoleranslı grupta BAG ,BGT ve DM olan hastaların sayısı sırasıyla 5,25 ve 50 olarak bulundu. ACE gen, AT1 R gen ve AGT gen, genotiplerinin dağılımı ile glukoz tolerans durumu arasındaki ilişki incelendi.

Sonuç: Son dönem böbrek yetmezlikli hastalarda; ACE gen D alel ile glukoz intoleransı arasında bir ilişki olduğunu düşündüren sonuçlar elde edildi. Ayrıca AGT gen,T alel ile insülin direnci arasında bir ilişki olduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler:Renal yetmezlik, glukoz tolerans, gen, polimorfizm

VIII.ABSTRACT

RELATION OF ACE GENE POLYMORPHISM , ANGIOTENSINOGEN GENE POLYMORPHISM AND ANGIOTENSIN RECEPTOR TYPE 1 GENE POLYMORPHISM WITH IMPAIRED GLUCOSE TOLERANCE IN PATIENT WITH END STAGE KIDNEY FAILURE

Aim and scope: RAAS renal hemodynamics is a system that has a role in blood pressure and fluid electrolyte balance regulation along with progression to end stage kidney failure. Angiotension II, the main mediator of this system, is thought to cause a functional impairment in insulin receptor and postreceptor signaling pathways. In this study, our aim was to show the relation of AC , AT1 R and angiotensinogen gene polymorphisms, that cause genetic susceptibility to over activation of RAAS, to glucose intolerance in patients with end stage kidney failure.

Material and methods: 100 dialysis and predialysis patients with end stage kidney failure were included in the study. Patients with no known diabetes were administered 75 gr OGTT. Based on fasting plasma glucose values and OGTT 2-hour glucose values, patients were grouped as normal patients and patients with glucose intolerance (BAG,BGT ve DM). Moreover, in all the patients that had undergone OGTT, insulin resistance was calculated by HOMA-IR method and insulin sensitivity index was calculated by ISI-S method. ACE gene, AT1 R gene and angiotensinogen gene polymorphism was detected by PCR method.

Results:The average creatine clearance of patients was calculated as $10,77 \pm 2,40$. Number of patients with normal glucose tolerance and glucose intolerance were found as 20 and 80, respectively. In the glucose intolerance group, number of patients with BAG, BGT and DM were found as 5, 25 and 50, respectively. The relation between genotype distribution of ACE gene, AT1 R gene and angiotensinogen gene and glucose intolerance was studied.

Conclusion: We have obtained results suggesting a relation between ACE gene D allele and glucose intolerance in in patients with end stage kidney failure, Moreover; a relation has been shown between angiotensinogen gene T allele and insulin resistance.

Keywords:Renal failure , glucose tolerance ,gene, polymorphism

IX.KAYNAKLAR

- 1.Narita I,Gejyo F.Gene polymorphism of renin-angiotensin system in patients with kidney diseases.Nippon Rinsho.2004 Oct;62 (10):1811-5
- 2._Lovati E, Richard A, Frey BM et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal disease Kidney Int. 2001 Jul;60(1):46-54.
3. Steinberg HO et al. Obesity/Insulin Resistance Is Associated with Endothelial Dysfunction. J Clin Invest. 1996 Jun 1;97(11):2601-10
- 4 .Rigat B, Hubert C, Corvol P et al. "PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1)" Nucleic Acids Res. 1992 Mar 25;20(6):1433
- 5.El-Atat FA,Stas SN,McFarlane SI et al. The relationship between hyperinsulinemia,hypertension and progresive renal disease. J Am Soc Nephrol.2004 Nov;15(11):2816-27.Review.
- 6.Mizuno M,Sada T,Kato M et al .Renoprotective effects of blocade of angiotensin II AT1 receptors in animal model of type 2 diabetes.Hypertens Res.2002 Mar;25(2):271-
7. PMID:120470438.Fox CS,Larson MG,Leip EP et al.Glycemic status and development of kidney disease:the Framingham Heart Study.Diabetes Care.2005 Oct;28(10):2436-40. PMID:16186276
- 8.F.Mallamaci,A.Zuccala,C.Zoccali,A.Testa et al.The Deletion Polymorphism of the Angiotensin –Converting Enzyme Is Associated With Nephroangiosclerosis. Am J Hypertens. 2000 Apr;13(4 Pt 1):433-7
- 9.Merta M, Reiterova J, Rysavá R. et al.Genetics of diabetic nephropathy. Nephrol Dial Transplant. 2003 Jul;18 Suppl 5:v24-5
- 10.Chahwala V,Arora R.Cardiovascular Manifestations of Insulin Resistance Am J Ther. 2009 May 19.

