



**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

PEDİATRİK DİYABETİK HASTALARDA PARAOKSONAZ GEN POLİMORFİZM ANALİZİ

**PEDİATRİ UZMANLIK TEZİ
Dr. PINAR EMÜR**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. KENAN HASPOLAT**

**DİYARBAKIR
2015**

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ilk iki yılını geçirdiğim Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Başhekimi Prof. Dr. Mustafa Bekir SELÇUK'a, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı başkanı Prof. Dr. Ayhan DAĞDEMİR'e ve diğer bütün hocalarıma; sonrasında eş durumu tayiniyle uzmanlık eğitimimin son 2 yılını tamamladığım Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Başhekimi Prof. Dr. Sait ALAN'a, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Kenan HASPOLAT'a ve diğer bütün hocalarıma; tez hazırlama aşamasında büyük katkıları olan Tıbbi Genetik Ana bilim Dalı üyesi Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ'e, Uzm. Dr. Ruken YILDIRIM'a, emeği geçen bütün hemşire ve personel arkadaşlara ve en önemlisi uzmanlık eğitimim süresince benden desteğini esirgemeyen canım anneme, eşime ve oğluma teşekkürü bir borç bilirim...

Pınar EMÜR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	IV
TABLolar DİZİNİ	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
ÖZET..	VIII
SUMMARY	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diyabetes Mellitus'un Tarihçesi	3
2.2. Diyabetes Mellitus'un Tanımı	3
2.3. Epidemiyoloji	4
2.4. Tanı ve Sınıflama	5
2.5. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları	15
2.6. Diyabet ve Oksidatif Stres	20
2.7. Paraoksonaz	23
2.7.1. Tarihçe	23
2.7.2. Paraoksonaz gen ailesi	23
2.7.3. PON1 gen polimorfizmi	24
2.7.4. PON1	25
2.8. PON1 ve Oksidatif Stres	33
2.9. PON1 ve Diyabet	33
3. MATERYAL VE METOD	35
3.1. Materyal	35
3.1.1. Hasta ve Kontrol Grupları	35
3.1.2. Kan Örnekleri	35

3.1.3. Kullanılan Solusyonlar ve Tamponlar.....	35
3.1.4. X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) Tamponu Hazırlanışı	37
3.1.5. Agaroz Jel Hazırlanışı	37
3.2. Metod	37
3.2.1. Periferik Kandan DNA İzolasyon Yöntemi	37
3.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Örneklerin Çoğalması	38
3.2.3. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimleri ile Kesimi.....	40
3.2.4. Agaroz Jel Elektrophorezi	41
3.2.5. İstatistiksel Analiz	42
3.2.6. Aydınlatılmış Onam Formu	42
3.2.7. Etik Kurul.....	43
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA.....	52
6. SONUÇLAR.....	58
7. KAYNAKLAR	60
8. ÖZGEÇMİŞ	66

KISALTMALAR

ADA	: Amerikan Diyabet Birliği
Anti-GAD	: Anti Glutamik Asit Dekarboksilaz
APG	: Açlık Plazma Glikozu
APO	: Apolipoprotein
bç	: Baz Çifti
DIDMOAD	: Diyabetes Insipitus, Diyabetes Mellitus, Optik Atrofi, Sağırılık
DKA	: Diyabetik Ketoasidoz
DM	: Diyabetes Mellitus
DNA	: Deoksi-Ribonükleik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidiyum Bromür
GFR	: Glomeruler Filtrasyon Oranı
HbA1c	: Hemoglobin A1c
HDL	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein
HLA	: İnsan Lökosit Antijeni
IAA	: İnsülin İlişkili Antikor
ICA	: Adacık Hücre Antikoru
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
IFG	: Bozulmuş Açlık Glikozu
IGT	: Bozulmuş Glikoz Toleransı
KCl	: Potasyum Klorür
LDL	: Düşük Yoğunluklu Protein
MgCl	: Magnezyum Klorür
MHC	: Major Histokompatibilite Kompleksi

MODY	: Gençlerde Görülen Erişkin Tip Diyabet
NDDG	: Amerikan Ulusal Diyabet Veri Toplama Grubu
NGT	: Normal Glikoz Toleransı
NIDDM	: İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet
NO	: Nitrik Oksit
OGTT	: Oral Glikoz Tolerans Testi
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PON1	: Paraoksonaz 1
ROS	: Reaktif Oksijen rnleri
SR-B1	: Scavenger Receptor – B1
TBE	: Tris-Borik Asit-EDTA
TRİS-HCl	: Tris Hidroklorür
WHO	: Dünya Sağlık rgt

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Diyabetes Mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri	5
Tablo 2. WHO kriterlerine göre OGTT yorumu	8
Tablo 3. NDDG kriterlerine göre OGTT yorumu.	9
Tablo 4. Diyabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması	10
Tablo 5. Diyabetik ketoasidozun belirti ve bulguları	15
Tablo 6. Diyabetes Mellitus'un mikroanjiopatik ve makroanjiopatik kronik komplikasyonları.....	20
Tablo 7. Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı	44
Tablo 8. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyete göre dağılımı.....	44
Tablo 9. PON1 55 polimorfizmi genotip ve allel frekansı	45
Tablo 10. PON1 192 polimorfizmi genotip ve allel frekansı.....	45
Tablo 11. Kontrol ve hasta gruplarının glikoz, HDL, LDL ve total kolesterol düzeyleri	46
Tablo 12. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile glikoz değerleri arasındaki ilişki	47
Tablo 13. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile HDL düzeyleri arasındaki ilişki	48
Tablo 14. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile total kolesterol düzeyleri arasındaki ilişki.....	49
Tablo 15. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile HbA1c düzeyleri arasındaki ilişki	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. PON1 geninin polimorfik bölgeleri.....	25
Şekil 2. İnsan serum Paraoksonaz enziminin yapısı	26
Şekil 3. PON1'in üç boyutlu yapısı	27
Şekil 4. Paraoksonazın Paraoksonu hidrolizi	27
Şekil 5. Paraoksonazın Fenilasetatı hidrolizi.....	28
Şekil 6. Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi	32
Şekil 7. PON1'in HDL'ye bağlanması.....	32
Şekil 8. PON1 L55M için PCR-RFLP enzim kesim sonuçları	42
Şekil 9. PON1 Q192R için PCR-RFLP enzim kesim sonuçları	42

ÖZET

PEDİATRİK DİYABETİK HASTALARDA PARAOKSONAZ GEN POLİMORFİZM ANALİZİ

Diyabetes Mellitus (DM) dünya genelinde, komplikasyonları nedeniyle mortalite ve morbiditeye neden olan hastalıklar sıralamasında ilk sıralarda yer alır. İnsidansının artması nedeniyle tıp dünyasında önemli bir yere sahiptir. Multifaktöryel etiyolojiye sahip DM'un ilişkili olduğu gen polimorfizmlerinin çocukluk yaş grubunda belirlenmesi hastalığın genetik alt yapısının anlaşılmasına yardımcı olacaktır. Çalışmamızda DM'lu hastalar da Paraoksonaz1 55 (PON1 55) ve PON1 192 polimorfizmlerinin DM ile ilişkisinin olup olmadığını ve farklı genotip gruplarında açlık glikozu, Hemogloblin A1c (HbA1c), kolesterol ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) ile korelasyonunu belirlemeyi hedefledik.

Çalışmada 3-15 yaş aralığında Diyabetes Mellitus tanısı almış 75 hasta ve bu gruba yaş ve cinsiyet açısından eş 54 sağlıklı kişide PON1 55 ve PON1 192 polimorfizmlerini inceledik. DNA izolasyonunun ardından, PCR ve RFLP yöntemleri ile bireylerin genotiplerini belirledik. Hasta ve kontrol grubundan ayrıca HDL, LDL, total kolesterol, glikoz ve sadece hasta grubundan HbA1c düzeyi için kan örnekleri aldık. İstatistiksel analizler SPSS 16.0 (Chicago ILL USA) kullanılarak yapıldı. Kategorik verilerin analizinde Chi-kare testi, numerik verilerin analizinde t-testi kullanıldı.

İncelenen polimorfizmlerde hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$). PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleriyle HDL, total kolesterol, glikoz seviyeleri arasında zayıf ilişki tespit edildi ($p>0,05$). Hasta grubunda, HbA1c düzeyi %6,6 ve üstü olan hastalarda PON1 55 polimorfizm genotip sıklığı HbA1c düzeyi %6,5 ve altında

olan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p<0,05$). PON1 192 polimorfizmiyle HbA1c düzeyi arasında anlamlı ilişki saptanmadı ($p>0,05$).

Sonuç olarak Diyabetes Mellitus ile paraoksonaz gen polimorfizmleri arasında anlamlı ilişki bulunamasa da mevcut literatür bilgilerimize göre paraoksonaz gen polimorfizmi ve DM ilişkisi konusunda çocuk yaş grubunda yapılan ilk çalışma olması bakımından da önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Diyabetes Mellitus; paraoksonaz geni; pediatri

SUMMARY

PARAOXANASE GENE POLYMORPHISM ANALYSIS IN PATIENTS WITH DIABETES MELLITUS

Diabetes Mellitus (DM) is one of the most important disease in the worldwide because of consisting serious complications of mortality and morbidity. It take important place in the world due to increasing incidence in medicine. Determining of the gene polymorphism in childhood, Diabetes Mellitus that associated with multifactorial etiology will lead to understanding of the genetic background of the disease. In this study, we aimed to determine whether the possible or impossible relationship between Paraoxonase1 55 (PON1 55) and 192 polymorphisms in pediatric patients with DM and to determine correlation between fasting glucose, HbA1c, cholesterol and high density lipoprotein (HDL) in among different genotype groups.

We examined PON1 55 and PON1 192 polymorphisms in 75 children who were diagnosed with DM and 54 healthy controls whose age and gender were matched similarly with mean age 3-15. After DNA extraction we determined the genotypes of the individuals by PCR-RFLP methods. Also, blood samples such as HDL, LDL, total cholesterol and glycose were taken from patient group and control group and only blood samples for HbA1c level were taken from patient group. Statistical analysis was performed by SSPS 16.0 (Chicago ILL USA). Qualitative data were compared between groups by the chi-square test and t-test was used for the analysis of numerical data.

There is no significant difference between patient and healthy control group ($p>0,05$) in examining polymorphisms. Weak relationship was identified between levels of HDL, total cholesterol, glucose and polymorphisms of PON1 55

and PON1 192. PON1 55 polymorphism frequency was statistically significantly higher in patient group with levels higher than %6,6 of HbA1c ($p<0,05$). There was no significant association between PON1 192 polymorphism and HbA1c level ($p>0,05$).

In conclusion, although no statistically significant relationship was found between the paraoxanase gene polymorphism and DM, this study is important in terms of being first study in pediatric age group about the relation between paraoxanase gene polymorphisms and Diabetes Mellitus according to our current literature knowledges.

Key words: Diabetes Mellitus; paraoxonase gene; pediatrics

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Birçok çalışmada Tip 1 ve Tip 2 diyabette PON1 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu azalmanın diyabetik hastalarda oksidatif stresin artması sonucu antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Aktivite üzerindeki etki muhtemelen genotipten bağımsızdır. Bununla birlikte PON1 55L'nin diyabetik retinopati ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve PON1 192R daha çok kardiyovasküler hastalığı olan diyabetiklerle ilişkilidir. L55M polimorfizmi ise azalmış glikoz toleransı, pankreas hücre harabiyeti ve artmış insülin rezistansı ile ilişkili olarak bulunmuştur (1).

Diyabetiklerde PON1'in azalma mekanizması tam bilinmemektedir. Fakat artmış glikoz konsantrasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Glikasyon hem PON'u inaktive eder hem de HDL üzerindeki lipid peroksidasyonunu artırır. Glike HDL oksidasyona da dirençsiz hale gelir. Yüksek glikoz seviyesi olan sağlıklı bireylerde de PON1 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (1).

Hipergliseminin oksidatif stres ve ateroskleroza zemin hazırladığı düşünülürse, diyabetli olgularda paraoksonazın rolü ortaya çıkar. Diyabetik hastalarda görülen hiperglisemi, hiperinsülinemi, yüksek serbest yağ asitleri ve dislipidemi; reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) fazla üretimine bağlı olabileceği gibi, diyabetik retinopati ve hipertansiyon gelişen olgularda izlenen düşük serum PON1 aktivitesi de muhtemelen lipid peroksidasyonuna yatkınlığın artmış olmasından kaynaklanmaktadır. Serum PON1 düzeylerini etkileyen çevresel ve genetik faktörler, HDL'nin düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) oksidasyondan, dolayısıyla aterosklerozdan koruma kapasitesini etkiler (1).

PON1 192 RR ve PON1 55 LL genotipleri tip 2 diyabetli olgularda daha sık izlenmiş olup; DM, hiperkolesterolemi, böbrek yetmezliği gibi koroner kalp

hastalığı ile ilişkisi olduğu bilinen hastalıklarda, düşük serum PON1 aktivitesinin genotipten bağımsız olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir. PON1'in HDL'ye bağlanması diyabetik hastalarda sağlıklı insanlarla kıyaslandığında daha düşük olup, değişik çalışmalarda PON1 aktivitesinin azalmış olduğu tespit edilmiştir (1).

Çalışmamızın amacı, 3-15 yaş arasındaki diyabetik hastalar da PON gene polimorfizmlerinin DM ile ilişkisinin olup olmadığını araştırmak ve farklı genotip gruplarında açlık glikozu, HbA1c, kolesterol ve HDL ile korelasyonunu belirlemeyi hedeflemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Diyabetes Mellitus'un Tarihçesi

İlk olarak Kapadokyalı Arateus tarafından çok idrar yapan ve kilo kaybeden insanlar sifonlu fıçıya benzetilerek hastalığa eski Yunanca da “sifon” anlamına gelen “diabetes” adı verilmiştir. 7. yüzyılda ise Mısırlı, Hintli ve Çinlilerce idrarın şekerli olduğu tadılmış ve “Lemadhumea” ballı idrar tanımlaması yapılmıştır. 11. yüzyılda İbn-i Sina, kaynatılan idrardaki tortuda bal tadını belirlemiştir. 16. yüzyılda “Thomas Willis” idrarda şeker tayinini yapmış ve 19. yüzyılda fizyolog “Claude Bernard” kan şekeri ölçümü gerçekleştirmiştir (2).

2.2. Diyabetes Mellitus'un Tanımı

Diyabetes Mellitus kanda glikoz seviyesinin artması ve idrarda glikoz atılması ile karakterize, insülinin yokluğu veya fonksiyonel bozukluğuna bağlı olarak meydana gelen, multipl etiyolojili kronik bir hastalıktır (1, 3). Gelişiminde beta hücrelerinin otoimmün hasarından insülin direncine kadar değişik patolojiler sorumludur (3). Bu patolojiler sonucunda karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklar meydana gelir (1).

Diyabetes Mellitus gelişmekte olan ülkelerde sık rastlanan endokrin bir hastalıktır (4). Çocukluk çağının en sık görülen kronik hastalıkları arasındadır. Çocuklarda ve gençlerde görülen diyabetin büyük bölümünü Tip I DM oluşturmaktadır (3).

Diyabetin genel bulguları arasında poliüri, polidipsi, polifaji, halsizlik, çabuk yorulma, ağız kuruluğu, noktüri, kilo kaybı, görmede bulanıklık, inatçı enfeksiyonlar, tekrarlayan mantar enfeksiyonları, kaşıntı ve büyüme geriliği sayılabilir (4, 5). Diyabetes Mellitus'un akut ve kronik olmak üzere birçok komplikasyonları bulunmaktadır. Akut komplikasyonlar diyabetik ketoasidoz,

beyin ödemi ve hipoglisemi; kronik komplikasyonlar ise mikrovasküler komplikasyonlar (retinopati, nefropati ve nöropati), makrovasküler komplikasyonlar (miyokard infarktüsü, inme ve periferik arter hastalığı), büyüme geriliği, osteopeni, eklem hareketlerinde kısıtlılık sendromu, katarakt ve puberte gecikmesi olarak sıralanabilir (5, 6).

2.3. Epidemiyoloji

Diyabetes Mellitus günümüzde en sık görülen endokrin hastalıklardan biridir. Kontrol edilemeyen hiperglisemiye bağlı oluşan komplikasyonlardan dolayı mortaliteye neden olan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer alır. Son 20 yılda DM hızla artmıştır (4). Diyabetes Mellitus bütün toplumlarda ve ırklarda görülen bir hastalık olmasına rağmen, her kesimde prevalansı değişkenlik gösterir. Papua Yeni Gine'deki kavimlerde Eskimolar'da ve ana kıtada yaşayan Çinliler'de bu oran %1 iken Avustralyadaki "aborigene"lerde, Mikronezya'daki "Nauruan"larda %20-45 arasında bulunabilmektedir. Amerika'daki "Pima" Kızılderelileri DM prevalansının en yüksek olduğu ırktır. Prevalansdaki bu farklılık uluslararası daha belirginleşmektedir. Örneğin beyaz ırka göre Amerika Birleşik Devletleri'nde Afrika kökenli Amerikalılar arasında iki kat, Meksika kökenli Amerikalılar arasında iki buçuk kat ve yerli Amerikalılar arasında 5 kat daha fazla diyabet görülmektedir (7, 8).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda değişik değerler bildirilmekle beraber 2002 yılında sonuçları yayınlanan TURDEP çalışmasına göre prevalansın %7.2'ye yükseldiği düşünülmektedir (9).

Diyabetli hastaların %90'ı Tip 2, %10'u ise Tip 1 DM'tur. Tip I DM, tüm yaş gruplarında görülebilirken, esas olarak çocukluk çağının (1-18 yaş) hastalığıdır. İlk 6 ay da nadir görülürken, 4-6, 8-14 yaşları arasında ve puberte

döneminde görülme sıklığı artar. Tip 2 diyabetin görülme sıklığı ise yaşla birlikte artar (4).

2.4. Tanı ve Sınıflama

Diyabet ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarının tanı ve sınıflamasında son 15 yılda değişiklikler yapılmıştır. Önce 1997 yılında Amerikan Diyabet Birliği (ADA) yeni tanı ve sınıflama kriterlerini yayınlamış ve hemen ardından 1999'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu kriterleri küçük revizyonlarla kabul etmiştir (5).

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) tarafından 2006 yılı sonlarında yayınlanan raporda 1999 kriterlerinin korunması benimsenmiştir. ADA ve Avrupa Diyabet Çalışma Birliği (EASD) 2007 yılında yayınlanan son raporlarında ise 2003 yılındaki düzenlemenin değişmemesi gerektiğini savunmaktadır (5). Diyabetes Mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri Tablo 1'de gösterilmiştir. Diyabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması Tablo 4'de verilmiştir.

2.4.1. Tanı

2.4.1.1. Tanı kriterleri

Tablo 1. Diyabetes Mellitus ve glikoz metabolizmasının diğer bozukluklarında tanı kriterleri* (5)

	Aşikar DM	İzole IFG**	İzole IGT	IFG+IGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.st PG	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200 mg/dl + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C***	≥%6.5 (≥48 mmol/mol)	-	-	-	%5.7-6.4 (39-46 mmol/mol)

* Glisemi venöz plazmada glikoz oksidaz yöntemi ile "mg/dl" olarak ölçülür. "Aşikar DM" tanısı için dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli iken "İzole bozulmuş açlık glikozu" (IFG), "İzole bozulmuş glikoz toleransı" (IGT) ve "IFG + IGT" için her iki kriterin bulunması şarttır. ** 2006 yılı WHO/IDF raporunda normal açlık plazma glikozu (APG) kesim noktasının 110 mg/dl ve IFG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir. *** Standardize metotlarla ölçülmelidir.

Bu tabloya göre diyabet tanısı dört farklı yöntemle konabilir. Tanı için iki farklı test yapılmış ve sonuçları uyumsuz ise sonucu eşik değerin üzerinde çıkan test tekrarlanmalı ve sonuç yine diyagnostik ise diyabet tanısı konulmalıdır (5).

Tanı testlerinden olan oral glikoz tolerans testi'nin (OGTT) diğerlerine göre sensitivitesi ve spesifitesi daha yüksek olmakla birlikte emek ve maliyeti de daha fazladır. Bu nedenle klinik pratikte daha kolay ve ucuz olan APG tercih edilmektedir (10).

Plazma glikoz (mg/dl)=0,558+(20,254x tam kan glikoz (mg/dl)/18)

Plazma glikoz (mg/dl)=0,102+(19,295x kapiller kan glikoz (mg/dl)/18)

Plazma glikoz (mg/dl)=0,137+(18,951x serum glikoz (mg/dl)/18)

Klinikte veya hastaların evde glisemi takibinde kullandıkları tam kan, kapiller kan ve serum glisemi değerleri formüllerde görüldüğü gibi biraz daha düşüktür (5).

Buna göre glikoz düzeyi venöz plazmada 126 mg/dl, tam kanda 112 mg/dl, kapiller kanda 118 mg/dl, serumda ise 120 mg/dl olarak ölçülür (5).

2.4.1.2. Tanı testi olarak A1c (HbA1c:A1C)

Uluslararası Diyabet Uzmanlar Komitesi 2008 yılında, uluslararası standardizasyon kurallarına uyulması koşulu ile diyabet tanısı için A1C kesim noktasını %6,5 (48 mmol/mol) olarak belirlemiştir. Tanı amaçlı olarak bu testin kullanılması komplikasyonların tanınması ve komplikasyonlara bağlı oluşabilecek olumsuz tabloların önlenmesinde daha fazla yarar sağlamaktadır (5).

2.4.1.3. Oral glikoz tolerans testi

2.4.1.3.1. OGTT endikasyonları (1, 11)

1. Tarama testinde açlık kan şekerinin 115 mg/dl ve üzerinde ya da postprandiyal kan şekerinin (120. dakika) 140 mg/dl ve üstünde bulunması

2. Gestasyonel diyabetin taraması
3. Obezler (ideal vücut ağırlığının %120 üzeri veya vücut kitle indeksinin 27'den büyük olduğu durumlar) ve/veya özellikle ağırlıklı ailesel diyabet hikayesi olanlar
4. Otozomal dominant (gençlerde görülen erişkin tip diyabet) (MODY) tipi diyabet hikayesi olanlar
5. Açıklanamayan nöropati, retinopati, ateroskleroz, koroner arter hastalığı, periferik vasküler hastalıklar (özellikle 50 yaşın altında olanlarda)
6. Operasyon, stres, travma, infarktüs, serebral vasküler olaylar, kortikosteroid kullanımı, gebelik esnasında anormal glikoz değerleri veya glikozüri görülenlerde, bu olaylar geçtikten sonra test yapılmalıdır
7. Metabolik sendrom X düşünülen kişilerde
8. Reaktif hipoglisemi düşünülen kişilerde (bu kişilerde OGTT süresi daha uzun tutulur)

WHO ve NDDG kriterlerine göre OGTT yorumları Tablo 2 ve Tablo 3'de verilmiştir.

2.4.1.3.2. OGTT hazırlığı (1, 5, 11)

1. Testten en az üç gün evvel hasta günde en az 200 gram karbonhidrat içeren beslenme programına alınmalıdır.
2. Hastanın ağır stres, akut serebral ve kardiyak olaylar, uzun süreli inaktivite (sedanter yaşam), enfeksiyon gibi OGTT'yi etkileyebilecek bir sorunun olmamasına dikkat edilmelidir. Akut hastalıkların geçmesi beklenmelidir.
3. Hipopotasemi, gastrointestinal motilite ve emilim bozuklukları, ağır karaciğer ve böbrek yetersizliği, Addison hastalığı, Cushing Sendromu,

hipertiroidi, akromegali, feokromasitoma gibi hastalıkların aktif döneminde OGTT yapılmamalıdır.

4. Oral kontraseptifler, diüretikler, kortikosteroidler, difenilhidantoin, tiroksin, nikotinik asit, psikotrop ajanlar ve beta bloker gibi ilaçların kullanımında testten en az bir hafta önce, yüksek doz östrojen içeren oral kontraseptif kullanımında ise en azından bir siklus önce ilaç kesilmelidir.

2.4.1.3.3. OGTT yapılması (1, 5, 11)

1. Test en az 8 saatlik açlık sonrası sabah uygulanır. Hasta sakın bir odaya alınır. O. dakikada ilk kan örnekleri alınır.

2. Açlık kan örneği alındıktan sonra standart olarak 75 gram anhidroz glikoz veya 82.5 gram glikoz monohidrat 250-300 ml su içinde eritilip 5 dakika içinde içirilir.

3. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre glikoz verildikten yalnızca 2 saat sonra kan örneği alınması yeterli olmakla birlikte; Amerikan Ulusal Diyabet Veri Toplama Grubu (NDDG)'nun önerdiği şekilde 2 saat süreyle 30 dakikada bir (30, 60, 90, 120. dk) kan örneği alınmasında fayda vardır. Reaktif hipoglisemi düşünülen vakalarda test süresi 5 saat kadar uzatılmaktadır.

4. Çocuklarda verilecek glikoz miktarı 1.75 g/kg (maksimum 75 g)'dır.

5. Test sırasında kişinin istirahat halinde olması gerekir.

6. Test öncesinde ve sırasında su içilebilir, ancak çay/kahve gibi içecekler veya sigara içilmesine izin verilmez.

Tablo 2. WHO kriterlerine göre OGTT yorumu (1, 11)

Kan glikoz düzeyi (venöz plazma mg/dl)	Normal Glikoz toleransı (NGT)	IGT	DM
Açlık	<110	<140	≥140
120. dk	<140	<140-199	≥200

Tablo 3. NDDG kriterlerine göre OGTT yorumu (1, 10)

Kan glikoz düzeyi (venöz plazma mg/dl)	NGT	IGT	DM
Açlık	≤ 115	< 140	≥ 140
30, 60, 90. dk en az bir değer	< 200	≥ 200	≥ 200
120. dk	< 140	140-200	≥ 200

2.4.1.4. Diğer tanı testleri

2.4.1.4.1. C-peptid düzeyi

Pankreas beta hücre (endojen insülin) rezervini yansıtır. Tip 1 diyabette rutin olarak ölçülmesine gerek yoktur. Otoimmün diyabetin tip 2 diyabetten ayrımında ve insülin tedavisine geçilecek tip 2 diyabet olgularının belirlenmesinde açlık ve uyarılmış C-peptid düzeyleri ölçülebilir (5).

2.4.1.4.2. Adacık otoantikorları

Anti-glutamik asit dekarboksilaz (anti-GAD), adacık hücresi sitoplazmik antikor (ICA), insülin otoantikoru ile anti-tirozin fosfataz, anti-fogrin antikorları ve çinkotransporter-8 antikorudur. Tip 1 diyabette rutin olarak otoantikorların ölçülmesine gerek yoktur (5).

2.4.2. Sınıflama

Tablo 4. Diyabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması (5)

I. Tip 1 diyabet (Genellikle mutlak insülin noksanlığına sebep olan β -hücre yıkımı vardır)	
A. İmmün aracılıklı B. İdiyopatik	
II. Tip 2 diyabet (İnsülin direnci zemininde ilerleyici insülin sekresyon defekti ile karakterizedir)	
III. Gestasyonel Diyabetes Mellitus Gebelik sırasında ortaya çıkan ve genellikle doğumla birlikte düzelen diyabet	
IV. Diğer spesifik diyabet tipleri	
A. β-hücre fonksiyonlarının genetik defekti (monogenik diyabet formları) 20. Kromozom, (HNF-4α) (MODY1) 7. Kromozom, Glukokinaz (MODY2) 12. Kromozom, HNF-1α (MODY3) 13. Kromozom, IPF-1 (MODY4) 17. Kromozom, HNF-1β (MODY5) 2. Kromozom, NeuroD1 (MODY6) 2. Kromozom, KLF11 (MODY7) 9. Kromozom, CEL (MODY8) 7. Kromozom, PAX4 (MODY9) 11. Kromozom, INS (MODY10) 8. Kromozom, BLK (MODY11) - Mitokondriyal DNA 11. Kromozom, Neonatal DM (Kir6.2, ABCC8, KCNJ11 mutasyonu) - Diğerleri B. İnsülinin etkisindeki genetik defektler - Leprechaunism - Lipoatrofik diyabet - Rabson-Mendenhall sendromu - Tip A insülin direnci - Diğerleri C. Pankreasın ekzokrin doku hastalıkları - Fibrokalkülöz pankreatopati - Hemokromatoz - Kistik fibroz - Neoplazi - Pankreatit - Travma/pankreatektomi - Diğerleri D. Endokrinopatiler - Akromegali - Aldosteronoma - Cushing sendromu - Feokromositoma - Glukagonoma - Hipertiroidi - Somatostatinoma - Diğerleri	E. İlaç veya kimyasal ajanlar - Atipik anti-psikotikler - Anti-viral ilaçlar β-adrenerjik agonistler - Diazoksit - Fenitoin - Glukokortikoidler α-İnterferon - Nikotinik asit - Pentamidin - Proteaz inhibitörleri - Tiyazid grubu diüretikler - Tiroid hormonu - Vacor - Diğerleri (post transplant diyabet) F. İmmün aracılıklı nadir diyabet formları - Anti-insülin reseptör antikorları "Stiff-man" sendromu - Diğerleri G. Diyabetle ilişkili genetik sendromlar - Alström sendromu - Down sendromu - Friedreich tipi ataksi - Huntington korea - Klinefelter sendromu - Laurence-Moon-Biedl sendromu - Miyotonik distrofi - Porfiria - Prader-Willi sendromu - Turner sendromu - Wolfram (DIDMOAD) sendromu - Diğerleri H. Enfeksiyonlar - Konjenital rubella - Sitomegalovirus - Koksaki B - Diğerleri (adenovirus, kabakulak)

HNF-1 α : Hepatosit nükleer faktör-1 α , MODY1-10: Gençlerde görülen erişkin tipi diyabet formları 1-10 (maturity onset diabetes of the young 1-10), HNF-4 α : Hepatosit nükleer faktör-4 α , IPF-1: İnsülin promotör faktör-1, HNF-1 β : Hepatosit nükleer faktör-1 β , NeuroD1: Nörojenik diferansiyasyon 1, BLK: Beta lenfosit-spesifik kinaz, DNA: Deoksi-ribonükleik asit, HIV: İnsan immün eksiklik virusu, DIDMOAD sendromu: Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optik atrofi ve sağırlık ile seyreden sendrom (Wolfram sendromu), KLF11: Kruppel like factor 11, CEL: Carboxyl ester lipase (bile salt-dependent lipase), PAX4: Paired box4, ABCC8: ATP binding cassette C8, KCNJ11: Potassium inwardly-rectifying channel J11, INS: İnsülin.

Bu tablodaki diyabet etiyolojilerinden ilk üçü primer, diğeri ise sekonder diyabet formları olarak bilinmektedir.

2.4.2.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus

2.4.2.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus'un etiyolojik sınıflaması (1)

1. Pankreas beta hücrelerinin idiopatik otoimmün yıkımı (Tip 1 DM)
2. Poliglandüler otoimmün sendrom Tip 2 (Schmidt sendromu)
3. Viral enfeksiyonların neden olduğu beta hücresi yıkımı
 - Konjenital rubella virüsü
 - Koksaki B (Tip B4 ve B3)
 - Sitomegalovirus
4. Akut pankreatit, kronik tekrarlayıcı pankreatit, pankreas kanseri, konjenital pankreas hipoplazisi ve pankreatektomiye bağlı pankreas doku kaybı
5. Pankreas beta hücresinde yıkıma neden olan kimyasal ajanlar
6. Genetik sendromlar:
 - DIDMOAD sendromu
 - Fredreich ataksisi
7. Diğer; Kesin olarak tanımlanamayan nedenlerle gelişen insülin salgısı azalması.

Çocuklarda ve gençlerde görülen diyabetin büyük bölümünü Tip I DM oluşturmaktadır. İleri yaşta nadirdir.

Tip I DM, pankreasta gelişen inflamasyon sonucu ilerleyici beta hücre harabiyeti ve total insülin yetersizliği ile karakterize kronik bir hastalıktır.

Genetik Faktörler:

Hastalık; 6 numaralı kromozomun kısa kolu üzerindeki Major Histokompatibilite Kompleksi (Major Histocompatibility Complex - MHC)'nin

polimorfik, İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen – HLA) olarak bilinen kısmı ile ilişkilidir (3).