11. Dogra G, Irish A, Chan D et al. Insulin resistance, Inflammation, and blood pressure determine vascular dysfunction in CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006 Dec;48(6):926-34
12. Guarnieri G, Zanetti M, Vinci P et al. Insulin resistance in chronic uremia. *J Ren Nutr.* 2009 Jan;19(1):20-4.
13. Meguid El Nahas A, Bello AK. Chronic kidney diseases: the global challenge *Lancet.* 2005 Jan 22-28;365(9456):331-40.
14. Levey AS, Coresh J, Balk E et al. National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Diseases: Evaluation, Classification, and Stratification" *Ann Intern Med.* 2003 Jul 15;139(2):137-47.
15. Arrigo Schieppati, Roberto Pisoni, G Remuzzi. Pathophysiology and Management of Chronic Kidney Diseases. *The primary on kidney diseases 2005*
16. Lesley A. Stevens, Andrew S. Levey. Chronic Kidney Diseases: Staging and Principles of Management. *The primary on kidney diseases 2005*
17. Türk Nefroloji Derneği Registry 2007
18. Arslan M. Diyabetes Mellitus'ta Tanı ve Laboratuvar. *Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005*
19. Martínez Veá A.. Polymorphism of the renin-angiotensin system and renal failure *Nefrologia.* 2002;22 Suppl 1:89-94
20. Nicholls MG, Robertson JL, Inagami T. The Renin-Angiotensin system in the twenty-first century" *Blood Press.* 2001;10(5-6):327-43.
21. Eriksson U, Danilczyk U, Penninger JM. " Just The Beginning: Novel Functions for Angiotensin-Converting Enzymes " *Curr Biol.* 2002 Oct 29;12(21):R745-52.
22. TRENDS in Endocrinology and Metabolism Vol.16 No.3 April 2005
23. Weir MR. " Effects of Renin-Angiotensin System Inhibition on End-Organ Protection: Can We Do Better ? *Clin Ther.* 2007 Sep;29(9):1803-24.
24. Crisan D., Carr J. "Angiotensin I-Converting Enzyme: Genotype and Diseases Associations" *J Mol Diagn.* 2000 Aug;2(3):105-15

- 25.-Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 2004 “ Böbrek Hastalıklarının Fizyolojisinde RAAS”
26. Wolf G.,”Molecular mechanisms of angiotensin II in the kidney :emerging role in the progression of renal diseases :beyond haemodynamics “ Nephrol Dial Transplant. 1998 May;13(5):1131-42
- 27.Miller JA, Scholey JW..” The impact of renin-angiotensin system polymorphisms on physiological and pathophysiological processes in humans Curr Opin Nephrol Hypertens. 2004 Jan;13(1):101-6
- 28.Kitamura H, Moriyama T, Izumi M et al.Angiotensin I-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: potential significance in nephrology. Kidney Int Suppl. 1996 Jun;55:S101-3
29. Sayed-Tabatabaei FA, Oostra BA, Isaacs A et al. ACE Polymorphism . Circ Res. 2006 May 12;98(9):1123-33
- 30.Reiterová J, Tesar V, Merta M. Effect of angiotensin-converting enzyme insertion-deletion polymorphism on progression of renal and cardiovascular diseases . Cas Lek Cesk. 2001 May;140(9):267-71.
31. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD et al . Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Mar 28;92(7):2735-9
32. Lalouel JM, Rohrwasser A, Terreros D' et alAngiotensinogen in Essential Hypertension:From Genetics to Nephrology J Am Soc Nephrol. 2001 Mar;12(3):606-15.
33. Michel MC, Hahntow I, Koopmans RP. Multiple gene approaches to delineate the role of the renin-angiotensin-aldosterone system in nephropathy” J Hypertens. 2005 Feb;23(2):269-72
- 34.Rigat B, Hubert C, Corvol P et al. PCR detection of the insertion / deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). Nucleic Acids Res 20:1433. (1992)
35. Caulfield M, Lavander P, Farral M et al. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. N Engl J Med 1994; 330: 1629-1633.

36. Alvarez R, Reguero JR, Batalla A et al. Angiotensin-converting enzyme and angiotensin II receptor 1 polymorphisms: association with early coronary disease. *Cardiovascular Res* 1998; 40: 375–379.
37. Young RP, Chan JC, Critchley JA et al. Angiotensinogen T235 and ACE insertion /deletion polymorphisms associated with albuminuria in Chinese type 2 diabetic patients. *Diabetes Care*. 1998 Mar;21(3):431-7
38. Thomas GN, Tomlinson B, Chan JC et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Feb;24(2):356-61
39. Lovati E, Richard A, Frey BM et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone system in end-stage renal diseases. *Kidney Int*. 2001 Jul;60(1):46-54
40. Buraczynska M, Ksiazek P, Drop A et al. Genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system in end-stage renal diseases. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Apr;21(4):979-83. Epub 2005 Dec 29.
41. Prasad P, Tiwari AK, Kumar KM et al. Chronic renal insufficiency among Asian Indians with type 2 diabetes :I. Role of RAAS gene polymorphisms. *BMC Med Genet*. 2006 May 3;7:42
42. Lau YK, Woo KT, Choong HL. et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms: its impact on IgAN and its progression to end-stage renal failure among Chinese in Singapore. *Nephron Physiol*. 2004;97(1):p1-8
43. Buraczyńska M, Grzebalska A, Spasiewicz D et al. Genetic polymorphisms of renin-angiotensin system and progression of interstitial nephritis. *Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med]*. 2002;57(2):330-6
44. Buraczyńska M, Józwiak L, Spasiewicz D et al. Renin-angiotensin system genes in chronic glomerulonephritis. *Pol Arch Med Wewn*. 2001 Jun;105(6):455-60
45. Luther Y, Bantis C, Ivens K et al. Effects of the genetic polymorphisms of the renin-angiotensin system on focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Blood Pres Res*. 2003;26(5-6):333-7

46. Lee KB, Kim UK. Angiotensinogen and angiotensin II type 1 receptor gene polymorphism in patients with autosomal dominant polycystic kidney disease: effect on hypertension and ESRD. *Yonsei Med J.* 2003 AUG 30;44(4):641-7
47. Kanauchi M, Kimura K, Akai Y et al. Insulin resistance and pancreatic beta-cell function in patients with hypertensive kidney diseases. *Nephrol Dial Transplant.* 2004 Aug;19(8):2025-9
48. Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W et al. Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care.* 2000 Mar;23(3):295-301