Tip 1 diyabetli olanların birinci derece akrabalarında tip 1 diyabet görülme oranı fazladır. %95’inde HLA-DR3 veya antijenleri pozitifdir. HLA-DR3 veya HLA-DR4’ün tek başına bulunması, tip I DM gelişme riskini 2-3 kat, bu antijenlerin ikisinin aynı kişide bulunması, riski 7-10 kat artırmaktadır. HLA-DQ β zincirinin 57. pozisyonundaki aspartik asitin homozigot yokluğu (non Asp/non Asp), Tip I DM gelişimi için rölatif riski yaklaşık 100 kat arttırır. Heterozigot yokluğu ise (non Asp/Asp), homozigotlara göre daha az olmakla birlikte DM gelişme riskini artırmaktadır. DQA1 0301/DQB1 0302, DR4, DQA1 0501/DQB1 0201 ve DR3 DM gelişimi açısından en riskli lokuslardır (3, 12).

Otoimmünite:

Beta hücre hasarı, üç farklı etki mekanizması ile oluşur. Bu mekanizmalar; antikora bağlı sitotoksiste, doğal katil hücreler ve komplemanın klasik yoldan aktivasyonudur (3).

Çevresel faktörler:

Genetik olarak yatkın bir bireyde, beslenme alışkanlıkları ve diyet içerikleri, kimyasal maddeler ve toksik ajanlar, emosyonel ve fiziksel stres, enfeksiyöz nedenler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle otoimmün süreç başlamakta, buna bağlı olarak insülin eksikliği ile giden tip 1 DM gelişmektedir (3, 13, 14).

Toksik ve kimyasal ajanlar:

DNA parçalanması ve oksidatif hasar yoluyla beta hücre tahribatına yol açtıkları bilinmektedir (3).

Emosyonel ve fiziksel stresler:

Stres, steroid salgılanmasına yol açarak insülin ihtiyacını arttırmaktadır (15).

Beslenme özellikleri:

Anne sütü, süt çocukluğu döneminde verilen D vitamini desteğinin diyabete neden olan çevresel faktörlere karşı koruyucu olduğu saptanmıştır. Buna karşılık, E ve C vitamini gibi antioksidanların eksikliği, eser elementlerin eksikliği, yüksek nitrozamin ve nitrat düzeyleri ve çinkodan fakir diyetin ise diyabet riskini arttırdığı düşünülmektedir (3, 16).

İnfeksiyöz ajanlar:

Virüslerin direk olarak sitotoksik etkileri ve uzun yıllar içinde otoimmunitenin tetiklenmesi infeksiyöz ajanların tip 1 DM üzerindeki başlıca mekanizmalarıdır. Suçiçeği, Rubella, Koksaki, Sitomegalovirus ve Ebstein Barr virüsün diyabetojenik etkileri olduğu bilinmektedir (3, 17, 18).

Tip 1 DM 4 dönemde incelenir:

1. Prediyabet dönemi

Aseptomatik dönem olup, çevresel faktörlerin beta hücrelerine karşı otoimmün aktivasyonu tetiklemesinden, klinik semptomlar ortaya çıkıncaya kadar geçen süredir. Bu dönemde tespit edilen tip 1 DM'un immünomodülasyon veya immünosupresyon tedavileri ile klinik tip 1 DM'a geçişinin engellenmesi mümkündür (4, 19).

2. Klinik dönem

Pankreasın beta hücre kitlesinin %80'den fazlasının harap olmasıyla başlayan dönemdir. Poliüri, polidipsi, kilo kaybı gibi semptomlar giderek

belirginleşir. Hastalar mutlak ekzojen insülin gereksinimi gösterirler. Ketoasidoz, hipoglisemi gibi akut komplikasyonlara sık rastlanır (4, 20).

Erken Klinik Dönem: Hiperglisemi ve klinik semptomlar başlamasına rağmen beta hücre rezervinin hala mevcut olduğu dönemdir (4).

3. Kısmi remisyon dönemi

Otoimmün yıkım sonrası sağlam kalan hücrelerin rejenerasyon sonucu çoğalmasına bağlı olarak endojen insülin salınımının artması ve ekzojen insülin ihtiyacının azalması ile karakterizedir. Bu süre 1 hafta ile 1 yıl arasında değişir (4, 19, 21).

4. Kronik dönem

Pankreas beta hücre kitlesinin çok azalmasına bağlı olarak glisemi kontrolünü sağlamak amacıyla yoğun insülin tedavisi gereken dönemdir (4).

2.4.2.1.2. Tip 1 Diyabetes Mellitus'ta semptom ve bulgular

Tip 1 DM hastalarının çoğunluğu başlangıçta klasik DM semptomları olan poliüri, polidipsi, polifaji, iştahsızlık, kilo kaybı ile, %25'i ise ketoasidoz tablosunda başvururlar. Ketoasidoz belirtileri bulantı, kusma, karın ağrısı, halsizlik, baş ağrısı, irritabilite, poliüri, polidipsi, noktürinin fazlalaşması, dehidratasyon, asidoz, uyku hali, şuur bulanıklığı ve komadır. İleri dönemde nefeste aseton kokusu, “kussmaul” solunumu ve beyin ödemi gelişebilir. Glikozüri, ketonüri, hiperglisemi, ketonemi, metabolik asidoz ve lökositoz sıklıkla görülen laboratuvar bulgularıdır (3, 22, 23).

2.4.2.1.3. Tip 1 Diyabetes Mellitus'un tanısı

Poliüri, polidipsi, polifaji, iştahsızlık, kilo kaybı gibi semptomları olup diyabetten şüphelenilen kişilerde tanıyı kuvvetlendirmek için başlangıç olarak biyokimya, tam idrar tetkiki, hemogram ve kan gazı parametreleri değerlendirilir.

Tip I diyabetli hastalarda, henüz hiperglisemi ile seyreden klinik dönem gelişmeden, beta hücresindeki otoimmün yıkımın göstergesi olan otoantikörlerin saptanması (ICA, IA-2, insülin ilişkili antikor (IAA), GAD) ile preklinik dönemde tanı koyulabilmesi mümkündür. Ancak olgular çoğunlukla hiperglisemi veya diyabetik ketoasidoz (DKA) tablosunda gelirler (3, 23-25).

2.4.2.1.4. Tip 1 Diyabetes Mellitus'un tedavisi (5)

1. İnsülin enjeksiyonları
2. Tıbbi beslenme tedavisi
3. Fizik aktivite
4. Hasta ve ailenin eğitimi
5. Evde kan glikoz ve keton izlemi

2.5. Diyabetes Mellitus'un Komplikasyonları

2.5.1. Akut komplikasyonlar

1. Diyabetik ketoasidoz (5)

Sıklıkla tip 1 DM olgularında görülür.

İnfeksiyonlar, insülin tedavisindeki hatalar, serebrovasküler olaylar, stres, pankreatit, myokard infarktüsü, travma, yeme bozuklukları DKA'ya hazırlayıcı faktörlerdir.

Diyabetik ketoasidozun belirti ve bulguları Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 5. Diyabetik ketoasidozun belirti ve bulguları (5)

Semptomlar	Fizik Muayene Bulguları
• Halsizlik • Bulantı, kusma • Ağız kuruluğu • Polidipsi, poliüri, pollaküri • Karın ağrısı • Nefes darlığı • Kilo kaybı	• Taşikardi • Dehidratasyon bulguları, hipotansiyon • Takipne, Kussmaul solunumu • Batında hassasiyet • Ağızda keton kokusu • Letarji, zihinsel küntleşme, koma

Laboratuar Bulguları (5):

1. Plazma glikoz düzeyi >250 mg/dl
2. Kan keton düzeyi >3 mmol/l
3. Kan ph ≤ 7.30
4. Serum bikarbonat düzeyi ≤ 15 meq/l
5. Serum ozmolalitesi >320 mosm/l
6. Anyon açığı >12
7. Hafif ya da orta derecede lökositoz

Tedavi:

Sıvı ve elektrolit tedavisi, insülin tedavisi, potasyum replasmanı, glikoz infüzyonu ve bikarbonat tedavisi ketoasidozun başlıca tedavi yöntemleridir. Bütün bu tedavilerin hedefi glikozu normal sınırlara getirmek, idrar ve serumdaki keton cisimlerini temizlemek ve elektrolit dengesini düzeltmektir (5).

2. Hiperosmolar hiperglisemik durum

Ciddi hiperosmolarite (>320 mOsm/l) ve hiperglisemi (>600 mg/dl) tanı için yeterli olan iki özelliştir. Vakaların 1/2'sinde sadece hiperosmolar hiperglisemik durum mevcut olmakla birlikte 1/3'ünde asidoz da söz konusudur. Sıvı elektrolit tedavisi ve insülin tedavisi başlıca tedavi yöntemleridir (5).

3. Laktik Asidoz

Kanda laktat konsantrasyonunun artmasına bağlı oluşan anyon açıklı asidoz durumudur (5).

Kan laktat düzeyi >5 mmol/l

Ph <7.30

Tedavide hedef 48 saatte laktat düzeyini ≤ 3 mmol/l düzeyine indirmektir (5).

4. Hipoglisemi

Whipple triadı (kan glikoz düzeyinin <50 mg/dl olması, düşük kan glikoz düzeyi ile uyumlu bulgular ve bu bulguların kan glikoz düşüklüğünü ortadan kaldıracak bir tedavi ile geçmesi) tanı için yeterlidir (5).

Hipogliseminin seviyesine göre titreme, soğuk terleme, anksiyete, bulantı, çarpıntı, sersemlik hissi, baş ağrısı, konsantrasyon bozukluğu, konuşma bozukluğu, halsizlik, konfüzyon görülebilir (5).

Hipogliseminin ana nedeni mutlak veya göreceli insülin fazlalığıdır.

Tedavide hastanın bilinci açıksa 15-20 gram oral glikoz (4-5 kesme şeker veya 150-200 ml meyve suyu), bilinç kapalıysa parenteral tedavi uygulanmalıdır (5).

2.5.2. Kronik komplikasyonlar

Diyabetin makroanjiyopatik ve mikroanjiyopatik kronik komplikasyonları Tablo 6'da verilmiştir.

2.5.2.1. Makrovasküler komplikasyonlar

1. Kardiyovasküler hastalıklar (5)

Diyabetli hastalarda kardiyovasküler hastalık en önemli morbidite ve mortalite nedenidir.

- Makrovasküler hastalık (sessiz myokard enfarktüsü, sessiz iskemi, periferik arter hastalığı, karotis arter hastalığı veya serebrovasküler olay)
- Mikrovasküler hastalık (özellikle retinopati ve nefropati)
- Koroner arter hastalığı açısından çok sayıda ilave risk faktörlerinin bulunması (ailevi erken koroner olay veya birinci derece akrabalarda serebrovasküler olay)
- Diyabet süresi uzun (>15 yıl) olan diyabetliler

Kardiyovasküler hastalıktan korunma için kan şekerinin regülasyonunun yanısıra hipertansiyon, dislipidemi, sigara, nefropati gibi risk faktörlerinin tedavisi gereklidir. Antiagregan ajanlar profilaksiste tercih edilebilir. Koroner arter hastalığı olanlarda da yine kan şekeri regülasyonu, hipoglisemi ataklarından kaçınma, dislipidemi tedavisi (statinler), hipertansiyon için ACE inhibitörleri tercih edilir (4).

2. Serebrovasküler hastalıklar

Diyabetli hastalarda trombosit aggregasyon yeteneğinin ve fibrinojen düzeylerinin ve buna bağlı olarak tromboza eğilimin artması serebrovasküler hastalık riskini arttırır (4, 26).

3. Periferik damar hastalığı

Koroner serebral ve periferik arterleri etkileyen ateroskleroz diyabete bağlı ölümlerin en önemli nedenidir (4).

2.5.2.2. Mikrovasküler komplikasyonlar

1. Diyabetik nefropati

Erken dönem nefropatiyi saptamak için mikroalbuminüri ölçümü ile birlikte glomeruler filtrasyon oranının hesaplanması gerekir. 3-6 ay ara ile yapılan en az iki idrar incelemesinde, persistan albüminüri (300mg/g veya >200 mcg/dk albümin saptanması) ile diyabetik nefropati tanısı konur. Sabah ilk idrarda albümin/kreatinin oranı bakılarak mikroalbuminüri taraması yapılır (5). Bu tarama çocuklarda 12 yaşından sonra yılda bir kez yapılır.

Nefropatinin en önemli sonucu son dönem böbrek yetersizliğine neden olmasıdır (5).

2. Diyabetik retinopati (5)

1. Non-proliferatif retinopati: mikroanevrizmalar ve sert eksudalar
2. Pre-proliferatif retinopati: eksudalar, kanamalar, intraretinal mikrovasküler anormallikler
3. Proliferatif retinopati: neovaskularizasyon
4. Retina dekolmanı

Tip 1 diyabetli hastalarda tanıdan 5 yıl sonra başlayarak puberteden itibaren yılda bir retinopati taraması yapılmalı, başlangıçta retinopatisi olmayan ya da minimal retinopatisi olanlarda yılda bir, ileri evre hastalarda 3-6 ayda bir kontrol yapılmalıdır (5).

3. Diyabetik nöropati

Diyabet en sık periferik nöropati sebebidir. Nontravmatik amputasyonların en önemli nedenlerinden biridir. İnsulin bağımlı olmayan DM'da (NIDDM) en sık rastlanan nöropati periferik distal simetrik sensöryel polinöropati'dir. Klasik olarak "eldiven, çorap tarzı" yayılımdan bahsedilir (4).

Tablo 6. Diyabetes Mellitus'un mikroanjiopatik ve makroanjiopatik kronik komplikasyonları (1)

Göz	1. Diabetik retinopati (vazoproliferatif ve makülopatik) 2. Vitreus kanaması 3. Rubeozis iritis 4. Glokom 5. Katarakt 6. Okuler kas felci
Böbrek	1. İnterkapiller glomeruloskleroz (Kimmelstiel Wilson) 2. Kronik böbrek yetersizliği 3. Renal papiller nekroz 4. Kronik pyelonefritis 5. Renovasküler hastalıklar ve hipertansiyon
Periferik sinir ve MSS	1. Somatik Diyabetik nöropati 2. Otonom Diyabetik nöropatisi 3. Diyabetik inmeler
Kardiyovasküler sistem	1. İskemik kalp hastalıkları 2. Diyabetik kardiyomiyopati 3. Diyabetik periferik arter hastalığı 4. Diyabetik arteriyal organ beslenme bozukluğu
Deri ve bağ dokusu	1. Necrobiosis lipoidica diabetorum 2. Xantoma diabetorum 3. Granuloma annulare 4. Fronkuloz 5. Mikotik infeksiyonlar
Gebelik	1. İri bebek gelişimi insidansında artış 2. Konjenital defekt (bebekte) 3. Gebelikte miad gecikmesi 4. Neonatal hipoglisemi 5. Neonatal ölüm değerlerinde artış

2.6. Diyabet ve Oksidatif Stres

Diyabetes Mellitus erken ve geç dönem komplikasyonlarının patogeneğinde artmış serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ve bunların yol açtığı oksidatif stres önemli rol oynamaktadır (27).

Serbest oksijen radikallerinin oluşum hızının artması ve buna karşılık antioksidan savunma sistemlerinin yetersiz kalması durumu oksidatif stres olarak tanımlanır ve bu da diyabetin geç dönem komplikasyonlarına neden olmaktadır. Bir başka deyişle hiperglisemi oksidatif strese yol açmaktadır (27).

Biyolojik sistemlerdeki ROS, süperoksit anyonu ($2O_2^-$), hidroksil radikali (HO^-), nitrik oksit (NO^-), peroksil radikali (ROO^-) ve radikal olmayan hidrojen

peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerini oluşturlar (27).

Oksidan moleküllerin neden olduğu hasar antioksidan moleküller tarafından hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilir. Hücre dışı savunma albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin ve ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi savunma ise serbest radikal toplayıcı enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, katalaz ve sitokrom oksidaz'dır. Bu serbest radikal toplayıcı enzimlerin fonksiyonları için bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler gereklidir (27).

1980'li yıllardan beri diyabette ROS'un rolü büyük ölçüde tartışılmaktadır. Diyabet ve diyabet komplikasyonlarının ROS ile olan ilişkisini gösteren çalışmalarda, nonenzimatik glikasyon, enerji metabolizmasındaki değişikliklerden kaynaklanan metabolik stres, sorbitol yol aktivitesi, hipoksi ve iskemi-reperfüzyon sonucu oluşan doku hasarının serbest radikal üretimini arttırdığı ve antioksidan savunma sistemini değiştirdiği vurgulanmaktadır (27).

Süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi serbest radikal toplayıcı enzimlerin ekspresyonları ve antioksidan kapasite pankreas adacık hücrelerinde en düşük düzeydedir. Hipergliseminin toksik etkilerinin beta hücrelerindeki oksidatif strese bağlı hasara neden olduğu düşünülmektedir (27).

Hidrojen peroksidin, yüksek reaktiviteye sahip bir ROS ürünü olan OH radikaline dönüşmesi sonrası insülin reseptör sinyal sistemi üzerinde etkili olduğu ve insülin tarafından reseptör aracılığı ile düzenlenen sinyal transdüksiyon yollarında anahtar bir rol oynayabileceği görüşü araştırmacıların savları arasında bulunmaktadır. Glikasyon aracılı serbest radikal üretiminin insülinin gen

transkripsiyonunu azalttığını ve beta hücre apoptozuna yol açtığını gösteren çalışmaların bulguları bu görüşü desteklemektedir. T ve B lenfositlerin, makrofajlar gibi inflamatuvar hücrelerin beta hücrelerine toksik etkilerini de serbest radikaller aracılığıyla yaptığı düşünülmektedir. Diyabet oluşturulan rat deney modellerinde oksidatif stres belirteci olarak değerlendirilen 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeylerinde de artış gözlenmiştir (27).

Serbest radikal oluşumunun hipergliseminin direkt sonucu olduğunu destekleyen çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca endotel ve düz kas hücreleri yüksek konsantrasyonda glikoz içeren ortamda inkube edildiğinde de serbest radikal oluşumunun başladığı gözlenmiştir (27).

Hiperglisemi ile oksidatif stres arasında yakın ilişki olduğunu gösteren in vivo çalışmalar bulunmaktadır. Deneysel hayvan çalışmalarında insanlardakine benzer diyabet oluşturmak için kullanılan N-nitroso türevi D-glikozamin yapısındaki streptozotosinin, oksidan maddeler meydana getirerek langerhans adacıklarını selektif olarak tahrip ettiği ve uygun olmayan NO cevapları vererek diyabeti başlattığı düşünülmektedir (1).

Araştırmacıların bulguları, vasküler komplikasyonları olan diyabetik hastalarda, hem LDL'nin oksidasyonunda hem de nonenzimatik glikasyonunda, hiperglisemiye bağlı artışlar olduğunu göstermektedir.

Diyabetik olgularda, lipidlere ilave olarak protein oksidasyonu da artmaktadır. Özellikle kollajen, elastin ve myelin kılıfındaki ekstrasellüler proteinlerin oksidasyonu sonucu; lens, damar, bazal membran gibi dokularda katarakt, mikroanjyopati, ateroskleroz ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlar gelişmektedir (27).

2.7. Paraoksonaz

Glikoprotein yapıda, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olan PON, hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip bir enzimdir (28).

2.7.1. Tarihçe

1946'da Abraham Mazur hayvan dokusunda organofosfat bileşiklerini hidroliz edebilen bir enzimin varlığını ilk kez bildirmiştir (29). Bu enzim 1953 yılında Aldridge W.N. tarafından p-nitrofenil asetat, propiyonat ve bütirat'ı hidroliz eden A-esteraz olarak teşhis edilmiştir (30, 31). 1961'de Uriel tarafından insan serumunda yapılan bir çalışmada ilk kez HDL ile PON ilişkisi gösterilmiştir (32). Mackness ve ark. yaptıkları çalışmalar ile, 1985'te PON'un HDL üzerinde bulunduğunu (33), 1988'de, PON'un HDL üzerinde apoA-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini (34) ve 1991 yılında da LDL üzerindeki lipid peroksit birikimini azalttığını bulmuşlardır (35). Bu bulguların sonucunda araştırmacılar, kardiyovasküler hastalıklar ile PON1 arasındaki ilişkiyi araştırmaya yönelmişlerdir.

2.7.2. Paraoksonaz gen ailesi

Paraoksonaz için ilgili insan geni HUMPONA'dır. Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda kromozom 7'nin uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır. Paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 üyesi vardır. Bu genler yapısal yönden büyük benzerlikler göstermektedir. Bu ailenin ilk bulunan ve üstünde en çok çalışma yapılan üyesi PON1'dir (1).

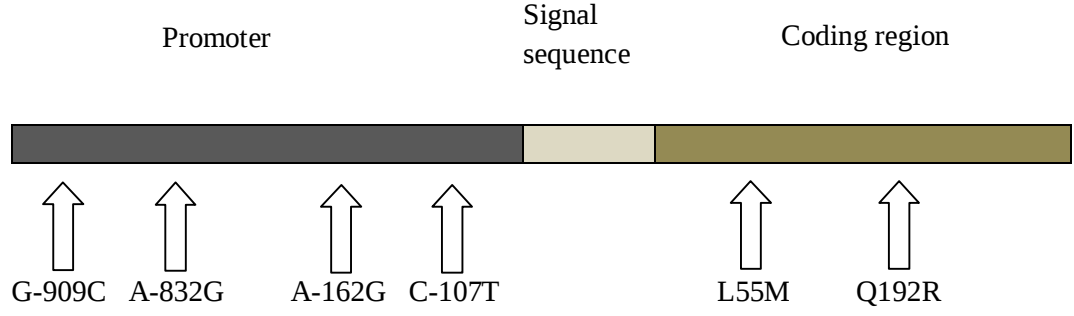
PON1, PON2 ve PON3 genleri memeliler arasında; %60 sekans benzerliği gösterir. PON ailesi enzimleri substrata spesifik hidrolazlardır (1).

PON1'i PON2 ve PON3'den ayıran farklardan biri 106. kodonda bulundurduğu lizin aminoasididir. PON1 ve PON3 karaciğer ve plazmada; PON2 karaciğer, böbrek, kalp, beyin, testis dokularında özellikle endotel tabakasında ve aortik düz kas hücrelerinde bulunmaktadır (1).

2.7.3. PON1 gen polimorfizmi

PON1 geninin kodlama bölgesi iki polimorfik bölge içerir (Şekil 1). Pozisyon 55'de lösin (L) ve metionin (M) (55 L>M) transizyonu ve pozisyon 192'de glutamin (Q) ve arginin (R) (192 Q>R) transizyonu (28). Her iki polimorfizm çeşitli patofizyolojik durumlarla ilgilidir. Üzerinde en çok çalışılan polimorfizmler bunlardır. Çünkü bu iki alloenzimin çeşitli substratlara karşı affiniteleri ve katalitik aktiviteleri farklılık göstermektedir. Paraokson, PON1 192R tarafından altı kat daha hızlı hidroliz edilir. PON1 192Q ise sarin, somon ve diazoksonu daha hızlı hidroliz etmektedir. Fenilasetat ve dihidrokumarinde ise farklılık görülmez. Tek bir aminoasitteki değişimin enzim aktivitesini bu kadar fazla etkilemesi enzimin yapısına bağlanmıştır. 192. pozisyonadaki arginin aktif bölgenin önemli bir yerindedir. Bu polimorfizm aynı zamanda LDL'yi oksidasyondan koruma özelliğini de etkiler. PON1 192Q alloenzimi daha koruyucudur (1, 36, 37).

M/L55 polimorfizmi substratla ilişkiyi değiştirmez. Enzimin düşük serum aktivitesi ve konsantrasyonuyla ilişkilidir. M aleli taşıyanlarda düşük PON1 messenger RNA (mRNA) seviyeleri bulunmuştur. L aleli taşıyanlar, daha stabildir, proteolize daha dayanıklıdır ve yüksek serum aktivitesine sahiptir (1).



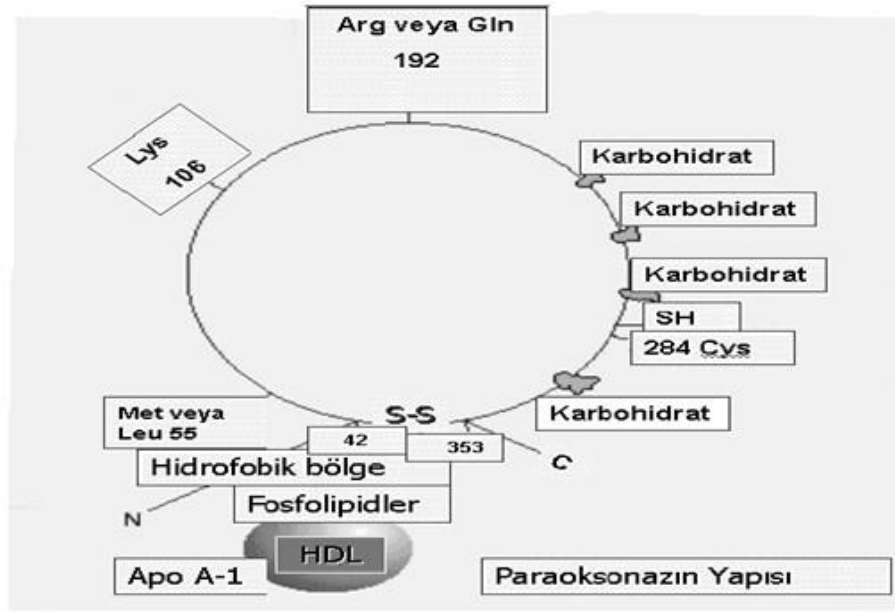
Şekil 1. PON1 geninin polimorfik bölgeleri (1)

2.7.4. PON1

2.7.4.1. PON1'in yapısı

İnsan serumundan saflaştırılan PON1, minimum 43000 dalton ağırlığında, 354 aminoasitten oluşan bir glikoproteindir. Dört farklı konumda proteine bağlı olarak bulunan karbonhidrat üniteleri ağırlığının %15,8'ini oluşturur (1) (Şekil 2) (Şekil 3).

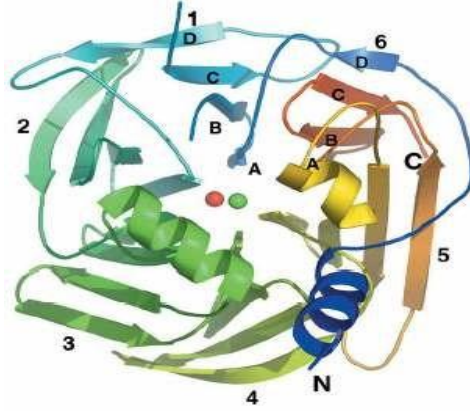
PON1'in amino asit bileşimi incelendiğinde, lösin içeriğinin yüksek olmasına karşılık, "kringle" yapısına sahip olacak kadar sistein içermediği görülür. Bununla beraber, 42, 284 ve 353. konumlarda yer alan sistein artıkları, PON1'in yapısal ve fonksiyonel özelliklerine katkıda bulunmaktadır. Protein yapısında bulunan tek disülfid bağı, polipeptid zincirinin siklik yapıda olmasına neden olmaktadır (1) (Şekil 2).



Şekil 2. İnsan serum Paraoksonaz enziminin yapısı (1)

Karaciğer’de sentezlenen ve dolaşıma verilen PON1’in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir. PON1’in HDL lipidlerine bağlanmasında hidrofobik N-terminal bölgesinin yanı sıra Apolipoprotein A1 (Apo A1) ve Apo J (klusterin) proteinlerinin de rol aldığı düşünülmektedir (1).

PON1, 6 yapraklı beta tabakası bir yapı içerir (1). Her bir yaprak 4 beta tabakası içerir ve enzimin merkez kısmında yapı ve katalitik aktivitesinin korunması için gerekli olan iki kalsiyum atomu vardır. Bunlardan yapısal kalsiyumun yapıdan uzaklaştırılması irreversibl denatürasyona neden olmaktadır. Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. Bu kalsiyum iyonu bir su molekülü ile fosfat iyonunun oksijeni ile etkileşmektedir (1).

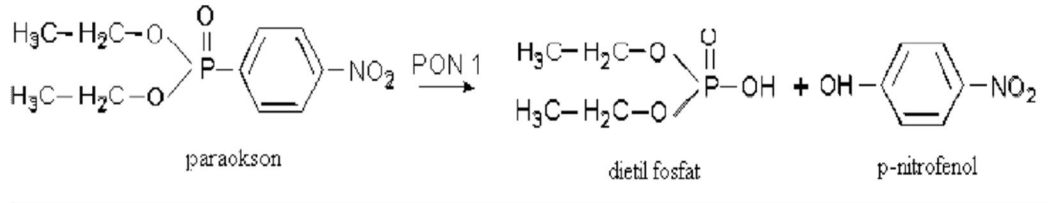


Şekil 3. PON1'in üç boyutlu yapısı (38)

2.7.4.2. PON1'in substratları

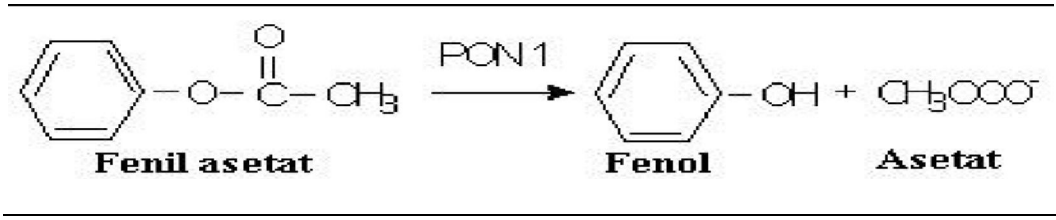
PON1 tarafından hidrolize edilen bileşikler olan organofosfatlar (paraokson ve diazokson), sinir gazı ajanları (somon ve sarin) ve aromatik esterlerin (fenilasetat) PON1'in non-fizyolojik substratları olduğu bildirilmiştir (1).

Paroksonazın hem aril esteraz aktivitesini hem de paroksonaz aktivitesini ölçmede en sık kullanılan substrat Parokson (O, O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)'dur (1) (Şekil 4).



Şekil 4. Paraoksonazın Paraoksonu hidrolizi

Fenil asetat ise sadece arilesteraz aktivitesini ölçmede kullanılan bir substrattır. PON1 polimorfik dağılımı nedeniyle aynı substrata karşı farklı aktivite gösterir (1) (Şekil 5).



Şekil 5. Paraoksonazın Fenil Asetatı hidrolizi

PON1' in lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde bulunan O ve P arasındaki ester bağınyı hidroliz ettiğı gösterilmiştir. Okside olmuş lipoproteinler ve kolesterol esterlerinin HDL bağımlı PON1 için fizyolojik substrat olduğı düşünülmektedir. İnsan arteriyel duvar hücre kültürlerinde yapılan bir çalışmada PON1'in okside 1-palmitil-2-araşidonoil-sn-glisero-3-fosforilkolin üzerindeki fosfolipid türlerini hidroliz ettiğı, böylece HDL'nin LDL'yi oksidasyondan koruyucu etkisinin paraokson hidroliz kapasitesinden bağımsız olduğı görülmüştür (1).

2.7.4.3. PON1'in fizyolojik fonksiyonu

Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkisi: Ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunu sağlayan oksidasyon, redüksiyon, hidroliz ve konjugasyon gibi reaksiyonların sıklıkla böbreklerde ve özellikle proksimal tübüllerde gerçekleştiğı bilinmektedir. İmmunohistokimyasal olarak, glomerüler yumak ve proksimal tübüllerin epitel hücrelerinde lokalize olduğı gösterilen PON1'in, ksenobiyotiklerin detoksifikasyonuna fonksiyonel katkısının olabileceğı düşünülmektedir. Renal epitel hücrelerinde anyon transport sistemleri ve PON1'in benzer intrasellüler dağılıma sahip olması; ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda ve toksik etkilerine karşı organizmanın korunmasında PON1'in önemli rol oynayabileceğı görüşünü desteklemektedir (39).

Organofosfatlara Karşı Koruma (Hidrolitik Aktivite): PON1'in en iyi bilinen fonksiyonu, hidroliz yoluyla organofosfat türevi sinir gazlarını ve insektisitleri zararsız hale getirmesidir. İnsektisit olarak yaygın olarak kullanılan paratyon ve klorpiroposokson gibi organofosfat bileşikleri ile somon ve sarin gibi sinir gazları, PON1'in başlıca substratlarındandır. Ancak, memelilerde bulunan PON1'in bu substratlara karşı afinitesi düşük olduğundan, tarımsal alanda çalışanlarda organofosfat zehirlenmelerine sık rastlanır. Bununla beraber, kronik olarak düşük dozda organofosfat türevlerine maruz kalanlarda, PON1'in daha etkili olduğu bildirilmektedir. Organofosfatlara karşı koruma, PON1'in sadece kan veya doku düzeylerine değil; izoenzimlerine de bağlıdır. PON1'in, organofosfatları ve diğer organik esterleri hidroliz edebilme kapasitesi, kişiler arasında geniş varyasyon gösterir. R tipi, Q tipine göre paraoksonun hidrolizinde daha etkili olmasına rağmen; organofosfatların çoğu, Q izoenzimi ile daha iyi hidroliz edilirler. Organofosfatlar, PON1'in yanı sıra, sinapslarda ve nöromusküler kavşaklarda bulunan psödokolinesteraz ve asetilkolinesteraz gibi esterazların da substratlarıdır. Organofosfatlar bu enzimleri irreversibl olarak inhibe ettiklerinden; PON1 dolaşımdaki organofosfatları hidroliz etmek suretiyle, sinir sistemini koruyan bir ajan olarak da görev yapmaktadır (39).

Bakteriyal Endotoksinlerden Kaynaklanan Toksisiteye Karşı Koruma: Son yıllarda, HDL kompleksinin gram negatif enfeksiyonlar sırasında gelişen endotoksemiye karşı savunmada rol oynadığı; bakteriyal lipoprotein polisakkarid ile makrofaj spesifik protein CD14 arasındaki etkileşimin, HDL tarafından henüz bilinmeyen bir mekanizmayla önlendiği düşünülmektedir. Böylece, TNF- α , IL-1 ve IL-6 gibi sitokinlerin salınımı engellenmektedir.

PON1'in sitokinlerin salınımının önlenmesinde rol oynayabileceği düşünülmektedir (39).

LDL ve HDL Oksidasyonunun Önlenmesi: Oksidatif stres altında lipid peroksidasyonu sadece LDL'de değil; HDL'deki lipidlerde de meydana gelmektedir. PON1'in hem LDL'yi hem de HDL'yi oksidasyondan koruduğu bildirilmiştir. HDL'nin oksidatif modifikasyonu; ters yönde kolesterol taşıma fonksiyonunda bozulmalara yol açar. Paraoksonaz, HDL'yi oksidasyondan koruyarak ters kolesterol taşıma fonksiyonunun devamını sağlar. Bu durum makrofajlarda kolesterol birikimini engelleyerek köpük hücre oluşumunu ve ateroskleroz gelişimini yavaşlatmaktadır (1). PON1'in HDL vasıtasıyla antioksidan etkiye katkıda bulunduğu ve HDL'nin inhibitör etkisinde, metal iyon şelasyonu ve/veya peroksidaz benzeri aktivite ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. HDL-PON1, uzun zincirli okside fosfolipidleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. HDL'nin LDL oksidasyonu üzerine koruyucu etkisinin öncelikle PON'dan kaynaklandığı düşünülmektedir. PON1'in, Cu^{+2} 'nin indüklediği lipoprotein oksidasyonunu in vitro olarak inhibe ettiği ve nonkompetitif PON1 inhibitörlerinin serbest radikal oluşumunu ve Cu^{+2} 'nin indüklediği HDL oksidasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, PON1'in makrofajlardan kolesterol çıkışını artırdığı da bildirilmiştir (39).

2.7.4.4. PON1'in sentezi

PON1 karaciğer tarafından üretilip kana verildiğinden serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Kanda HDL ile birlikte bulunur (38).

Serumdaki PON seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında değişkenlik göstermektedir. Bunun nedeni enzim aktivitesini ve peptit konsantrasyonunu

etkileyen PON1 geninin kodlanma ve promoter bölgesinde çok sayıda polimorfizm göstermesidir. PON1'in serumdaki aktivitesini ve konsantrasyonunu belirleyen promoter aktivitesi üzerinde en önemli polimorfizm -107 pozisyonundadır. PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. Ayrıca herhangi bir hastalık durumunda PON1'in karaciğerden sentezi etkilenmektedir. Enzim aktivitesinin ve konsantrasyonunun PON1 geninin polimorfizmiyle birlikte diyet, yaşam biçimi ve çeşitli hastalıklardan etkilendiği gösterilmiştir (38).

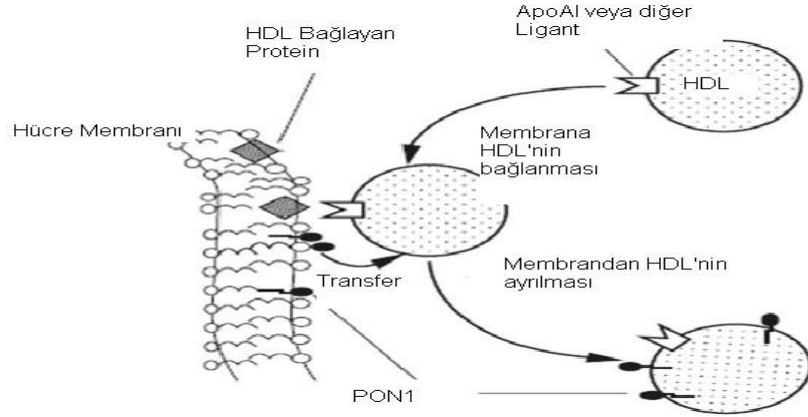
2.7.4.5. PON1'in hücrelerden salınımı

Çeşitli faktörler PON1 sekresyonunun mekanizmasını değiştirerek serum düzeyinin belirlenmesini sağlar. Lipoproteinlerin yokluğunda az miktarda PON1 sekrete edilir. Fosfolipid miçeller ve HDL hücrelerden sekrete edilen PON1'i stimüle ederken, LDL ve Apo A1 etki göstermez (1).

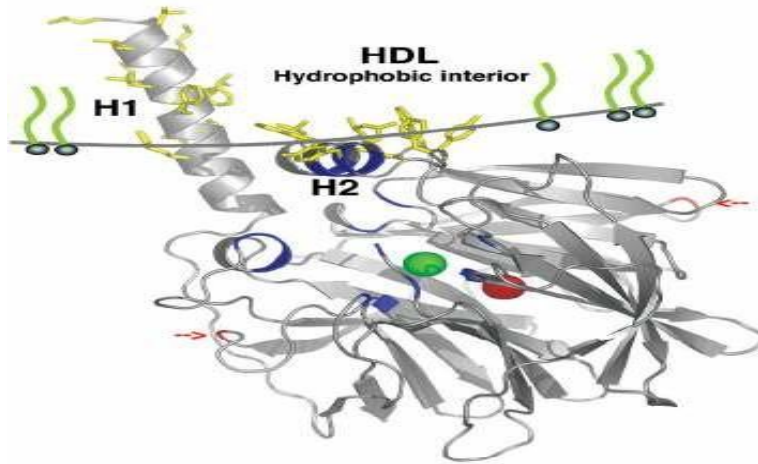
PON1 HDL ile fosfolipidlerden ayrılabilir. Membrana bağlı PON1 fenilasetata etki gösterir. HDL'nin belirmesiyle bu etki ortadan kaybolur. Bu da HDL'nin PON1'i hücre membranından ayırabildiğini gösterir. HDL ile indüklenmiş PON1 sekresyonu konsantrasyona ve reseptöre bağımlıdır. HDL en uygun alıcı olmasına rağmen fosfolipid kompleksin tek başına hücrelerden PON1 salınımını uyarma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir (1).

Hücre membranının dış yüzünde bulunan PON1'in, HDL yaklaşıncı lipoproteinler vasıtasıyla HDL'ye geçtiği belirtilmiştir. HDL için bir reseptör olarak daha önceden tanımlanan scavenger reseptör B1 (SR-B1)'in HDL ile PON1 ilişkisini sağladığı hipotezi ortaya atılmıştır. SR-B1 HDL'nin hücre membranına bağlanmasını ve hücre ile lipoproteinler arasında materyal değişimini sağlar. SR-B1, yüksek afinite ile HDL'ye bağlanır ama bağı gevşektir ve

fosfolipid komplekse bağlanma kapasitesi vardır. Sonunda PON1'in karaciğerden bol miktarda salındığı belirtilmiştir (1) (Şekil 6) (Şekil 7).



Şekil 6. Hücre membranında bulunan PON1'in HDL'ye transferi



Şekil 7. PON1'in HDL'ye bağlanması (38)

2.7.4.6. PON1 ve HDL

PON1 gen polimorfizmi varyasyonunun %25'ini oluşturur. %75 ise diğer faktörler tarafından sağlanır. HDL, PON1 için serum vektörüdür. Serum konsantrasyonunun önemli bir göstergesidir. HDL eksikliği olan durumlarda PON1 konsantrasyonu da düşmektedir. PON1 trigliseridden zengin HDL partiküllerinde gösterilmiştir. PON1'in büyük kısmı Apo A1 içeren HDL ile birliktedir. Aynı zamanda, HDL'nin Apo J ve clusterin ile ilişkili PON1 içeren bir

alt grubu daha vardır. PON1'in büyük ebattaki HDL'ye bağlanma eğilimi diyabet gibi HDL'nin azaldığı hastalıklardaki değişimini açıklayabilir (40).

2.8. PON1 ve Oksidatif Stres

PON1'in, LDL'nin hücre kaynaklı oksidasyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. PON1'in bunu nasıl yaptığının mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen çalışmalarda PON1'in antioksidan kapasitesinde 284. pozisyondaki serbest sisteinin rol oynadığı bildirilmiştir (1).

HDL bağımlı PON1'in yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da engellediği gösterilmiştir. Bu etki PON1'in lipoprotein aracılı peroksitleri hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır. PON1 lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde bulunan O ve P arasındaki ester bağınyı hidroliz edebildiği gösterilmiştir (1).

Paraoksonazın fosfotidilkolinleri hidroliz etme kapasitesi, okside LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu bildirilmiştir (41).

LDL üzerine PON1'in antioksidan etkisinin endotel hücrelerine monosit adezyonunu ve okside fosfolipidlere bağlanan makrofaj kemotaksisini azalttığı bildirilmiştir (1).

2.9. PON1 ve Diyabet

Tip 1 ve Tip 2 diyabette PON1 aktivitesinin azaldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir. Bu azalmanın diyabetik hastalarda oksidatif stresin artması sonucu antioksidan kapasitenin azalmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. Aktivite üzerindeki etki muhtemelen genotipten bağımsızdır. Bununla birlikte PON1 55L'nin diyabetik retinopati ile ilişkili olduğu belirlenmiştir ve PON1 192R daha çok kardiyovasküler hastalığı olan diyabetiklerle ilişkilidir. L55M polimorfizmi

ise azalmış glikoz toleransı, pankreas hücre harabiyeti ve artmış insülin rezistansı ile ilişkili olarak bulunmuştur (1).

Diyabetiklerde PON1'in azalma mekanizması tam bilinmemektedir. Fakat artmış glikoz konsantrasyonu ile ilişkili olabileceği düşünülebilir. Glikasyon hem PON'u inaktive eder hem de HDL üzerindeki lipid peroksidasyonunu artırır. Glike HDL oksidasyona da dirençsiz hale gelir. Yüksek glikoz seviyesi olan sağlıklılarda da PON1 aktivitesinin azaldığı gösterilmiştir (40).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta ve kontrol grupları

Dicle Üniversitesi Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Endokrinoloji polikliniğine başvurmuş ve diyabet tanısı almış, yaş aralığı 3-15 yaş olan 75 hasta (1. grup) ve diyabeti olmayan, koroner arter hastalığı olmayan, metabolik sendrom kriterleri bulunmayan, karaciğer, böbrek ve tiroid hastalığı olmayan yaş aralığı 3-15 yaş olan 54 sağlıklı kişiden oluşan kontrol grubu (2. grup) alındı. Her iki gruptakilerden kan örnekleri alındı.

3.1.2. Kan örnekleri

Çalışma grubuna dahil edilen hastalardan 12 saat açlık sonrası etilendiamintetraasetik asit (EDTA)'li tüplere alınan en az 2 ml kan örnekleri DNA ekstraksiyonu yapılncaya kadar -20 °C'de tutuldu. Hemoliz olan serum örnekleri çalışmaya dahil edilmedi. HDL, LDL, total kolesterol ve glikoz düzeyleri için ise 12 saat açlık sonrası antikoagulan jelli biyokimya tüplerine alınan kan örnekleri santrifüj edildikten sonra çalışıldı.

3.1.3. Kullanılan solusyonlar ve tamponlar

1. Lysis Buffer (Reaktif A) pH 8.0

- 10 mM TRİS hidroklorür (TRİS-HCL)
- 320 mM Sucrose
- 5 mM magnezyum klorür (MgCl₂)

Otoklav edilir ve % 1 Triton-X100 eklenir.

2. Reaktif B pH 8.0

- 400 mM TRİS-HCL
- 60 mM EDTA

- 150 mM NaCl

Otoklav edilir ve %1 sodyum dodesil sulfat eklenir.

3. Sodyum Perklorate

5 M Sodium Perklorate

4. Taq DNA polimeraz Tamponu (10X)

- 100 mM Tris-HCl
- 10 mM MgCl₂
- 500 mM potasyum klorür (KCl₂)
- % 1 Triton X-100

5. dNTP karışımı (pH 7.4)

- 2 mM dATP
- 2 mM dTTP
- 2 mM dCTP
- 2 mM dGTP

6. 10 X TAE Elektroforez Tamponu

- 0,4 M Tris-acetate pH 7.8
- 10 mM Sodium EDTA pH 8.0

7. 10 X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) Elektroforez Tamponu

- 90 mM Tris-borate
- 10mM Sodium-EDTA pH 8.3

8. 10 X Agaroz Jel Elektroforezi Yükleme Karışımı

- %10 Glycerol
- %2,5 (w/v) Ficoll (type 400)
- 1mM EDTA
- %0,25 Bromophenol Blue

3.1.4. X TBE tamponu hazırlanışı

Yatay elektroforez cihazının tankı ve agaroz jel için kullanılan 10 X TBE tamponundan 1 X TBE tamponu ara stoğu hazırlandı. 1X TBE tamponu hazırlamak için; 10 X TBE tamponundan 100 ml alınıp 1000 ml distile suya tamamlandı.

3.1.5. Agaroz jel hazırlanışı

%1'lik agaroz jel hazırlamak için 1 gram agaroz hassas terazide tartılıp, mezürde ölçülen 100 ml 1 X TBE tamponuyla beher içinde karıştırılarak mikrodalgada ısıtıldı. Kaynamaya başladıktan ve homojen bir karışım elde edildikten sonra, beher mikrodalgadan çıkarılmış, ortalama 60°C'ye gelen karışıma 0,1 µg/µL Etidium bromür (EtBr) (%0.005 final konsantrasyonu olacak şekilde) karıştırılarak yatay elektroforez tankına yerleştirilecek iki yanı kapalı 10 cm - 15 cm ebatlarındaki kasete döküldü. %3'lük agaroz jel hazırlamak için 3 gram agaroz 100 ml 1 X TBE tamponu eklenip karıştırılarak mikrodalgada ısıtıldı. Kaynadıktan sonra ortalama 60°C'ye gelen karışıma EtBr ilave edilip karıştırılan jel, yatay elektroforez tankının kasetine döküldü.

3.2. Metod

3.2.1. Periferik kandan DNA izolasyon yöntemi

Sodium EDTA'lı tüplere 5-10 ml kan alındı. Santrifüj 4°C için ön soğutmaya hazırlandı. 5-10 ml kan 50 ml'lik polypropylene santrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerine 40 ml lysis buffer eklendi (Reaktif A). Elle hafifçe iki dakikalık bir süre için karıştırıldı. 4°C de 10 dakika süre ile 3000 rpm de santrifüj edildi. Hücrelere zarar vermeksizin süpernatant hipo suyuna döküldü.

Tüplere 2 ml Reaktif B eklendi ve hafifçe karıştırarak hücre çöktülerin çözümleri sağlandı. Bu süspansiyon daha sonra 15 ml'lik kapaklı polypropylene tüplerine aktarıldı.

Her bir tüpe 5M'lık Sodium Perklorat'tan 500µl eklendi ve tüpler kan döndürme (rotary mix) cihazına kondu, oda ısısında 15 dakika süre ile karışması sağlandı. Tüpler 30 dakika 65°C'lik sıcak blokta inkübe edildi.

Her bir tüpe daha önceden -20°C'de bırakılan kloroform'dan 2 ml eklendi. 10 dakikalık süre için oda sıcaklığında rotary mix'e kondu. 10 dakika 1400X g de santrifüj edildi.

DNA içeren faz (üstteki berrak tabaka) plastik pastör pipetleri kullanılarak 15 ml'lik yeni bir santrifüj tüpüne aktarıldı. DNA içeren volümün 2 katı kadar soğuk etanol (daha önceden 4°C'de bırakılmış) ilave edildi. Hafifçe karıştırarak DNA'nın presipite olması sağlandı. Plastik öze ile presipite olan DNA alındı ve 3-5 dakika dışarda bekletilerek kuruması sağlandı. Daha sonra 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine 200µl bidistile su buffer kondu. Üzerinde DNA'nın kuruması sağlanan plastik öze kesildi ve içinde TE buffer bulunan tüpe kondu.

3.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile örneklerin çoğalması

Eksonların PCR ile çoğaltılması için 50 µl'lik hacimde PCR karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 38,8 µl H₂O, 0.5 ünite Taq Polimerase enzimi, Taq Polimeraz enziminin çalışması için gereksinim duyduğu 10X reaksiyon çözeltisi (50 mM KCL, 100 mM Tris-HCl Ph 9.0 25°C de) triton X-100, 1.5-2.5 mM MgCl₂, 2mM dNTP's, 200 ng primer ile karışım elde edildi. Kişilere ait hedef DNA 100-150 ng olacak şekilde PCR karışımına eklendi. Buharlaştırmanın engellenmesi için karışımın üzerine 30µl mineral yağ damlatılarak örneklerin Techne PHC3 (USA) thermal cyclerda amplifikasyon işlemleri gerçekleştirildi.

3.2.2.1. PON1 Leu55Met (L55M) polimorfizmi PCR aşaması

PON1 L55M polimorfizmi için; 5 µl genomik DNA (100 ng), her bir primerden (F ve R) 1 µl (10 pmol/µl) (5' GAA GAG TGA TGT ATA GCC CCA G 3' ve reverse 5' TTT AAT CCA GAG CTA ATG AAA GCC 3') (0,2 µM), 5 µl Taq Buffer (10 X), 3 µl MgCl₂ (25 mM), 4 µl dNTP (2.5 mM), ve 0.5 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5 u/µl) PCR grade suyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak PCR gerçekleştirildi. PON1 L55M polimorfizminin, uygun primerlerle yapılan PCR'nın thermocycler programı; 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 45 saniye hibridizasyon, 72 °C'de 1 dakika uzama (30 döngü) ve son olarak 72 °C'de 5 dakika final uzaması şeklinde referans alınan kaynaktan yeniden düzenleme ile optimize edildi (42). 10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme tamponu karışımı, %1'lik jele yüklenerek 90 V'da 45 dk. kadar yürütülüp, 170 baz çifti (bc) uzunluğundaki bantların varlığı kontrol edildi.

3.2.2.2. PON1 Gln192Arg (Q192R) polimorfizmi PCR aşaması

PON1 Q192R polimorfizmi için; 7,5 µl genomik DNA (150 ng), her bir primerden (F ve R) 1,5 µl (10 pmol/µl) (PON 192 polimorfizmi için forward 5'TAT TGTTGCTGTGGGACCTGA G 3' ve rewerse 5' CAC GCT AAA CCC AAA TAC ATC TC 3') (0.3 µM), 5 µl Taq Buffer (10 X), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 5 µl dNTP (2.5 mM), ve 1 µl Taq DNA Polimeraz enzimi (5u/µl) PCR grade suyla toplam hacim 50 µl olacak şekilde tamamlanarak PCR gerçekleştirildi. PON1 Q192R polimorfizminin, uygun primerlerle yapılan PCR'nın thermocycler programı; 96°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben 95°C'de 1 dakika denatürasyon, 58 °C'de 1 dakika hibridizasyon, 72 °C'de 2 dakika uzama (35 döngü) ve son olarak 72 °C'de 10 dakika final uzaması şeklinde referans

alınan kaynaktan yeniden düzenleme ile optimize edildi (43). Bant varlığına bakılmak üzere, 10 µl PCR ürünü ile 2 µl yükleme tamponu karışımı, %1'lik jelle yüklenerek 90 V'da 45 dk. kadar yürütülüp, 99 bç uzunluğundaki bantların varlığı kontrol edildi.

3.2.3. PCR ürünlerinin restriksiyon enzimleri ile kesimi

PCR ürünleri, spesifik restriksiyon enzimleri ile kesilerek ilgili polimorfizmin varlığı saptanmıştır.

3.2.3.1. PON1 L55M polimorfizm bölgesi enzim kesimi

15 µl'lik PCR ürünü, 0,5 µl (5 ünite) Nla III restriksiyon enzimi (10 u/µl) ve 2 µl 10X NE Buffer 4 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde PCR grade su ilave edilerek; 37 °C'de 8 saat 65°C'de 20 dakika (1 döngü) olmak üzere kesildi. 25 µl'lik enzim kesim ürünü ile 5 µl 6X yükleme tamponu karışımı, % 3'lük agaroz jelde 100 bp moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile 90 V'da bir saat yürütülüp, ultraviyole (UV) altında görüntülenmiştir. Kesim ürünleri, MM polimorfizminde 126- ve 44- bç, ML polimorfizminde 170-, 126-, 44- bç'lik fragmanlar vermiştir. Yaban tip allele (LL) sahip bireylerin PCR ürünleri kesilmemiştir (42).

3.2.3.2. PON1 Q192R Polimorfizm Bölgesi Enzim Kesimi

15 µl'lik PCR ürünü, 1 µl (5 ünite) Alw I restriksiyon enzimi (5 u/µl) ve 2 µl 10X NE Buffer 4 ile son hacim 25 µl'ye tamamlanacak şekilde PCR grade su ilave edilerek; 37 °C'de 10 saat 65°C'de 20 dakika (1 döngü) olmak üzere kesildi. 25 µl'lik enzim kesim ürünü ile 5 µl yükleme tamponu karışımı, % 3'lük agaroz jelde 100 bp DNA moleküler ağırlık belirteci (Fermentas) ile 90 V'da bir saat yürütüldü, UV altında görüntülendi. Kesim ürünleri RR alleli 66- ve 33- bç, QR

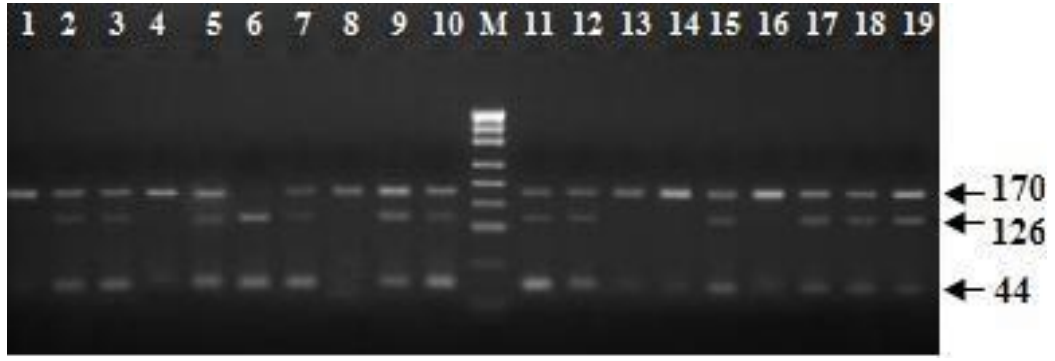
alleli 66-, 33- ve 99- bç fragmanlar vermiştir. QQ (yaban tip) alleli kesilmemiştir (43).

3.2.3.3. Enzim kesimi ürünleri

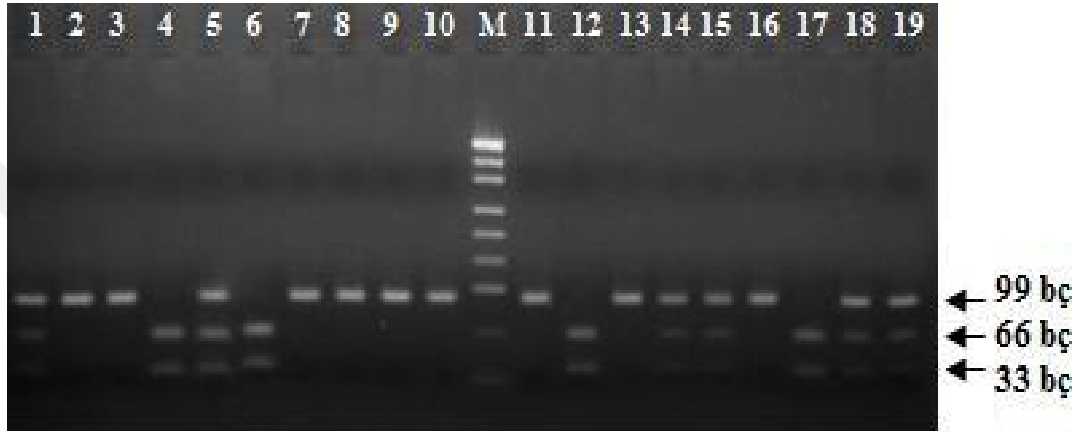
Çalışılan polimorfizmlere ait enzim kesim sonuçları Şekil 8 ve Şekil 9'da gösterilmiştir.

3.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PCR sonrası spesifik amplifikasyonun ve PCR artefaktlarının olup olmadığının kontrol edilmesi için agaroz jel kullanıldı. Amplifikasyonun incelenmesi için % 1'lik agaroz jeli hazırlandı ve örnekler agaroz jel işlemine tabii tutuldu. 1 gram agaroz tartılıp, beher içinde 1X TBE tampon ile 100 ml'ye tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ısıtıcıda kaynatıldı. Yaklaşık 50-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra üzerine konsantrasyonu 1 mg/μl olacak şekilde etidyum bromid eklenip karıştırıldı. Jel soğuduktan sonra jel tabağına döküldü. Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlendi. Tankın benç üzerindeki dengesi ayarlandı. Jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerine 1 XTBE elektroforez tamponu döküldü. 8μl PCR ürünü 2μl yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Ayrıca her jelin bir kuyucuğuna 100 bç'lik size marker yüklendi. Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek örnekler 30-45 dakika 80-100 V'ta yürütüldü. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel ultraviyole transilluminatör altında incelenerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildikten sonra jelin fotoğrafı çekildi.



Şekil 8. PON1 L55M için PCR-RFLP enzim kesim sonuçları



Şekil 9. PON1 Q192R için PCR-RFLP enzim kesim sonuçları

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen kategorik veriler yüzde ve frekans olarak, numerik veriler aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edildi. İstatistiksel analizler SPSS 16.0 (Chicago ILL USA) kullanılarak yapıldı. Genotip dağılımı için Hardy-Weinberg eşitliği Chi-kare testi ile belirlendi. Kategorik verilerin analizinde Chi-kare testi, numerik verilerin analizinde t-testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

3.2.6. Aydınlatılmış Onam Formu

Çalışma grubuna alınan çocukların ailelerine sözlü ve yazılı olarak çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verildi ve araştırmayı kabul eden ailelerden bilgilendirilmiş aile gönüllü olur formu imzalatılarak izin alındı.

3.2.7. Etik Kurul

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu tarafından değerlendirilerek onaylandı.



4. BULGULAR

Diyabetes Mellitus'lu hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait yaşların ortalamaları ve standart sapma değerleri Tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Kontrol ve hasta gruplarının yaşa göre dağılımı

	Kontrol (n=54)	Hasta (n=75)	p
Yaş	9,0±3,2 yıl	10,0±3,4 yıl	0,08

Hasta grubunun yaş ortalaması 10,0±3,4 yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması ise 9,0±3,2 yıl idi. Hasta ve kontrol grupları arasında yaş ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubuna ait cinsiyetlerin yüzde olarak değerleri Tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Kontrol ve hasta gruplarının cinsiyete göre dağılımı

	Kontrol (n=54) n (%)	Hasta (n=75) n (%)	p	X ²
Cinsiyet				
Kız	28 (51,9)	35 (46,7)	0,561	0,338
Erkek	26 (48,1)	40 (53,3)		

Hasta grubu 35'i (%46,7) kız, 40'ı (%53,3) erkek olmak üzere toplam 75 hastadan; kontrol grubu ise 28'i (%51,9) kız, 26'sı (%48,1) erkek olmak üzere toplam 54 sağlıklı bireyden oluşmaktadır. İki grup arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$, $X^2=0,338$).

Hasta ve kontrol grubunda yapılan çalışmada saptanan PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmlerine ait genotip ve allel frekansları Tablo 9 ve Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 9. PON1 55 polimorfizmi genotip ve allel frekansı

PON1 55 Genotipi	Kontrol (n=54) n (%)	Hasta (n=75) n (%)	p	X ²
LL	21 (38,9)	25 (33,3)	0,516	0,422
LM	25 (46,3)	39 (52,0)	0,523	0,409
MM	8 (14,8)	11 (14,7)	0,981	0,001
Alleles				
L	67 (62,0)	89 (59,3)	0,661	0,192
M	41 (38,0)	61 (40,7)	0,661	0,192

LL: Homozigot normal, LM: Heterozigot, MM: Homozigot mutant

Çalışmada kontrol grubu olarak alınan toplam 54 sağlıklı bireyden 21'i (%38,9) PON1 55 genotipi açısından homozigot normal (LL) iken, hasta grubu olarak alınan toplam 75 hastadan 25'i (%33,3) homozigot normaldi. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,422$). Kontrol grubundan 25 (%46,3) birey, hasta grubundan ise 39 (%52,0) birey heterozigot (LM) olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=0,409$). Kontrol grubunun sekizi (%14,8), hasta grubunun ise 11'i (%14,7) homozigot mutant (MM) olarak bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,001$).

Allel frekansları açısından bakıldığında kontrol grubundaki 54 bireyde bulunan L alleli sayısı 67 (%62,0) iken, hasta grubunda bu sayı 89 (%59,3) idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,192$). Kontrol grubunda M alleli sayısı 41 (%38,0), hasta grubunda M alleli sayısı ise 61 (%40,7) idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,192$).

Tablo 10. PON1 192 polimorfizmi genotip ve allel frekansı

PON1 192 Genotipi	Kontrol (n=54) n (%)	Hasta (n=75) n (%)	p	X ²
QQ	26 (48,0)	33 (44,0)	0,641	0,218
QR	20 (37,0)	36 (48,0)	0,215	1,536
RR	8 (14,8)	6 (8,0)	0,220	1,507
Alleles				
Q	72 (66,7)	102 (69,0)	0,822	0,051
R	36 (33,3)	48 (32,0)	0,822	0,051

QQ: Homozigot normal, QR: Heterozigot, RR: Homozigot mutant

Çalışmada kontrol grubu olarak alınan toplam 54 sağlıklı bireyden 26'sı (%48,0) PON1 192 genotipi açısından homozigot normal (QQ) iken hasta grubu olarak alınan toplam 75 hastadan 33'ü (%44,0) homozigot normaldi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,218$). Kontrol grubundan 20 (%37,0) birey, hasta grubundan ise 36 (%48,0) birey heterozigot (QR) olarak saptandı. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=1,536$). Kontrol grubunun sekizi (%14,8), hasta grubunun ise altısı (%8,0) homozigot mutant (RR) olarak bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=1,507$).

Allel frekansları açısından bakıldığında kontrol grubundaki 54 bireyde bulunan Q alleli sayısı 72 (%66,7) iken, hasta grubunda bu sayı 102 (%69,0) idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,051$). Kontrol grubunda R alleli sayısı 36 (%33,3), hasta grubunda R alleli sayısı ise 48 (%32,0) idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$, $X^2=0,051$).

Hasta ve kontrol gruplarında saptanan glikoz, HDL, LDL ve total kolesterol düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Kontrol ve hasta gruplarının glikoz, HDL, LDL ve total kolesterol düzeyleri

	Kontrol (n=54)	Hasta (n=75)	p
Glikoz	82,9±13,9	232,5±147,2	<0,05
Kolesterol	129,2±40,7	166,6±31,8	<0,05
HDL	39,21±13,3	49,6±13,7	<0,05
LDL	72,2±29,6	92,9±24,4	<0,05
HbA1c	-	9,4±2,9	

Glikoz, kolesterol, HDL ve LDL düzeyleri 'mg/dl' olarak ölçülür.

Kontrol grubuna alınan 54 bireyde bakılan glikoz değeri ortalaması 82,9±13,9, hasta grubuna katılan toplam 75 hastada bakılan glikoz değeri ortalaması ise 232,5±147,2 idi. Hasta grubunun glikoz değerleri ortalaması kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek saptandı ($p<0,05$).

Hasta grubunun total kolesterol düzeyleri ortalaması ($166,6 \pm 31,89$) kontrol grubuna ($129,2 \pm 40,7$) göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Hasta grubunda ölçülen HDL düzeyleri ortalaması $49,6 \pm 13,7$; kontrol grubunda ölçülen HDL düzeyleri ortalaması ise $39,21 \pm 13,3$, idi. İstatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,05$).

Hasta grubunun LDL düzeyleri ortalaması ($92,9 \pm 24,4$), kontrol grubuna ($72,2 \pm 29,6$) göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p < 0,05$).

Çalışmamıza alınan kontrol ve hasta grupları dahil toplam 129 hastada bakılan PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile glikoz değerleri arasındaki ilişki Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 12. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile glikoz değerleri arasındaki ilişki

	Glikoz 109 ve altı (n=66) n (%)	Glikoz 110 ve üstü (n=63) n (%)	p	X ²
PON1 55			0,936	0,132
LL	24 (36,4)	22 (34,9)		
LM	33 (50,0)	31 (49,2)		
MM	9 (13,6)	10 (15,9)		
PON1 192			0,343	2,141
QQ	32 (48,5)	27 (42,9)		
QR	25 (37,9)	31 (49,2)		
RR	9 (13,6)	5 (7,9)		

Glikoz değerleri ‘mg/dl’ olarak ölçülür.

LL: Homozigot normal, LM: Heterozigot, MM: Homozigot mutant

QQ: Homozigot normal, QR: Heterozigot, RR: Homozigot mutant

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre glikoz değeri 109 ve altı saptanan 66 bireyden 24’ü (%36,4) PON1 55 genotipi olarak homozigot normal (LL), 33’ü (%50,0) heterozigot (LM), dokuzu (%13,6) homozigot mutant (MM) iken, glikoz değeri 110 ve üzeri saptanan 63 bireyin 22’si (%34,9) homozigot normal, 31’i (%49,2) heterozigot, 10’u (%15,9) homozigot mutant idi. Glikoz düzeyi 109 ve altı olan grup ile 110 ve üstü olan

grup arasında PON1 55 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=0,132$).

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre glikoz değeri 109 ve altı saptanan 66 bireyden 32'si (%48,5) PON1 192 genotipi olarak homozigot normal (QQ), 25'i (%37,9) heterozigot (QR), dokuzu (%13,6) homozigot mutant (RR) iken, glikoz değeri 110 ve üzeri saptanan 63 bireyin 27'si (%42,9) homozigot normal, 31'i (%49,2) heterozigot, beşi (%7,9) homozigot mutant idi. Glikoz düzeyi 109 ve altı olan grup ile 110 ve üstü olan grup arasında PON1 192 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=2,141$).

Çalışmaya katılan tüm bireylerde bakılan PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizimleri ile HDL düzeyleri arasındaki ilişki Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizimleri ile HDL düzeyleri arasındaki ilişki

	HDL 37 ve altı (n=35) n (%)	HDL 38 ve üstü (n=94) n (%)	p	X^2
PON1 55			0,816	0,407
LL	14 (40,0)	32 (34,0)		
LM	16 (45,7)	48 (51,1)		
MM	5 (14,3)	14 (14,9)		
PON1 192			0,674	0,790
QQ	18 (51,4)	41 (43,6)		
QR	13 (37,1)	43 (45,7)		
RR	4 (11,4)	10 (10,6)		

HDL düzeyi 'mg/dl' olarak ölçülür.

LL: Homozigot normal, LM: Heterozigot, MM: Homozigot mutant

QQ: Homozigot normal, QR: Heterozigot, RR: Homozigot mutant

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre HDL düzeyi 37 ve altı saptanan 35 bireyden 14'ü (%40,0) PON1 55 genotipi olarak homozigot normal (LL), 16'sı (%45,7) heterozigot (LM), beşi (%14,3) homozigot mutant (MM) iken, HDL düzeyi 38 ve üzeri saptanan 94 bireyin 32'si (%34,0) homozigot normal, 48'i (%51,1) heterozigot, 14'ü (%14,9) homozigot mutant idi. HDL düzeyi 37 ve altı saptanan grup ile 38 ve üstü saptanan grup arasında PON1 55

gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$, $X^2=0,407$).

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre HDL düzeyi 37 ve altı saptanan 35 bireyden 18'i (%51,4) PON1 192 genotipi olarak homozigot normal (QQ), 13'ü (%37,1) heterozigot (QR), dördü (%11,4) homozigot mutant (RR) iken, HDL düzeyi 38 ve üzeri saptanan 94 bireyin 41'i (%43,6) homozigot normal, 43'ü (%45,7) heterozigot, 10'u (%10,6) homozigot mutant idi. HDL düzeyi 37 ve altı saptanan grup ile 38 ve üstü saptanan grup arasında PON1 192 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$, $X^2=0,790$).

Çalışmamıza alınan kontrol ve hasta grupları dahil toplam 129 hastada bakılan PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile total kolesterol değerleri arasındaki ilişki Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile total kolesterol düzeyleri arasındaki ilişki

	Kolesterol 199 ve altı (n=116) n (%)	Kolesterol 200 ve üstü (n=13) n (%)	p	X^2
PON1 55			0,325	2,249
LL	43 (37,1)	3 (23,1)		
LM	55 (47,4)	9 (69,2)		
MM	18 (15,5)	1 (7,7)		
PON1 192			0,381	1,932
QQ	53 (45,7)	6 (46,2)		
QR	49 (42,2)	7 (53,8)		
RR	14 (12,1)	0 (0)		

Total kolesterol düzeyi 'mg/dl' olarak ölçülür.

LL: Homozigot normal, LM: Heterozigot, MM: Homozigot mutant

QQ: Homozigot normal, QR: Heterozigot, RR: Homozigot mutant

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre total kolesterol düzeyi 199 ve altı saptanan 116 bireyden 43'ü (%37,1) PON1 55 genotipi olarak homozigot normal (LL), 55'i (%47,4) heterozigot (LM), 18'i (%15,5) homozigot mutant (MM) iken, total kolesterol düzeyi 200 ve üzeri

saptanan 13 bireyin üçü (%23,1) homozigot normal, dokuzu (%69,2) heterozigot, biri (%7,7) homozigot mutant idi. Total kolesterol düzeyi 199 ve altı saptanan grup ile 200 ve üstü saptanan grup arasında PON1 55 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=2,249$).

Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre total kolesterol düzeyi 199 ve altı saptanan 116 bireyden 53'ü (%45,7) PON1 192 genotipi olarak homozigot normal (QQ), 49'u (%42,2) heterozigot (QR), 14'ü (%12,1) homozigot mutant (RR) iken, total kolesterol düzeyi 200 ve üzeri saptanan 13 bireyin altısı (%46,2) homozigot normal, yedisi (%53,8) heterozigot idi. Bu grupta homozigot mutant hasta saptanmadı. Total kolesterol düzeyi 199 ve altı saptanan grup ile 200 ve üstü saptanan grup arasında PON1 192 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$, $X^2=1,932$).

Sadece hasta grubunda bakılan PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile HbA1c düzeyleri arasındaki ilişki Tablo 15'de gösterilmiştir.

Tablo 15. PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile HbA1c düzeyleri arasındaki ilişki

	HbA1C %6,5 ve altı (n=14) n (%)	HbA1C %6,6 ve üstü (n=61) n (%)	p	X ²
PON1 55			0,024	7,429
LL	9 (64,3)	16 (26,2)		
LM	4 (28,6)	35 (57,4)		
MM	1 (7,1)	10 (16,4)		
PON1 192			0,120	4,243
QQ	5 (35,7)	28 (45,9)		
QR	6 (42,9)	30 (49,2)		
RR	3 (21,4)	3 (4,9)		

LL: Homozigot normal, LM: Heterozigot, MM: Homozigot mutant
QQ: Homozigot normal, QR: Heterozigot, RR: Homozigot mutant

Yalnız hasta grubunda yapılan analize göre HbA1c düzeyi %6,5 ve altı saptanan 14 hastadan dokuzu (%64,3) PON1 55 genotipi olarak homozigot normal (LL), dördü (%28,6) heterozigot (LM), biri (%7,1) homozigot mutant

(MM) iken, HbA1c düzeyi %6,6 ve üzeri saptanan 61 hastanın 16'sı (%26,2) homozigot normal, 35'i (%57,4) heterozigot, 10'u (%16,4) homozigot mutant idi. HbA1c düzeyleri farklı iki grup arasında PON1 55 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,024$, $X^2=7,429$).

Hasta grubunda yapılan çalışmaya göre HbA1c düzeyi %6,5 ve altı saptanan 14 hastadan beşi (%35,7) PON1 192 genotipi olarak homozigot normal (QQ), altısı (%42,9) heterozigot (QR), üçü (%21,4) homozigot mutant (RR) iken, HbA1c düzeyi %6,6 ve üzeri saptanan 61 hastanın 28'i (%45,9) homozigot normal, 30'u (%49,2) heterozigot, üçü (%4,9) homozigot mutant idi. HbA1c düzeyleri farklı iki grup arasında PON1 192 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,120$, $X^2=4,243$).

5. TARTIŞMA

Etiyolojisinde birden çok faktörün rol aldığı kronik bir hastalık olan Diyabetes Mellitus günümüzde en sık görülen endokrin hastalıklardan biridir ve insidansı giderek artmaktadır. Diyabete bağlı komplikasyonların nedeni kontrol edilemeyen hiperglisemidir. Diyabetes mellitus oluşan komplikasyonlara bağlı olarak mortaliteye neden olan hastalıklar arasında ilk sıralarda yer alır. Son 20 yılda DM hızla artmıştır (4).

Glikoprotein yapıda, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz olup, hem arilesteraz (E.C. 3.1.1.2) hem de paraoksonaz (E.C.3.1.8.1) aktivitesine sahip bir enzim olan paraoksonazın (28) PON1, PON2 ve PON3 şeklinde 3 tipi vardır (1). Bunlardan PON1 ilk bulunan ve üzerinde en çok çalışma yapılan tipidir. PON1'in HDL yapısında yer aldığı bilinmektedir (38). PON1 55 ve PON1 192 üzerinde en çok çalışma yapılan polimorfizmlerdir. Her iki polimorfizm çeşitli patofizyolojik durumlarla ilgilidir (1).

Çalışmamıza katılan hasta grubunun %46,7'si kız, %53,3'ü erkek; kontrol grubunun %51,9'u kız, % 48,1'i erkeklerden oluşmakta idi. Her iki grup arasında cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). El-Lebedy D ve arkadaşlarının 2014 yılında Mısır'da ki erişkin popülasyonda yaptığı çalışmada (44) ve Mohamed Abdel-Halem Helaly ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada da (45) hasta ve kontrol grupları arasında yaş ve cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Ancak bu alanda yapılan benzer makaleler sınırlı sayıda ve yine erişkin çalışmaları olup literatür bilgilerimiz sınırlı idi.

El-Lebedy D ve arkadaşlarının 2014 yılında Mısır'da 50 kişilik kontrol grubu ve 68 kişilik hasta grubunda yaptığı çalışmada PON1 55 LL, LM ve MM

genotip frekansları hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,009$) (44). Mohamed Abdel-Halem Helaly ve arkadaşlarının 2013 yılında 100 kişiden oluşan hasta grubu ve yine 100 kişiden oluşan kontrol grubunda yaptığı çalışmada ise erişkin kardiyak komplikasyonları olan diyabetik hasta grubunun PON1 55 LL genotip frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek saptanmıştır ($p=0,002$) (45). Aynı çalışmada mikrovasküler komplikasyonları olan diyabetik hasta grubunun PON1 55 LL genotip frekansı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,001$) (45). Ancak komplikasyonları olmayan diyabet hastalarıyla kontrol grubu arasında PON1 55 gen polimorfizmi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0,05$) (45). Bizim çalışmamızda ise hasta grubu ile kontrol grubu arasında PON1 55 LL, LM, MM genotip frekansı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Bu sonuçlar bize PON gen polimorfizmlerinin diyabet hastalığının kendisinden ziyade komplikasyonlarıyla daha yakından ilişkili olduğunu göstermektedir.

El-Lebedy D ve arkadaşlarının çalışmasında PON1 192 QQ, QR ve RR genotip frekansları hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,02$) (44). Mohamed Abdel-Halem Helaly ve arkadaşlarının çalışmasında ise PON1 192 polimorfizminin QQ ve QR genotipleri komplikasyonu olan diyabetli hastalarda kontrol grubuna göre daha sık saptanmıştır (45). PON1 192 QQ, QR ve RR genotip frekansları açısından komplikasyonu olmayan diyabet hastaları ile kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,3$) (45). Bizim çalışmamızda ise hasta ve kontrol grupları arasında PON1 192 QQ, QR, RR genotip frekansı

açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$). Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması bize yine PON gen polimorfizmlerinin komplikasyonlarla ilişkisinin daha kuvvetli olduğunu düşündürtmektedir. Ancak bu konuda daha sağlıklı karşılaştırmalar yapabilmek adına ocuk yaşı grubunda ki tip 1 diyabetli hastalarda çalışmaların arttırılması kanaatindeyiz.

El-Lebedy D ve arkadaşlarının çalışmasında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmlerine ait L, M, Q, R allel frekansları oranı hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur ($p=0,03$) (44). Mohamed Abdel-Halem Helaly ve arkadaşlarının çalışmasında da bu konuda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ($p=0,6$) (45), bizim çalışmamız da benzer şekilde allel frekansları açısından kontrol ve hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Mohamed Abdel-Halem Helaly ve arkadaşlarının 2013 yılında yaptığı çalışmada da (45), El-Lebedy D ve arkadaşlarının çalışmasında da (44) erişkin diyabetik hasta grubunda bakılan HDL, LDL, total kolesterol düzeylerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (45). Bizim alışmamızda da hasta grubunda bakılan glikoz, HDL, LDL, ve total kolesterol düzeyinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulundu ($p<0,05$). Bu sonuçlar Diyabetes Mellitus'un lipid profilinde olumsuz yönde değişikliğe neden olduğunu bir kez daha göstermektedir.

Çalışmamıza katılan hasta ve kontrol gruplarının tümünde glikoz düzeyleri ile paraoksonaz gen polimorfizmi arasındaki ilişki de irdelendi. Zhou H ve arkadaşlarının koroner kalp hastalığı olan 86 birey, koroner kalp hastalığına açlık hiperglisemisinin eşlik ettiği 62 birey, koroner kalp hastalığına tip 2 diyabetin eşlik ettiği 46 birey ve 90 bireyden oluşan kontrol grubu ile erişkin yaşı grubunda

yaptıkları çalışmada bu dört grup arasında PON1 55 gen polimorfizmiyle açlık kan düzeyleri ve Diyabetes Mellitus arasında anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (46). Bizim çalışmamızda da yapılan istatistiksel analize göre glikoz düzeyi 110 ve üzeri olan hastalarla 109 ve altı olan hastalar arasında hem PON1 55 gen polimorfizmi genotip frekansı açısından hem de PON1 192 gen polimorfizmi genotip frekansı açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$). Bu durumun hastanın değişken glikoz düzeylerine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Daha doğru sonuçlar elde etmek adına hasta ve kontrol gruplarının uzun dönem glikoz izlemlerinin gerekli olduğunu düşünmekteyiz.

C. Aubo ve arkadaşlarının myokardiyal enfarktüs geçirmiş 156 kişiden oluşan hasta grubu ve 310 kişiden oluşan kontrol grubu ile yaptıkları erişkin yaş grubuna ait çalışmada PON1 192 gen polimorfizmi için farklı genotip frekanslarına sahip bireyler arasında HDL kolesterol düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (47). Bizim çalışmamıza katılan bireylerin hepsinde HDL kolesterol düzeyleri ile PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri arasındaki ilişki incelendi. Bizim çalışmamızda da HDL kolesterol düzeyi 37 ve altı saptanan grupla 38 ve üzeri saptanan grup arasında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri genotip frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

C. Aubo ve arkadaşlarının çalışmasında PON1 192 gen polimorfizmi için farklı genotip frekanslarına sahip bireyler arasında total kolesterol düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (47). Bizim çalışmamızda da total kolesterol düzeyi 199 ve altında saptanan grupla 200 ve üzeri saptanan grup arasında PON1 55 ve PON1 192 genotip frekansları açısından anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Bu çalışmada irdelenen son parametre ise sadece hasta grubunda değerlendirilen paraoksonaz gen polimorfizmleri ile HbA1c düzeyleri arasındaki ilişkidir. Yapılan istatistiksel analize göre, HbA1c düzeyi %6,5 ve altı bulunan hastalarla, %6,6 ve üstü bulunan hastalar arasında PON1 55 gen polimorfizmi genotip frekansı açısından anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Bu sonuca göre HbA1c düzeyi %6,6 ve üzeri olan grupta görülen homozigot mutant (MM), heterozigot (LM) ve homozigot normal (LL) hasta sayısı, HbA1c düzeyi %6,5 ve altında saptanan gruptaki homozigot mutant, heterozigot ve homozigot normal hasta sayısından fazla bulundu. Ancak HbA1c'nin aynı değerlerinde PON1 192 geni için istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmadı ($p>0,05$). HbA1c düzeyi diyabet hastalarında uzun dönem glikoz değerlerini yansıttığından hiperglisemi ve paraoksonaz gen polimorfizmi arasında daha sağlıklı bir sonuca ulaşılmıştır. Bu da bize diyabet hastalarında uzun dönem izlemde görülen aralıklı hiperglisemilerin temelinde yatan mekanizmalardan birinin PON1 55 gen polimorfizmiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Ancak bu alanda bizim çalışmamız dışında başka çalışmalara da ihtiyaç vardır.

Mevcut literatür bilgilerimize göre çalışmamız paraoksonaz gen polimorfizmi ve Diyabetes Mellitus ilişkisi konusunda çocuk yaş grubunda yapılan ilk çalışmadır. Bu alanda ki diğer çalışmalar erişkin yaş grubuna aittir. Erişkinlerde yapılan çalışmaların çoğu da PON gen polimorfizmiyle değil PON1 aktivitesiyle ilişkilidir.

Bu veriler ışığında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri ile Diyabetes Mellitus arasında anlamlı bir ilişki saptanmamasına rağmen paraoksonaz polimorfizminin diyabetik pediatrik hastalarla ilişkisinin daha

sağlıklı sonuçlar vermesi açısından hasta ve kontrol örneklerinin artırılması kanaatindeyiz.



6. SONUÇLAR

1. Çalışmaya diyabet tanısı almış 75 hasta ve 54 kontrol vaka alındı. Diyabet tanısı alan hastaların yaş ortalaması $10,0 \pm 3,4$ yıl, kontrol grubunun yaş ortalaması ise $9,0 \pm 3,2$ yıl idi.

2. Hasta grubunun %46,7'si kız, %53,3'ü erkek; kontrol grubunun %51,9'u kız, %48,1'i erkek idi.

3. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında PON1 55 LL, LM, MM genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

4. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında PON1 192 QQ, QR, RR genotipi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$).

5. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında PON1 55 geni L, M allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

6. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında PON1 192 geni Q, R allel frekansları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

7. Hasta grubunda bakılan açlık glikoz düzeyi, total kolesterol, HDL ve LDL düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde yüksek saptandı ($p < 0,05$).

8. Glikoz değerleri 109 ve altı ile 110 ve üzeri olan iki grup arasında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

9. Hasta ve kontrol gruplarının tamamında yapılan analize göre HDL düzeyi 37 ve altı saptanan bireyler ile HDL düzeyi 38 ve üzeri saptanan bireyler arasında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$).

10. Total kolesterol düzeyi 199 ve altı ile 200 ve üzeri saptanan iki grup arasında PON1 55 ve PON1 192 gen polimorfizmleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

11. Sadece hasta grubunda yapılan analize göre HbA1c düzeyi % 6,5 ve altı saptanan 14 hastanın %64,3'ü PON1 55 genotipi olarak homozigot normal (LL), %28,6'sı heterozigot (LM), %7,1'i homozigot mutant (MM) iken, HbA1c düzeyi %6,6 ve üzeri saptanan 61 hastanın %26,2'si homozigot normal, %57,4'ü heterozigot, %16,4'ü homozigot mutant idi. Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$). Fakat aynı iki grup arasında PON1 192 gen polimorfizmi açısından anlamlı fark yoktu ($p>0,05$).

7. KAYNAKLAR

1. Öztürk H. Diyabetes Mellitus'da Paraoksonaz aktivitesi ve AOPP düzeyleri. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Bölümü, Tıbbi Biyokimya Uzmanlık Tezi. İstanbul 2008.
2. Onuker BE. Tip 1 Diyabetes Mellitus'lu hastalarda Diyabetes Mellitus başlangıç yaşının komplikasyon gelişme süresine etkisi. Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Aile Hekimliği Uzmanlık Tezi. İstanbul 2008.
3. Temel KÖ. Tip 1 Diyabetes Mellitus tanısı ile izlenmekte olan çocuklarda bilişsel işlevlerin değerlendirilmesi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. Ankara 2012.
4. Göç M. Diyabetes Mellitus'lu hastalarda hastalığın süresi, hastaların öğrenim düzeyi, diyabetik ayakla ilgili eğitim alma durumu, metabolik değerlerin, diyabetik ayak gelişim riski ve diyabetik ayaktan koruyucu davranış modelleri geliştirmeye etkileri. Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi. İstanbul 2008.
5. Satman I, Imamoğlu S, Yılmaz C, et al. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Diyabetes Mellitus ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Ankara 2013.
6. Güven T. Diyabetes Mellitus'lu hastalarda yaşam kalitesi ve depresyon etkisinin araştırılması. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Psikiyatri Kliniği, Uzmanlık Tezi. İstanbul 2007.
7. Laakso M. The epidemiology and diagnosis of type 2 diabetes. In: Goldstein BJ, Wieland DM (eds). Type 2 Diabetes. İstanbul, 2003; pp: 2-12.

8. Orhan Y. Diyabetes Mellitus. In: Sencer E (ed). Endokrinoloji, Metabolizma ve Beslenme Hastalıkları. İstanbul; Nobel, 2001, ss: 246-86.
9. Satman I, Yılmaz MT, Dinçdağ N, et al. TURDEP Çalışması. Türkiye’de diyabet prevalansı ve diyabet gelişmesine etkili faktörler. İstanbul 2002.
10. Modan M, Harris MI, Haklin H, et al. Evaluation of WHO and NDDG Criteria for impaired glucose tolerance. Results from two national samples. Diabetes 1989; 38(12): 1630-5.
11. World Health Organization. Definition and diagnosis of Diabetes Mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation. 2006.
12. Kyvik KO, Green A, Beck-niesan H, et al. Concordance rates Insulin Dependent Diabetes Mellitus: a population based study of young Danish twins. BMJ 1995; 311(7010): 913-17.
13. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of Insulin Dependent Diabetes Mellitus. N Engl J Med 1994; 331(21): 1428-36.
14. Atkinson MA, Eisenbarth GS. Type 1 Diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. Lancet 2001; 358(9277): 221-29.
15. Srikantha S, Ganda OP, Jackson RA, et al. Type 1 Diabetes Mellitus in monozygotic twins: chronic progressive beta cell dysfunction. Ann Intern Med 1983; 99(3): 320-26.
16. Moordian AD, Morley JE. Micronutrient status in Diabetes Mellitus. Am J Clin Nutr 1987; 45(5): 887-995.
17. Teziç T. Ulusal Diyabet programı çocuk ve adölesan çağı diyabet grubu. Çocukluk ve adölesan çağı tip I Diyabet Mellitus, 1997; 1-89.

18. Ujihara N, Daw K, Gianani R, et al. Identifications of glutamic acid decarboxylase autoantibody heterogeneity and epitope regions in type 1 Diabetes. Diabetes 1994; 43(8): 968-75.
19. Yılmaz MT. Tip 1 Diyabetes Mellitus. In: Büyüköztürk K (ed). İç Hastalıkları İstanbul Tıp Fakültesi. İstanbul; Nobel Tıp Kitabevleri, 2007; ss: 489-501.
20. Tamborlane WV, Sikes KA, Swan K, Weinzimer SA. Type 1 diabetes in children. In: Harold E, Lebovitz MD (eds). Therapy for Diabetes Mellitus and related disorders. United States of America; American Diabetes Association, 2009; pp: 86-97.
21. Hatemi H. Diyabetes Mellitus'un tarihçesi. Aktüel Tıp Dergisi 1996; 7: 497-99.
22. Güler Ö, Teker Z. Tip I diyabetli hastalarda ve diyabetik olmayan kardeşlerinde serum leptin düzeyinin kan glikozu, HbA1c, C-peptid ve diğer parametrelerle ilişkisi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık tezi. Adana 2001.
23. Foster DW, McGarry JD. The metabolic dearrangements and treatment of diabetic ketoacidosis. N Eng J Med 1983; 309(3): 159-69.
24. Sperling MA, Weinzimer SA, Tamborlane WV. Diabetes Mellitus. In: Sperling MA (ed). Pediatric Endocrinology (3rd ed). Philadelphia; Saunders Company, 2008; pp: 374-421.
25. Hagopian WA, Michelsen B, Karlsen AE, et al. Autoantibodies in IDDM primarily recognize the 65000 – M(r) rather than 67000 – M(r) isoform of glutamic acid decarboxylase. Diabetes 1993; 42(4): 631-36.

26. Aleksanyan V, Abaoğlu C. Teşhiste Temel Bilgi (2.baskı). Filiz Kitabevi, İstanbul, 1982.
27. Altan N, Dinçel A, Koca C. Diabetes Mellitus ve oksidatif stres. Türk Biyokimya Dergisi 2006; 31(2): 51-6.
28. Uysal S, Akyol S, Hasgül R, et al. Çok yönlü bir enzim: Paraoksonaz. Yeni Tıp Dergisi 2011; 28(3): 136-41.
29. Mazur A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus-fluorine bond of alkyl fluorophosphates. J Biol Chem 1946;164: 271-89.
30. Aldridge WN. Serum Esterases. II. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera. Biochem J 1953; 53: 117-24.
31. Aldridge WN. Serum esterases. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. Biochem J 1953; 53: 110-7.
32. Uriel J. Characterization of cholinesterase and other carboxylic esterases after electrophoresis and immunoelectrophoresis on agar. I. Application to the study of esterases of normal human serum. Ann Inst Pasteur (Paris) 1961; 101:104-19.
33. Mackness MI, Hallam SD, Peard T, et al. The separation of sheep and human serum "A"- esterase activity into the lipoprotein fraction by ultracentrifugation. Comp Biochem Physiol B 1985; 82(4): 675-7.
34. Mackness MI, Walker CH. Multiple Forms Of Sheep Serum A-Esterase Activity Associated With The High-Density Lipoprotein. Biochem J. 1988; 250: 539-45.

35. Mackness MI, Arrol S, Durrington PN. Paraonase prevents accumulation of lipoperoxides in low-density lipoprotein. *FEBS Lett* 1991; 286: 152-4.
36. Heinecke JW, Lusis AJ. Paraonase-gene polymorphisms associated with coronary heart disease: support for the oxidative damage hypothesis? *Am J Hum Genet* 1998; 62: 20-24.
37. Schmidt H, Schmidt R. PON1 polymorphism leu-Met54 is associated with carotid atherosclerosis: results of the Austrian stroke prevention study. *Stroke* 1998; 29: 2043-48.
38. Akçay F. İnsan serum Paraoksonaz enzimi (PON1) 192 GLN-ARG gen polimorfizminin belirlenmesi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi. Balıkesir 2006.
39. Başkol G, Köse K. Paraoksonaz: biyokimyasal özellikleri, fonksiyonları ve klinik önemi. *Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal)* 2004; 26(2): 75-80.
40. Deakin S, James RW. Genetic and enviromental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme Paraonase-I. *Clinical Science* 2004; 107(5): 435-47.
41. Shih DM, Xia Y-R, Wang Y-P, et al. Combined serum paraonase knockout/ apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 17527-35.
42. Humbert R, Adler DA, Distecche CM, et al. The molecular basis of the human serum paraonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993; 3(1): 73-6.
43. Adkins S, Gan KN, Mody M, et al. Molecular basis for the polymorphic forms of human serum paraonase/arylesterase: glutamine or arginine at position 191, for the respective A or B allozymes. *Am J Hum Genet* 1993; 52(3): 598-608.

44. El-Lebedy D, Kafoury M, Abd-El Haleem D, et al. Paraoxonase-1 gene Q192R and L55M polymorphisms and risk of cardiovascular disease in Egyptian patients with type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Metab Disord* 2014; 13(1): 12.
45. Mohamed Abdel-Halem Helaly, Ehab El-Said Abdel-Khalek, Hala A. Abdel-Hafez, et al. Paraoxonase1 55 and 192 gene polymorphisms in an Egyptian population with diabetic complications. *Eur J Basic Med Sci* 2013; 3(1): 9-16.
46. Zhou H, Lu CZ, Gao Y, et al. Relationships between PON1 L55M polymorphism and coronary heart diseases complicated with fasting hyperglycemia in Han populations in Guangdong. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2009; 40(1): 68-72.
47. Aubo C, Senti M, Marrugat J, et al. Risk of myocardial infarction associated with Gln/Arg 192 polymorphism in the human paraoxonase gene and Diabetes Mellitus. *European Heart Journal* 2000; 21: 33-38.

8. ÖZGEÇMİŞ

05.06.1984'de Bursa'da doğdum. İlkokulu 1990-1995 yıllarında Setbaşı İlköğretim Okulu'nda, orta ve lise eğitimimi ise 1995-2002 yıllarında Bursa Şükrü Şankaya Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2002 yılında Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne kayıt yaptırdım. 2003 yılında İstanbul Amerikan Hastanesi'nde stajyer olarak bulundum. 2008 yılında Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldum. 2008-2010 yılları arasında Ordu Gürgentepe Devlet Hastanesi ve Ordu Devlet Hastanesi'nde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2010 yılında Tıpta Uzmanlık sınavını kazanarak Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. 2012 yılında eş durumu nedeniyle Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı'na geçiş yaptım. İngilizce biliyorum. Evliyim. Bir çocuk annesiyim.

**DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK
ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR
NONINTERVENTIONAL STUDIES**

334

KARAR

Prof. Dr. Yusuf Kenan HASPOLAT, Yrd. Doç. Dr. Selahattin TEKEŞ, Arş. Gör. Dr. Pınar EMÜR, Dr. Selda ŞİMŞEK, Dr. Ruken YILDIRIM araştırmacılar tarafından planlanan "Diyabetik hastalarda paraoxanase gen polimorfizm analizi" başlıklı araştırmaya Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.

Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.

DECISION

The project titled as "Paraoxanase gene polymorphism analysis in pediatric patients with diabetes mellitus" planned Kenan HASPOLAT, Selahattin TEKEŞ, Pınar EMÜR, Selda ŞİMŞEK, Ruken YILDIRIM has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.

Oturum No (Meeting number) : Tarih (Date): 05.08.2014 Saat (Hour): 13:00-15:00

KURUL BAŞKANI (CHIEF) Prof.Dr.Aydın ECE

KURUL ÜYELERİ / MEMBERS

	ÜNVANI	ADI-SOYADI	KURUMU	BRANŞI	İMZA
1	Prof. Dr.	Aydın ECE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Çocuk Sağlığı ve Hast.	
2	Prof. Dr.	Nuriye METE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyokimya	
3	Prof. Dr.	Süleyman GÖREN	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Adli Tıp	
4	Yrd. Doç. Dr.	İlker KELLE	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Tıbbi Farmakoloji	
5	Doç.Dr.	A. Çetin TANRIKULU	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Göğüs Hast.	
6	Doç. Dr.	Abdullah BÖYÜK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Genel Cerrahi	
7	Yrd. Doç. Dr.	İsmail YILDIZ	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Biyostatistik	
8	Doç. Dr.	Uğur FIRAT	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Patoloji	
9	Yrd. Doç. Dr.	Orhan ATEŞ	Dicle Üniversitesi İlahiyat Fakültesi	Temel İslam Bilimleri	
10	Doç. Dr.	Mehmet Uğur ÇEVİK	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Nöroloji	
11	Avukat	Recep ÖTER	Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi	Avukat	

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DİYARBAKIR
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 kuruletikdiyar@gmail.com